



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Pós-graduação em Patologia Molecular

Flávia Arruda Portilho

**O USO DE NANOESFERAS DE ALBUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA E
MAGNETOHIPERTERMIA DO TUMOR DE EHRLICH**

Brasília
Julho/ 2011

Flávia Arruda Portilho

**O USO DE NANOESFERAS DE ALBUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA E
MAGNETOHIPERTERMIA DO TUMOR DE EHRLICH**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Doutor em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

Orientadora: Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Co-orientadora: Maria de Fátima Menezes de Almeida Santos

Co-orientador: Cláudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti

Brasília
Julho/ 2011

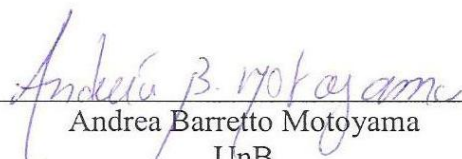
Flávia Arruda Portilho

**O USO DE NANOESFERAS DE ALBUMINA NA TERAPIA FOTODINÂMICA E
MAGNETOHIPERTERMIA DO TUMOR DE EHRlich**


Tese de doutora submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção de Título de Doutor em Patologia Molecular na área de concentração em Genética.

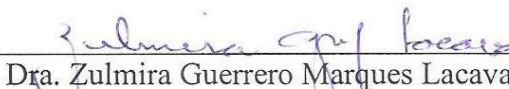
Aprovada em: 15 de julho de 2011.


Lídia Guillo
UFG


Andrea Barretto Motoyama
UnB


Rosângela Vieira de Andrade
UCB


Silene Paulino Lozzi
UnB


Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava
Departamento de Genética e Morfologia
IB - UnB
Orientadora

Brasília
Julho/ 2011

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais por terem me dado a oportunidade de realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha família e por todas as oportunidades de aprendizado nesta vida.

À professora Zulmira Lacava por mais esta oportunidade. Obrigada, Zu, pela compreensão e confiança para eu desenvolver meu trabalho. Já estou sentindo saudades!!

Ao meu querido **pai** que sempre esteve ao meu lado e é o **meu maior exemplo** de vida!!! Força pai!! Volta logo pra gente!!! Sentimos muito a sua falta e estamos orando por sua recuperação. Te amo muito.

À minha querida mãe que sempre tem uma palavra de esperança quando tudo parece perdido. Agradeço e admiro sua força, suas palavras e sua preocupação com todos nós. Obrigada por tudo. Amo você.

Às minhas pequenas, Bruna e Carolina que são a realização do meu maior sonho. Nada pra mim vale mais ou tem mais importância que o amor e a felicidade de vocês. Desculpe a ausência e, muitas vezes, a falta de paciência. Vocês são tudo pra mim, meus amores!

Às minhas lindas irmãs, Déia, Dri e Val por todo o apoio e cuidado durante toda a minha vida. Que bom que tenho esses três colos nos momentos difíceis. Amo muito cada uma de vocês!

Ao meu lindo marido peço desculpas pela ausência e agradeço pela ajuda e preocupação durante esses longos anos de doutorado. Obrigada por sua companhia nos dias de experimento à noite ou nos fins de semana na UnB. Te amo, meu bem!

Às minhas queridíssimas amigas Ana Luisa e Bélin, por toda ajuda nos dias de experimento e durante a preparação da tese. Não sei o que seria de mim sem a ajuda de vocês. Muito obrigada pelos momentos maravilhosos e inesquecíveis que passamos ao longo destes quatro anos. Trabalhamos muito, mas nos divertimos muito também. Foi ótimo. Muito obrigada por tudo.

Ao meu queridíssimo amigo (guru) Cláudio Cavalcanti por todos os ensinamentos e dedicação a este trabalho. Devo muito à você! Obrigada por toda a ajuda nos dias de experimento, pelos seus ensinamentos e sua valiosa amizade.

Aos meus colegas tão queridos, Eliza, Luciana, Adriana, Mariana Campos, Lívia, Marcella, Raphael, João Paulo, Leandro, Luis Carlos, Ingrid, Mariana, Ieler pelo apoio e prestatividade nos momentos necessários. Muito obrigada por tudo!!!

À querida professora Maria de Fátima por toda a ajuda nos momentos de sufoco e na elaboração deste trabalho. Obrigada por seus ensinamentos e paciência, Fafi.

À professora Anamélia por ser solícita sempre que precisei de seus esclarecimentos.

Ao CNPq pelo respaldo financeiro e ao Laboratório SABIN pelas análises laboratoriais imprescindíveis para a elaboração desta Tese.

Ao querido professor César pelo carinho e por sempre estar disposto a me ajudar.
Você realmente é muito especial pra mim! Muito obrigada por tudo!

RESUMO

O aumento crescente da incidência de câncer e a necessidade de se desenvolver terapias mais eficazes com o mínimo de efeitos adversos têm suscitado a busca de tratamentos alternativos. Entre estes, duas terapias promissoras são a magnetohipertermia (MHT) e a terapia fotodinâmica (TFD), as quais podem proporcionar ainda maior eficácia se realizadas com materiais nanoestruturados. O presente trabalho teve o objetivo de, utilizando modelos de tumor sólido de Ehrlich, verificar a atividade antitumoral de duas amostras à base de nanoesferas de albumina: (1) amostra contendo nanopartículas magnéticas à base de maghemita (PAM) usadas na concentração de $1,2 \times 10^{15}$ partículas magnéticas/mL foi testada para MHT de tumores localizados na cabeça após administração de $5,5 \times 10^4$ células tumorais e (2) amostra contendo 0,5 mM zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAF) para TFD na orelha após administração de $2,75 \times 10^4$ células tumorais. PAM e PAF foram usadas, respectivamente, em diferentes protocolos de MHT e TFD. MHT foi feita com equipamento operando a 1 MHz e 40 Oe de amplitude de campo e foram realizadas análises histológicas do tumor para verificar o grau de necrose. As análises mostraram que dois dos animais submetidos à MHT duas vezes ao dia, durante três dias consecutivos, apresentaram 100% de necrose e ausência de proliferação celular. Para a realização da TFD foi usado luz laser com comprimento de onda de 670 nm e animais distribuídos em três grupos experimentais. A avaliação dos procedimentos foi feita por observações clínicas (peso do animal, peso e volume do tumor), testes hematológicos e bioquímicos, análise morfológica, tanto do fígado, quanto dos rins para avaliar possíveis alterações teciduais, e análises morfométricas do tumor para avaliar o grau de necrose obtido. Para validar os experimentos de TFD, grupos tratados com o quimioterápico doxorrubicina (Dox) foram investigados. Os resultados mostraram que a TFD, quando realizada de três em três dias durante nove dias experimentais induziu necrose equiparável ao do tratamento com Dox, com menos efeitos adversos, sobretudo no fígado; Já os tratamentos combinados com TFD e Dox não apresentaram efeitos sinérgico ou antagônico. Em geral, os melhores protocolos de MHT e TFD levaram a pelo menos 60% de necrose. Conclui-se que as nanoesferas de albumina, além de altamente biocompatíveis, representam material nanoestruturado eficaz na realização da MHT e TFD que, embora nem sempre tenham causado a remissão total do tumor, revelaram significativa atividade antiproliferativa, apresentando alto potencial para tratamento do câncer.

Palavras-chave: Magnetohipertermia, terapia fotodinâmica, nanopartículas magnéticas, tumor de Ehrlich, nanoesferas de albumina.

ABSTRACT

The increasing incidence of cancer and the need to develop more effective therapies with minimal collateral effects have prompted the search for alternative treatments. Among these, two promising therapies are magnetohyperthermia (MHT) and photodynamic therapy (PDT), which can be even more efficient if performed with nanostructured materials. The present work was aimed to investigate the antitumor activity of two samples based on albumin nanospheres: one containing magnetic nanoparticles (PAM) and another containing zinc-phthalocyanine tetrasulfonated (PAF) while using the model of Ehrlich solid tumor (head for MHT and ear for PDT). PAM and PAF were used in different protocols of MHT and PDT, respectively. MHT was performed with the equipment operating at 1 MHz and 40 Oe, while PDT have used light source at 670nm. The evaluation of both procedures was made by clinical observations (weight of animal, weight, volume, and size of tumor), cytometry, haematological, and biochemical tests, and morphological analysis of the liver and kidney tissue to evaluate possible changes, and also morphology of tumor to assess the degree of necrosis induced. Two animals submitted to MHT showed 100% necrosis. In general, the best protocols of MHT and PDT led to at least 60% necrosis. To validate the PDT experiments, groups treated with the chemotherapeutic agent doxorubicin (Dox) were investigated. PDT and Dox induced comparable necrosis. PDT showed fewer side effects than Dox. PDT and Dox showed no synergistic or antagonistic effect. We conclude that the highly biocompatible albumin nanospheres represent nanostructured material efficient in performing the MHT and PDT procedures. Though they not caused total remission of the tumor, they showed significant antiproliferative activity evidencing a high potential for cancer treatment.

Keywords: Magnetohyperthermia, photodynamic therapy, magnetic nanoparticles, Ehrlich tumor, albumin nanospheres.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Manutenção do tumor de Ehrlich..... | 31 |
| Figura 2: Camundongos da linhagem Swiss portando tumor de Ehrlich..... | 33 |
| Figura 3: Camundongos fêmeas da linhagem Swiss..... | 35 |
| Figura 4: Cronograma experimental da MHT..... | 37 |
| Figura 5: Camundongo inoculado com PAM na região da cabeça, recebendo o campo eletromagnético de frequência alternada para a realização da magnetohipertermia..... | 38 |
| Figura 6: Cronograma experimental da TFD..... | 42 |
| Figura 7: camundongo recebendo aplicação de células tumorais de Ehrlich na região da orelha..... | 42 |
| Figura 8: Camundongo inoculado com PAF na região da orelha, recebendo o laser para a realização da terapia fotodinâmica..... | 43 |
| Figura 9: Fotomicrografia da amostra PAM..... | 48 |
| Figura 10: Histograma do diâmetro médio das nanoesferas de albumina magnéticas (PAM) obtidos por MET..... | 49 |
| Figura 11: Fotomicrografia eletrônica de varredura das nanoesferas de albumina associadas à zinco-fitalocianinas presentes na amostra PAF..... | 50 |
| Figura12: intensidade de fluorescência da amostra PAF..... | 50 |
| Figura 13: Fotomicrografias do tumor de Ehrlich transplantado em subcutâneo de camundongo..... | 52 |
| Figura 14: Descrição do método de quantificação das áreas com necrose de cortes histológicos de tecido tumoral..... | 53 |
| Figura 15: Peso dos animais no 9º dia experimental..... | 56 |
| Figura 16: Avaliação do volume (mm ³) e do peso (mg) tumoral..... | 57 |
| Figura 17: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral..... | 59 |
| Figura 18: Animais com diferentes graus de necrose (Grupo A)..... | 61 |
| Figura 19: Avaliação da necrose no tecido tumoral..... | 62 |
| Figura 20: Contagem de leucócitos totais do sangue periférico..... | 63 |
| Figura 21: Contagem de glóbulos brancos do sangue periférico..... | 64 |
| Figura 22: Fotomicrografia do rim..... | 71 |
| Figura 23: Fotomiografia do fígado..... | 72 |
| Figura 24: Peso dos animais no 15º dia experimental..... | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 25: Avaliação do volume (mm ³) e do peso (mg) tumoral..... | 75 |
| Figura 26: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral..... | 76 |
| Figura 27: Animais com diferentes graus de necrose (Grupo B)..... | 77 |
| Figura 28: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral..... | 78 |
| Figura 29: Contagem de leucócitos totais do sangue periférico..... | 79 |
| Figura 30: Contagem de de glóbulos brancos do sangue periférico..... | 80 |
| Figura 31: Peso dos animais no 15° dia experimental..... | 87 |
| Figura 32: Avaliação do volume (mm ³) e peso (mg) tumoral..... | 88 |
| Figura 33: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral..... | 89 |
| Figura 34: Animais com diferentes graus de necrose (Grupo C)..... | 90 |
| Figura 35: Avaliação da necrose no tecido tumoral..... | 91 |
| Figura 36: Contagem de leucócitos totais do sangue periférico..... | 92 |
| Figura 37: Contagem de de glóbulos brancos do sangue periférico..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Grupos e subgrupos experimentais dos animais tratados com TFD, com n=8 para cada subgrupo..... | 41 |
| Tabela 2: Métodos usados para avaliação dos efeitos de PAF no tratamento do tumor de Ehrlich pela TFD..... | 45 |
| Tabela 3: Efeitos da magnetohipertermia realizada com a amostra PAM sobre a necrose tumoral..... | 55 |
| Tabela 4: Grupo A- resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 66 |
| Tabela 5: Grupo A- resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 68 |
| Tabela 6: Grupo A- resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 70 |
| Tabela 7: Grupo B- resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 82 |
| Tabela 8: Grupo B- resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 83 |
| Tabela 9: Grupo B- resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 85 |
| Tabela 10: Grupo C- resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 94 |
| Tabela 11: Grupo C- resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 95 |
| Tabela 12: Grupo C- resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich..... | 96 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| AC | Campo magnético de frequência alternada |
| ALT (ou TGP) | Alanina aminotransferase (ou transaminase glutâmico pirúvica) |
| AST (ou TGO) | Aspartato aminotransferase (ou transaminase glutâmico oxalacética) |
| CHCM | Concentração hemoglobínica corpuscular média |
| dL | Decilitros |
| EDTA | Ácido etilediaminotetracético |
| EPM | Erro padrão da média |
| fl | Fentolitros |
| g | Gramas |
| g/dL | Gramas por decilitro |
| GGT | Gama glutamiltransferase |
| h | Hora |
| HCM | Hemoglobina corpuscular média |
| HCT | Hematócrito |
| HGB | Hemoglobina |
| Kg | Quilograma |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| mg | Miligrama |
| mg/dL | Miligramas pó decilitro |
| MHT | Magnetohipertermia |
| MHz | Mega-hertz |
| µL | Microlitro |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| nm | Nanômetro |
| NPM | Nanopartículas magnéticas |
| Oe | Orsted |
| PAF | Nanoesferas de albumina associadas a zinco- ftalocianina |
| PAM | Nanoesferas de albumina magnéticos |
| pH | Potencial de hidrogênio |

| | |
|--------------|--|
| pg | Picograma |
| P-LCR | Porcentagem de plaquetas gigantes (do inglês <i>Platelet large cell ratio</i>) |
| PDW | Amplitude da distribuição do tamanho de Plaquetas (do inglês <i>Platelet Distribution Width</i>) |
| RDW | Amplitude ou variação da distribuição do tamanho do eritrócito (do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>) |
| TFD | Terapia fotodinâmica |
| TGO (ou AST) | Transaminase glutâmico oxalacética (ou aspartato aminotransferase) |
| TGP (ou ALT) | Transaminase glutâmico pirúvica (ou alanina aminotransferase) |
| U/L | Unidades por litro |
| VCM | Volume corpuscular médio |
| VPM | Volume plaquetário médio |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | Materiais Nanoestruturados | 19 |
| 1.2 | Magnetohipertermia..... | 20 |
| 1.3 | Terapia Fotodinâmica | 24 |
| 1.3.1 | Fotossensibilizantes | 26 |
| 1.3.2 | Fontes de Luz utilizadas na Terapia Fotodinâmica | 27 |
| 1.4 | Justificativa | 28 |
| 1.5 | Objetivo Geral..... | 29 |
| 1.5.1 | Objetivos específicos..... | 29 |
| 2 | MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 2.1 | Delineamento experimental | 30 |
| 2.2 | ETAPA I - Desenvolvimento do modelo tumoral - Local de aplicação das células tumorais | 30 |
| 2.2.1 | Manutenção do tumor de Ehrlich | 30 |
| 2.2.2 | Local de aplicação das células tumorais..... | 31 |
| 2.3 | ETAPA II - Investigação da Magnetohipertermia (MHT)..... | 33 |
| 2.3.1 | Amostra | 33 |
| 2.3.2 | Caracterização da amostra PAM por Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 34 |
| 2.3.3 | Equipamento eletromagnético | 34 |
| 2.3.4 | Animais..... | 34 |
| 2.3.5 | Anestésicos | 35 |
| 2.3.6 | Grupos experimentais para tratamento com a MHT | 36 |
| 2.3.7 | Tratamento com amostra nanoesferas de albumina magnéticos (PAM) | 37 |
| 2.3.8 | Exposição ao campo AC..... | 37 |
| 2.3.9 | Análise histológica dos tumores após tratamento com MHT | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.4 | ETAPA III - Investigação da Terapia Fotodinâmica | 38 |
| 2.4.1 | Amostra | 39 |
| 2.4.2 | Caracterização da amostra PAF por Microscopia Eletrônica de Transmissão | 39 |
| 2.4.3 | Equipamento – Luz laser | 39 |
| 2.4.4 | Animais..... | 39 |
| 2.4.5 | Anestésicos | 39 |
| 2.4.6 | Grupos experimentais para tratamento com a TFD..... | 39 |
| 2.4.7 | Tratamento com amostra nanoesferas de albumina contendo zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAM)..... | 42 |
| 2.4.8 | Tratamento com Quimioterápico Doxorrubicina | 43 |
| 2.4.9 | Exposição ao Laser | 43 |
| 2.4.10 | Observações clínicas dos animais tratados com TFD | 44 |
| 2.4.11 | Ensaio hematológicos e bioquímicos após tratamento com TFD | 46 |
| 2.4.12 | Observações clínicas dos tumores e análise histológica após tratamento com TFD | 46 |
| 2.4.13 | Análise estatística para os animais tratados com TFD | 47 |
| 3 | RESULTADOS | 48 |
| 3.1 | Caracterização das amostras | 48 |
| 3.1.1 | Determinação do diâmetro da amostra PAM (nanoesferas de albumina magnéticas) .. | 48 |
| 3.1.2 | Determinação do diâmetro da amostra PAF (nanoesferas de albumina associadas a zinco-ftalocianina tetrassulfonada)..... | 49 |
| 3.2 | Tumor de Ehrlich | 51 |
| 3.3 | Resultados da MHT | 53 |
| 3.4 | Resultados da terapia fotodinâmica do grupo A | 55 |
| 3.4.1 | Observações clínicas..... | 56 |
| 3.4.1.1 | Peso dos animais..... | 56 |
| 3.4.1.2 | Volume e peso dos tumores..... | 57 |
| 3.4.1.3 | Dimensões dos tumores | 58 |
| 3.4.1.4 | Observações macroscópicas | 59 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.4.2 | Porcentagem de necrose do tumor..... | 61 |
| 3.4.3 | Análises Hematológicas | 62 |
| 3.4.3.1 | Contagem de Leucócitos totais..... | 63 |
| 3.4.3.2 | Análises Citométricas | 64 |
| 3.4.4 | Plaquetas..... | 67 |
| 3.4.5 | Análises Bioquímicas | 69 |
| 3.4.6 | Análises histológicas | 71 |
| 3.4.6.1 | Rim | 71 |
| 3.4.6.2 | Fígado | 72 |
| 3.5 | Resultados da terapia fotodinâmica do grupo B..... | 73 |
| 3.5.1 | Observações clínicas..... | 73 |
| 3.5.1.1 | Peso dos animais..... | 73 |
| 3.5.1.2 | Volume e peso dos tumores..... | 74 |
| 3.5.1.3 | Dimensões dos tumores | 75 |
| 3.5.1.4 | Observações macroscópicas | 76 |
| 3.5.2 | Porcentagem de necrose do tumor..... | 77 |
| 3.5.3 | Análises Hematológicas | 78 |
| 3.5.3.1 | Contagem de Leucócitos totais..... | 78 |
| 3.5.3.2 | Análises Citométricas | 79 |
| 3.5.4 | Plaquetas..... | 83 |
| 3.5.5 | Análises Bioquímicas | 83 |
| 3.5.6 | Análises histológicas | 86 |
| 3.5.6.1 | Rim | 86 |
| 3.5.6.2 | Fígado | 86 |
| 3.6 | Resultados da terapia fotodinâmica do grupo C | 86 |
| 3.6.1 | Observações clínicas..... | 86 |
| 3.6.1.1 | Peso dos animais..... | 86 |

| | | |
|---------|--|------------|
| 3.6.1.2 | Volume e peso dos tumores..... | 87 |
| 3.6.1.3 | Dimensões dos tumores..... | 88 |
| 3.6.1.4 | Observações macroscópicas..... | 89 |
| 3.6.2 | Porcentagem de necrose do tumor..... | 90 |
| 3.6.3 | Análises Hematológicas..... | 91 |
| 3.6.3.1 | Contagem de Leucócitos totais..... | 91 |
| 3.6.3.2 | Análises Citométricas..... | 92 |
| 3.6.4 | Plaquetas..... | 95 |
| 3.6.5 | Análises Bioquímicas..... | 95 |
| 3.6.6 | Análises histológicas..... | 97 |
| 3.6.6.1 | Rim..... | 97 |
| 3.6.6.2 | Fígado..... | 97 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 98 |
| 4.1 | Considerações sobre o tumor de Ehrlich..... | 98 |
| 4.2 | Considerações sobre a amostra PAM e magnetohipertermia..... | 99 |
| 4.3 | Considerações sobre a amostra PAF e a terapia fotodinâmica..... | 102 |
| 4.4 | Considerações sobre os testes biológicos..... | 103 |
| 4.4.1 | Testes hematológicos..... | 103 |
| 4.4.2 | Testes bioquímicos..... | 106 |
| 4.5 | Considerações sobre o tumor: volume, peso..... | 110 |
| 4.6 | Considerações sobre as observações macroscópicas e as morfométricas..... | 110 |
| 4.7 | Considerações sobre o tratamento com doxorrubicina..... | 111 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 112 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 113 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui um dos principais problemas mundiais de saúde e de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, INCA, uma das causas mais importantes de morbidade e de mortalidade em crianças e adultos (INCA, 2007). O nome câncer é dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum a proliferação celular desenfreada associada à capacidade de invasão e destruição tecidual (RUDDON, 2007). O processo da carcinogênese, ou seja, de formação de câncer ocorre, em geral, de forma lenta, podendo levar vários anos para que uma célula neoplásica prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por três estágios antes de chegar ao tumor: iniciação, promoção e progressão. Durante a iniciação, o primeiro estágio, as células sofrem o efeito dos fatores carcinogênicos que provocam modificações em alguns de seus genes, ficando, desta forma, suscetíveis à ação de um segundo grupo de fatores que atuará no segundo estágio, a promoção. Neste, as células iniciadas são transformadas em células malignas se em longo e continuado contato com o fator cancerígeno promotor. Na progressão, terceiro e último estágio da carcinogênese, ocorre proliferação descontrolada e irreversível das células alteradas, que resulta no surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (WEINBERG, 2008). A carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos, os quais induzem alterações mutagênicas ou epigenéticas nas células. Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são diversos, destacando-se a ação de: (i) substâncias químicas; (ii) fatores biológicos e físicos; (iii) fatores epigenéticos e (iv) predisposição hereditária (SOARES, 1993; WEINBERG, 2008).

Alguns procedimentos têm sido adotados no tratamento ao câncer, sendo os mais comuns a cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Resumidamente, a cirurgia baseia-se na remoção do tecido doente, desde que o mesmo se encontre em regiões passíveis de serem submetidas ao processo (RANG *et al.*, 2004). O processo cirúrgico pode, muitas vezes, levar a lesões de tecidos e órgãos. A radioterapia, por sua vez, emprega um feixe de radiação ionizante para destruir células tumorais. É utilizada quando o tecido doente está localizado em regiões que não possibilitam a intervenção cirúrgica ou quando ocorre reincidência após cirurgia. A resposta à radiação depende de fatores como tempo de irradiação, a sensibilidade do tumor ao tratamento e a sua localização (MARKS; MOHIUDDIN; EITAN, 1991; MACHADO, 2000; RANG *et al.*, 2004). Esta terapia, via de regra, além dos tumorais, afeta

também os tecidos normais. Já a quimioterapia antineoplásica, um outro procedimento adotado no combate ao câncer, faz uso de substâncias químicas que afetam a função e a proliferação celular, tanto de células normais, quanto das cancerígenas (CHUNFU *et al.*, 2004). Embora esses procedimentos apresentem significativa importância no aumento da sobrevivência dos pacientes, podem ser ineficazes quando se considera a cura completa, apresentando desvantagens como efeitos adversos indesejáveis e, muitas vezes, deficiência na resposta terapêutica (MANTHE *et al.*, 2010). Em muitos casos há necessidade de combinar essas terapias para um resultado mais eficaz.

Diante do exposto, há uma incessante necessidade de se buscar fármacos eficientes que apresentem baixa toxicidade às células não tumorais e, conseqüentemente, causem o mínimo de efeitos adversos para o paciente (MELO; PIMENTA, 2004) e métodos alternativos que tenham maior especificidade para os tecidos neoplásicos. Este tem sido um importante foco de estudos científicos nas últimas décadas, dentre os quais se incluem a magnetohipertermia e a terapia fotodinâmica (LACAVA *et al.*, 2000; MACHADO, 2000), especialmente quando empregam materiais nanoestruturados.

1.1 Materiais Nanoestruturados

A ideia de manipulação de átomos e/ou moléculas individuais em escala nanométrica – a nanomanipulação – se propagou e ganhou consistência a partir de uma palestra intitulada “There’s plenty of room at the bottom” (“Há muito espaço lá embaixo”) proferida em 1959, pelo físico Richard Feynman, um dos mais renomados cientistas do século XX e ganhador de dois prêmios Nobel. Entretanto, a análise de estruturas em escala nanométrica (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006), se tornou factível apenas nos anos 80 devido à invenção do microscópio de tunelamento e do microscópio de força atômica (AFM), os quais permitiram o desenvolvimento da Nanociência e da Nanotecnologia. Devido às suas inúmeras aplicações nas mais variadas áreas, o emprego dos materiais nanoestruturados apresenta, atualmente, interesse crescente (FILHO, 2006).

Os materiais nanoestruturados são caracterizados por dimensões nanométricas (1 nm = um bilionésimo do metro). Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades térmicas, ópticas, magnéticas e elétricas, como tolerância à temperatura, variedade de cores e alterações da reatividade química, propriedades estas não observadas

quando os mesmos materiais estão nas escalas micro ou macroscópica (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Uma das principais características dos nanomateriais é sua grande área de superfície, quando comparados aos materiais macroscópicos (BERRY; CURTIS, 2003; KIM; RUTKA; CHAN, 2010). Essa peculiaridade pode ser apontada como uma de suas grandes vantagens, uma vez que os torna muito mais reativos, possibilitando inúmeras aplicações, tanto de diagnóstico quanto terapêuticas (LIU; WEBSTER, 2007). Exemplos de nanomateriais com uso potencial nas aplicações biomédicas incluem lipossomas, nanocápsulas, nanotubos de carbono, fulerenos, dendrímeros e nanopartículas as mais variadas, inclusive as magnéticas (KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

Na Nanobiotecnologia e, em particular, na Nanomedicina, os nanomateriais têm sido empregados, com sucesso, como sistemas de entrega e liberação controlada de fármacos, com grandes vantagens sobre os sistemas convencionais, pois permitem maior especificidade, seletividade e eficácia, ao mesmo tempo em que geram menos efeitos adversos (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). No desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento do câncer, os nanomateriais têm proporcionado avanços importantes na magnetohipertermia (MHT) e na terapia fotodinâmica (TFD).

1.2 Magnetohipertermia

Hipertermia é uma modalidade terapêutica empregada para proporcionar aumento de temperatura em uma determinada região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar lise de suas células tumorais (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). O conceito da utilização do calor para tratar o câncer não é novo. Já no final de 1800 os médicos usavam o calor para o tratamento do câncer. Certamente não houve ensaios clínicos randomizados para descrever o tratamento hipertérmico do câncer, mas muitos relatos descrevem pacientes curados de sua doença após passar por estado febril ou aquecimento externo de tumores superficiais (CHERUKURI; GLAZER; CURLEY, 2010).

O aumento da temperatura corporal (hipertermia), em parte ou em todo organismo, pode ser causado por fatores externos – exposição ao sol ou regiões de temperatura elevada – ou por fatores internos – reações do organismo. Proporcionando um aumento de temperatura significativo, entre 5 a 8°C devido a perda de histerese, a hipertermia tem-se mostrado promissora como terapia contra o câncer (ITO *et al.*, 2003; VASSEURA *et al.*, 2006),

especialmente quando utilizada para intensificar a eficácia da quimioterapia e da radioterapia (ZEE *et al.*, 2000). A combinação da energia térmica com a quimioterapia oferece vantagens sobre a quimioterapia administrada isoladamente. Por exemplo, a captura de drogas por células malignas e sua distribuição intracelular são melhoradas pelo aumento da permeabilidade celular. Também ocorre aumento do metabolismo de drogas e reação com DNA e, ainda, o reparo do DNA é inibido (GOFRIT *et al.*, 2004). Estudos pré-clínicos mostraram aumento da citotoxicidade de derivados de platina e que a hipertermia pode superar a resistência que as drogas adquirem. Van der Zee *et al.* mostraram, em ensaios clínicos de fase III para tratar carcinoma cervical inicial, benefícios de sobrevivência para tratamentos de hipertermia e radioterapia em comparação a radioterapia isoladamente (RICHEL *et al.*, 2004).

Tal fato poderia ser explicado, pelo menos em parte, porque as células tumorais são relativamente resistentes à radiação, mas sensíveis ao aumento de temperatura (VASANTHAN *et al.*, 2005) devido à desorganização angiogênica da massa tumoral que não possibilita a dissipação do calor (JORDAN *et al.*, 1999). Assim, a hipertermia representa um fator eficaz para a destruição celular, especialmente para células em hipóxia, as necessitadas de nutrientes e as que estejam em ambiente de baixo pH, características comumente presentes em tumores malignos (AKTAS *et al.*, 2006). Vale ressaltar que numerosas aplicações clínicas com aquecimento de tecido têm sido identificadas, incluindo redução da dor ou inflamação, cicatrização de feridas, preservação de órgãos e cirurgia térmica (STAUFFER, 2005).

A hipertermia pode ser alcançada, entre outros métodos por aplicação de laser, microondas, radiofrequência, agulhas ferromagnéticas (YANASE *et al.*, 1998) ou administração de substâncias pirogênicas (BLASIAK; WIDERA; PERTYŃSKI, 2003). Embora essas técnicas possam ser eficazes no aumento de temperatura, podem apresentar efeitos adversos indesejados, pela incapacidade de promover aquecimento uniforme por toda a região tumoral, além de atingirem também tecidos saudáveis (SHINKAI *et al.*, 1999; SUZUKI *et al.*, 1999).

Esta dificuldade pode, entretanto, ser superada quando o aumento de temperatura é induzido com o uso de nanopartículas magnéticas (NPM). O uso das nanopartículas magnéticas (monodomínios magnéticos) é preferível às micropartículas (multidomínios magnéticos) porque as nanopartículas magnéticas respondem mais eficientemente a campos de frequência alternada aplicados externamente (LACAVA; MORAIS, 2004) onde transformam a energia absorvida em calor por meio de diversos mecanismos físicos (NEILSEN, HORSMAN; OVERGAARD, 2001; MA *et al.*, 2004), sendo, portanto, capazes

de induzir aquecimento sítio-específico em uma área desejada (CHATTERJEE *et al.*, 2005). Uma vez no tumor as NPM são endocitadas pelas células neoplásicas ou estão associadas à sua membrana e o aumento da temperatura induzirá as células à destruição, enquanto a maioria do tecido normal circunvizinho permanece ileso (BACRI *et al.*, 1997; WUST *et al.*, 2002).

O aquecimento sítio-específico pode ser atingido de várias maneiras: (i) frequência e amplitude de campo; (ii) características das NPM: composição, diâmetro e susceptibilidade magnética (BRUSENTOV, 2004); (iii) uso de nanopartículas magnéticas (NPM) biocompatíveis associadas a moléculas que as conduzam especificamente para as células tumorais, como receptores ou anticorpos monoclonais que reconheçam proteínas da membrana de células neoplásicas; (iv) uso de campo magnético estático na região tumoral ou (v) pela injeção intratumoral das NPM (YANASE *et al.*, 1998).

Relatos da literatura têm mostrado que o uso de NPM para a hipertermia magnética, ou magnetohipertermia, MHT, pode representar uma terapia eficiente contra o câncer (RAU *et al.*, 2000; VAN DER ZEE *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2005). Uma análise crítica mostra que nanopartículas magnéticas devem ser ferramentas adequadas para eliminação minimamente invasiva de tumores de mama. Neste processo é explorado o fato das NPM absorverem a energia de um campo eletromagnético alternado e a convertem em calor. O aquecimento induzido é utilizado para eliminar o tumor, de preferência, sem a necessidade de procedimento cirúrgico. Esta abordagem está em acordo com a atual tendência para tratamentos menos invasivos, reduzindo a quantidade de tecido removido, particularmente durante o tratamento de tumores pequenos de mama (HILGER, 2005). Ito *et al.*, (2003) obtiveram a completa regressão de um carcinoma mamário de camundongo maior que 15 mm por meio de exposições repetidas a um campo magnético.

Muitos são os tipos de materiais magnéticos que podem ser usados para gerar e dissipar calor; entre eles, destacam-se as partículas superparamagnéticas (GUPTA; GUPTA, 2005).

1.2.1 Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPM) constituem uma classe particularmente interessante de material nanoestruturado. Ao serem dispersas em um líquido, suas propriedades magnéticas serão partilhadas por todo o líquido, permitindo que o mesmo seja

conduzido para um alvo desejado por um gradiente de campo magnético. Respondem a um campo magnético de frequência alternada (AC) por dissipação de calor. Além dessa aplicação na MHT, as nanopartículas magnéticas podem ser usados em imagens de ressonância magnética nuclear, onde as nanopartículas potencializam contraste da imagem e quando associadas a anticorpos monoclonais, possibilitam a detecção precoce de micrometástases; podem também funcionar como sistema de entrega de drogas, onde as nanopartículas magnéticas transportam substâncias que serão entregues diretamente no tecido doente, passando pelo sistema vascular sem provocar embolia dos vasos (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; WANG *et al.*, 2009;) direcionamento este que pode ser feito, por exemplo, com o auxílio de um campo magnético externo.

Devido a estas propriedades e às suas dimensões comparáveis às dos vírus (20-500 nm), proteínas (5-50 nm) ou até mesmo de um gene (2 nm) (TARTAJ *et al.*, 2005), oferecem muitas possibilidades atrativas em biotecnologia. Uma delas, a de que quando administradas a um ser vivo, se movimentam mais facilmente no interior e através dos tumores. De forma geral, nanopartículas magnéticas menores que 10 nm são rapidamente eliminadas pelos rins. Porém partículas com diâmetro na faixa de 10 nm a 100 nm são consideradas ideais para as aplicações biomédicas (WANG *et al.*, 2009), pois suas dimensões são compatíveis com sistemas biológicos (KIM; RUTKA; CHAN, 2010), apresentando aspectos favoráveis à biodistribuição, além de responderem adequadamente a campos magnéticos.

As NPM podem ser sintetizadas a partir de diferentes tipos de ferrita ($M^{+2}Fe_2O_4$, onde M^{+2} simboliza um metal), tais como ferrita de cobalto, manganês ou zinco (BARBOSA, 2008). Porém, para aplicações biomédicas, as NPM mais utilizadas são as compostas por um núcleo de ferro que pode ser de magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) (BERRY; CURTIS, 2003; GUPTA; GUPTA, 2005). Nestas aplicações, as NPM precisam ainda ser biodegradáveis, hemocompatíveis e não tóxicas, características que podem ser atingidas por seu recobrimento/ funcionalização com moléculas como proteínas, íons, nucleotídeos, antibióticos, vitaminas ou anticorpos, evitando, assim, seu reconhecimento pelo sistema mononuclear fagocitário.

Nosso grupo de pesquisa tem investigado a biocompatibilidade de muitas amostras magnéticas com o intuito de futuras aplicações biomédicas, especialmente para o uso na MHT. Essas amostras magnéticas podem ter naturezas químicas diferentes: magnetita (GARCIA, 2002; FREITAS, 2002; CHAVES, 2002; LACAVA, 2002; BARBOSA, 2004; SADEGHIANI, 2004), ferrita de cobalto (KÜCKELHAUS, 2003; BARBOSA, 2008) e maghemita (PORTILHO- CORRÊA, 2007; BRUGIN, 2007; ESTEVANATTO, 2008;

SALDANHA, 2008), coberturas ou tamanhos distintos. Muitas destas amostras eram obtidas na forma de fluidos magnéticos (GARCIA, 2002; FREITAS, 2002; CHAVES, 2002; LACAVAL, 2002; BARBOSA, 2004; SADEGHIANI, 2004), outras na forma de magnetolipossomas, por meio do encapsulamento das nanopartículas magnéticas em lipossomas (KÜCKELHAUS, 2003; BARBOSA, 2008), outras ainda na forma de polímeros (ESTEVANATO, 2008; SALDANHA, 2008). Estes estudos possibilitaram o desenvolvimento de amostra magnéticas cada vez mais biocompatíveis e apropriadas para aplicações na MHT.

Nesse sentido, nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), encapsuladas em polímeros de albumina (PAM) seriam interessantes, pois além de apresentarem alta susceptibilidade magnética são também altamente biocompatíveis e, por conseguinte, com grande potencial para aplicações biomédicas, seja como sistema entregador de fármacos ou no processo de magnetohipertermia, procedimentos promissores na terapia do câncer (SALDANHA, 2007). Vale lembrar que, a albumina é a proteína plasmática mais abundante e tem como função fisiológica o controle da pressão osmótica do sangue e o transporte, metabolismo e a distribuição de várias substâncias endógenas, tais como: hormônios, aminoácidos, ácidos graxos, íons metálicos e drogas (HE; CARTER, 1992).

1.3 Terapia Fotodinâmica

No que concerne ao outro método alternativo citado, a Terapia Fotodinâmica – TFD – vem sendo utilizada no tratamento de doenças desde a antiguidade (KENDALL; MORTON, 2003). Um dos primeiros experimentos de terapia fotodinâmica descrito data de 1900, quando Oscar Raab descreveu a ação de corantes acridina associada à luz solar sobre *Paramecium Caudatum*, demonstrando morte deste organismo unicelular sob essas condições (RAAB, 1900 apud Sibata *et al.*, 2000). Já Von Tappeiner, em 1903, utilizou a aplicação tópica do corante eosina juntamente com exposição à luz, para o tratamento de câncer de pele (SIMPLICIO, 2002). Na década de 50, estudos como os de Dougherty mostraram que uma hematoporfirina quando irradiada com a luz vermelha poderia erradicar tumores mamários de camundongos (TRIESSCHEIJN *et al.*, 2006). Em 1985, Hayata e colaboradores trataram um carcinoma gástrico utilizando luz laser (PAVANI, 2006). A partir desta época, foram desenvolvidos equipamentos de luz laser acoplados a fibra óptica que permitem o acesso da luz por via endoscópica a inúmeras regiões do corpo humano.

A TFD consiste na irradiação de uma substância, fotossensível, com luz em comprimento de onda específico; a absorção da luz por essa substância fotossensibilizante na presença de oxigênio tripleto desencadeia processos fotoquímicos que resultam na formação de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies de oxigênio apresentam elevada reatividade pelo fato de seus átomos possuírem um número ímpar de elétrons.

Atualmente, a TFD já é utilizada em fase clínica no tratamento de diversos tipos de tumores (LI *et al.*, 2006; MANG *et al.*, 2006), em vários países (DOUGHERTY *et al.*, 1978; KALKA *et al.*, 2000; MARMUR *et al.*, 2004), inclusive no Brasil (DE ROSA *et al.*, 2000; 2003; PIERRE *et al.*, 2001a; 2001b; THURCHIELLO *et al.*, 2003). Desde 2006, nosso grupo de pesquisa implantou um Serviço de Terapia Fotodinâmica em hospital público de Brasília (HRAN- Hospital Regional da Asa Norte, Brasília, DF) onde têm sido realizados testes clínicos com TFD (KARST-PASSOS *et al.*, 2011) Além disso, a TFD também vem sendo aplicada no tratamento de patologias de caráter cardiovascular, dermatológico, oftálmico e microbiológico (SIMPLICIO *et al.*, 2002). Vale salientar que, como terapia antineoplásica, a TFD pode ser utilizada também em combinação com outras terapias convencionais.

Na terapia fotodinâmica antineoplásica, o fármaco fotossensível é administrado local, tópica ou sistemicamente ao paciente (MACHADO, 2000; SIBATA, 2000). Entretanto, essa terapia é particularmente mais eficiente no tratamento de lesões de fácil acesso, como cânceres de pele não melanoma bem delimitados e superficiais. Contudo, no tratamento de tumores internos, o fármaco fotossensibilizante deve ser administrado ao paciente por via endovenosa, com o inconveniente de o paciente não poder expor-se à luz por horas ou até mesmo por dias. Estes efeitos podem ser minimizados caso o fármaco fotossensível seja associado a uma molécula nanoestruturada, como nanopartículas magnéticas recobertas com polímeros, de maneira que o fármaco atinja mais facilmente a lesão. Assim como podem ser utilizadas na magnetohipertermia, as nanopartículas magnéticas podem, também, ser associadas a fármacos fotossensíveis e serem utilizados na TFD. Novos materiais obtidos pela associação de partículas magnéticas com um fármaco fotossensibilizante têm sido desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia da UnB. Por poderem ser aplicados endovenosamente, estes materiais podem ser conduzidos especificamente até ao tecido alvo com auxílio de um campo magnético externo ao organismo. Uma vez no alvo, o calor pode ser utilizado para liberar a droga fotossensibilizante permitindo assim que sejam utilizados simultaneamente na magnetohipertermia e na TFD.

1.3.1 Fotossensibilizantes

Os fotossensibilizantes, FS, são substâncias farmacologicamente inativas caracterizados por sua habilidade de absorver luz visível, interagindo fotoquimicamente com moléculas de oxigênio localizadas na região próxima à irradiada, gerando espécies reativas de oxigênio que ao reagir com biomoléculas podem induzir processo inflamatório, necrótico ou apoptótico (OLIVEIRA, 2006).

Entre os FS de primeira geração destacam-se as hematoporfirinas e as porfirinas muito utilizados na década de 60. O Photofrin, um preparado semi-purificado de hematoporfirina, foi o primeiro fotossensibilizante a obter aprovação para ser utilizado como coadjuvante no tratamento de vários tumores em muitos países. Apesar de essa substância possuir várias propriedades benéficas como a ausência de toxicidade sistêmica, alguns procedimentos experimentais mostraram desvantagens em sua utilização, como, por exemplo, a demora em ser excretada pelo organismo, o que leva ao seu acúmulo na pele, acarretando prolongada sensibilidade e necessidade de evitar exposição à luz por várias semanas (ORENSTEIN, 1996; MACHADO, 2000; MCDONALD; DOUGHERTY 2001). Outro fotossensibilizante de primeira geração muito utilizado na TFD de doenças cutâneas é o ácido 5-aminolevulínico, ALA. O uso tópico deste composto representa uma das técnicas mais populares de TFD em dermatologia, devido ao fato de não induzir fotossensibilidade cutânea generalizada (KALKA *et al.*, 2000; MARMUR *et al.*, 2004).

No intuito de diminuir os efeitos adversos das porfirinas e seus derivados, diversos estudos têm sido realizados de forma a desenvolver fotossensibilizantes que sejam ideais para as diferentes patologias. Para tanto, estes devem possuir toxicidade local baixa na ausência de luz e mínima toxicidade quando administrado sistemicamente, absorvendo luz no comprimento de onda que abrange o vermelho ou infravermelho próximo, para melhor penetração nos tecidos (MÜLLER, 2006). Além disso, o FS ideal deve preferencialmente acumular no tecido alvo, possuir fotossensibilidade não prolongada e ser liberado do organismo de forma rápida (SIMPLICIO; MAIONCH; HIOKA, 2002; ALISSON, 2004).

Dentro desse contexto, outras famílias de FS foram desenvolvidas e entre elas destacam-se as ftalocianinas. Esta família de FS faz parte de um grupo de fotossensibilizantes que tem atraído atenção por exibirem características fotoquímicas muito interessantes. Esses corantes, denominados de segunda geração, absorvem luz entre 630 a 700 nm e possuem máxima penetração tecidual por apresentar propriedades para localização tumoral e alta

eficácia como agente fotossensibilizador (FERREIRA *et al.*, 2004; HAYWOOD-SMALL, 2006).

Entretanto, vale ressaltar que as propriedades fotofísicas das ftalocianinas, mais favoráveis para aplicação em TFD, são dependentes do íon metal que compõe sua estrutura molecular. Assim, as ftalocianinas podem ser associadas a metais tais como zinco ou alumínio e cloro, formando complexos de zinco-ftalocianina e cloro-alumínio-ftalocianina. Contudo, esses complexos são insolúveis em água ou soluções fisiológicas e, assim, agregam-se facilmente. Desse modo, para que as ftalocianinas sejam biocompatíveis para as aplicações biológicas elas devem ser preparadas em formulações solúveis em soluções fisiológicas (LONGO, 2008). Um procedimento simples consiste em ligar a ftalocianina, de forma não covalente, à molécula carreadora, tal qual a albumina. É importante notar que as células neoplásicas superexpressam receptores para a proteína albumina; essas células utilizam a albumina, assim como outras proteínas plasmáticas, para a sua nutrição (SIMIONI, 2006). Desse modo, ocorre maior absorção do fotossensibilizador pelas células tumorais, além de se evitar sua degradação no interior do organismo antes que atinja o sítio alvo.

1.3.2 Fontes de Luz utilizadas na Terapia Fotodinâmica

A luz laser, cuja palavra vem do acrônimo "*light amplification by stimulated emission of radiation*", ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, é uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada, que em contato com os diferentes tecidos resulta, dependendo do tipo, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares (HENRIQUES, *et al.*, 2008; BRUGNERA, 1998). Ao contrário de outras formas de radiação usadas terapêuticamente, essa irradiação é bem tolerada pelos tecidos por não ser invasiva (HENRIQUES, *et al.*, 2008), além de fornecer maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do fotossensibilizador, sem efeitos térmicos significativos (MACHADO, 2000). Assim, o laser tem contribuído muito para o desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica devido às suas características: (a) monocromaticidade, onde a luz é composta por apenas um comprimento de onda; (b) alta intensidade, o que permite estimular os níveis de energia das moléculas do fotossensibilizador; (c) direcionamento, já que o feixe de luz é composto por fótons propagando-se na mesma direção e (d) coerência, por manter as ondas sincronizadas (KURACHI, 2002; SOUZA, 2009).

A laserterapia é classificada em dois sistemas quanto à potência dos equipamentos: baixa (LPLT “Low Power Laser Therapy”) e alta potência (HPLT “High Power Laser Therapy”), sendo que a diferença entre eles depende do grau de excitabilidade que poderá causar no tecido alvo biológico. No de baixa intensidade, a potência média é de 30 a 100mV, com modo de emissão contínuo e comprimento de onda que varia entre 630 a 904 nm. Neste caso a excitabilidade é relativamente pequena, o que permite regular as funções fisiológicas celulares, podendo apresentar efeito analgésico, antiinflamatório e biomodulador (LIZARELLI, 2005). Porém, quando associado a uma molécula fotossensível, tal laser tem a propriedade de provocar morte celular pela produção de espécies reativas de oxigênio, caracterizando, assim, a Terapia Fotodinâmica (KURACHI, 2002). No de alta potência, a energia que o tecido recebe é tão grande que pode provocar rompimento das ligações químicas por meio do corte, ablação, coagulação e vaporização (SOUZA, 2009).

1.4 Justificativa

O aumento crescente da incidência de câncer e a necessidade de se desenvolver terapias mais eficazes com o mínimo de efeitos adversos têm suscitado a busca de tratamentos alternativos. Entre estes, duas terapias promissoras são a magnetohipertermia e a terapia fotodinâmica, as quais demandam o desenvolvimento de novos materiais. Nosso grupo de pesquisa tem investido na pesquisa de novos materiais em escala nanométrica que possam realizar as duas terapias e que apresentem as características de biocompatibilidade necessárias para as aplicações biomédicas. Recentemente, uma amostra baseada em nanoesferas de albumina foi sintetizada. A necessidade imprescindível de se entender os mecanismos de ação de novos nanomateriais, e ainda investigar sua eficácia em realizar os procedimentos de magnetohipertermia e terapia fotodinâmica em animais portadores de tumor, justificam esta pesquisa.

1.5 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar efeitos biológicos e eficácia de materiais nanoestruturados à base de nanoesferas de albumina para tratar tumor sólido de Ehrlich por magnetohipertermia ou terapia fotodinâmica

1.5.1 Objetivos específicos

- (i) Desenvolver modelo tumoral baseado no tumor de Ehrlich adequado para a realização de magnetohipertermia e da terapia fotodinâmica;
- (ii) Investigar a eficiência de nanoesferas de albumina magnéticas no tratamento do tumor sólido de Ehrlich por magnetohipertermia;
- (iii) Investigar a eficiência de nanoesferas de albumina contendo zinco-ftalocianina tetrassulfonada no tratamento do tumor sólido de Ehrlich por terapia fotodinâmica;
- (iv) Comparar os resultados da terapia fotodinâmica com os do quimioterápico doxorrubicina, investigando possível potencial sinérgico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

A primeira etapa do estudo consistiu no desenvolvimento de um modelo animal portador de tumor adequado para as investigações da eficiência de MHT e TFD ao se usar nanoesferas de albumina magnéticas (PAM) e nanoesferas de albumina associada à agente fotossensível zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAF) respectivamente. Para tanto foi necessário determinar, nos camundongos, uma região apropriada para inocular as células tumorais de Ehrlich na forma ascítica.

Na segunda etapa foi avaliada a eficiência da PAM em realizar a MHT pela exposição dos animais tratados a um gradiente de campo magnético de frequência alternada.

Por fim, na terceira etapa foi avaliada a eficiência da PAF em realizar a TFD pela exposição dos animais a uma fonte de luz com comprimento de onda de 670 nm. Um grupo de animais tratados com o quimioterápico doxorrubicina foi acrescentado a esta etapa.

2.2 ETAPA I - Desenvolvimento do modelo tumoral - Local de aplicação das células tumorais

2.2.1 Manutenção do tumor de Ehrlich

Para a realização deste trabalho utilizamos células tumorais de Ehrlich (EHRlich; APOLANT, 1905) segundo procedimentos previamente executados em nosso laboratório (BARBOSA, 2008; SADEGHIANI, 2008). A manutenção do tumor foi feita por meio do transplante de células tumorais retiradas de um animal portando a neoplasia (**Figura 1- A**), na quantidade de 10^6 , e inoculadas diretamente no peritônio do camundongo receptor (**Figura 1- B**), procedimento que resultava na formação do tumor ascítico em período de até sete dias (SIGIURA, 1965).

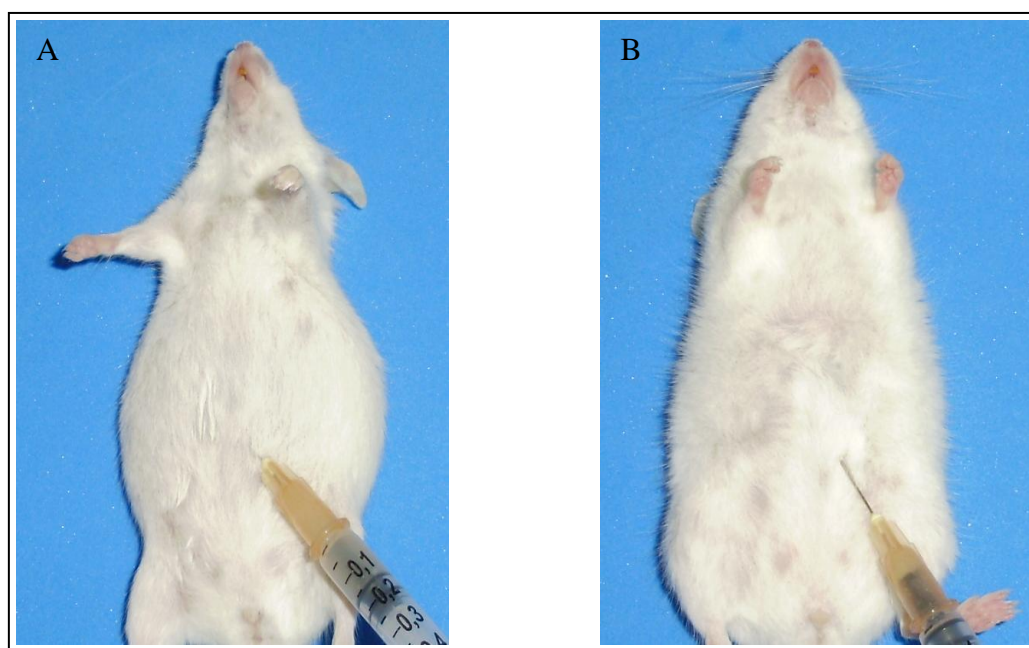


Figura 1: Manutenção do tumor de Ehrlich. (A) camundongo portador de tumor ascítico de Ehrlich. (B) camundongo receptor sendo inoculado com 100 μ L de tumor ascítico de Ehrlich.

2.2.2 Local de aplicação das células tumorais

Tamanho e localização do tumor são dois aspectos importantes abordados no desenvolvimento do modelo tumoral utilizado. O tumor de Ehrlich quando implantado em animais na quantidade de 10^6 , cresce de maneira muito rápida, possibilitando iniciar o tratamento poucos dias após a inoculação das células tumorais. Porém, para utilizá-lo como modelo experimental, é interessante que o tumor seja menor que 5 mm, pois dimensões maiores dificultam o êxito do tratamento pelo fato do tumor ser muito agressivo.

No que tange ao local de desenvolvimento do tumor no animal, a primeira região escolhida para a inoculação das células tumorais foi o dorso dos animais, pelo fato de ser um local de fácil acesso para aplicação e também por já ter sido utilizado previamente em estudos do tratamento de tumor de Ehrlich (SADEGHIANI, 2008). Para tanto, foram inoculados 40 μ L do líquido ascítico peritoneal, contendo $5,5 \times 10^4$ células tumorais. Foi constatado, logo nos primeiros dias, que este local apresentava alguns inconvenientes para avaliar as medidas do tumor, pois a pele e os pêlos, mesmo após tricotomia, dificultavam a visualização e percepção do tumor no dorso dos animais. Como não existia crescimento padrão do tumor entre os animais da linhagem Swiss, era necessário tatear o local inoculado todos os dias a fim de se detectar o “nódulo” e com ajuda de um paquímetro, fazer suas medidas, até que as

mesmas fossem consideradas as ideais para iniciar os tratamentos. Desta forma, as coletas aconteciam sem a certeza do tamanho do tumor e na hora da coleta observávamos, com frequência, que tumores aparentemente pequenos, haviam na verdade enraizado no músculo ou se espalhado pelo dorso.

Em consequência, o segundo local escolhido para a implantação do tumor ascítico de Ehrlich, foi a cabeça (**Figura 2- A**). Nesta localização, percebemos que ao aplicarmos as células tumorais, na mesma quantidade inoculada no dorso, formava-se um pequeno “nódulo” e 24 horas após, o mesmo continuava não espalhado. Como se pretendia que a terapia fosse realizada em tumor sólido, alguns animais foram sacrificados 24 e 48 horas após a inoculação das células tumorais. Os resultados histológicos mostraram que os tumores implantados há 24 horas apresentavam-se ainda líquidos em algumas regiões. Porém, as análises histológicas revelaram que após 48 horas, os mesmos estavam sólidos e com dimensões entre 3 a 5 mm, ideais para serem tratados. Em seguida foram feitos alguns outros testes preliminares para testar se a região da cabeça seria, realmente, adequada para receber os dois tratamentos, MHT e TFD. Os estudos com MHT nesta região foram adequados. Porém, para o tratamento com TFD, não observamos diferenças entre as várias exposições ao laser, sugerindo, assim, que o local da inoculação das células tumorais para posterior terapia fotodinâmica não estava adequado. Mesmo sem ter certeza dos motivos pelos quais a TFD não tenha sido efetiva, percebemos que a pele, devida à sua espessura, poderia ter dificultado a penetração do laser. Por esta razão, buscamos um local mais propício, onde o laser pudesse penetrar com mais facilidade.

O terceiro local testado para a implantação das células de Ehrlich foi a orelha (**Figura 2- B**). Após a inoculação das células tumorais nesta região, percebemos o mesmo “nódulo” de células tumorais da região da cabeça, evidenciando sua implantação. Porém, devido à dificuldade em inocular um volume de 40 μL em uma região tão fina e de área limitada como a da orelha, optamos por diminuir o volume tumoral, inoculando na orelha dos animais, 10 ou 20 μL de células tumorais contendo, respectivamente, $1,37 \times 10^4$ e $2,75 \times 10^4$ células. Após a inoculação das células, deixamos os animais sobreviverem por 40 dias e, após esta data, observamos que o crescimento tumoral dos animais inoculados com 20 μL foi de 100%, enquanto nos animais inoculados com 10 μL houve somente 25% de crescimento. Com base nesses dados, decidimos utilizar inóculos de 20 μL de células tumorais nos experimentos. Nestes, a linhagem dos camundongos também foi feita com camundongos Swiss, não isogênicos.

Como já sabíamos que deveríamos iniciar os tratamentos com o tumor sólido, ou seja, 48 horas após a inoculação, o desafio era saber se a pele da orelha não seria um obstáculo para a penetração do laser. Os testes com a TFD revelaram necrose clínica maior nos animais tratados com a amostra PAF quando comparados aos animais controle. Com base nessas informações, decidimos desenvolver o trabalho utilizando a orelha como local de aplicação das células tumorais nos testes da amostra PAF.

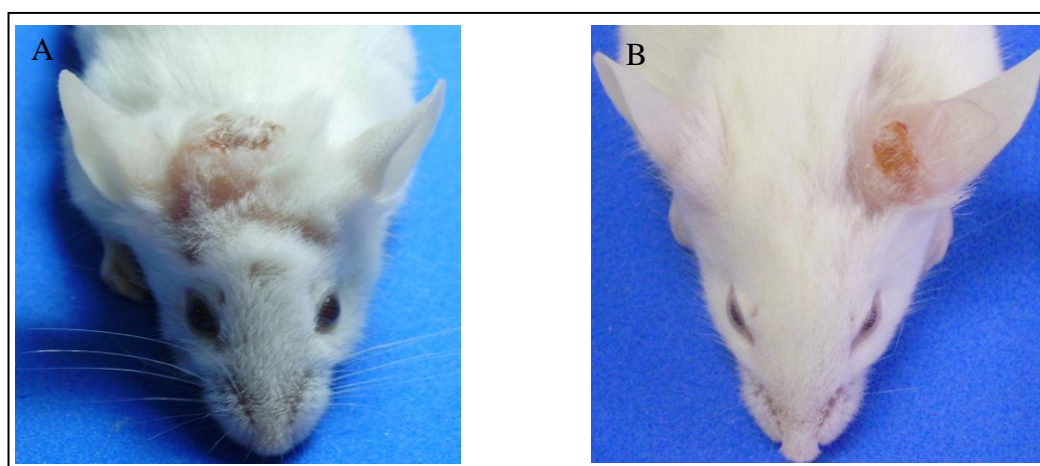


Figura 2: Camundongos da linhagem Swiss portando tumor de Ehrlich- (A) na cabeça; (B) na orelha.

2.3 ETAPA II - Investigação da Magnetohipertermia (MHT)

2.3.1 Amostra

A amostra nanoestruturada utilizadas neste trabalho consistem em nanoesferas de albumina magnéticas contendo nanopartículas de maghemita, denominadas PAM. As nanopartículas de maghemita provém de uma amostra de fluido magnético iônico sintetizada no Instituto de Física da Universidade de Brasília (UnB), DF, por Bruno M. Lacava, sob orientação do Prof. Doutor Paulo César de Moraes. A amostra de nanoesferas de albumina PAM foram preparadas sob a responsabilidade do Prof. Doutor Antônio Cláudio Tedesco do Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina do Departamento de Química da FFCLRP (USP), em Ribeirão Preto, SP.

2.3.2 Caracterização da amostra PAM por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a obtenção do diâmetro da amostra PAM e das nanopartículas contidas na amostra, alíquota foi diluída 1000 vezes em água destilada e colocada sobre telas de microscopia eletrônica recobertas com Formvar. Após secarem por duas horas, as telas foram analisadas e fotomicrografadas em um microscópio eletrônico JEOL 100CXII. Os diâmetros das partículas magnéticas foram obtidos por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 4.0. A distribuição de diâmetro das partículas foi realizada utilizando-se o melhor ajuste de distribuição lognormal (LACAVA *et al.*, 2000).

2.3.3 Equipamento eletromagnético

O aparelho para gerar campo magnético alternado utilizado para a magnetohipertermia foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Patente: PI 0204433-1) e opera a 1MHz com 40Oe de amplitude de campo.

2.3.4 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, não isogênicos, com 12 semanas de idade, pesando $32,87 \pm 3,95$ g, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - CEMIB - da Universidade de Campinas, SP (**Figura 3**). Durante a fase experimental, os animais foram alojados em gaiolas plásticas (8 animais/gaiola) forradas com serragem, com acesso livre à comida e água filtrada. Essas gaiolas, por sua vez, eram armazenadas em estantes ventiladas à temperatura ambiente, com ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas, no biotério do Laboratório Nanogen. Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estão em acordo com o Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/63, Instituto de Biologia/ Universidade de Brasília).



Figura 3: Camundongos fêmeas da linhagem Swiss.

2.3.5 Anestésicos

Para a realização dos experimentos, em acordo com o método descrito por Miranda-Vilela *et al.* (2011), os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina, ambos obtidos como cloridrato. Ketamina, vendida como Dopalen 100 mg / mL, foi obtida a partir da Ceva Animal Health Ltd (São Paulo, Brasil) e Xilazina (20mg/ml Coopazine ®) da Coopers (São Paulo, Brasil). Os animais foram anestesiados por uma administração intraperitoneal de Ketamina (80 mg / kg) e Xilazina (10 mg / kg), ambos na mesma seringa, na dose final de 0.1mL/30g.

2.3.6 Grupos experimentais para tratamento com a MHT

Os grupos experimentais foram divididos em: controle 2 dias (n=3), animais que permaneceram com tumor durante 48 horas e sem tratamento; controle 5 dias (n=3), animais que permaneceram com tumor durante 5 dias e sem tratamento; controle 11 dias (n=3), animais que permaneceram com tumor durante 11 dias e sem tratamentos; controle PAM1x animais com tumor tratados com uma aplicação da amostra PAM durante 3 dias consecutivos (n=2); controle PAM2x animais com tumor tratados com duas aplicações da amostra PAM durante 3 dias consecutivos (n=2); controle PAM3/3 animais com tumor tratados com uma aplicação da amostra PAM de 3 em 3 dias (n=2); controle AC1x animais com tumor tratados com uma aplicação do campo eletromagnético durante 3 dias consecutivos (n=3); controle AC2x animais com tumor tratados com duas aplicações do campo eletromagnético durante 3 dias consecutivos (n=3); controle AC3/3 animais com tumor tratados com uma aplicação do campo eletromagnético de 3 em 3 dias (n=3); MHT1x animais com tumor tratados com uma aplicação da amostra PAM e submetidos a MHT durante 3 dias consecutivos (n=3); MHT2x animais com tumor tratados com duas aplicações da amostra PAM e submetidos a MHT durante 3 dias consecutivos (n=3); MHT3/3 animais com tumor tratados com uma aplicação da amostra PAM e submetidos a MHT de 3 em 3 dias (n=3).

O tempo de exposição ao tratamento, bem como o dia do sacrifício dos animais, por deslocamento cervical, estão ilustrados na **Figura 4**.

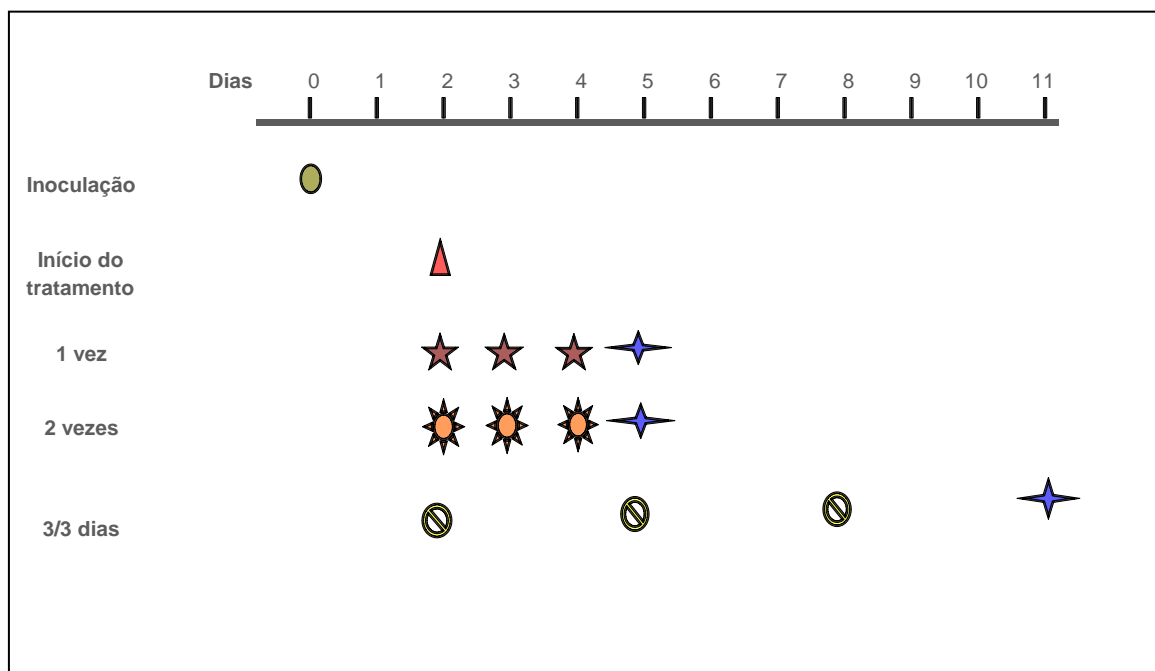


Figura 4: Cronograma experimental da MHT. Todos os tratamentos foram iniciados dois dias após a inoculação das células tumorais. O grupo MN1x recebeu tratamentos de MHT um vez ao dia durante três dias consecutivos. O grupo MN2x recebeu tratamento de MHT duas vezes ao dia durante três dias consecutivos. O grupo MN 3/3 recebeu tratamento de MHT uma vez ao dia, de três em três dias. O sacrifício dos animais dos grupos MN1x e MN2x ocorreu 24 horas após o último tratamento, enquanto no grupo MN3/3 ocorreu três dias após o último tratamento.

2.3.7 Tratamento com amostra nanoesferas de albumina magnéticos (PAM)

Animais foram tratados por injeção intratumoral de 40 μL de PAM, na região da cabeça, contendo $1,2 \times 10^{15}$ nanopartículas/mL de PAM. A aplicação da amostra foi realizada 48 horas após a inoculação das células tumorais. Para os animais que foram submetidos a MHT, a amostra PAM foi inoculada uma hora antes da exposição ao campo.

2.3.8 Exposição ao campo AC

Os animais foram submetidos a um gradiente de campo magnético de frequência alternada por 10 minutos gerado pelo equipamento descrito no item 2.3.1. Parte deles foi

tratado com PAM uma hora antes da exposição ao campo AC para a realização do procedimento da magnetohipertermia (**Figura 5**).

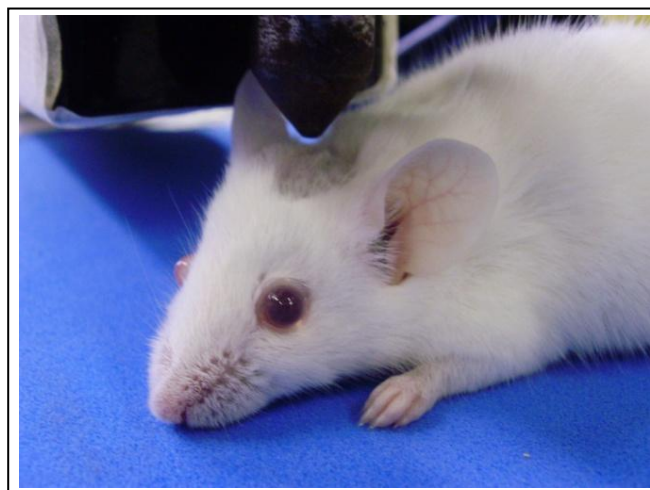


Figura 5: Camundongo inoculado com PAM na região da cabeça, recebendo o campo eletromagnético de frequência alternada para a realização da magnetohipertermia.

2.3.9 Análise histológica dos tumores após tratamento com MHT

Tumores foram removidos cirurgicamente e fixados em formol 10% por 24 h, transferidos para etanol 70%, incluídos em parafina usando um processador automático de tecidos (OMA ® DM-40, São Paulo, Brasil), cortados a 5 μ m de espessura em micrótomo Leica RM2235 manual (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica (microscopia de luz). Um total de 5 seções histológicas, com 100 μ m de distância entre os cortes, foi analisado por amostras de cada tumor.

2.4 ETAPA III - Investigação da Terapia Fotodinâmica

2.4.1 Amostra

A amostra nanoestruturada utilizadas nesta etapa consiste em nanoesferas de albumina associadas a zinco-ftalocianina tetrassulfonada como agente fotossensibilizador (PAF). Sua síntese está descrita no item 2.3.1.

2.4.2 Caracterização da amostra PAF por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A caracterização da amostra PAF está descrita no item 2.3.2.

2.4.3 Equipamento – Luz laser

O laser utilizado para a terapia fotodinâmica é da marca BWF light source-Techin. O comprimento de onda de emissão é de 670 nm e a potência é de 80 mw.

2.4.4 Animais

Os animais utilizados para realizar o tratamento com a TFD estão descritos no item 2.3.4.

2.4.5 Anestésicos

Os anestésicos utilizados para os procedimentos com os animais estão descritos no item 2.3.5.

2.4.6 Grupos experimentais para tratamento com a TFD

Os grupos experimentais foram divididos em: A, B e C. Dentro do grupo A havia os subgrupos: (1) Controle (n=8): animais saudáveis que não receberam qualquer tipo de

tratamento; (2) Tumor (n=8): animais com tumor e que não receberam tratamento; (3) PAF (n=8): animais com tumor, inoculados com PAF via intratumoral; (4) Laser (n=8): animais com tumor, submetidos ao laser; (5) TFD (n=8): animais com tumor que foram inoculados com PAF via intratumoral e submetidos ao laser, ou seja, animais que receberam a terapia fotodinâmica; (6) Tumor dx (n=8): animais com tumor, inoculados, via intratumoral, doxorrubicina; (7) PAF dx (n=8): animais com tumor, inoculados com PAF e doxorrubicina, via intratumoral; (8) Laser dx (n=8): animais com tumor, inoculados com doxorrubicina e submetidos ao laser; (9) TFD dx (n=8): animais com tumor que foram inoculados com PAF e doxorrubicina, ambos via intratumoral, submetidos ao laser, ou seja, animais que receberam a terapia fotodinâmica juntamente com o quimioterápico doxorrubicina.

Para os grupos B e C, havia os subgrupos: (1) Controle (n=8): animais saudáveis que não receberam qualquer tipo de tratamento; (2) Tumor (n=8): animais com tumor e que não receberam tratamento; (3) PAF (n=8): animais com tumor, inoculados com PAF via intratumoral; (4) Laser (n=8): animais com tumor, submetidos ao laser; (5) TFD (n=8): animais com tumor que foram inoculados com PAF via intratumoral e submetidos ao laser, ou seja, animais que receberam a terapia fotodinâmica.

Para um maior esclarecimento, a **Tabela 1** resume os grupos e subgrupos experimentais.

Tabela 1: Grupos e subgrupos experimentais dos animais tratados com TFD, com n=8 para cada subgrupo.

| Grupos Experimentais | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|
| A | B | C |
| C-A | C-B | C-C |
| T-A | T-B | T-C |
| PAF-A | PAF-B | PAF-C |
| L-A | L-B | L-C |
| TFD-A | TFD-B | TFD-C |
| Tdx-A | | |
| PAFdx-A | | |
| Ldx-A | | |
| TFDdx-A | | |

Grupos e subgrupos experimentais dos animais tratados com TFD, com n=8 para cada subgrupo. C: animais saudáveis que não receberam qualquer tipo de tratamento; T: animais com tumor e que não receberam tratamento; PAF: animais com tumor, inoculados com PAF via intratumoral; L: animais com tumor, submetidos ao laser; TFD: animais com tumor que foram inoculados com PAF via intratumoral e submetidos ao laser, ou seja, animais que receberam a terapia fotodinâmica; Tdx: animais com tumor, inoculados, via intratumoral, doxorrubicina; PAFdx: animais com tumor, inoculados com PAF e doxorrubicina, via intratumoral; Ldx: animais com tumor, inoculados com doxorrubicina e submetidos ao laser; TFDdx:): animais com tumor que foram inoculados com PAF e doxorrubicina, ambos via intratumoral, submetidos ao laser, ou seja, animais que receberam a terapia fotodinâmica juntamente com o quimioterápico doxorrubicina.

O tempo de exposição ao tratamento, bem como o dia do sacrifício dos animais estão ilustrados abaixo, na **Figura 6**. No momento da coleta, os animais foram mortos por deslocamento cervical.

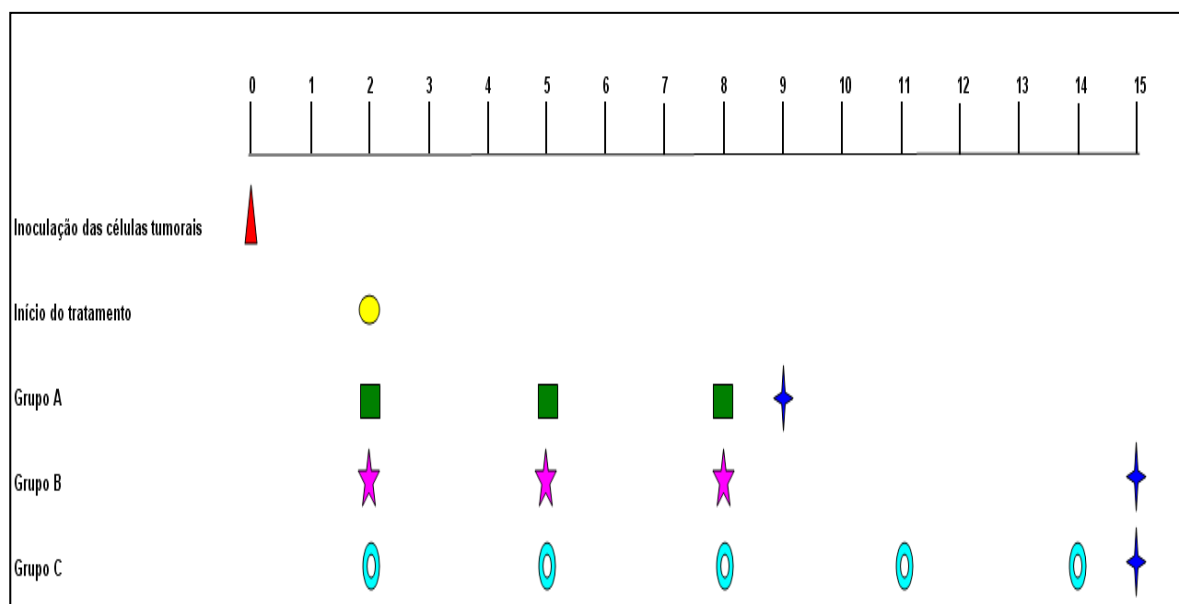


Figura 6: Cronograma experimental da TFD. Todos os tratamentos foram iniciados dois dias após a inoculação das células tumorais e todos eles foram realizados de 3 em 3 dias. Os grupos A e B receberam 3 tratamentos e o grupo C recebeu 5 tratamentos. O sacrifício dos animais dos grupos A e C ocorreu 24 horas após o último tratamento, enquanto no grupo B, o mesmo foi feito 7 dias após o tratamento.

2.4.7 Tratamento com amostra nanoesferas de albumina contendo zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAM)

Animais foram tratados por injeção intratumoral de 20 μ L de PAF, na região da orelha (**Figura 7**), na concentração de 0,5 mM de agente fotossensibilizador. A aplicação da amostra foi realizada 48 horas após a inoculação das células tumorais. Para os animais que foram submetidos à TFD, a amostra PAF foi inoculada 5 minutos antes da exposição ao laser.



Figura 7: camundongo recebendo aplicação de células tumorais de Ehrlich na região da orelha.

2.4.8 Tratamento com Quimioterápico Doxorrubicina

A doxorrubicina (DX), cujo nome comercial é antraciclina, é um antibiótico comumente utilizado no tratamento de um amplo espectro de tumores (MITRA, 2001).

Para validação da TFD e verificar possíveis efeitos sinérgicos/antagônicos, parte dos animais do grupo A foram chamados grupo A+doxorrubicina (ver item 2.9.1) e receberam 10 μL correspondendo a 20 mg/m^2 de quimioterápico via intratumoral, logo após a administração da PAFou antes da exposição à luz de 670 nm, também no mesmo local.

2.4.9 Exposição ao Laser

Animais foram submetidos à luz de comprimento de onda de 670 nm por 20 minutos e parte deles foi tratado com PAF 5 minutos antes da exposição ao laser para testar o procedimento de terapia fotodinâmica (**Figura 8**).

A escolha da fonte de luz no vermelho ou no vermelho próximo é para que a radiação penetre efetivamente no tecido neoplásico, já que emissões abaixo de 600 nm são absorvidas por cromóforos bioendogênicos e/ou espalhadas pelos tecidos, o que torna a fotoxidação apenas superficial (RIBEIRO, 2007).

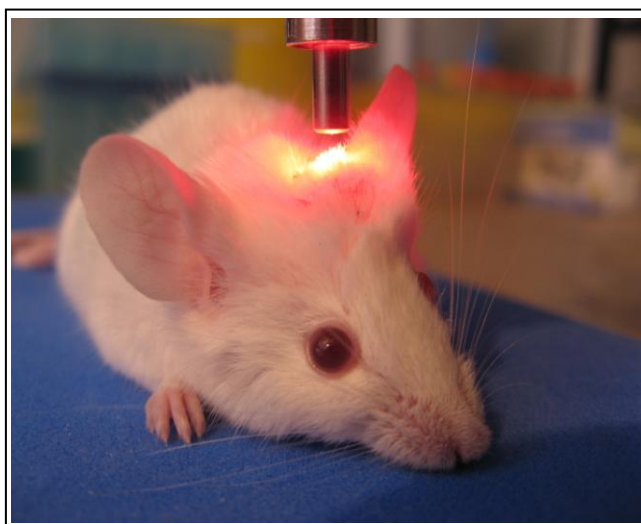


Figura 8: Camundongo inoculado com PAF na região da orelha, recebendo o laser para a realização da terapia fotodinâmica.

2.4.10 Observações clínicas dos animais tratados com TFD

Durante os procedimentos experimentais e logo após o sacrifício dos animais, foram feitas observações para identificar, macroscopicamente, o aspecto tumoral bem como a área de necrose. Estas observações e os outros testes realizados a seguir estão sumarizados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Métodos usados para avaliação dos efeitos de PAF no tratamento do tumor de Ehrlich pela TFD.

| Avaliação dos efeitos da PAF no tratamento de TFD | |
|--|----------------------------------|
| Hemograma completo | |
| Bioquímica | Bilirrubina total |
| | Bilirrubina direta |
| | Bilirrubina indireta |
| | Aspartato aminotransferase (AST) |
| | Alanina aminotransferase (ALT) |
| | Gama glutamiltransferase (GGT) |
| | Fosfatase Alcalina |
| | Fosfatase creatinina |
| | Uréia |
| Histologia | Tumor |
| | Fígado |
| | Rim |
| Morfometria | Necrose do tumor |
| Observações Clínicas | Peso |
| | Desenvolvimento do tumor |
| Controle da atividade tumoral | Doxorrubicina |

2.4.11 Ensaio hematológicos e bioquímicos após tratamento com TFD

De animais devidamente anestesiados, amostras de sangue (1 mL) coletado por punção cardíaca, foram utilizadas para realizar hemograma completo e dosagens bioquímicas (executados em parceria com o Sabin - Laboratório Clínico) de bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, aspartato aminotransferase (AST) também chamada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), alanina aminotransferase (ALT) também chamada de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina fosfatase creatinina e uréia.

Parte do sangue retirado dos animais para fazer o hemograma foi colocada em microtubos contendo EDTA como anticoagulante e processada em um analisador hematológico automatizado para uso veterinário, Sysmex Poch-100iV Diff (Curitiba / Paraná, Brasil), calibrado para ratos. A outra parte foi usada para a confecção do esfregaço sanguíneo. Análises bioquímicas de soro foram executadas no analisador químico automatizado ADVIA 2400 (Siemens), utilizando os reagentes químicos adequados Advia e protocolos. Bilirrubina total, frações de bilirrubina e creatinina foram determinados por métodos colorimétricos; GGT por um método colorimétrico cinético; uréia por método enzimático colorimétrico, e AST, ALT e fosfatase alcalina, por métodos cinéticos otimizados. A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical.

2.4.12 Observações clínicas dos tumores e análise histológica após tratamento com TFD

Tumores, fígado e rins foram removidos cirurgicamente. Largura, comprimento e espessura dos tumores foram medidos utilizando um paquímetro digital e seu volume foi calculado de acordo com Yanase *et al.* (1998). Posteriormente, os tumores e os órgãos foram fixados em formol 10% por 24 h, transferidos para etanol 70%, incluídos em parafina usando um processador automático de tecidos (OMA ® DM-40, São Paulo, Brasil), cortados a 5 (m de espessura em micrótomo Leica RM2235 manual (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha) e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica (microscopia de luz). Um total de 5 seções histológicas, com 100 mM de distância entre os cortes, foi analisado por amostras de cada tumor. Todos os cortes histológicos foram fotografados e as áreas de necrose do tumor foram quantificadas por um software para análise de imagens (Image Pro Plus 5.1, Media Cybernetics).

2.4.13 Análise estatística para os animais tratados com TFD

A análise estatística foi realizada usando o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15.0. Os dados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média) e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para a distribuição normal com Shapiro-Wilk. Para o peso do corpo dos animais, as diferenças entre os grupos foram verificadas por ANOVA, e as diferenças em outras variáveis foram investigadas por ANOVA ou Kruskal-Wallis (quando os dados não apresentavam distribuição normal). Para obter resultados significativos, ANOVA, teste post-hoc de Bonferroni foi escolhido para a realização de 2 para duas comparações entre os tratamentos. Para obter resultados significativos Kruskal-Wallis, Mann-Whitney foi realizado para verificar diferenças entre os tratamentos (comparação 2 a 2).

Para a análise morfométrica do tumor, as áreas de necrose foram quantificadas em imagem ProPlus 5,1 software, onde a média e desvio padrão do percentual de área de necrose foram calculados por grupo de tratamento. Um total de oito animais foram incluídos por subgrupo experimental.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização das amostras

3.1.1 Determinação do diâmetro da amostra PAM (nanoesferas de albumina magnéticas)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para determinar o diâmetro da amostra PAM bem como das nanopartículas de maghemita presentes nesta amostra, como ilustra a (A e B) **Figura 9**:

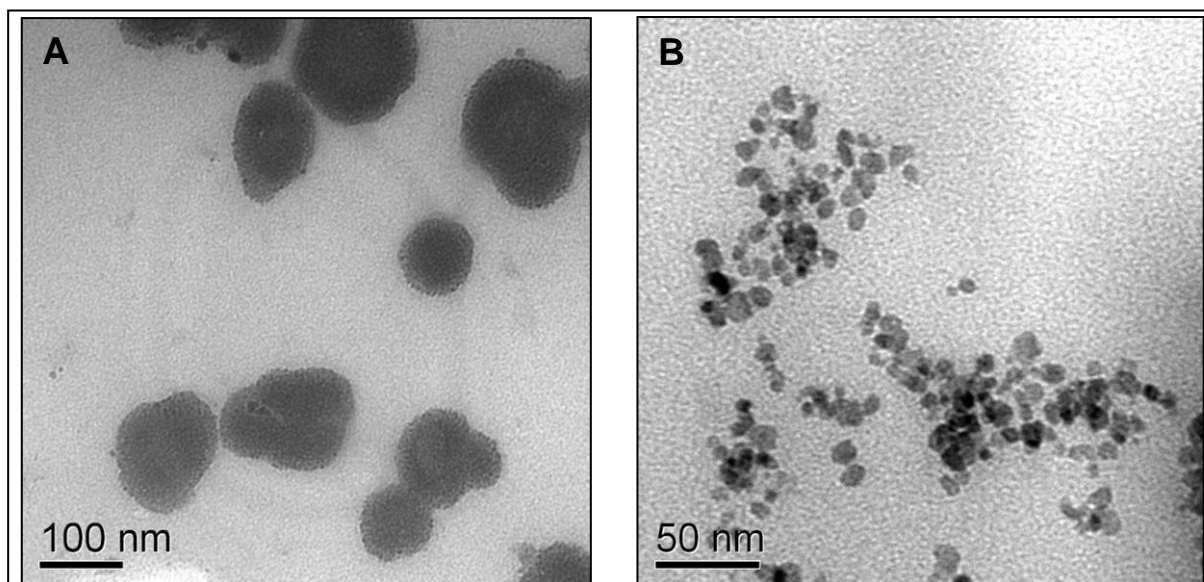


Figura 9: Fotomicrografia da amostra PAM. (A) Fotomicrografia eletrônica das nanoesferas de albumina e (B) nanopartículas de maghemita presentes na amostra PAM. MET realizada por Leandro Carlos Figueiredo e por Débora de Oliveira Cintra e Silva.

A distribuição lognormal dos diâmetros mostrou que a amostra PAM apresenta diâmetro médio de aproximadamente de 73 nm com desvio padrão de aproximadamente 0,37, como mostra a **Figura 10**. O diâmetro médio das NPs de meghemita é de aproximadamente 8,9 nm com desvio padrão de aproximadamente 0,25.

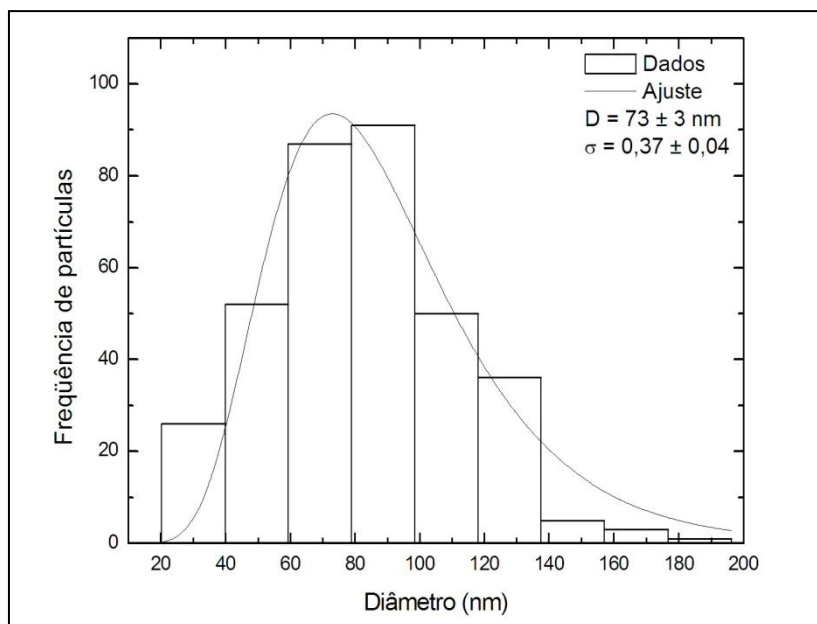


Figura 10: Histograma do diâmetro médio das nanoesferas de albumina magnéticas (PAM) obtidos por MET.

3.1.2 Determinação do diâmetro da amostra PAF (nanoesferas de albumina associadas a zinco-ftalocianina tetrassulfonada)

Para determinar o diâmetro da amostra PAF a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada e a distribuição lognormal dos diâmetros mostrou que a amostra PAF apresenta diâmetro médio de aproximadamente de 452 nm. A amostra PAF foi também analisada em microscopia de varredura, como mostra a figura **Figura 11**.

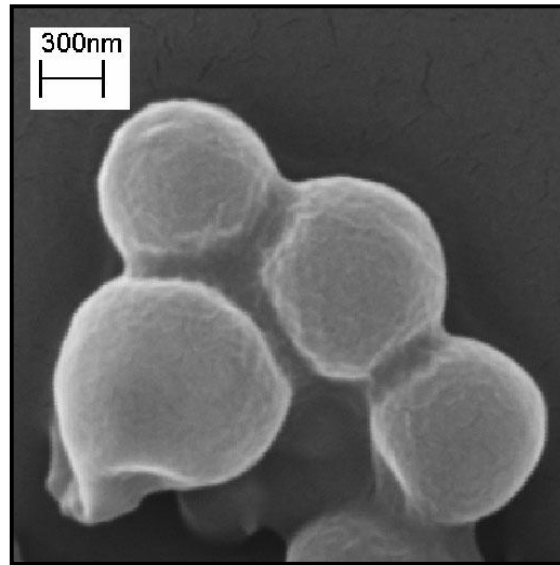


Figura 11: Fotomicrografia eletrônica de varredura das nanoesferas de albumina associadas à zinco-ftalocianinas presentes na amostra PAF.

Para obtermos uma maior eficiência no tratamento da terapia fotodinâmica, a intensidade de fluorescência foi medida, como mostra a **Figura 12:**

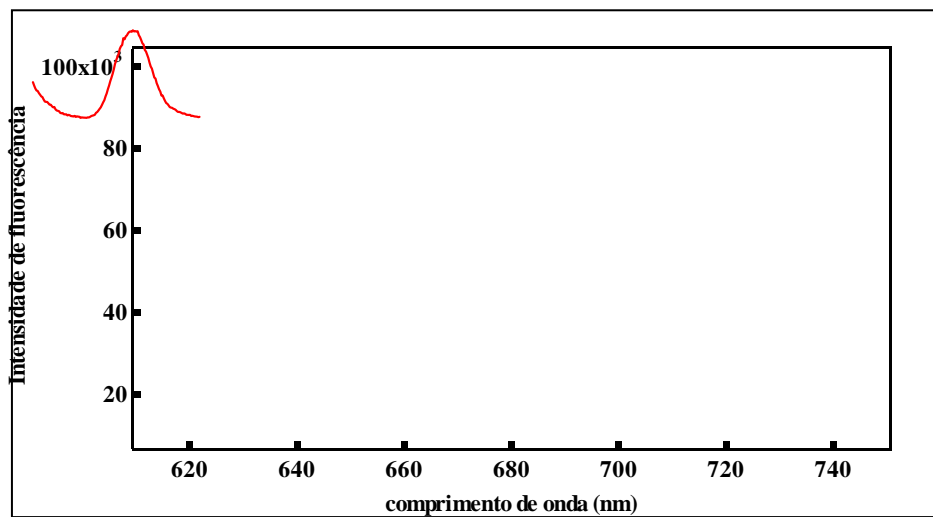


Figura12: intensidade de fluorescência da amostra PAF.

3.2 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich prolifera recoberto pelas camadas do tecido subcutâneo que incluem a porção de tecido epitelial, removida durante a dissecação dos tumores, por fibras musculares típicas da espécie e pelo tecido subcutâneo que inclui uma porção de tecido conjuntivo propriamente dito e uma fina camada de tecido adiposo.

Por apresentar uma capacidade proliferativa alta, identificada pela grande quantidade de figuras mitóticas, o tumor de Ehrlich apresenta focos de necrose em meio ao tecido tumoral viável. Esses focos de necrose centrais são típicos de tecidos tumorais hiperproliferativos, consequência da diferença entre a alta proliferação tumoral e a formação de novos vasos que não acompanha o mesmo ritmo de crescimento neoplásico. Mesmo nos tumores controle, a quantificação das áreas tumorais foi observada em todos os tumores experimentais, sendo o aumento da proporção de necrose tumoral identificada como uma consequência dos diferentes tratamentos experimentais.

As áreas de necrose tumoral foram identificadas morfológicamente por características morfológicas e de coloração, que incluem: (1) ausência de núcleos, ou cariólise, decorrente da degeneração das estruturas nucleares; (2) aspecto granuloso das estruturas celulares, identificado pela ausência de limites citoplasmáticos precisos, formando uma massa tecidual granulosa e homogênea; (3) forte eosinofilia e ausência de coloração pela hematoxilina, decorrente da degeneração nuclear e dos ribossomos citoplasmáticos (**Figura 13**).

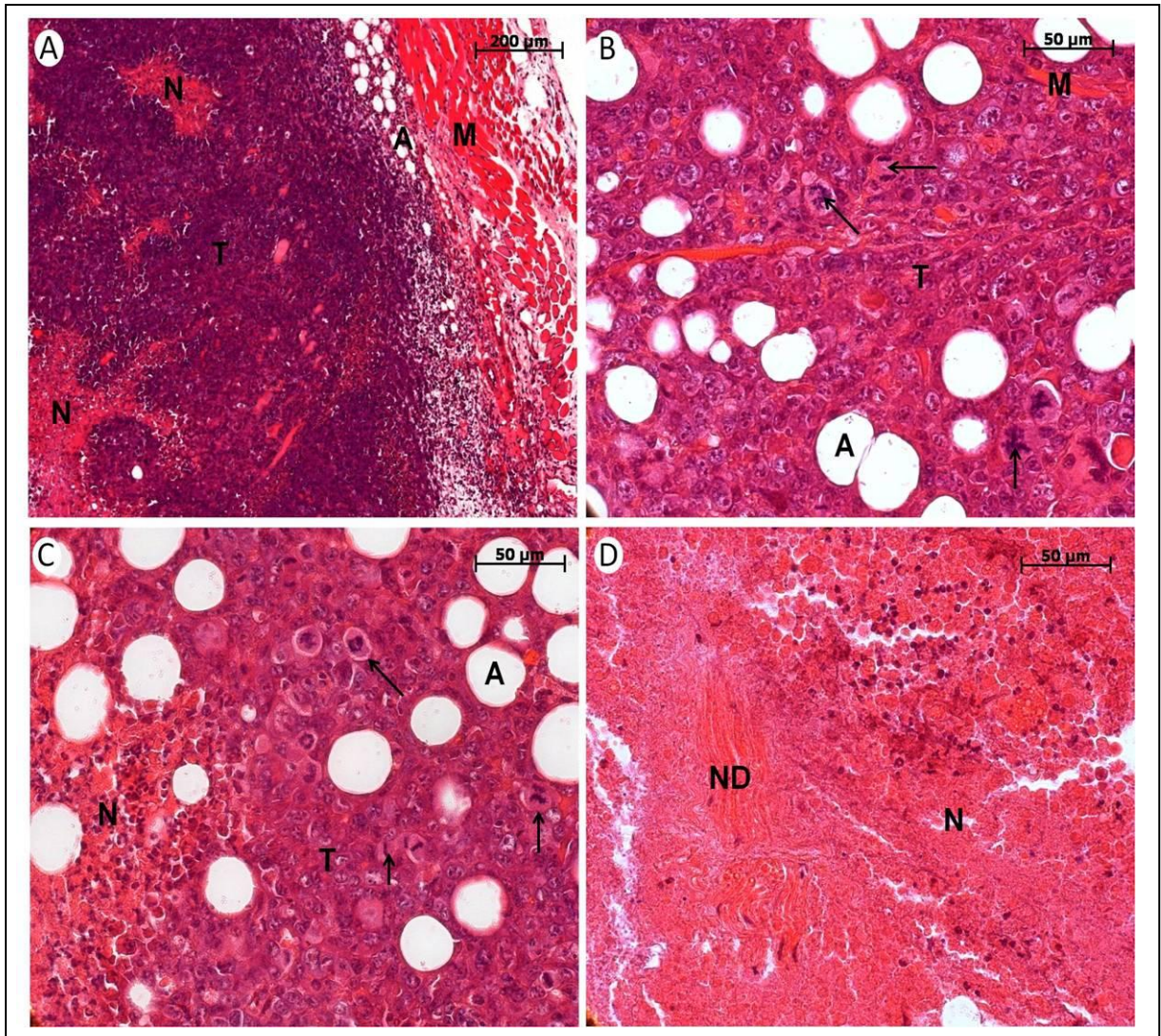


Figura 13: Fotomicrografias do tumor de Ehrlich transplantado em subcutâneo de camundongo. Em (A) o aspecto geral do tumor recoberto externamente pelas camadas musculares (M) e tecido adiposo (A) do tecido cutâneo. Na micrografia observa-se o tumor viável (T) e focos de tecido tumoral necrótico (N). Em (B) e (C) observa em maior detalhe o aspecto do tumor de Ehrlich (T), com grande presença de figuras mitóticas (setas). Em (C) observa-se o limite entre o tecido tumoral viável (T) e necrótico (N). Em (D) o aspecto de necrose tecidual (N) caracterizado pela ausência de núcleos, eosinofilia, aspecto granuloso sem os limites citoplasmáticos definidos. Em detalhe fibras nervosas em degeneração em meio à massa tumoral necrótica.

A **Figura 14**, abaixo, representa a descrição do método de quantificação das áreas de necrose realizada por um software imagem ProPlu 5.1.

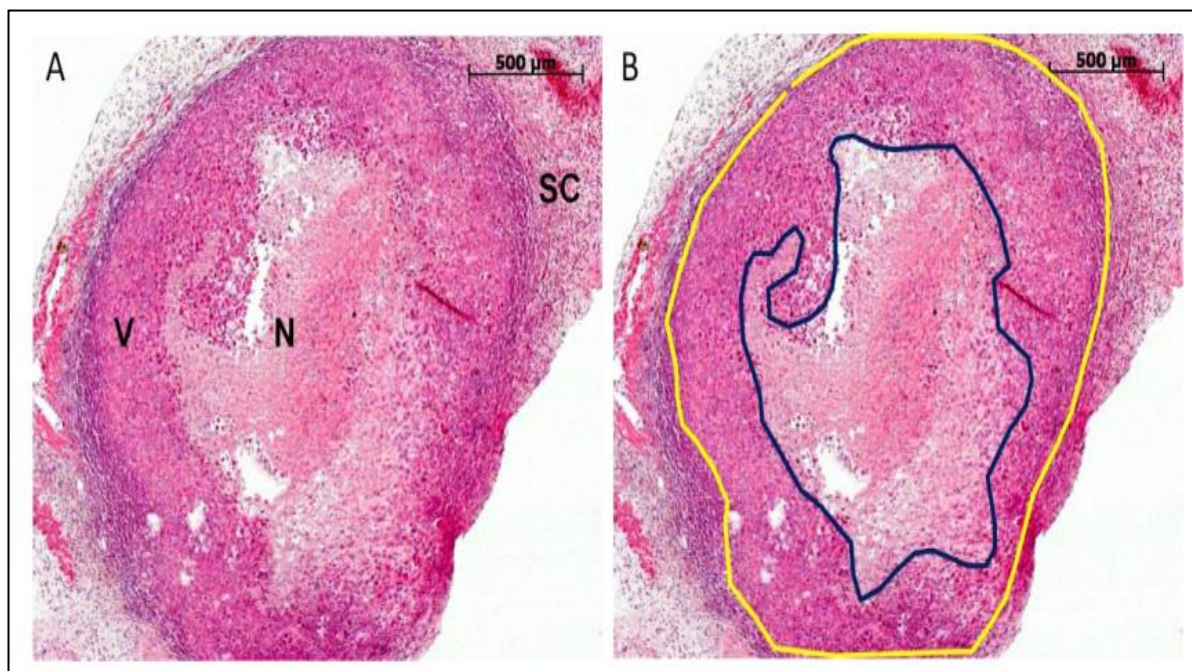


Figura 14: Descrição do método de quantificação das áreas com necrose de cortes histológicos de tecido tumoral. Em (A) fotomicrografia apresentando tecido tumoral viável (V); área de necrose tecidual (N) e o tecido subcutâneo (SC). Em (B) a marcação gráfica das áreas de tecido tumoral (marcada em amarelo); e a região de necrose tecidual (marcada em azul) contida no centro da área tumoral.

3.3 Resultados da MHT

A eficácia da magnetohipertermia foi determinada pela intensidade de necrose induzida pelo tratamento por meio de análises morfológicas. O grau de necrose foi classificado como: (-), (+), (++) , (+++) , (++++), que correspondem, respectivamente, a 0%, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100% de área do tumor necrosada. Os resultados estão relatados no artigo *Investigation of a magnetohyperthermia system efficacy* publicado na revista *Journal of Applied Physics* 109, 07B307, 2011.

Conforme **Tabela 3** abaixo, os animais do grupo controle (C), sem tratamento, apresentaram necrose que aumentava proporcionalmente ao desenvolvimento do tumor. A exposição ao campo magnético (AC) não alterou o padrão de necrose típica dos animais do grupo controle.

Por outro lado, a administração das nanoesferas de albumina magnéticas (PAM), por si só, acelerou o processo de necrose. Esta foi particularmente mais intensa após seis aplicações com a amostra (PAM3 e PAM4), induzindo grau de necrose de aproximadamente 80%.

A MHT realizada uma vez ao dia, durante três dias consecutivos (MHT1-MHT3) induziu um padrão de necrose semelhante aos respectivos controles. Entretanto, a MHT realizada duas vezes ao dia durante três dias consecutivos (MHT4-MHT6) resultou na necrose mais intensa observada neste estudo, tendo dois dos animais apresentados praticamente 100% de necrose, com raríssimas áreas de células viáveis.

Tabela 3: Efeitos da magnetohipertermia realizada com a amostra PAM sobre a necrose tumoral.

| Com tratamento | Tratamentos | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | CONTROLE | | | |
| 2º dia* | C1 (+) | - | - | - |
| | C2 (-) | - | - | - |
| | C3 (++) | - | - | - |
| | | Controle | Controle | MHT |
| 5º dia* | | PAM | AC | (PAM+AC) |
| | | PAM1 (+++) | AC1 (+) | MHT1 (++) |
| | 1x | PAM2 (-) | AC2 (-) | MHT2 (++) |
| | | | AC3 (++) | MHT3 (++) |
| 5º dia* | C4 (+) | | | |
| | C5 (++) | PAM3 (++++) | AC4 (+++) | MHT4 (++++) |
| | C6 (+++) | 2x PAM4 (++++) | AC5 (-) | MHT5 (+++) |
| | | | AC6 (++) | MHT6 (++++) |
| 11º dia* | C7 (++++) | PAM5 (+++) | AC7 (++++) | MHT7 (++++) |
| | C8 (++++) | 3/3 PAM6 (+++) | AC8 (++++) | MHT8 (++++) |
| | C9 (+++) | | AC9 (++++) | MHT9 (++++) |

^a dias da coleta das células tumorais após implantação do tumor; Grupo controle sem tratamento (C1-9); PAM (PAM1-PAM6) animais tratados com as nanoesferas de albumina magnéticas; AC (AC1-AC9) animais submetidos ao campo eletromagnético de frequência alternada; MHT (MHT1-MHT9) animais submetidos à MHT.

3.4 Resultados da terapia fotodinâmica do grupo A

Os experimentos deste grupo foram realizados com a intenção de se verificar se a amostra PAF é eficiente na realização da terapia fotodinâmica (TFD) quando aplicada por três vezes em intervalos de três dias, perfazendo um total de nove dias experimentais. Este grupo também teve como objetivo comparar os resultados da TFD com os de um quimioterápico clássico, a doxorrubicina, e verificar se essa droga poderia funcionar como um adjuvante no

tratamento da TFD, causando maior destruição no tecido tumoral. Assim, aos experimentos do grupo A (T-A, PAF-A, L-A e TFD-A) foi adicionada uma injeção intratumoral de doxorubicina (Tdx-A, PAFdx-A, Ldx-A e TFDdx-A), de três em três dias, perfazendo um total de nove dias experimentais.

3.4.1 Observações clínicas

3.4.1.1 Peso dos animais

A avaliação do peso dos animais realizada no período experimental de 9 dias mostrou que a implantação do tumor de Ehrlich (T-A) e os seus subseqüentes tratamentos sem adição de doxorubicina (PAF-A, L-A e TFD-A) ou conjugados a esse quimioterápico (Tdx-A, PAFdx-A, Ldx-A e TFDdx-A) não alteraram significativamente este parâmetro (**Figura 15**).

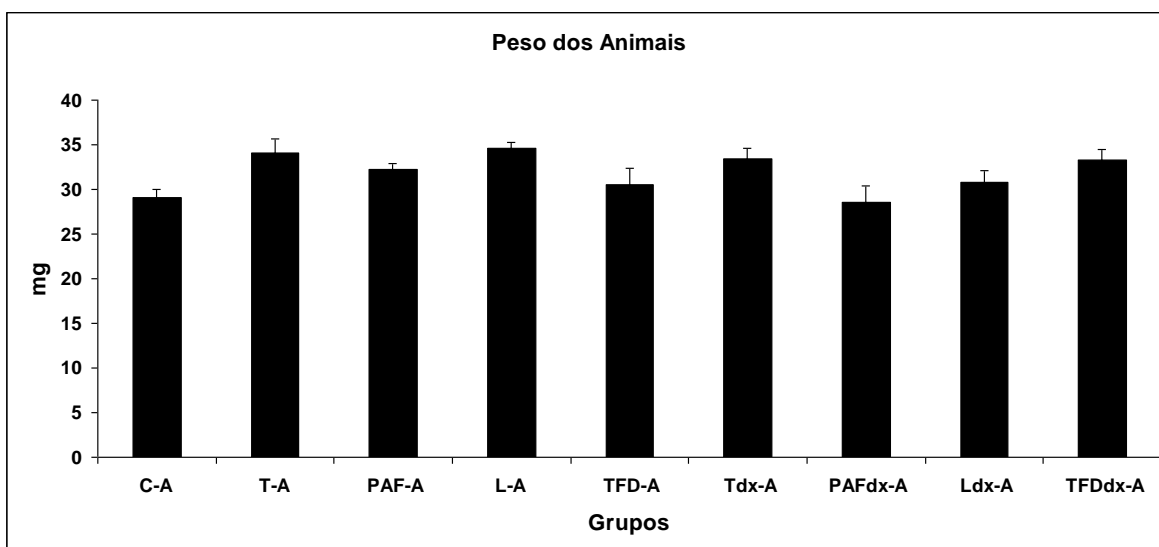


Figura 15: Peso dos animais no 9º dia experimental. C-A: animais saudáveis; T-A: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-A: animais com tumor tratados com PAF; L-A: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-A: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica. Tdx-A: animais com tumor tratados com doxorubicina; PAFdx-A: animais com tumor tratados com PAF e doxorubicina; Ldx-A: animais com tumor tratados com doxorubicina e submetidos ao laser; TFDdx-A: animais com tumor tratados com doxorubicina e submetidos à terapia fotodinâmica. barra indica erro padrão.

3.4.1.2 Volume e peso dos tumores

A análise dos resultados revelou que nenhum dos tratamentos (PAF-A, L-A e TFD-A) alterou significativamente o volume e o peso dos tumores, exceto o volume do grupo tratado com PAF-A em relação aos animais portadores de tumor (T-A). A comparação entre os diferentes tratamentos em que não foram utilizados o quimioterápico doxorrubicina mostrou que os tumores tratados com TFD têm apenas volume estatisticamente diminuído em relação aos tratamentos com a amostra PAF (PAF-A) e laser (L-A), ainda que estes dois tratamentos façam parte da TFD. Porém com a introdução do quimioterápico nos tratamentos, os resultados mostraram que a injeção intratumoral da doxorrubicina nos animais portadores de tumor (Tdx-A) induziu diminuição estatisticamente significativa do volume tumoral, tanto em relação aos animais portadores de tumor que não receberam tratamento quimioterápico (T-A), quanto em relação aos animais tratados com a amostra PAF e submetidos ao laser (L-A). Resultado semelhante foi encontrado no grupo de animais que receberam a doxorrubicina e posteriormente foram submetidos ao laser (Ldx-A). Vale a pena ressaltar que apenas estes dois grupos tiveram o volume do tumor diminuído em relação ao observado nos animais com tumor. Ainda que o grupo tratado com TFD e o da terapia fotodinâmica conjugado com a doxorrubicina (TFDdx-A) tenham apresentado alterações diferentes em relação a sub-grupos (PAF-A e L-A), os mesmos não apresentaram diferenças estatísticas entre si e nem em relação ao grupo dos animais portadores de tumor (T-A) (**Figura 16**).

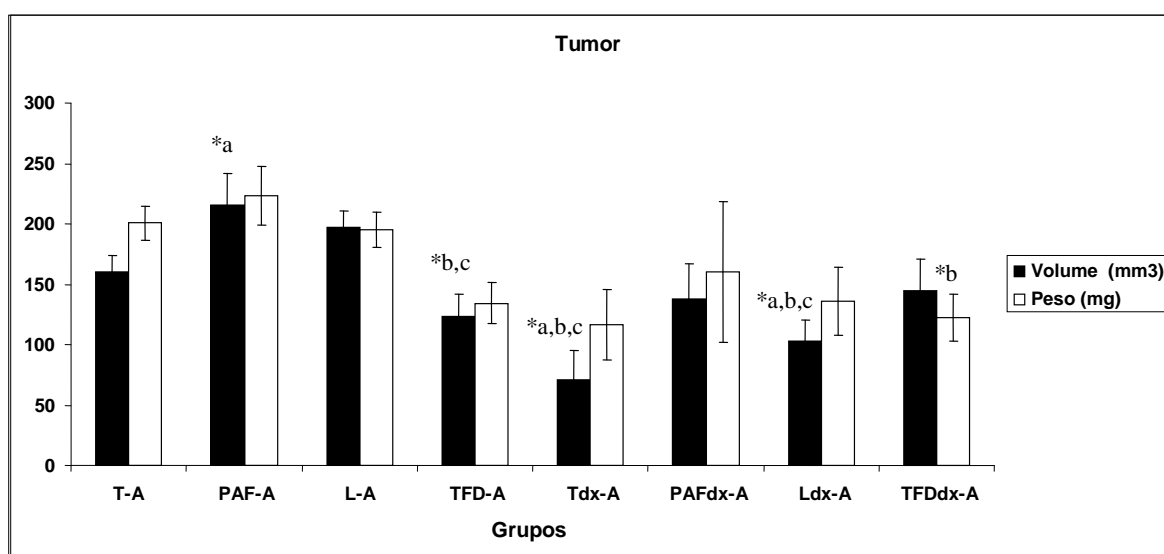


Figura 16: Avaliação do volume (mm³) e do peso (mg) tumoral. T-A: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-A: animais com tumor tratados com PAF; L-A: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-A: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica; Tdx-A: animais com tumor tratados com

doxorrubicina; PAFdx-A: animais com tumor tratados com PAF e doxorrubicina; Ldx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos ao laser; TFDdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos à terapia fotodinâmica Para as análises estatísticas: T-A corresponde a (a); PAF-A corresponde a (b); L-A corresponde a (c); TFD-A corresponde a (d); Tdx-A corresponde a (e); PAFdx-A corresponde a (f); Ldx-A corresponde a (g); TFDdx-A corresponde a (h) * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.4.1.3 Dimensões dos tumores

No que tange às diferentes dimensões dos tumores, os resultados mostraram que nenhum dos tratamentos sem o uso do quimioterápico (PAF-A, L-A e TFD-A) alterou significativamente a largura e a espessura dos tumores em relação ao grupo T-A, como também nenhuma alteração estatística foi encontrada entre os diferentes tratamentos. Porém, em relação ao comprimento dos tumores, tanto o tratamento com a amostra PAF quanto o grupo exposto ao laser induziu aumento estatisticamente significativo em relação ao observado no grupo de animais portadores de tumor (T-A). Na comparação entre os diferentes tratamentos, os animais tratados com terapia fotodinâmica (TFD-A) apresentaram diminuição estatisticamente significativa do comprimento em relação aos tratamentos com PAF e com laser (L-A), valendo lembrar que os mesmos compõem a TFD. Porém, o grupo da TFD não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais portadores de tumor (T-A).

Em relação às dimensões tumorais dos grupos tratados com doxorrubicina, as análises estatísticas revelaram que o grupo portador de tumor que recebeu tratamento quimioterápico (Tdx-A) teve a largura estatisticamente diminuída tanto em relação ao grupo de animais tratados com a amostra PAF quanto ao grupo submetido ao laser (L-A), não diferindo estatisticamente dos animais portadores de tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento (T-A). O comprimento, por sua vez, diminuiu em relação ao grupo portador de tumor (T-A) e também a todos os outros grupos que não receberam o tratamento da doxorrubicina, ou seja, PAF-A, L-A e TFD-A. Os grupos que fizeram uso do quimioterápico tratados com a amostra PAFdx-A e Ldx-A, que são controles específicos da TFDdx, também apresentaram diminuição estatisticamente significativa em relação aos grupos PAF-A e L-A sendo que o último grupo ainda apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos animais portadores de tumor (T-A). Entretanto, o grupo de animais que recebeu os tratamentos da terapia fotodinâmica juntamente com a doxorrubicina (TFDdx-A) não mostrou alterações estatisticamente significativas, em nenhum dos três parâmetros, em relação a todos

os outros grupos experimentais que foram ou não tratados com o quimioterápico. Por outro lado, a espessura tumoral não foi estatisticamente alterada independentemente se o tratamento teve ou não presença de quimioterápico (**Figura 17**).

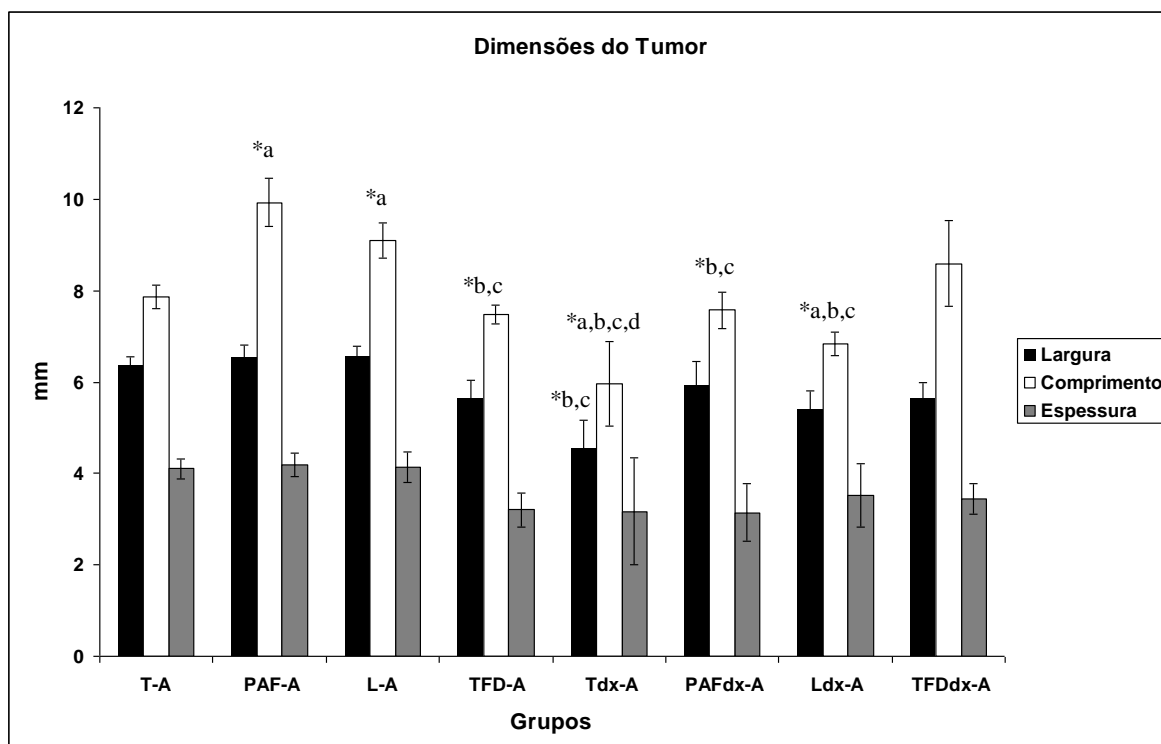
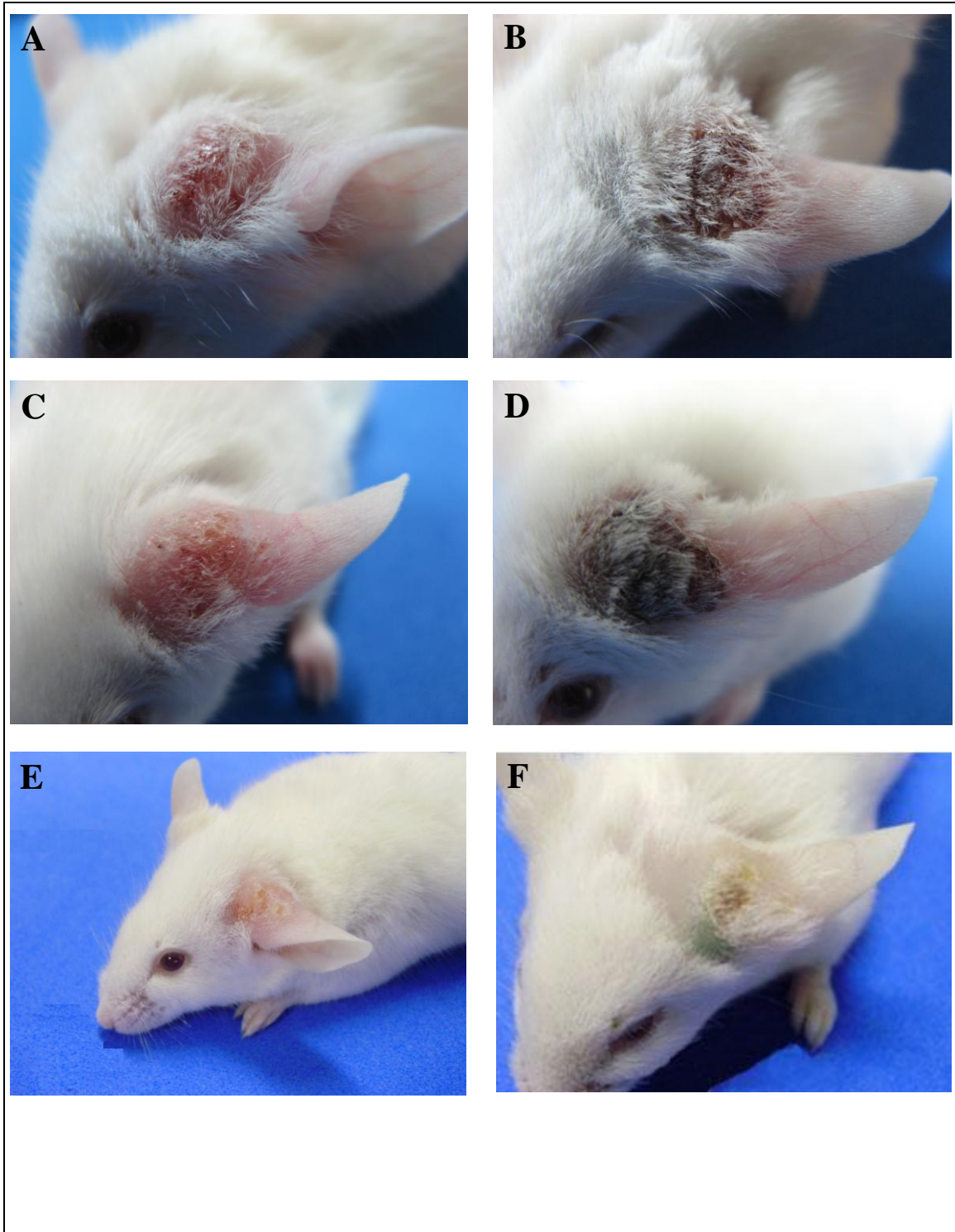


Figura 17: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral. T-A: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-A: animais com tumor tratados com PAF; L-A: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-A: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica; Tdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina; PAFdx-A: animais com tumor tratados com PAF e doxorrubicina; Ldx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos ao laser; TFDdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-A corresponde a (a); PAF-A corresponde a (b); L-A corresponde a (c); TFD-A corresponde a (d); Tdx-A corresponde a (e); PAFdx-A corresponde a (f); Ldx-A corresponde a (g); TFDdx-A corresponde a (h) * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.4.1.4 Observações macroscópicas

Observações clínicas macroscópicas foram realizadas após o último dia de tratamento, 24 horas antes do sacrifício dos animais. As mesmas permitiram avaliar, de forma superficial o grau de necrose após os diferentes tratamentos. A média de necrose encontrada nos animais portadores de tumor foi de 22%. O grupo administrado com PAF-A foi maior, 44%. Para o grupo de animais submetido ao laser, a média foi de 19%. O tratamento com a terapia

fotodinâmica mostrou, macroscopicamente, necrose de 59%. Já para os tratamentos associados ao quimioterápico doxorrubicina (Tdx-A, PAFdx-A, Ldx-A e TFD dx-A) os resultados encontrados foram 38%, 38%, 25% e 44%, respectivamente (**Figura 18**).



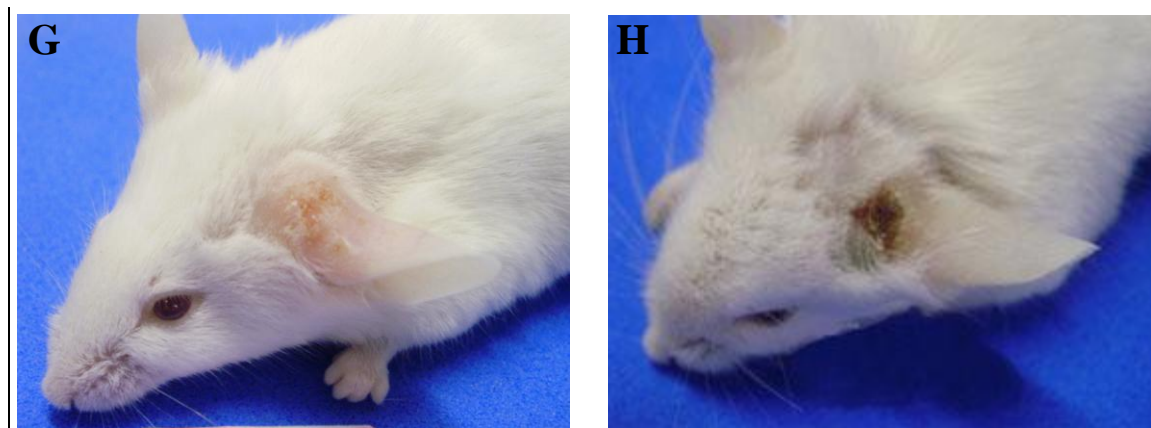


Figura 18: Animais com diferentes graus de necrose (Grupo A). (A): animais portadores de tumor; (B): animais tratados com a amostra PAF; (C): animais submetidos ao laser; (D): animais tratados com TFD; (E): animais tratados com tumor e doxorubicina; (F): animais com tumor tratados com a amostra PAF e doxorubicina; (G): animais com tumor tratados com doxorubicina e submetidos ao laser; (H): animais com tumor tratados com TFD e doxorubicina.

3.4.2 Porcentagem de necrose do tumor

O percentual de necrose foi avaliado por meio de análises morfométricas onde os resultados mostraram que, na ausência do quimioterápico, no grupo dos animais com tumor (T-A) havia 17,6% de necrose no tecido tumoral. Resultado um pouco maior (22%) foi encontrado no grupo dos animais que receberam a PAF. Por outro lado, nos animais submetidos ao laser (L-A), observou-se que 26% da área do tumor estava necrosada, o que difere estatisticamente do grupo T-A. Entretanto, a maior área de necrose foi encontrada no grupo tratado com terapia fotodinâmica, em que 66% do tecido tumoral estava com áreas de necrose, resultado este que diferiu, estatisticamente, de todos os outros grupos. As análises morfométricas revelaram que todos os tratamentos que incluíram a doxorubicina (Tdx-A, PAFdx-A, Ldx-A e TFDdx-A) induziram aumento estatisticamente significativo em relação aos tratamentos onde não foi utilizado o quimioterápico (T-A, PAF-A, L-A), com exceção do grupo tratado com a TFD-A. Animais portadores de tumor (Tdx) tratados com o quimioterápico, por exemplo, apresentaram 64% de necrose no tecido tumoral, valor próximo ao observado com a TFD (66%). Nos tratamentos associados com a doxorubicina, o percentual de necrose dos tumores não diferiu estatisticamente deste, tendo sido de 59%. nos

animais tratados com a amostra PAF (PAFdx-A), de 55% no grupo submetido ao laser (Ldx-A) e de 59% quando associado à TFD (TFDdx-A) (**Figura 19**).

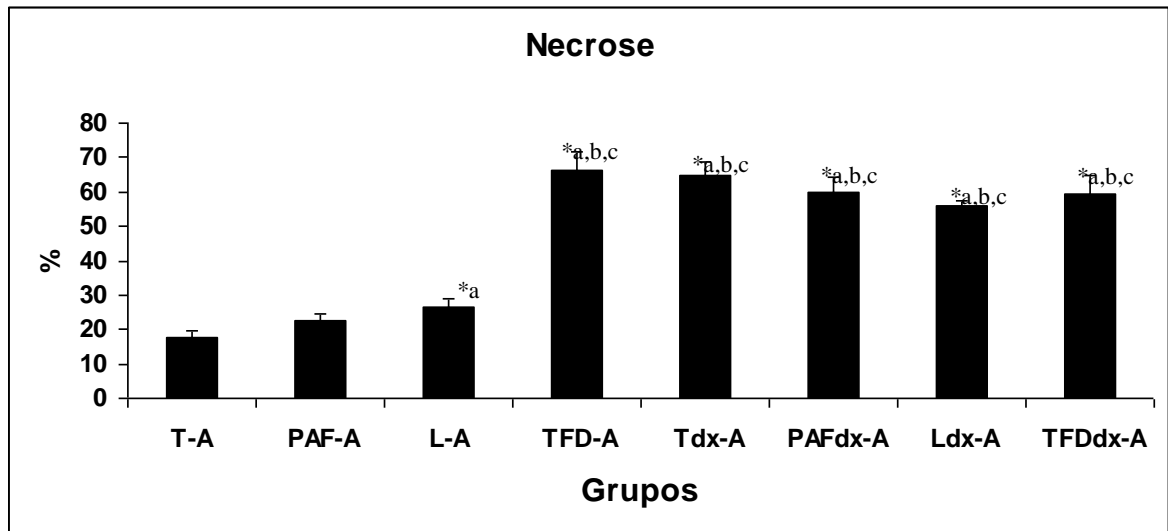


Figura 19: Avaliação da necrose no tecido tumoral. T-A: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-A: animais com tumor tratados com PAF; L-A: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-A: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica; Tdx-A: animais com tumor tratados com doxorubicina; PAFdx-A: animais com tumor tratados com PAF e doxorubicina; Ldx-A: animais com tumor tratados com doxorubicina e submetidos ao laser; TFDdx-A: animais com tumor tratados com doxorubicina e submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-A corresponde a (a); PAF-A corresponde a (b); L-A corresponde a (c); TFD-A corresponde a (d); Tdx-A corresponde a (e); PAFdx-A corresponde a (f); Ldx-A corresponde a (g); TFDdx-A corresponde a (h) * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

As áreas de necrose observadas nos grupos T-A, PAF-A e L-A foram identificadas especialmente nas áreas centrais do tumor. No grupo que recebeu a terapia fotodinâmica (TFD-A), entretanto, a necrose foi identificada não somente nas áreas centrais do tumor, mas também na região periférica, onde foi observada presença de infiltrados inflamatórios, além de hemorragias em vasos sanguíneos.

Os tecidos tumorais viáveis foram caracterizados pela presença de células com núcleos intactos e limite citoplasmático. Por outro lado, a necrose tecidual foi identificada pela presença de um tecido eosinofílico, amorfo, com células sem integridade da membrana citoplasmática e ausência de núcleo.

3.4.3 Análises Hematológicas

3.4.3.1 Contagem de Leucócitos totais

O efeito pró-inflamatório da terapia fotodinâmica foi avaliado, após o período experimental de 9 dias, por meio da contagem das células do sangue periférico. Os resultados das análises do número total de leucócitos mostraram que tanto o grupo tratado com a amostra PAF-A quanto o grupo submetido à TFD-A, ambos na ausência da doxorrubicina, mostraram aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo de animais saudáveis (C-A) e animais portadores de tumor (T-A). Entretanto, a inoculação intratumoral da doxorrubicina nos animais portadores de tumor (Tdx-A) não alterou estatisticamente seus valores nem em relação ao mesmo grupo que não recebeu tratamento quimioterápico (T-A) e nem em relação aos animais saudáveis (C-A). O tratamento com a amostra PAF juntamente com o quimioterápico (PAFdx-A), que é controle específico da TFDdx, por sua vez, mostrou diminuição estatisticamente significativa tanto em relação aos animais portadores de tumor (T-A), quanto aos animais tratados com a TFD-A. Entretanto, a combinação da terapia fotodinâmica com a doxorrubicina (TFDdx-A) induziu aumento estatisticamente significativo, tanto em relação aos animais saudáveis, quanto em relação aos animais tratados com a amostra PAF e quimioterápico juntos (PAFdx-A) (**Figura 20**).

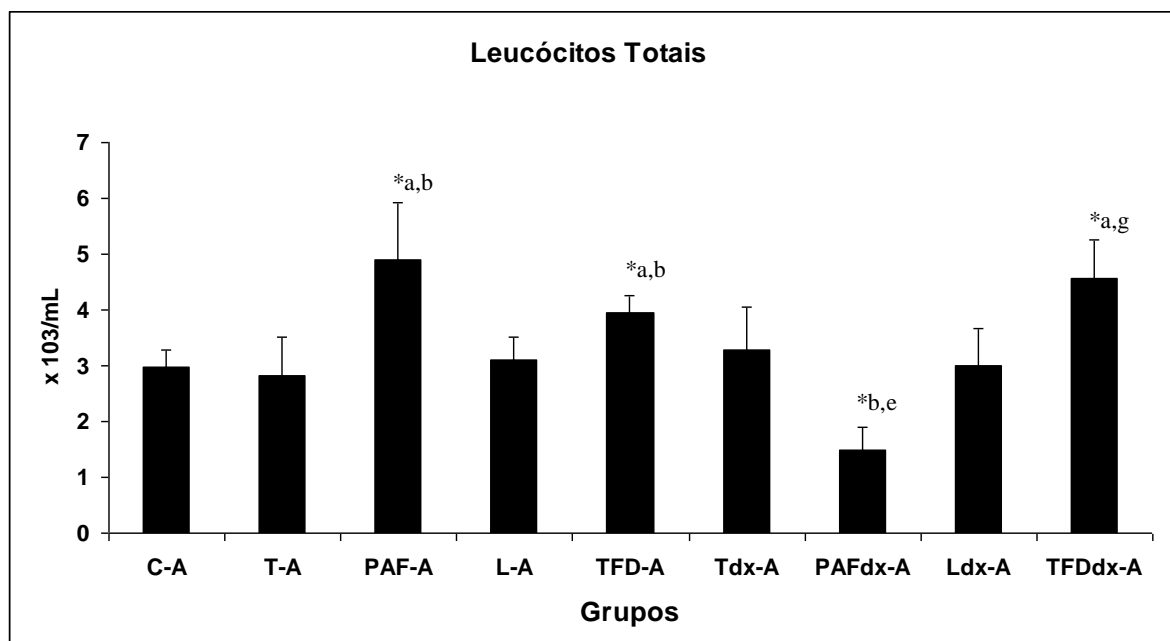


Figura 20: Contagem de leucócitos totais do sangue periférico. C-A: animais saudáveis; T-A: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-A: animais com tumor tratados com PAF; L-A: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-A: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica; Tdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina; PAFdx-A: animais com tumor tratados com PAF e

doxorrubicina; Ldx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos ao laser; TFDdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: C-A corresponde a (a); T-A corresponde a (b); PAF-A corresponde a (c); L-A corresponde a (d); TFD-A corresponde a (e); Tdx-A corresponde a (f); PAFdx-A corresponde a (g); Ldx-A corresponde a (h); TFDdx-A corresponde a (i) * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.4.3.2 Análises Citométricas

3.4.3.2.1 Glóbulos Brancos

A avaliação da contagem diferencial de leucócitos durante 9 dias experimentais mostrou que independentemente dos tipos de tratamentos, na presença ou não de doxorrubicina, os resultados foram semelhantes, ou seja, houve uma diminuição estatisticamente significativa na população de linfócitos com um aumento concomitante na população de neutrófilos em relação aos animais saudáveis, permanecendo a população de eosinófilos sem nenhuma alteração estatística (**Figura 21**).

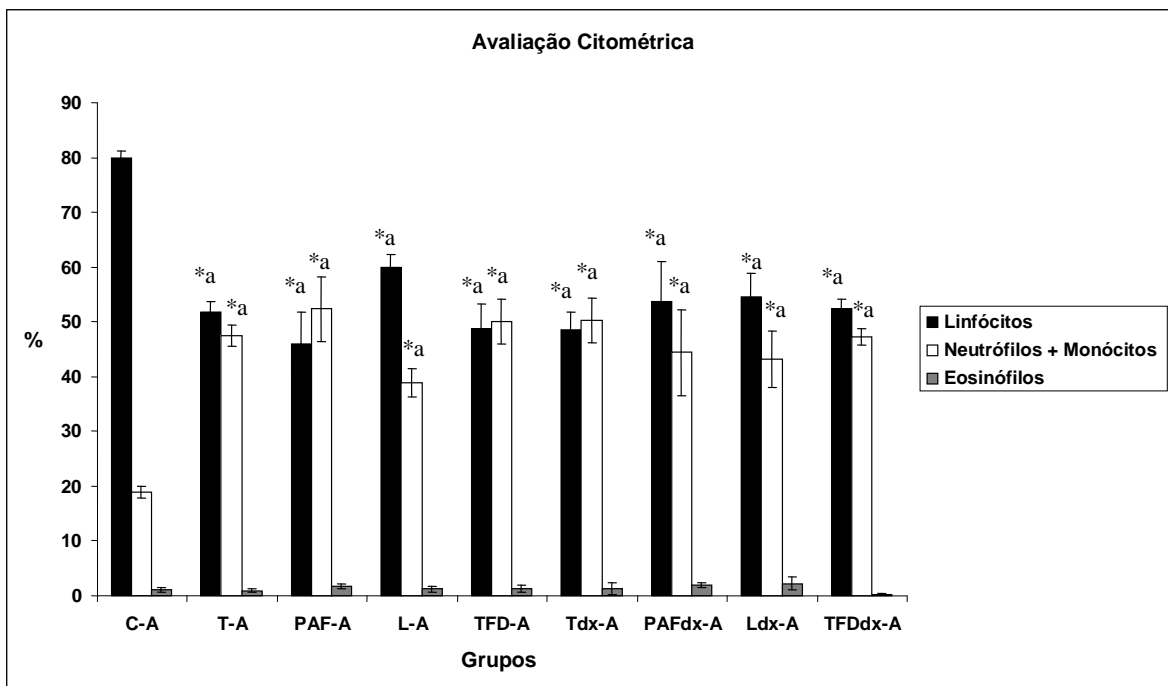


Figura 21: Contagem de glóbulos brancos do sangue periférico. C-A: animais saudáveis; T-A: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-A: animais com tumor tratados com PAF; L-A: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-A: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica; Tdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina; PAFdx-A: animais com tumor tratados com PAF e doxorrubicina; Ldx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos ao laser; TFDdx-A: animais com tumor tratados com doxorrubicina e submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: C-A corresponde a (a); T-A corresponde a (b); PAF-A corresponde a (c); L-A corresponde a (d); TFD-A corresponde

a (e); Tdx-A corresponde a (f); PAFdx-A corresponde a (g); Ldx-A corresponde a (h); TFDdx-A corresponde a (i) * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.4.3.2.2 Glóbulos Vermelhos

A análise do eritrograma revelou que após 9 dias experimentais a inoculação de células tumorais de Ehrlich (T-A) mostrou diminuição estatisticamente significativa de dois parâmetros, HCM e CHCM, em relação aos animais saudáveis. O tratamento com a TFD sem a associação do quimioterápico (TFD-A), por sua vez, induziu diminuição estatisticamente significativa na população de eritrócitos quando comparados aos animais saudáveis (C-A), portadores de tumor (T-A) e aos expostos ao laser (L-A); diminuição da HGB em relação aos animais tratados com a amostra PAF e, ainda, diminuição do HCT em relação aos animais saudáveis (C-A) e aos portadores de tumor (T-A). Porém, a injeção intratumoral da doxorrubicina nos animais portadores de tumor (Tdx-A) não mostrou alterações significativas em seus valores em relação aos animais saudáveis, exceto no índice CHCM, onde houve diminuição estatisticamente significativa. Porém, em relação aos animais portadores de tumor que não receberam tratamento com quimioterápico (T-A), os resultados foram semelhantes. Entretanto, o tratamento conjugado da doxorrubicina com a terapia fotodinâmica (TFDdx-A) mostrou diminuição estatisticamente significativa em dois parâmetros HCT e CHCM em relação aos animais saudáveis. Contudo, não mostrou alterações estatisticamente significativas tanto em relação aos animais portadores de tumor (T-A), quanto em relação aos animais portadores de tumor tratados com quimioterapia (Tdx-A) (**Tabela 4**).

Tabela 4: Grupo A- resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupo | Tratamento | Eritrócitos | HGB | HCT | VCM | HCM | CHCM | RDW |
|------------------|------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------|
| | | (x 10 ⁶ /μL) | (g/dL) | (%) | (fL) | (pg) | (g/dL) | (%) |
| a | C-A | 8,82 ± 0,11 | 12,76 ± 0,09 | 31,54 ± 0,31 | 35,75 ± 0,10 | 14,46 ± 0,10 | 40,51 ± 0,22 | 13,01 ± 0,09 |
| b | T-A | 8,61 ± 0,16 | 11,95 ± 0,21 | 30,71 ± 0,47 | 35,69 ± 0,32 | 13,88 ± 0,12 ^a | 38,93 ± 0,23 ^a | 13,60 ± 0,25 |
| c | PAF-A | 6,56 ± 0,73 ^{a,b} | 9,24 ± 0,92 ^{a,b} | 23,27 ± 2,47 ^{a,b} | 35,56 ± 0,38 | 14,21 ± 0,27 | 39,91 ± 0,45 | 14,14 ± 0,67 |
| d | L-A | 8,47 ± 0,11 ^{a,c} | 11,93 ± 0,18 ^c | 30,48 ± 0,45 ^{a,c} | 35,98 ± 0,10 | 14,08 ± 0,08 ^a | 39,13 ± 0,17 ^a | 13,13 ± 0,24 |
| e | TFD-A | 8,12 ± 0,18 ^{a,b,d} | 11,38 ± 0,28 ^c | 29,01 ± 0,63 ^{a,b} | 35,73 ± 0,24 | 13,99 ± 0,10 | 39,19 ± 0,19 | 13,98 ± 0,26 |
| f | Tdx-A | 7,84 ± 0,34 | 11,08 ± 0,29 | 29,60 ± 1,37 | 37,95 ± 2,42 | 14,15 ± 0,33 | 37,58 ± 1,47 ^a | 13,45 ± 0,39 |
| g | PAFdx-A | 8,03 ± 0,38 ^a | 10,90 ± 0,50 | 28,30 ± 1,30 ^a | 35,25 ± 0,05 | 13,60 ± 0,00 ^{a,d} | 38,50 ± 0,00 ^{a,c,d} | 13,75 ± 0,35 |
| h | Ldx-A | 7,64 ± 0,37 ^{a,b,d} | 10,9 ± 0,45 ^a | 27,30 ± 1,12 ^{a,b,d} | 35,80 ± 0,66 | 14,28 ± 0,12 ^b | 39,93 ± 0,53 | 13,50 ± 0,58 |
| i | TFDdx-A | 8,33 ± 0,18 ^{c,h} | 11,8 ± 0,23 ^c | 30,14 ± 0,58 ^{a,c} | 36,21 ± 0,27 | 14,18 ± 0,12 ^g | 39,16 ± 0,12 ^{a,g} | 14,20 ± 0,26 |
| P-valores | | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,195 | 0,018 | 0,000 | 0,033 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). HGB = Hemoglobina; HCT = Hematócito; VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (do inglês *Red Cell Distribution Width*); g/dL = gramas por decilitros; fl = femtolitros; pg = picograma.. Para as análises estatísticas: C-A corresponde a (a); T-A corresponde a (b); PAF-A corresponde a (c); L-A corresponde a (d); TFD-A corresponde a (e); Tdx-A corresponde a (f); PAFdx-A corresponde a (g); Ldx-A corresponde a (h); TFDdx-A corresponde a (i); A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

3.4.4 Plaquetas

Os resultados do plaquetograma revelaram que após a injeção de células tumorais de Ehrlich (T-A), a população de plaquetas teve um aumento estatisticamente significativo em relação aos animais saudáveis. Porém, o tratamento com a TFD induziu aumento, tanto na população de plaquetas, quanto no índice plaquetário P-LCR. Por sua vez, o tratamento com o quimioterápico nos animais portadores de tumor (Tdx-A) mostrou que após um período experimental de 9 dias, a presença da doxorrubicina não causou nenhuma alteração no plaquetograma em relação aos animais saudáveis (C-A), ou aos animais portadores de tumor (T-A). O tratamento com o quimioterápico nos animais submetidos à TFD (TFDdx-A) provocou diminuição estatisticamente significativa no parâmetro PDW em relação aos animais saudáveis, não diferindo seus valores, tanto em relação aos animais portadores de tumor (T-A), quanto em relação aos animais portadores de tumor tratados com quimioterapia (Tdx-A) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Grupo A- resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| G | Tratamento | Plaquetas | VPM | P-LCR | PDW |
|------------------|------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | (x 10 ³ /μL) | (fl) | (%) | (fl) |
| a | C-A | 1172,47 ± 46,50 | 6,31 ± 0,06 | 6,44 ± 0,31 | 6,77 ± 0,04 |
| b | T-A | 1496,13 ± 51,52 ^a | 6,54 ± 0,11 | 8,10 ± 0,87 | 6,80 ± 0,07 |
| c | PAF-A | 1503,00 ± 314,21 ^a | 7,03 ± 0,14 ^a | 9,43 ± 0,47 ^a | 7,30 ± 0,21 ^a |
| d | L-A | 1366,13 ± 70,93 ^a | 6,54 ± 0,07 | 7,83 ± 0,51 ^a | 6,86 ± 0,07 |
| e | TFD-A | 1528,00 ± 107,16 ^a | 6,70 ± 0,10 | 8,44 ± 0,64 ^a | 6,91 ± 0,12 |
| f | Tdx-A | 1312,50 ± 185,50 | 6,57 ± 0,27 | 7,53 ± 1,39 | 6,87 ± 0,32 |
| g | PAFdx-A | 1219 | 7,10 | 12,70 | 6,90 |
| h | Ldx-A | 1807,67 ± 85,79 ^{a,b,d} | 6,30 ± 0,15 ^c | 6,87 ± 1,65 | 6,53 ± 0,03 ^{a,b,c,d} |
| i | TFDdx-A | 1389,88 ± 84,75 ^h | 6,34 ± 0,11 ^c | 6,27 ± 1,02 ^c | 6,57 ± 0,12 ^{a,c} |
| P-valores | | 0,005 | 0,000 | 0,026 | 0,035 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= porcentagem de plaquetas gigantes (do inglês, *platelet large cell ratio*); PDW= amplitude da distribuição das plaquetas (do inglês, *platelet distribution width*). Para as análises estatísticas: C-A corresponde a (a); T-A corresponde a (b); PAF-A corresponde a (c); L-A corresponde a (d); TFD-A corresponde a (e); Tdx-A corresponde a (f); PAFdx-A corresponde a (g); Ldx-A corresponde a (h); TFDdx-A corresponde a (i); A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

3.4.5 Análises Bioquímicas

No que concerne aos ensaios bioquímicos, os resultados revelaram que o desenvolvimento do tumor (T-A) nos animais durante 9 dias, levou à diminuição estatisticamente significativa dos valores da bilirrubina direta e da fosfatase alcalina e ao aumento também significativo dos valores de bilirrubina indireta e TGO, em relação aos animais saudáveis (C-A). O tratamento com terapia fotodinâmica (TFD-A), por sua vez, mostrou aumento estatisticamente significativo no parâmetro bilirrubina indireta e diminuição estatisticamente significativa na fosfatase alcalina em relação aos animais saudáveis. Vale dizer que estes resultados com a terapia fotodinâmica não diferiram dos animais portadores de tumor (T-A), ainda que seus controles específicos (PAF-A) e (L-A) tenham tido algumas outras diferenças, tanto em relação aos saudáveis quanto aos com tumor. O tratamento da doxorrubicina nos animais portadores de tumor (Tdx-A) aumentou estatisticamente o índice TGO em relação ao grupo de animais saudáveis (C-A), não alterando significativamente em relação aos animais portadores de tumor que não foram tratados com o quimioterápico (T-A). Entretanto, os tratamentos combinados de TFD e doxorrubicina (TFDdx-A) aumentaram significativamente os valores de TGO em relação aos animais saudáveis. Ao mesmo tempo, este parâmetro aparece diminuído significativamente, tanto em relação aos animais portadores de tumor (T-A), quanto em relação ao grupo de animais portadores de tumor que foram tratados com doxorrubicina(Tdx-A) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Grupo A- resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| G | T | Bilirrubina Total (mg/dL) | Bilirrubina direta (mg/dL) | Bilirrubina indireta (mg/dL) | TGO (U/L) | TGP (U/L) | GGT (U/L) | Fosfatase Alcalina (U/L) | Creatinina (mg/dL) | Uréia (mg/dL) |
|------------------|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| a | C-A | 0,10 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 70,63 ± 3,99 | 34,62 ± 1,88 | 1,88 ± 0,09 | 114,75 ± 8,64 | 0,20 ± 0,03 | 59,13 ± 2,15 |
| b | T-A | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 ^a | 0,08 ± 0,00 ^a | 185,50 ± 33,26 ^a | 36,00 ± 2,89 | 1,75 ± 0,25 | 68,38 ± 7,98 ^a | 0,20 ± 0,08 | 56,88 ± 4,56 |
| c | PAF-A | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 ^a | 0,08 ± 0,00 ^a | 236,43 ± 30,10 ^a | 43,71 ± 2,71 | 2,00 ± 0,00 | 40,86 ± 5,98 ^{ab} | 0,16 ± 0,02 | 46,00 ± 3,44 ^a |
| d | L-A | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 ^a | 0,08 ± 0,00 ^a | 95,50 ± 22,36 ^c | 32,63 ± 5,82 | 2,25 ± 0,25 | 42,00 ± 8,51 ^{ab} | 0,44 ± 0,09 ^{abc} | 39,25 ± 8,50 ^a |
| e | TFD-A | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 ^a | 162,38 ± 84,17 | 29,63 ± 8,63 | 1,88 ± 0,13 | 43,62 ± 6,83 ^a | 0,29 ± 0,05 | 43,50 ± 7,54 |
| f | Tdx-A | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 ^d | 0,07 ± 0,00 ^d | 173,50 ± 21,17 ^a | 37,25 ± 4,07 | 1,50 ± 0,29 ^{cd} | 52,50 ± 9,56 | 0,25 ± 0,06 | 55,00 ± 2,61 |
| g | PAFdx-A | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 ^a | 0,08 ± 0,00 ^a | 159,50 ± 13,59 ^a | 27,00 ± 1,58 | 1,75 ± 0,25 | 46,75 ± 10,59 ^a | 0,25 ± 0,03 ^c | 50,00 ± 3,19 |
| h | Ldx-A | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 ^d | 0,07 ± 0,00 ^d | 162,25 ± 19,73 ^{ad} | 34,50 ± 4,17 | 2,00 ± 0,00 | 87,75 ± 17,85 ^{cd} | 0,18 ± 0,03 | 55,50 ± 4,66 |
| i | TFDdx-A | 0,28 ± 0,18 | 0,04 ± 0,01 ^{d,e} | 0,23 ± 0,17 | 106,29 ± 17,12 ^{ab,c,f} | 25,29 ± 3,77 | 2,86 ± 1,06 | 42,00 ± 5,96 | 0,20 ± 0,02 | 39,29 ± 5,53 |
| P-valores | | 0,393 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,247 | 0,519 | 0,000 | 0,067 | 0,025 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; T= Tratamento; TGO= transaminase glutâmico oxalacética; TGP= transaminase glutâmico pirúvica; GGT= gama-glutamil transferase; mg/dL= miligramas por decilitro; U/L= unidades por litro. Para as análises estatísticas: C-A corresponde a (a); T-A corresponde a (b); PAF-A corresponde a (c); L-A corresponde a (d); TFD-A corresponde a (e); Tdx-A corresponde a (f); PAFdx-A corresponde a (g); Ldx-A corresponde a (h); TFDdx-A corresponde a (i); A (s) letra (s) aponta (s) diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

3.4.6 Análises histológicas

3.4.6.1 Rim

Macroscopicamente, os rins de todos os animais deste estudo apresentaram aparência normal, com coloração rosa-vermelha e consistência firme. Ao microscópio de luz, apresentavam-se divididos em duas zonas: cortical localizada mais externamente, e medular com localização mais central (**Figura 22- A**). Na região cortical encontram-se os corpúsculos renais os quais são constituídos pelo glomérulo renal, tufo de capilares e cápsula de Bowman contendo dois folhetos, visceral e parietal (**Figura 22- B**). Este último formado por células epiteliais pavimentosas que limitam o espaço capsular. Ainda na cortical distinguem-se os túbulos contorcidos proximais e distais. Nos grupos de animais controle, não foram observadas alterações histológicas nas diferentes estruturas do rim, sob microscopia de luz. Porém, discreto infiltrado inflamatório mononuclear de distribuição predominantemente focal foi observado em dois animais que foram tratados com o quimioterápico doxorrubicina e submetidos à terapia fotodinâmica (TFDdx-A).

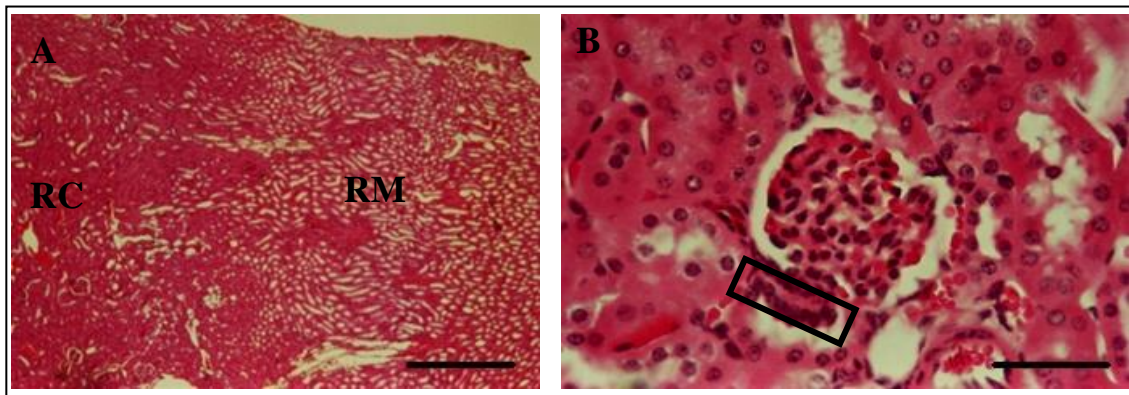


Figura 22: Fotomicrografia do rim. Em (A) RC: região cortical, RM: região medular. O tamanho da barra corresponde a 250 μm . (B) Ao centro, corpúsculo renal. No detalhe (retângulo), mácula densa. O tamanho da barra corresponde a 50 μm .

3.4.6.2 Fígado

Neste estudo, os animais de todos os grupos apresentaram macroscopicamente fígado aparentemente normal, com coloração marrom avermelhada e consistência firme. Ao microscópio de luz, a organização histológica do fígado dos camundongos (ver aspecto geral na **Figura 23- A**) consistia em arranjo dos hepatócitos em cordões, alguns deles binucleados; estes cordões estavam dispostos radialmente a partir de uma veia centro lobular contendo sinusóides (**Figura 23- B**) e células de Kupffer . A análise histológica demonstrou que nos animais do grupo controle e nos animais submetidos aos diversos tratamentos os hepatócitos apresentavam grânulos de glicogênio e pequenos vacúolos.

No grupo submetido à Doxorrubicina, a análise histológica do fígado demonstrou algumas células inflamatórias no interior dos vasos próximas à parede vascular (**Figura 23- C**), vacuolização citoplasmática dos hepatócitos caracterizando lesão celular difusa, causa de degeneração citoplasmática (**Figura 23- D**).

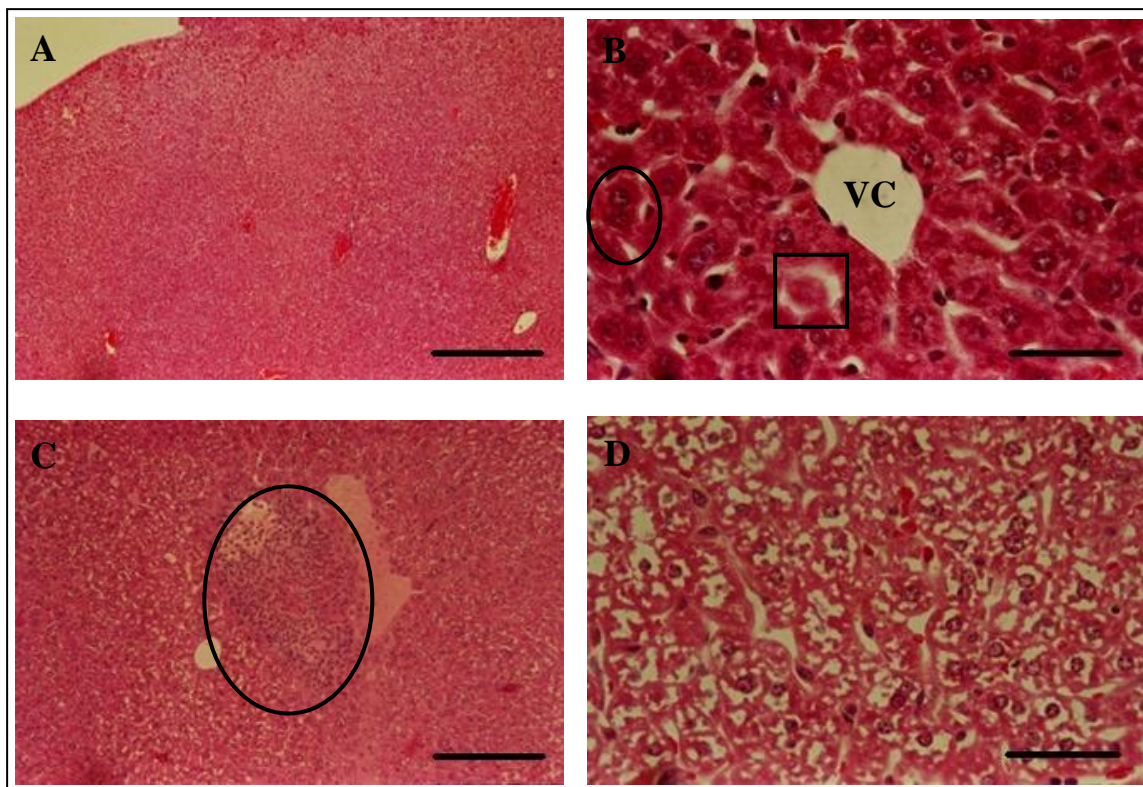


Figura 23: Fotomicrografia do fígado. Em (A) aspecto geral do tecido hepático. O tamanho da barra corresponde a 250 μm .; (B) VC: veia centro lobular, hepatócito binucleado (círculo) e sinuzóides (quadrado). (C) infiltrado

inflamatório próximo a veia. (D) processo de degeneração do fígado. O tamanho da barra para (B), (C) e (D) corresponde a 50 μm .

3.5 Resultados da terapia fotodinâmica do grupo B

O experimento do grupo B teve o intuito de verificar se as alterações causadas por três aplicações da terapia fotodinâmica e observadas após nove dias de implantação do tumor (Grupo A) eram mantidas por um período maior de tempo. Tendo em vista a evolução do tumor, o sacrifício dos animais foi feito sete dias após o último tratamento, perfazendo um total de 15 dias de experimento.

3.5.1 Observações clínicas

3.5.1.1 Peso dos animais

A avaliação do peso dos animais realizada 15 dias após a inoculação das células tumorais, mostrou que o peso final dos animais portadores de tumor teve diminuição estatisticamente significativa em relação aos animais saudáveis. Entretanto, o tratamento com a terapia fotodinâmica mostrou aumento estatisticamente significativo, tanto em relação aos animais portadores de tumor, quanto em relação aos seus controles específicos: PAF-B e L-B (**Figura 24**).

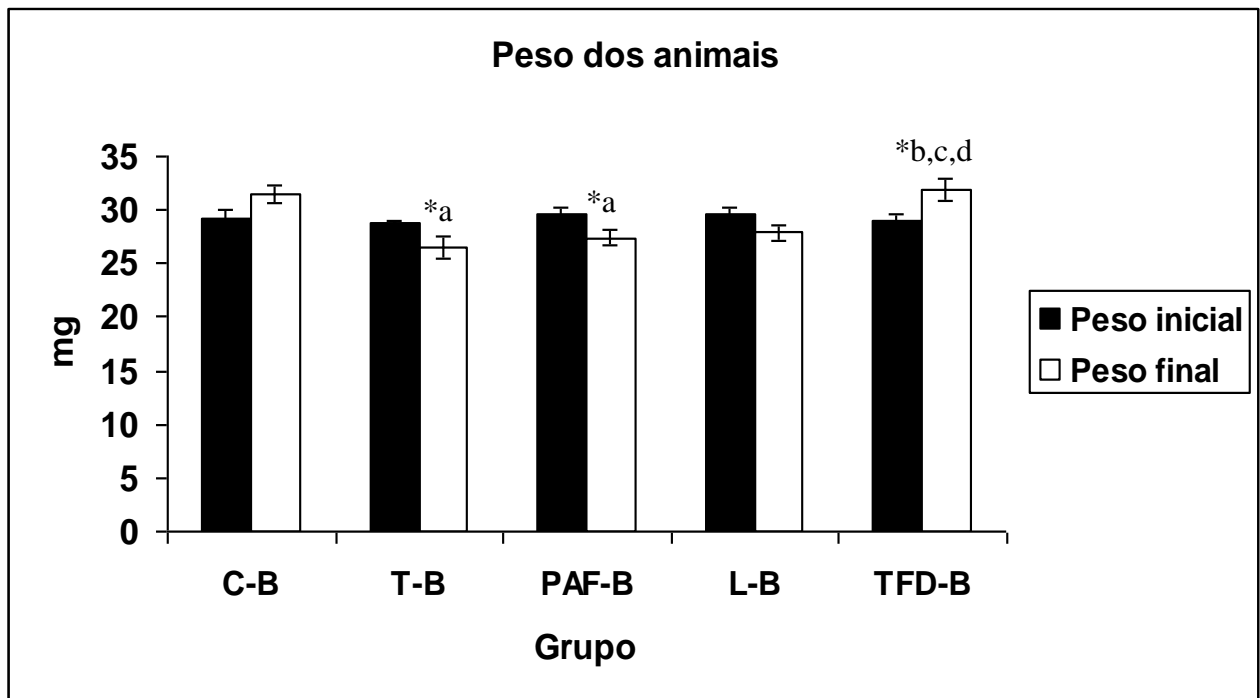


Figura 24: Peso dos animais no 15º dia experimental. C-B: animais saudáveis; T-B: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-B: animais com tumor tratados com PAF; L-B: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-B: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-B corresponde a (a); PAF-B corresponde a (b); L-B corresponde a (c); TFD-B corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.5.1.2 Volume e peso dos tumores

As análises de volume e peso do tumor revelaram que nenhum dos tratamentos (terapia fotodinâmica e seus controles) levou a alterações estatisticamente significativas destes parâmetros em relação aos portadores de tumor. Por outro lado, os animais submetidos à terapia fotodinâmica tiveram aumento estatisticamente significativo, nos dois parâmetros analisados, em relação aos animais de um dos seus controles específicos, os que foram submetidos ao laser (L-B).

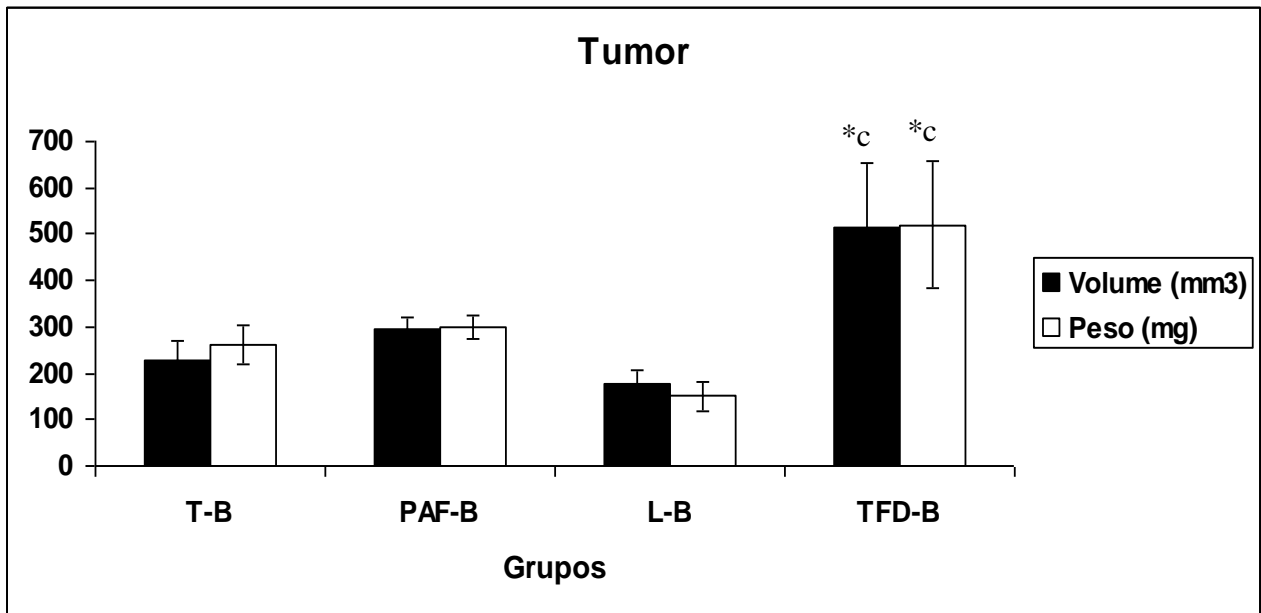


Figura 25: Avaliação do volume (mm³) e do peso (mg) tumoral. T-B: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-B: animais com tumor tratados com PAF; L-B: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-B: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-B corresponde a (a); PAF-B corresponde a (b); L-B corresponde a (c); TFD-B corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.5.1.3 Dimensões dos tumores

No que concerne às dimensões do tumor, as análises mostraram que, 15 dias após a implantação das células de Ehrlich, nenhum dos tratamentos (PAF-B, L-B e TFD-B) alterou significativamente a largura dos tumores em relação ao grupo de animais T-B. Entretanto, em relação ao comprimento e espessura tumoral, a TFD induziu aumento estatisticamente significativo nos dois parâmetros em relação aos animais portadores de tumor, sendo que no comprimento o aumento também foi em relação aos animais expostos ao laser. Estas alterações no grupo TFD foram também observadas em seu controle específico relacionado ao tratamento com a amostra PAF (**Figura 26**).

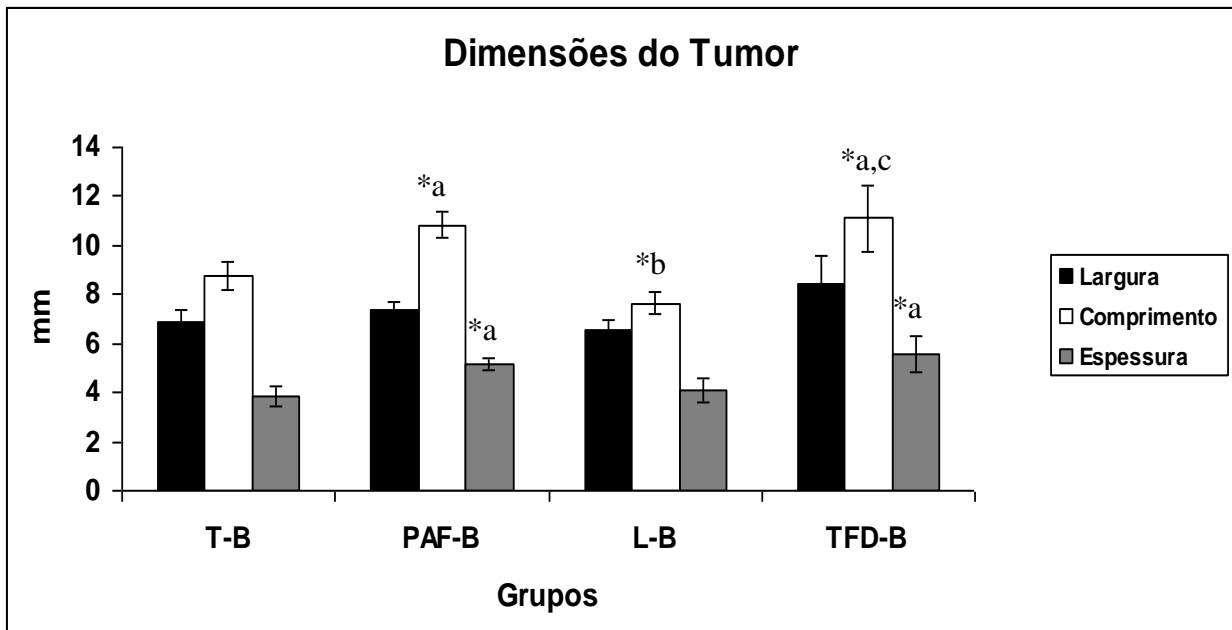


Figura 26: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral. T-B: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-B: animais com tumor tratados com PAF; L-B: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-B: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-B corresponde a (a); PAF-B corresponde a (b); L-B corresponde a (c); TFD-B corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.5.1.4 Observações macroscópicas

As observações macroscópicas foram realizadas 24 horas antes do sacrifício dos animais. A média de necrose encontrada nos animais portadores de tumor foi de 38%. O grupo de animais tratados com a amostra PAF-A sugeriu que 50% do tecido tumoral estava necrosado. Já para o grupo de animais submetido ao laser, a média foi de 31%. Porém, o tratamento com a terapia fotodinâmica mostrou 50% de necrose. (**Figura 27**).

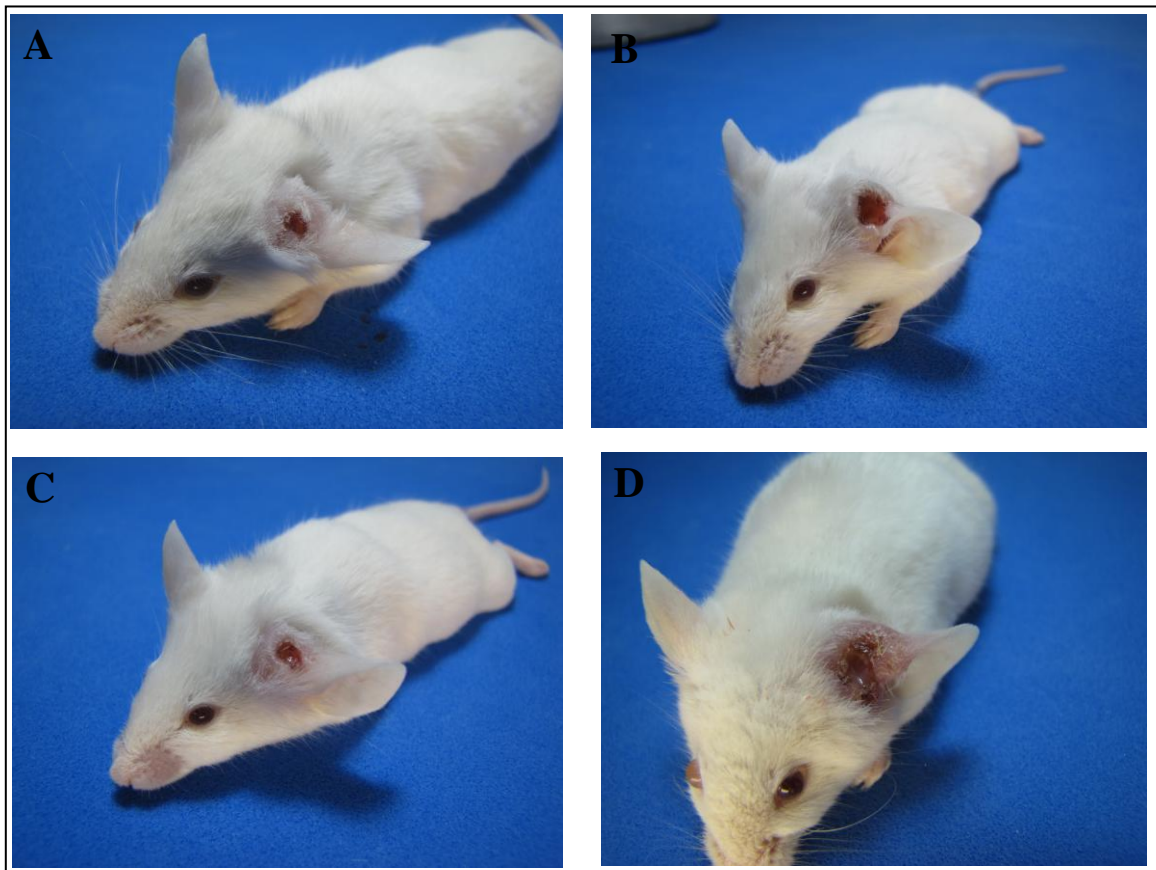


Figura 27: Animais com diferentes graus de necrose (Grupo B). A: animais portadores de tumor (T-B); B: animais tratados com a amostra PAF (PAF-B); C: animais submetidos ao laser (L-B); D: animais tratados com TFD (TFD-B).

3.5.2 Porcentagem de necrose do tumor

As análises morfométricas mostraram que, 15 dias após os experimentos tanto os animais portadores de tumor quanto os animais que receberam a amostra PAF-B ou foram submetidos ao laser o percentual de necrose no tecido tumoral foi muito semelhante, ou seja, 31%, 31% e 33%, respectivamente. Porém, o tratamento com terapia fotodinâmica induziu 60% de necrose na área tumoral, razão pela qual este grupo diferiu estatisticamente dos portadores de tumor e de seus controles específicos (**Figura 28**).

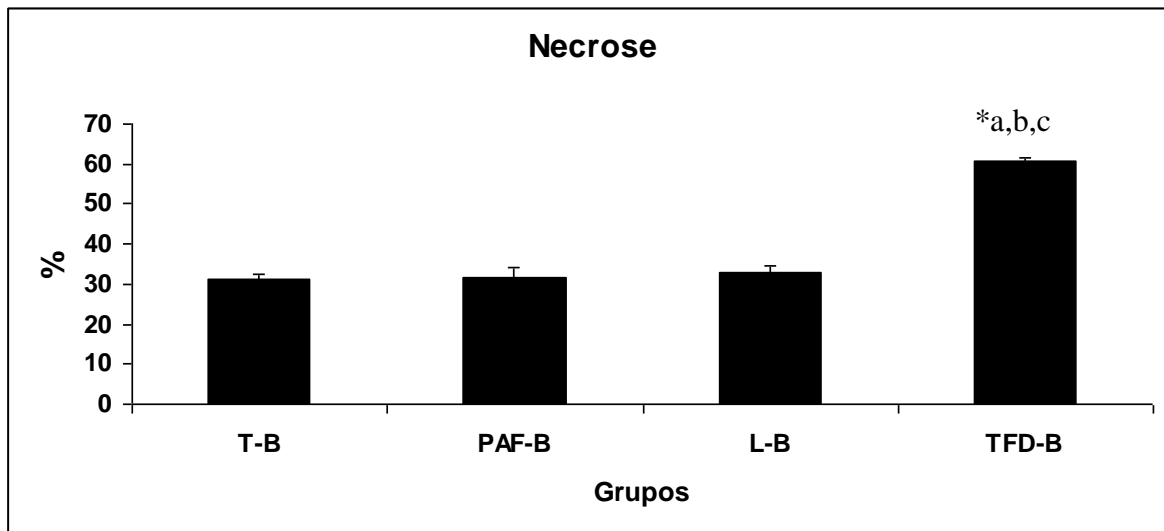


Figura 28: Avaliação da largura, do comprimento e da espessura tumoral. T-B: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-B: animais com tumor tratados com PAF; L-B: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-B: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-B corresponde a (a); PAF-B corresponde a (b); L-B corresponde a (c); TFD-B corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.5.3 Análises Hematológicas

3.5.3.1 Contagem de Leucócitos totais

A contagem global de leucócitos realizada após o período experimental de 15 dias mostrou que a inoculação das células tumorais de Ehrlich (T-B) não levou a diferenças estatisticamente significantes em relação aos animais saudáveis (C-B). Da mesma forma, o tratamento com a terapia fotodinâmica não apresentou diferenças estatísticas em relação aos animais saudáveis ou em relação aos animais portadores de tumor. Este tratamento só apresentou diferenças significativas em relação ao controle específico, o de animais submetidos ao laser.

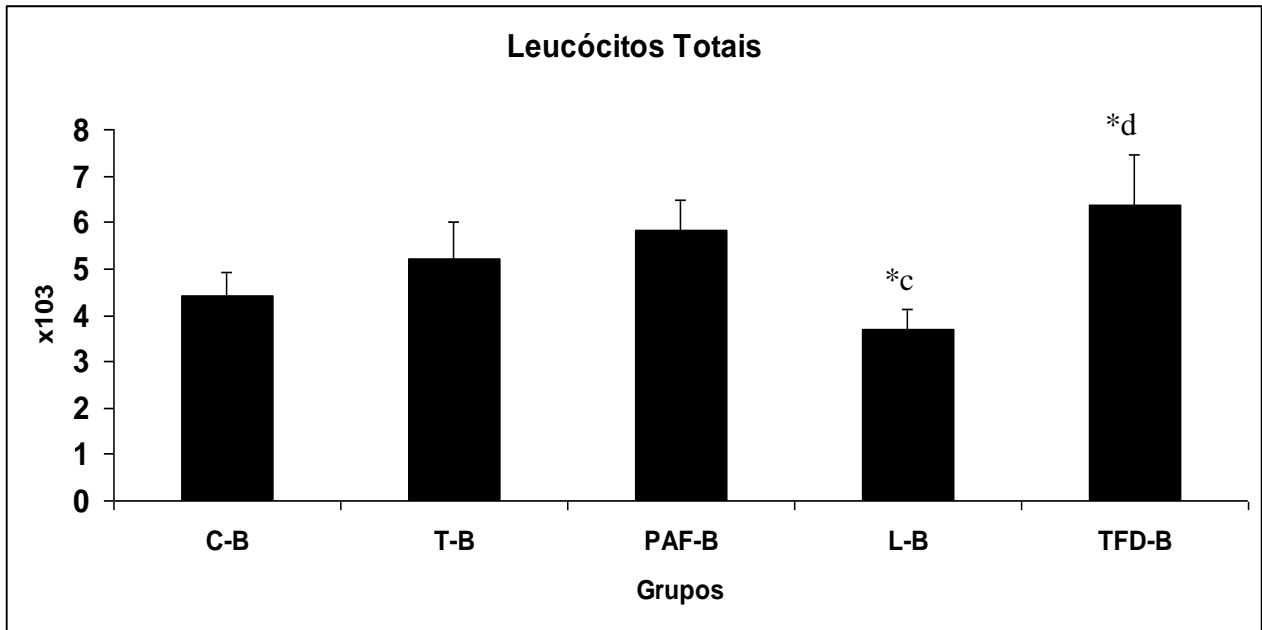


Figura 29: Contagem de leucócitos totais do sangue periférico. C-B: animais saudáveis; T-B: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-B: animais com tumor tratados com PAF; L-B: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-B: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: C-B corresponde a (a); T-B corresponde a (b); PAF-B corresponde a (c); L-B corresponde a (d); TFD-B corresponde a (e). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.5.3.2 Análises Citométricas

3.5.3.2.1 Glóbulos Brancos

Após a implantação das células tumorais (T-B), observou-se um decréscimo estatisticamente significativo na população de linfócitos, em relação aos animais saudáveis (C-A), decréscimo este mantido em todos os grupos experimentais (PAF-B, L-B e TFD-B). No caso dos animais tratados com terapia fotodinâmica, o decréscimo ocorreu também em relação ao seu controle específico constituído por animais expostos ao laser. Porém, não houve diferenças estatisticamente significativas destes grupos em relação aos animais portadores de tumor. A linfopenia, ou seja, a queda na população de linfócitos, ocorreu simultaneamente com o aumento significativo da população de neutrófilos + monócitos em todos os grupos, em relação aos animais saudáveis. Para os animais tratados com a TFD, o aumento ocorreu inclusive em relação

aos animais submetidos ao laser. No que se refere à população de eosinófilos, o grupo de animais tratados com a amostra PAF foi o único a apresentar eosinofilia, ou seja aumento estatisticamente significativo, tanto em relação aos animais saudáveis, quanto em relação aos animais portadores de tumor (Figura 30).

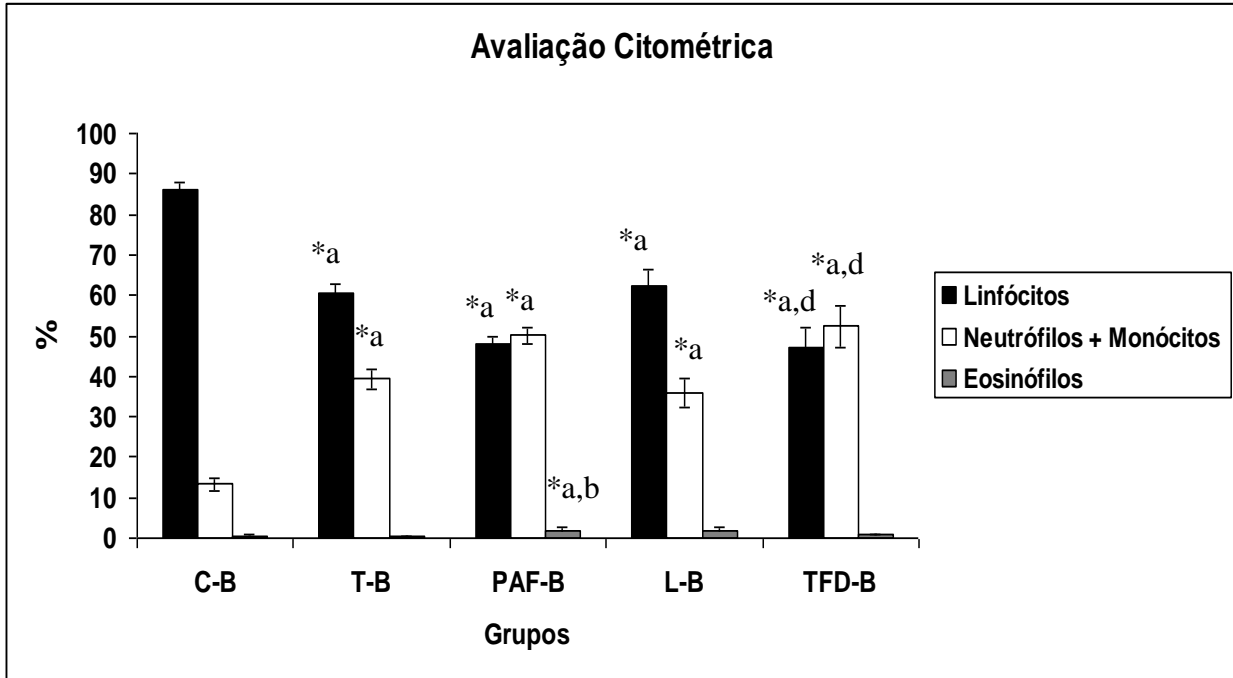


Figura 30: Contagem de de glóbulos brancos do sangue periférico. C-B: animais saudáveis; T-B: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-B: animais com tumor tratados com PAF; L-B: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-B: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: C-B corresponde a (a); T-B corresponde a (b); PAF-B corresponde a (c); L-B corresponde a (d); TFD-B corresponde a (e). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.5.3.2.2 Glóbulos Vermelhos

As análises do eritrograma revelaram que a implantação do tumor de Ehrlich não altera seus índices em relação aos animais saudáveis, com exceção dos parâmetros HCM e CHCM, os quais se encontram estatisticamente diminuídos. O tratamento com a terapia fotodinâmica mostrou resultado semelhante, sendo que o CHCM também apresentou diminuição estatisticamente significativa em relação aos animais submetidos ao laser, um dos controles

específicos da TFD. Além disso, o tratamento TFD alterou o parâmetro RDW que apresenta seus valores aumentados tanto em relação aos animais saudáveis (C-A) e portadores de tumor (T-B), quanto em relação aos seus controles específicos (PAF-B e L-B) (**Tabela 7**).

Tabela 7: Grupo B- resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupo | Tratamento | Eritrócitos | HGB | HCT | VCM | HCM | CHCM | RDW |
|------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| | | (x 10 ⁶ /μL) | (g/dL) | (%) | (fL) | (pg) | (g/dL) | (%) |
| a | C-B | 9,39 ± 0,18 | 13,77 ± 0,19 | 34,13 ± 0,59 | 36,36 ± 0,20 | 14,63 ± 0,13 | 40,39 ± 0,26 | 13,01 ± 0,09 |
| b | T-B | 9,67 ± 0,21 | 13,35 ± 0,31 | 34,29 ± 0,80 | 35,49 ± 0,32 | 13,83 ± ,15 ^a | 38,93 ± 0,17 ^a | 13,76 ± 0,31 |
| c | PAF-B | 9,48 ± 0,53 | 12,83 ± 0,60 | 32,94 ± 1,65 | 34,96 ± 0,39 | 13,61 ± ,21 ^a | 38,99 ± 0,20 ^a | 13,91 ± 0,49 |
| d | L-B | 9,04 ± 0,72 | 12,46 ± 0,99 | 31,58 ± 2,57 | 34,86 ± 0,31 | 13,80 ± ,11 ^a | 39,58 ± 0,24 | 13,88 ± 0,32 |
| e | TFD-B | 8,56 ± 0,47 | 11,57 ± 0,63 | 29,90 ± 1,56 | 35,03 ± 0,45 | 13,48 ± ,19 ^a | 38,51 ± 0,21 ^{a,d} | 16,00 ± 0,55 ^{a,b,c,d} |
| P-valores | | 0,340 | 0,063 | 0,181 | 0,035 | 0,001 | 0,000 | 0,000 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). HGB = Hemoglobina; HCT = Hematócito; VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (do inglês *Red Cell Distribution Width*); g/dL = gramas por decilitros; fl = femtolitros; pg = picograma.. Para as análises estatísticas: C-B corresponde a (a); T-B corresponde a (b); PAF-B corresponde a (c); L-B corresponde a (d); TFD-B corresponde a (e). A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

3.5.4 Plaquetas

As análises do plaquetograma revelaram que a implantação das células tumorais de Ehrlich e os tratamentos com a terapia fotodinâmica ou de seus controles específicos (PAF-B e L-B) não induziram alterações estatisticamente significativas em relação aos animais saudáveis (Tabela 8).

Tabela 8: Grupo B- resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupo | Tratamento | Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | VPM (fl) | P-LCR (%) | PDW (fl) |
|-----------|------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| A | C-B | 1311,14 \pm 70,38 | 6,18 \pm 0,11 | 6,38 \pm 0,46 | 6,76 \pm 0,19 |
| B | T-B | 1728,5 \pm 93,5 | 6,6 \pm 0,11 | 8,64 \pm 0,97 | 6,87 \pm 0,11 |
| C | PAF-B | 1666,57 \pm 324,21 | 6,68 \pm 0,11 | 9,1 \pm 0,51 | 6,93 \pm 0,15 |
| D | L-B | 1429,5 \pm 224,66 | 6,5 \pm 0,06 | 6,9 \pm 1,15 | 6,6 \pm 0,12 |
| E | TFD-B | 1697,5 \pm 106,46 | 6,63 \pm 0,08 | 9,07 \pm 0,85 | 6,62 \pm 0,07 |
| P-valores | | 0,429 | 0,028 | 0,131 | 0,374 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= porcentagem de plaquetas gigantes (do inglês, *platelet large cell ratio*); PDW= amplitude da distribuição das plaquetas (do inglês, *platelet distribution width*). Para as análises estatísticas: C-B corresponde a (a); T-B corresponde a (b); PAF-B corresponde a (c); L-B corresponde a (d); TFD-B corresponde a (e). A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.5.5 Análises Bioquímicas

No que tange aos ensaios bioquímicos, as análises dos resultados revelaram que 15 dias após a inoculação das células tumorais ocorreu diminuição estatisticamente significativa da bilirrubina direta e aumento também significativo dos valores de TGO e uréia, em relação aos animais saudáveis. O tratamento com a terapia fotodinâmica, entretanto, apresentou diminuição estatisticamente significativa nos parâmetros bilirrubina direta e fosfatase alcalina, enquanto mostra aumento significativo de bilirrubina indireta, TGO e uréia em relação aos animais

saudáveis. Em relação aos animais portadores de tumor, o tratamento com TFD só mostra alteração no parâmetro uréia (**Tabela 9**).

Tabela 9: Grupo B- resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupos | Tratamento | Bilirrubina | Bilirrubina | Bilirrubina | TGO | TGP | GGT | Fosfatase | Creatinina | Uréia |
|------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------|------------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|
| | | Total | direta | indireta | | | | Alcalina | | |
| | | (mg/dL) | (mg/dL) | (mg/dL) | (U/L) | (U/L) | (U/L) | (U/L) | (mg/dL) | (mg/dL) |
| a | C-B | 0,10 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 93,88 ± 17,19 | 41,50 ± 4,64 | 1,88 ± 0,13 | 118,62 ± 26,08 | 0,24 ± 0,02 | 44,13 ± 3,73 |
| b | T-B | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 ^a | 0,07 ± 0,00 ^a | 193,38 ± 32,97 ^a | 49,25 ± 9,41 | 2,00 ± 0,00 | 119,63 ± 41,47 | 0,24 ± 0,03 | 74,75 ± 11,27 ^a |
| c | PAF-B | 0,10 ± 0,00 | 0,04 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 239,00 ± 57,41 ^a | 80,86 ± 19,88 | 26,86 ± 12,34 ^{a,b} | 44,00 ± 13,31 ^a | 0,27 ± 0,04 | 72,57 ± 9,21 ^a |
| d | L-B | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 ^a | 0,07 ± 0,00 ^a | 294,63 ± 27,80 ^{a,b} | 50,88 ± 6,70 | 1,75 ± 0,16 ^c | 85,88 ± 22,41 | 0,24 ± 0,03 | 73,50 ± 4,21 ^a |
| e | TFD-B | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 ^a | 0,08 ± 0,00 ^a | 207,62 ± 57,72 ^{a,d} | 35,25 ± 4,25 | 2,00 ± 0,00 ^c | 39,13 ± 6,82 ^a | 0,21 ± 0,04 | 49,88 ± 5,91 ^b |
| P-valores | | 1,000 | 0,014 | 0,014 | 0,003 | 0,082 | 0,017 | 0,013 | 0,627 | 0,006 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; T= Tratamento; TGO= transaminase glutâmico oxalacética; TGP= transaminase glutâmico pirúvica; GGT= gama-glutamil transferase; mg/dL= miligramas por decilitro; U/L= unidades por litro. Para as análises estatísticas: C-B corresponde a (a); T-B corresponde a (b); PAF-B corresponde a (c); L-B corresponde a (d); TFD-B corresponde a (e). A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.5.6 Análises histológicas

3.5.6.1 Rim

Os rins de todos os animais mostraram aspectos normais tanto macroscopicamente quanto ao microscópio de luz. A única alteração encontrada foi um leve e pontual infiltrado inflamatório em um dos oito animais do grupo tratado com laser (L-B).

3.5.6.2 Fígado

As análises histológicas do fígado do grupo B foram semelhantes aos encontrados no grupo A, ou seja, os hepatócitos tanto dos animais do grupo controle quanto dos animais submetidos aos tratamentos com a amostra PAF, laser ou tratados com TFD apresentaram pequenos vacúolos e grânulos de glicogênio.

3.6 Resultados da terapia fotodinâmica do grupo C

O experimento do grupo C teve como propósito verificar se 5 aplicações da terapia fotodinâmica, realizadas de 3 em 3 dias, causariam mais danos no tecido tumoral que 3 aplicações (grupos A e B). Após o período experimental, os animais foram sacrificados 24 horas após o último tratamento, perfazendo um total de 15 dias experimentais. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

3.6.1 Observações clínicas

3.6.1.1 Peso dos animais

A análise do peso dos animais, realizada após o período experimental de 15 dias, mostrou que a inoculação das células tumorais e os tratamentos com a amostra PAF, submissão ao laser

ou tratamento com a terapia fotodinâmica não alteraram estatisticamente o peso final dos animais em relação ao peso inicial (**Figura 31**).

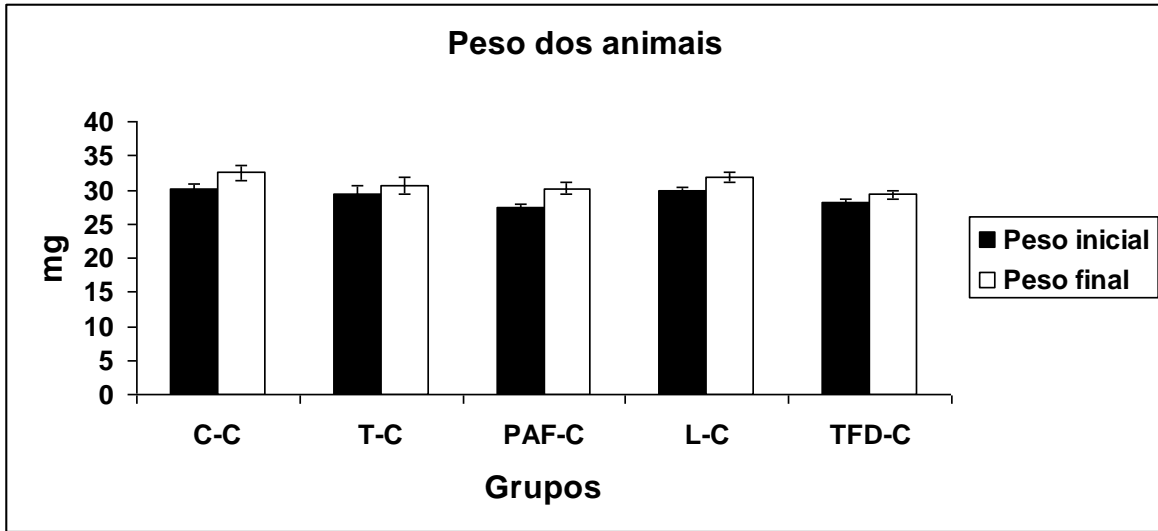


Figura 31: Peso dos animais no 15º dia experimental. C-C: animais saudáveis; T-C: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-C: animais com tumor tratados com PAF; L-C: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-C: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-C corresponde a (a); PAF-C corresponde a (b); L-C corresponde a (c); TFD-C corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.6.1.2 Volume e peso dos tumores

A avaliação do volume e peso tumoral mostrou que a implantação das células tumorais não diferiu estatisticamente dos animais tratados com terapia fotodinâmica, bem como dos seus controles específicos (PAF-C e L-C) (**Figura 32**).

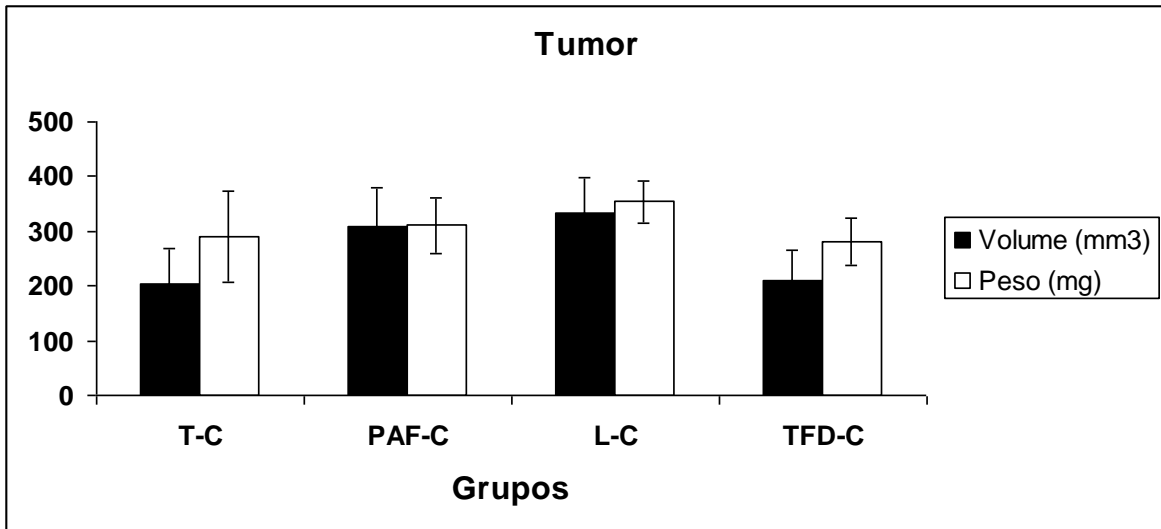


Figura 32: Avaliação do volume (mm³) e peso (mg) tumoral. T-C: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-C: animais com tumor tratados com PAF; L-C: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-C: animais que foram metidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-C corresponde a (a); PAF-C corresponde a (b); L-C corresponde a (c); TFD-C corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.6.1.3 Dimensões dos tumores

Em relação às dimensões dos tumores, o tratamento com a terapia fotodinâmica e de seus controles específicos (PAF-C e L-C) não apresentou, em nenhum dos três parâmetros, alterações estatisticamente significativas em relação aos animais portadores de tumor (**Figura 33**).

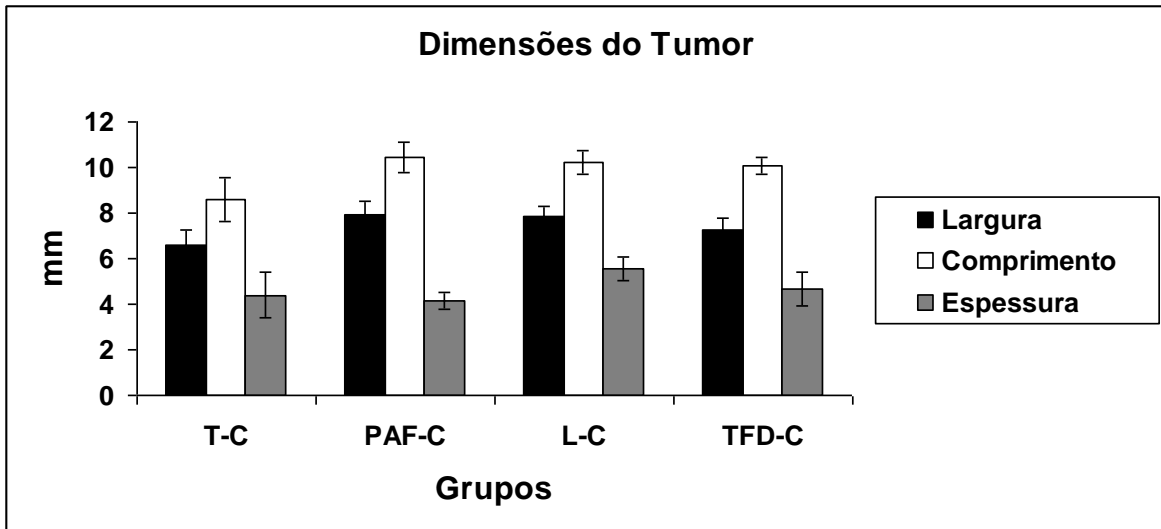


Figura 33: Avaliação da largura, comprimento e espessura tumoral. T-C: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-C: animais com tumor tratados com PAF; L-C: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-C: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-C corresponde a (a); PAF-C corresponde a (b); L-C corresponde a (c); TFD-C corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.6.1.4 Observações macroscópicas

Observações clínicas macroscópicas foram realizadas 24 horas antes do sacrifício dos animais. Para os animais portadores de tumor (T-C) a média de necrose foi de 38%. Porém, os animais tratados com a amostra PAF-A mostraram 36% de necrose no tecido tumoral. Já para o grupo de animais submetido ao laser, a média foi de 31%. O tratamento com a terapia fotodinâmica mostrou, macroscopicamente, necrose de 70%. Os diferentes graus de necrose estão ilustrados na **Figura 34**.

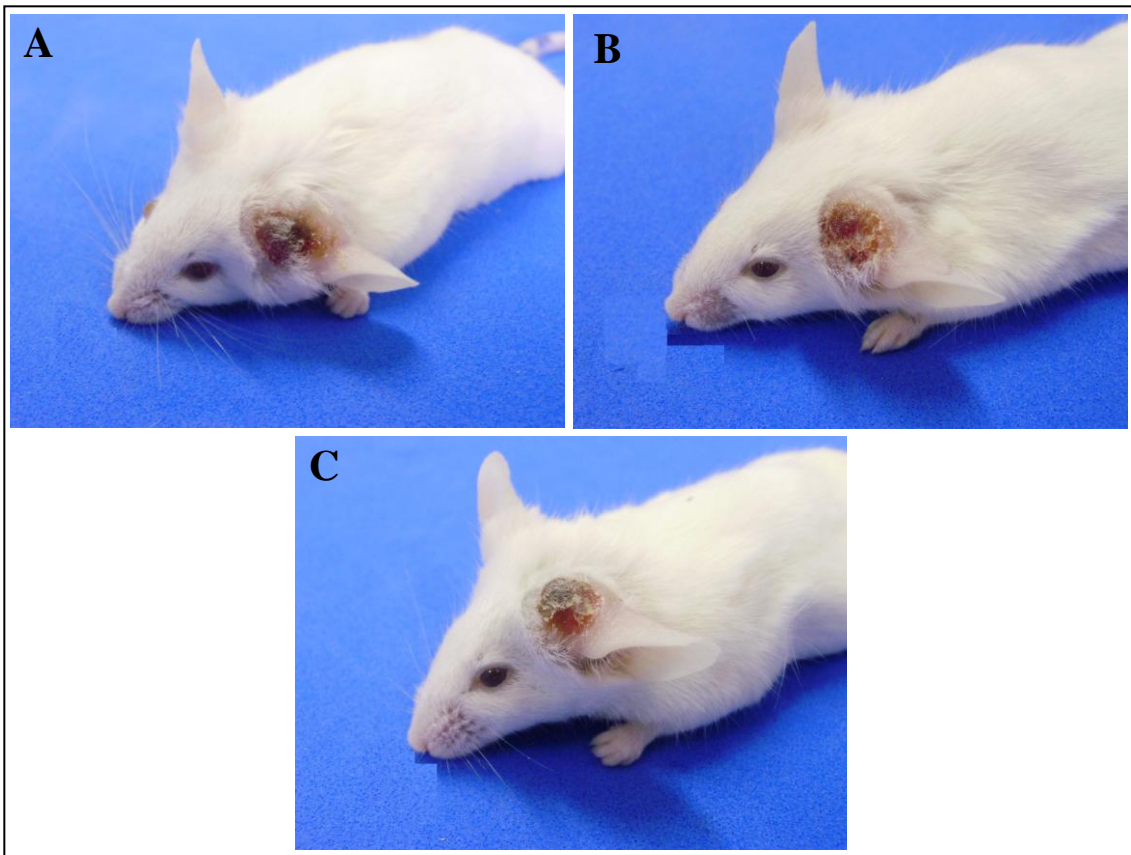


Figura 34: Animais com diferentes graus de necrose (Grupo C). A: animais tratados com a amostra PAF (PAF-C); B: animais submetidos ao laser (L-C); C: animais tratados com TFD (TFD-C).

3.6.2 Porcentagem de necrose do tumor

As análises morfométricas realizadas 15 dias após início dos experimentos revelaram que a implantação do tumor de Ehrlich provocou 26,92% de necrose no tecido tumoral. No grupo tratado com a amostra PAF e nos animais submetidos ao laser, o percentual de necrose foi elevado (não significativamente) para 32,00% e 30,43%, respectivamente. Entretanto, o tratamento com terapia fotodinâmica induziu 61,7% de necrose na área tumoral resultando em aumento estatisticamente significativo em relação a todos os outros grupos (**Figura 35**).

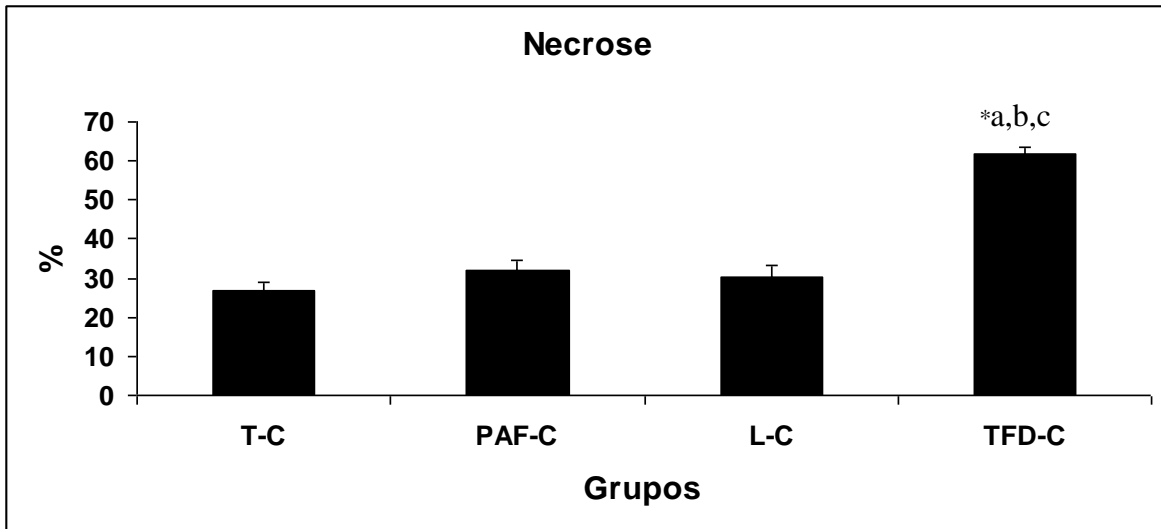


Figura 35: Avaliação da necrose no tecido tumoral. T-C: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-C: animais com tumor tratados com PAF; L-C: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-C: animais que foram submetidos à terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: T-C corresponde a (a); PAF-C corresponde a (b); L-C corresponde a (c); TFD-C corresponde a (d). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.6.3 Análises Hematológicas

3.6.3.1 Contagem de Leucócitos totais

A contagem global de leucócitos revelou que nenhum dos tratamentos (PAF-C, L-C e TFD-C) apresentou alterações estatisticamente significativas em relação aos animais saudáveis e portadores de tumor (**Figura 36**).

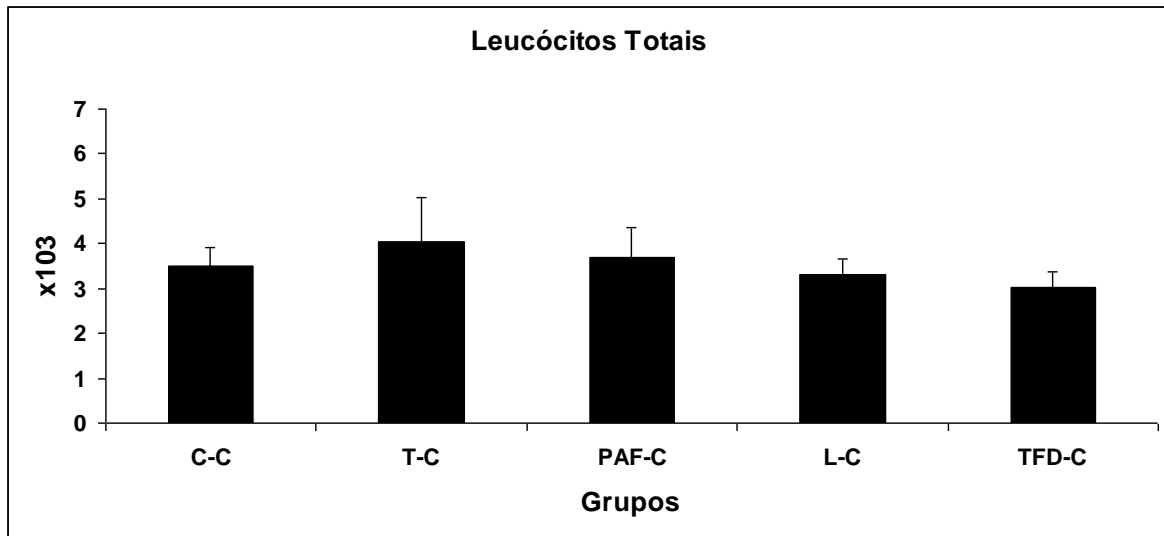


Figura 36: Contagem de leucócitos totais do sangue periférico. C-C: animais saudáveis; T-C: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-C: animais com tumor tratados com PAF; L-C: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-C: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: C-C corresponde a (a); T-C corresponde a (b); PAF-C corresponde a (c); L-C corresponde a (d); TFD-C corresponde a (e). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.6.3.2 Análises Citométricas

3.6.3.2.1 Glóbulos Brancos

As análises dos glóbulos brancos revelaram que tanto a implantação do tumor de Ehrlich quanto o tratamento com a terapia fotodinâmica não alteraram estatisticamente a contagem diferencial das células do sangue periférico em relação aos controles. Porém, o grupo de animais tratados com a amostra PAF, um dos controles específicos da terapia fotodinâmica, mostrou diminuição estatisticamente significativa na população de linfócitos e aumento estatisticamente significativo na população de neutrófilos + monócitos em relação aos animais saudáveis, não diferindo estatisticamente dos animais portadores de tumor (**Figura 37**).

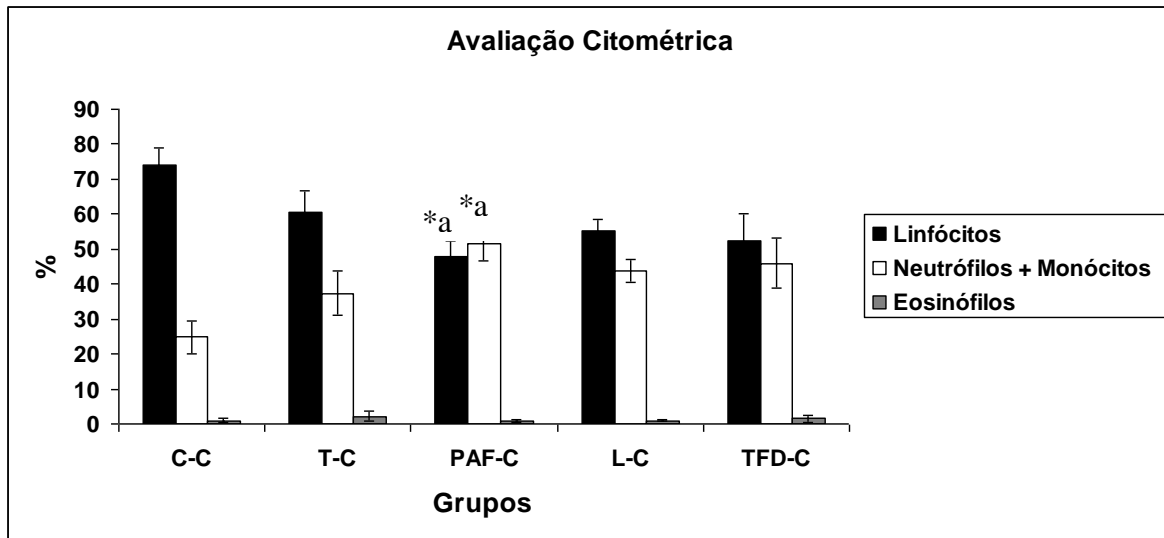


Figura 37: Contagem de de glóbulos brancos do sangue periférico. C-C: animais saudáveis; T-C: animais com tumor que não receberam nenhum tipo de tratamento; PAF-C: animais com tumor tratados com PAF; L-C: animais com tumor submetidos ao laser; TFD-C: animais que foram submetidos a terapia fotodinâmica. Para as análises estatísticas: C-C corresponde a (a); T-C corresponde a (b); PAF-C corresponde a (c); L-C corresponde a (d); TFD-C corresponde a (e). * aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); A barra indica erro padrão.

3.6.3.2.2 Glóbulos Vermelhos

Os resultados do eritograma após 15 dias experimentais mostraram que a inoculação das células tumorais praticamente não alterou seus valores em relação aos animais saudáveis, exceto no parâmetro RDW onde houve um aumento estatisticamente significativo. Entretanto, o tratamento com a terapia fotodinâmica levou à diminuição estatisticamente significativa nos parâmetros HGB, HCM e CHCM em relação aos animais saudáveis e diminuição estatisticamente significativa de RDW em relação aos animais portadores de tumor. Resultados semelhantes foram encontrados nos grupos controles da TFD (PAF-C e L-C) (**Tabela 10**).

Tabela 10: Grupo C- resultados do eritrograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupo | Tratamento | Eritrócitos | HGB | HCT | VCM | HCM | CHCM | RDW |
|------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | (x 10 ⁶ /mL) | (g/dL) | (%) | (fL) | (pg) | (g/dL) | (%) |
| a | C-C | 8,75 ± 0,26 | 12,9 ± 0,21 | 31,75 ± 0,73 | 36,33 ± 0,55 | 14,78 ± 0,33 | 40,67 ± 0,38 | 13,33 ± 0,28 |
| b | T-C | 8,39 ± 0,16 | 11,70 ± 0,20 | 29,48 ± 0,64 | 35,15 ± 0,45 | 13,98 ± 0,26 | 39,70 ± 0,38 | 14,65 ± 0,43 ^a |
| c | PAF-C | 8,12 ± 0,26 | 11,37 ± 0,41 ^a | 28,99 ± 1,07 | 35,69 ± 0,31 | 14,00 ± 0,12 | 39,24 ± 0,24 ^a | 13,41 ± 0,31 ^b |
| d | L-C | 8,40 ± 0,16 | 11,63 ± 0,16 ^a | 29,54 ± 0,46 | 35,20 ± 0,16 | 13,86 ± 0,10 ^a | 39,36 ± 0,17 ^a | 13,53 ± 0,16 ^b |
| e | TFD-C | 7,99 ± 0,29 | 11,15 ± 0,31 ^a | 28,53 ± 0,95 | 35,72 ± 0,17 | 13,87 ± 0,19 ^a | 39,12 ± 0,22 ^a | 12,78 ± 0,54 ^b |
| P-valores | | 0,228 | 0,002 | 0,091 | 0,131 | 0,015 | 0,066 | 0,091 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). HGB = Hemoglobina; HCT = Hematócito; VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW = amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (do inglês *Red Cell Distribution Width*); g/dL = gramas por decilitros; fl = femtolitros; pg = picograma.. Para as análises estatísticas: C-C corresponde a (a); T-C corresponde a (b); PAF-C corresponde a (c); L-C corresponde a (d); TFD-C corresponde a (e). A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.6.4 Plaquetas

Os resultados do plaquetograma mostraram que, após o período experimental de 15 dias, tanto a inoculação das células tumorais, quanto o tratamento com a terapia fotodinâmica e seus controles específicos, não foram alterados estatisticamente em relação aos animais saudáveis (**Tabela 11**).

Tabela 11: Grupo C- resultados do plaquetograma de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupo | Tratamento | Plaquetas | VPM | P-LCR | PDW |
|------------------|--------------|-------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | | (x 10 ³ /mL) | (fl) | (%) | (fl) |
| a | C-C | 1239,80 ± 24,19 | 6,40 ± 0,22 | 7,66 ± 1,73 | 6,76 ± 0,12 |
| b | T-C | 1232,50 ± 344,00 | 6,73 ± 0,15 | 10,20 ± 1,51 | 6,70 ± 0,06 |
| c | PAF-C | 1433,00 ± 245,36 | 6,27 ± 0,09 | 6,17 ± 0,57 | 6,67 ± 0,11 |
| d | L-C | 1547,25 ± 87,94 | 6,61 ± 0,11 | 8,01 ± 0,82 | 6,85 ± 0,11 |
| e | TFD-C | 1430,33 ± 224,77 | 6,55 ± 0,17 | 7,97 ± 1,11 | 6,72 ± 0,09 |
| P-valores | | 0,77 | 0,172 | 0,217 | 0,577 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= porcentagem de plaquetas gigantes (do inglês, *platelet large cell ratio*); PDW= amplitude da distribuição das plaquetas (do inglês, *platelet distribution width*). Para as análises estatísticas: C-C corresponde a (a); T-C corresponde a (b); PAF-C corresponde a (c); L-C corresponde a (d); TFD-C corresponde a (e) A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

3.6.5 Análises Bioquímicas

Os ensaios bioquímicos revelaram que a implantação do tumor de Ehrlich gerou um aumento estatisticamente significativo no índice TGO e uma diminuição estatisticamente significativa na concentração de uréia em relação aos animais saudáveis. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com a terapia fotodinâmica, sendo que o valor da uréia diminuiu estatisticamente em relação aos animais portadores de tumor (**Tabela 12**).

Tabela 12: Grupo C- resultados das dosagens bioquímicas de camundongos Swiss albinos fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

| Grupos | Tratamento | Bilirrubina Total (mg/dL) | Bilirrubina direta (mg/dL) | Bilirrubina indireta (mg/dL) | TGO (U/L) | TGP (U/L) | GGT (U/L) | Fosfatase Alcalina (U/L) | Creatinina (mg/dL) | Uréia (mg/dL) |
|------------------|--------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------|
| a | C-C | 0,10 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 62,17 ± 5,75 | 28,67 ± 2,72 | 1,50 ± 0,22 | 77,67 ± 9,10 | 0,25 ± 0,09 | 57,00 ± 1,57 |
| b | T-C | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 196,50 ± 31,61 ^a | 30,00 ± 3,24 | 2,00 ± 0,00 | 37,50 ± 6,89 | 0,30 ± 0,07 | 38,00 ± 2,74 ^a |
| c | PAF-C | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 ^a | 0,08 ± 0,00 ^a | 139,67 ± 19,32 ^a | 26,67 ± 1,78 | 1,00 ± 0,00 ^b | 64,00 ± 9,90 | 0,22 ± 0,02 | 60,00 ± 13,86 |
| d | L-C | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 ^{a,b} | 0,08 ± 0,00 ^{a,b} | 188,20 ± 20,02 ^a | 35,60 ± 7,20 | 12,20 ± 7,12 | 65,40 ± 12,09 | 0,32 ± 0,06 | 50,80 ± 3,22 ^b |
| e | TFD-C | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 149,83 ± 16,74 ^a | 28,67 ± 3,54 | 3,67 ± 2,47 | 51,00 ± 6,23 | 0,23 ± 0,03 | 53,17 ± 4,05 ^b |
| P-valores | | 1,000 | 0,023 | 0,023 | 0 | 0,588 | 0,105 | 0,07 | 0,57 | 0,047 |

Os dados correspondem à média e ao erro padrão da média (EPM). G= grupo; T= Tratamento; TGO= transaminase glutâmico oxalacética; TGP= transaminase glutâmico pirúvica; GGT= gama-glutamil transferase; mg/dL= miligramas por decilitro; U/L= unidades por litro. Para as análises estatísticas: C-C corresponde a (a); T-C corresponde a (b); PAF-C corresponde a (c); L-C corresponde a (d); TFD-C corresponde a (e). A (s) letra (s) aponta (m) diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

3.6.6 Análises histológicas

3.6.6.1 Rim

Neste estudo as análises histológicas mostraram que os rins de todos os animais (controle e tratados) apresentaram aspectos normais tanto macroscopicamente quanto ao microscópio de luz. As alterações encontradas foram infiltrados inflamatórios em dois animais do grupo tratado com laser (L-C) e dois animais tratados com a amostra PAF (PAF-C). Vale frisar que os dois grupos são controles específicos da TFD.

3.6.6.2 Fígado

As análises histológicas do fígado do grupo C foram semelhantes aos encontrados nos grupos anteriores A e B, ou seja, alguns hepatócitos tanto dos animais do grupo controle quanto dos animais submetidos aos tratamentos com a amostra PAF, laser ou TFD apresentaram pequenos vacúolos e grânulos de glicogênio.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos os efeitos da administração de duas amostras baseadas em polímeros de albumina. A primeira delas, polímeros de albumina magnéticos contendo nanopartículas de maghemita (PAM), foi utilizada para testar a eficiência no processo de magnetohipertermia no tratamento de tumor sólido de Ehrlich. A segunda amostra, polímeros de albumina associados a zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAF), foi sintetizada para ser testada no processo de terapia fotodinâmica também para tratamento de tumor sólido de Ehrlich.

4.1 Considerações sobre o tumor de Ehrlich

O cultivo de células neoplásicas, bem como a indução de células tumorais em animais, são abordagens importantes para se investigar a biologia tumoral. Muitos dos atuais conhecimentos a respeito do processo de carcinogênese em humanos são fortemente influenciados por modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. Atualmente, uma grande variedade de modelos experimentais é usada para explicar, não somente os mecanismos biológicos envolvidos na progressão do câncer, mas também para melhorar o prognóstico dos pacientes afetados e elaborar novas modalidades terapêuticas (MOGNETTI; DI CARLO; BERTA, 2006).

Nesse sentido, o tumor de Ehrlich, transplantável, de origem epitelial, vem sendo amplamente utilizado como modelo experimental oncológico devido à rapidez de crescimento, facilidade de manuseio e comportamento agressivo (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Este tumor experimental, correspondente ao adenocarcinoma mamário de camundongos, é mantido até hoje por transplantes sucessivos no tecido subcutâneo ou no peritônio de camundongos, desenvolvendo-se na forma sólida ou ascítica, respectivamente (SIGIURA, 1965).

Foi observado, tanto nos experimentos com a MHT, quanto nos experimentos com a TFD, que o tumor de Ehrlich apresentava, 10 dias após a inoculação, desenvolvimento acelerado, dificultando a observação da resposta ao tratamento. Já está documentado na literatura que tumores de rápido crescimento conseguem diminuir a capacidade de resposta

linfóide ou mesmo criar anticorpos com proteção tumoral (BAIOCHI *et al.*, 1986). O desenvolvimento acelerado poderia ser uma das justificativas para o fato de que cinco aplicações da terapia fotodinâmica não terem induzido mais necrose no tecido tumoral (TFD-C) do que três aplicações (TFD-A).

4.2 Considerações sobre a amostra PAM e magnetohipertermia

As nanopartículas magnéticas (NPM) têm sido cada vez mais utilizadas na área da biociência e da medicina (SHINKAI, 2002), pois apresentam muitas características interessantes, uma das quais a capacidade de atravessar a barreira endotelial e se acumular preferencialmente no tecido alvo, mantendo ileso o tecido saudável (LACAVA *et al.*, 2000). Para tanto, as nanopartículas devem possuir características que as tornem biocompatíveis (GUPTA; GUPTA, 2005). Dentre essas características destacam-se a natureza química, o diâmetro e a cobertura das nanopartículas.

O grupo de pesquisadores do Centro de Nanociência e Nanobiotecnologia - CNANO - (IB, UnB) tem avaliado a biocompatibilidade de várias amostras magnéticas com naturezas químicas diferentes: magnetita (GARCIA, 2002; FREITAS, 2002; CHAVES, 2002; LACAVA, 2002; BARBOSA, 2004; SADEGHIANI, 2004), ferrita de cobalto (KÜCKELHAUS, 2003) e maghemita (PORTILHO-CORRÊA, 2007; BRUGIN, 2007; ESTEVANATTO, 2008; SALDANHA, 2008). No presente trabalho optamos por dar continuidade aos estudos utilizando NP à base de maghemita, pois esta já se encontra na forma oxidada e, portanto, com potencial menor em causar toxicidade aos tecidos. Enquanto NP de magnetita recobertas com citrato causam toxicidade tecidual (GARCIA, 2002). Brugin (2007) constatou em seus experimentos que NP de maghemita recobertas com citrato são altamente biocompatíveis e, portanto, atendem a este requisito importante para aplicações biomédicas.

Outro parâmetro imprescindível para a utilização das NP em aplicações biomédicas é o seu diâmetro. O diâmetro médio das nanopartículas pode influenciar no seu reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear, bem como no tempo de permanência no organismo e a velocidade com que atravessam a barreira endotelial (BERRY; CURTIS, 2003). Partículas de diâmetro entre 8 a 100 nm, por exemplo, são mais utilizadas para aplicações biomédicas devido ao fato de penetrarem com maior facilidade em capilares, atingindo, assim, melhor biodistribuição. Em consonância, as NP de maghemita provenientes de uma amostra de fluido

magnético iônico estabilizado em pH ácido e utilizadas na amostra PAM apresentam diâmetro médio de 8,9 nm.

A cobertura das nanopartículas, também um fator relevante para a sua utilização em aplicações biomédicas, permite que as mesmas não se precipitem, não se aglomerem e se mantenham estáveis. Diversas amostras com coberturas variadas foram investigadas previamente, sendo que cada uma delas apresentou características de biocompatibilidade e biodistribuição distintas: dextrana (LACAVA, 2002), DMSA (CHAVES, 2002), ácido cítrico (GARCIA, 2002; BRUGIN, 2007), tartarato (BARBOSA, 2004), ácido poliaspártico (SADEGHIANI, 2004), dentre outras. Nosso trabalho foi realizado com uma amostra magnética em que as NP magnéticas estão encapsuladas em nanoesferas de albumina. A escolha dessa amostra se deve ao fato da albumina ser a proteína mais abundante do soro sanguíneo (50% das proteínas totais do soro humano) e por ser considerada uma molécula não antigênica, biodegradável, fácil de ser purificada e solúvel em água e, portanto, uma molécula ideal para preparação de nanopartículas (SEBAK *et al.*, 2010). Estudos prévios com a amostra PAM revelaram potencial significativo para aplicações biomédicas. Estevanato (2008) aplicou a amostra PAM na concentração de $1,23 \times 10^{15}$ no peritônio de camundongos e investigou, no período de 30 minutos a 30 dias, seus possíveis efeitos biológicos: testes citométricos e de viabilidade celular mostraram apenas alterações leves e temporárias, ensaios de micronúcleo revelaram total ausência de genotoxicidade, enquanto análise histológica evidenciou ausência de alterações morfológicas nos órgãos fígado, baço, rins, entre outros. Saldanha (2007), por sua vez, avaliou os efeitos da PAM *in vitro* utilizando células de glândula submandibular humana (HSG) e células mesangiais (CM) em três diferentes concentrações, tendo observado resultados também satisfatórios no que diz respeito à biocompatibilidade da amostra.

Neste estudo relatamos o uso bem sucedido das nanoesferas de albumina magnéticas biocompatíveis para os procedimentos de magnetohipertermia com subsequente lise das células tumorais de Ehrlich. Os resultados mostram que o campo eletromagnético de frequência alternada não exerce nenhum efeito sobre a necrose tumoral, o que é um resultado interessante se consideradas as células normais que circundam o tumor. A determinação dos parâmetros de operação do equipamento gerador de campo AC em que não há dano aos tecidos normais deve proceder aos testes com tumores, como previamente mostrado por Guedes *et al.* (2004, 2005). Por outro lado, a injeção intratumoral da amostra PAM induziu, por si só, aumento no processo de necrose. Neste caso, podemos levantar a hipótese de que o ambiente ácido na parte interna do tumor pode ter desestabilizado as nanoesferas de albumina com subsequente exposição do ferro das NPM. A presença aumentada do ferro pode ter

levado à maior produção de radicais livres que teriam efeito citotóxico sobre as células tumorais.

Necrose tumoral mais expressiva, entretanto, só foi evidenciada quando após a inoculação intratumoral da amostra PAM havia a exposição ao campo duas vezes ao dia durante três dias consecutivos, mostrando, assim, a eficiência da amostra PAM em realizar a magnetohipertermia. Apesar de, na representação por cruzes, os tratamentos com a amostra PAM e por MHT (PAM + campo AC) terem recebido classificação +++, o que representa necrose de 76-100%, a necrose promovida pela MHT foi próxima a 100%, o mesmo não ocorrendo com a PAM.

É interessante observar que os resultados da MHT são dependentes da amostra, do tamanho do tumor e das condições utilizadas neste procedimento. Barbosa (2008) investigou a eficácia de amostra de magnetolipossomas à base de ferrita de cobalto no tumor ascítico de Ehrlich, tendo obtido resultados pouco expressivos na redução do tumor por MHT. Concluiu que esse material magnético não apresentava as características necessárias para responder adequadamente ao campo AC. Sadeghiani (2008) utilizou amostra de material magnético à base de nanopartículas de magnetita recobertas por ácido poliaspártico para testar a eficácia da magnetohipertermia no tratamento de tumor sólido de Ehrlich, tendo encontrado necrose em cerca de 33% do tumor. Neste caso, os tumores se localizavam no dorso do animal e apresentavam tamanhos muito superiores aos utilizados no presente trabalho, o que pode explicar esta resposta relativamente pequena.

Outra consideração interessante em relação a MHT, diz respeito à via de administração da amostra. A injeção da amostra magnética no alvo, como foi feito neste trabalho, ou sua atração por gradiente de campo magnético ou ainda a associação de anticorpos monoclonais às NPM ou ainda a presença de receptores específicos torna viável a restrição do aquecimento ao tecido tumoral, minimizando danos aos tecidos normais, fazendo com que a MHT seja aceita como uma terapia que não causa efeitos adversos nas células normais. De fato, de todos os animais testados, apenas um apresentou necrose em células musculares circundantes.

4.3 Considerações sobre a amostra PAF e a terapia fotodinâmica

Estudos sobre câncer vêm sendo realizados a fim de se encontrar um tratamento adequado para cada tipo de neoplasia. A terapia fotodinâmica (TFD) é considerada um método eficaz para o tratamento de câncer precoce e paliativo do câncer avançado. Utiliza a combinação de fotossensibilizante químico não tóxico e luz visível para a destruição tumoral por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007), apresentando, por exemplo, vantagens sobre a quimioterapia em termos de maior segurança e menor toxicidade no tratamento de lesões malignas (KIM; PARK, 2010). Entretanto, existem limitações para sua utilização, pois a eficácia do tratamento depende da profundidade de alcance do laser nos tecidos. Assim, a escolha do fármaco é imprescindível para determinar o limite de penetração do laser na TFD (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

Muitos fotopssensibilizadores têm sido aprovados para tratamento clínico de muitas patologias malignas, como o Levulan[®] (baseado no ácido aminolevulínico – ALA), Metvix[®], Photofrin[®]. Cada um destes fotossensibilizadores disponíveis comercialmente apresenta características específicas, mas nenhum deles pode ser considerado um fotossensibilizador ideal. A maioria deles é hidrofóbica e se agregam em meio aquoso, alterando suas propriedades biológicas, químicas e fotofísicas (PASZKO *et al.*, 2011). Uma das estratégias para minimizar estes efeitos é de nanoencapsular o fotossensibilizante, o que foi recentemente atingido por pesquisadores do CNANO com o ALA (KARST-PASSOS *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas foram desenvolvidos fotossensibilizadores de segunda geração no intuito de aumentar a eficácia no tratamento terapêutico, dentre os quais se inclui uma das mais promissoras alternativas, as ftalocianinas. Esta classe de fotossensibilizador apresenta uma das propriedades físico-químicas mais importantes que é a elevada capacidade de absorção do comprimento de onda na faixa entre 630 e 700nm, característica que confere maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006). Estas, associadas a um metal central, possuiriam influência em sua propriedade fotossensibilizadora, principalmente se este metal for zinco, que já tem seu emprego clínico aprovado na Rússia (TOMAZINI *et al.*, 2007). Estudos relatam que as ftalocianinas tetrassulfonadas possuem características favoráveis para serem utilizadas na TFD por apresentarem longa permanência no seu estado ativado e intensa absorção na faixa do vermelho visível (SMETANA *et al.*, 1994).

As novas formulações de substâncias fotossensíveis nanoestruturadas visam, além de especificidade, aumento da penetração do fármaco proporcionando resultados mais satisfatórios na TFD.

Neste trabalho utilizamos nanoesferas de albumina associadas a zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAF) para realizar os procedimentos da terapia fotodinâmica. A amostra PAF possui diâmetro médio de 452 nm e, portanto, tem dimensões muito maiores do que a amostra PAM utilizada para realizar a magnetohipertermia e que apresentava cerca de 73 nm. Levando em consideração que o menor tamanho dos capilares do organismo possuem entre 5 a 6 μm e que a vasculatura do tumor possui poros com diâmetro aproximado em 100 a 1000 nm, as duas amostras utilizadas nesse trabalho têm dimensões que as tornam adequadas para aplicações biomédicas.

A escolha do intervalo de três dias para aplicação do laser teve como base o conhecimento de que durante a aplicação da TFD ocorre dano vascular seguido de hipóxia tecidual (BICALHO, 2010). Sabendo que o oxigênio é imprescindível para a realização da TFD e que sua redução pode comprometer a eficácia do tratamento, é importante que o tempo entre as aplicações do laser possibilite que o tecido irradiado recupere o oxigênio consumido durante a aplicação anterior para que a TFD promova maior dano ao tecido (HENDERSON *et al.*, 2004; BUSCH, 2006).

4.4 Considerações sobre os testes biológicos

4.4.1 Testes hematológicos

O hemograma completo é um dos exames mais frequentemente requisitados para avaliar e quantificar os componentes celulares do sangue. leucócitos; eritrócitos e plaquetas. Tanto o eritrograma, quanto o leucograma e o plaquetograma constituem ferramentas importantes em análises patológicas, pois permitem identificar processos inflamatórios, alérgicos, parasitológicos, anemias (GARCIA, 2002) e distúrbios na coagulação sanguínea.

A função primária dos eritrócitos é transportar oxigênio para os tecidos e, portanto, a massa de células vermelhas determina a capacidade potencial de carrear oxigênio e é estimada por 3 parâmetros: número total de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Em camundongos, esses parâmetros têm valores mais baixos em fêmeas do que em machos e variam de acordo

com a raça (FOX *et al.*, 2006). Os outros índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM e RDW) são derivados dos parâmetros supracitados. O VCM, volume corpuscular médio, resulta na divisão do hematócrito com o número total de eritrócitos (HCT/eritrócitos) e indica o volume de um eritrócito médio; o HCM, hemoglobina corpuscular média, é calculado dividindo-se a concentração de hemoglobina pelo número total de eritrócitos (HGB/eritrócitos) e indica o conteúdo hemoglobínico de cada hemácia, ou seja, o peso da hemoglobina em uma célula média; O CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média, é calculado dividindo-se a concentração de hemoglobina pelo hematócrito (HGB/HCT) e expressa a taxa de peso da hemoglobina em relação a 1 dL de eritrócitos. O RDW, amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos, representa uma medida de anisocitose (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004). Em camundongos, a anisocitose é mais pronunciada devido a uma maior concentração de reticulócitos, usualmente de 1 a 6% dos eritrócitos circulantes, ou seja, de 100.000 a 350.000 reticulócitos por microlitro (FOX *et al.*, 2006).

Todos os tratamentos (grupos A, B e C) promoveram alterações no eritrograma. Entretanto, apenas as alterações sugestivas de distúrbios hematológicos serão discutidas. De todos os grupos, apenas os animais tratados com a amostra PAF do grupo A (PAF-A, um dos controles específicos da terapia fotodinâmica.) apresentou um quadro sugestivo de anemia normocítica normocrômica isocítica, com HGB abaixo dos valores de referência. Os valores encontrados nos demais tratamentos, apesar de apresentarem alterações significativas em relação aos animais saudáveis, estavam dentro dos valores de referência.

Os leucócitos, como amplamente conhecidos, incluem vários tipos celulares: linfócitos, monócitos e granulócitos, assim chamados por possuírem grânulos densamente corados em seu citoplasma e que podem ser de três tipos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O tipo de leucócito mais comumente encontrado no sangue periférico de camundongos é o linfócito, constituindo aproximadamente $\frac{3}{4}$ da população, seguido da população de neutrófilos (THRALL, 2007). Geralmente o número de leucócitos no sangue de camundongos varia entre 2000 a 10.000 / μ L (FOX, 2006), sendo sua principal função a ativação do sistema imunitário (ABBAS, 2003). No presente trabalho, mesmo havendo alterações na contagem global de leucócitos, todos os resultados estavam dentro dos valores de referência. Em relação aos tipos celulares, observamos concomitantemente à inoculação do tumor, decréscimo na população de linfócitos e aumento nas populações de neutrófilos e de monócitos em relação aos animais saudáveis. Tem sido mostrado que as atividades das enzimas antioxidantes diminuem em uma grande variedade de tumores (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SUN *et al.*, 1989;

DURSUN *et al.*, 2006) e o estresse oxidativo aumentado está relacionado à supressão da imunidade dependente de linfócitos (AMES; SHIGENAGA; HAGEN 1993). Por sua vez, os neutrófilos são responsáveis pela fagocitose de pequenas partículas e pela modulação da resposta imune (FOX, 2006). Nenhum dos tratamentos resultou em alteração significativa nestas populações em relação aos animais portadores de tumor, indicando que as diferenças significativas em relação aos animais saudáveis foram decorrentes da inoculação do tumor e não dos tratamentos. No que se refere aos outros granulócitos, eosinófilos e basófilos, suas funções de proteção são menos entendidas. Acredita-se que ambas as células sejam importantes na defesa contra parasitas, mas, sua principal importância clínica é o envolvimento nas reações inflamatórias alérgicas (MURPHY, 2010). Apesar dos resultados do grupo B terem mostrado diferenças estatisticamente significativas entre os animais administrados com a amostra PAF e os animais saudáveis (C-B) e os portadores de tumor (T-B), os mesmos estão dentro dos valores de referência, não indicando processo alérgico.

As plaquetas são essenciais para hemostasia; aderem ao colágeno exposto de vasos com injúria, sofrendo mudanças de forma e liberando fatores envolvidos na vasoconstrição e iniciação da cascata de coagulação (THRALL, 2007). Neste trabalho, apenas o grupo A apresentou diferenças estatisticamente significativas nos valores plaquetários na comparação entre a maioria dos tratamentos (T-A, PAF-A, L-A, TFD-A, Ldx-A) e os animais saudáveis (C-A). Porém, apenas o grupo Ldx-A apresentou plaquetocitose, estando os outros resultados dentro dos valores de referência (900 a $1.600 \times 10^3/\mu\text{L}$) (FOX, 2006). É bem descrito na literatura que as plaquetas são heterogêneas em relação à densidade e volume. Desta forma, é importante a avaliação dos índices plaquetários merecendo destaque o volume plaquetário médio (VPM), por se tratar de variável biológica que determina a função e atividade plaquetária (SANTOS, FILHO, 2004). Outro índice importante que também avalia a atividade plaquetária é o P-LCR (% de macroplaquetas). A importância clínica de volumes plaquetários maiores tem sido relacionada com a presença de agregação plaquetária aumentada (THRALL, 2007). A largura da distribuição das plaquetas (PDW) é o coeficiente de variação do histograma que reflete as amplitudes da variação das populações plaquetárias (SANTOS, FILHO, 2004) aumentando com variabilidade no tamanho das plaquetas, visto que é uma medida de anisocitose (FOX *et al.*, 2006). Neste estudo, apenas o grupo administrado com amostra PAF-A apresentou aumento estatisticamente significativo, tanto do VPM, quanto do P-LCR em relação aos animais saudáveis, indicando maior reatividade plaquetária do que os tratamentos com laser e TFD, que apresentaram aumento significativo apenas nos valores de P-LCR. Estes resultados associados com os resultados do leucograma indicam participação

das plaquetas no processo inflamatório. Visto que o tratamento com a amostra PAF-A apresentou maiores diferenças nos índices plaquetários, já era esperado aumento significativo nos valores de PDW em relação aos animais saudáveis.

É importante frisar que a terapia fotodinâmica não levou a alterações plaquetárias, ainda que a amostra PAF-A que utiliza tenha causado as alterações plaquetárias citadas (VPM e P-LCR).

4.4.2 Testes bioquímicos

A enzimologia clínica representa importante investigação que conduz ao diagnóstico de enfermidades de animais, oferecendo o máximo de informação com um mínimo de invasibilidade. Pode ser definida como um conjunto de ensaios que se emprega para auxiliar no diagnóstico de doenças, no prognóstico de quadros clínicos diversos e na avaliação do estado nutricional dos animais (CSEH, 2003; SCHEFFER; GONZÁLEZ, 2003). Para o diagnóstico, as enzimas de interesse são constituintes celulares de alguns tecidos específicos, fazendo parte do conteúdo citossólico ou da membrana celular, como organelas. Constantemente essas enzimas são liberadas na corrente sanguínea e, ao mesmo tempo, retiradas do sangue, havendo um equilíbrio entre a velocidade de liberação dos tecidos e de sua eliminação ou catabolismo. Seu aumento na corrente sanguínea pode ocorrer por morte celular, aumento da permeabilidade da membrana ou pela proliferação celular. (SCHEFFER; GONZÁLEZ, 2003).

Para a avaliação de função hepática, os testes utilizados como marcadores das desordens hepatobiliares incluem as dosagens dos níveis séricos de bilirrubinas, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), gama-glutamil transferase (gama-GT) e fosfatase alcalina (FA) (SUTHERLAND, 1989; DIAL, 1995). Para a avaliação de função renal, além dos testes supracitados, são também usadas as dosagens de uréia e creatinina.

A bilirrubina é um pigmento produzido pela degradação da hemoglobina por células do sistema mononuclear fagocitário, existindo dois tipos: conjugada e não conjugada. A não-conjugada ou indireta é uma molécula não solúvel em água que é transportada no sangue ligada à albumina. Os hepatócitos capturam esta bilirrubina que então sofre glucoronidação (conjugação com o ácido glucurônico) para produzir a forma solúvel em água, a bilirrubina conjugada, que é subsequentemente excretada via sistema hepatobiliar e na bile. Os métodos mais comuns para a dosagem de bilirrubina são: bilirrubina total e bilirrubina direta, sendo

que a direta mede a bilirrubina conjugada e a bilirrubina total. A dosagem indireta mede a bilirrubina não-conjugada, calculando a diferença entre bilirrubina total e bilirrubina direta (FOX, 2006). Níveis elevados de bilirrubina não-conjugada (indireta) são usualmente observados em situações de lise aumentada de eritrócitos, como ocorre em doenças hemolíticas. A hiperbilirrubinemia indireta é também observada em doenças nas quais a captação, a conjugação e a secreção de bilirrubinas estão diminuídas. Níveis elevados de bilirrubina conjugada (direta) estão associados à colestase intrahepática ou obstrução do ducto biliar extrahepático (THRALL, 2007). No grupo A foi observado aumento significativo de bilirrubina Indireta em relação aos animais saudáveis a partir da inoculação do tumor e para quase todos os tratamentos (PAF-A, L-A, TFD-A, PAFdx-A) que também tiveram redução significativa de eritrócitos, sugerindo que essa alteração foi em decorrência de hemólise. Esse resultado pode ser devido apenas à presença do tumor, visto que a partir da sua inoculação os valores de bilirrubina indireta ficaram aumentados. Já nos grupos B e C, apesar de serem observados aumentos de bilirrubina indireta, tais aumentos não podem ser relacionados à hemólise, visto que nenhuma diferença significativa em relação aos animais saudáveis foi observada na população de eritrócitos. Em relação à bilirrubina direta, aumentos significativos podem indicar colestase, como citado acima, obstrução de ducto biliar ou mesmo condições que comprometem a massa funcional renal. Todavia, nem mesmo a inoculação do tumor induziu aumento significativo deste parâmetro.

A transaminase glutâmica-oxalacética (TGO), também chamada de aspartato aminotransferase ou AST), é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias de muitas células, principalmente do fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e eritrócitos (DEWAR *et al.*, 1958), enquanto a transaminase glutâmica-pirúvica (TGP), também chamada de ALT (alanina aminotransferase) é encontrada em altas concentrações apenas no fígado. Uma lesão hepática pode ser evidenciada pelo efluxo dessas enzimas citosólicas para a circulação sanguínea. Consequentemente, níveis séricos aumentados dessas enzimas observados, por exemplo, após exercício agudo servem como indicativos de lesão oxidativa neste órgão (BRUCE *et al.*, 1958; DEWAR *et al.*, 1958; ALMERSJÖ, 1968; CHALIFOUX; LAGACÉ, 1969). No grupo A, os resultados de TGO e TGP corroboraram a sugestão de hemólise, visto que nenhuma diferença significativa foi observada para TGP em relação aos animais saudáveis. Porém, TGO apresentou diferenças significativas para quase todos os tratamentos, exceto L-A e TFD-A, sugerindo, mais uma vez, que o aumento foi decorrente da lise dos eritrócitos e que a TFD-A melhorou a situação geral. Entretanto, todos os tratamentos

com doxorubicina induziram aumento significativo de TGO em relação aos animais saudáveis, indicando maior efeito colateral deste quimioterápico em relação à TFD-A.

A uréia é produzida no fígado como produto residual do catabolismo de proteínas. Ela é uma pequena molécula que se difunde livremente por meio das membranas celulares. Sendo assim, sua concentração é a mesma no sangue, soro e plasma. Tradicionalmente, a concentração da uréia é medida em termos de nitrogênio da uréia (quantidade de nitro contido na uréia). Níveis elevados de nitrogênio da uréia podem ser encontrados por causas pré-renal, renal e pós renal. As causas pré-renais incluem: aumento do catabolismo de proteínas tais como ocorre na inflamação, subnutrição e dietas hiperproteicas. Causas renais usualmente estão associadas com condições que comprometem mais que 70-75% da massa funcional renal e inclui condições como amiloidose renal, doença glomerular imune complexa e doença policística. As condições pós renais incluem qualquer causa que resulta em obstrução do sistema urinário inferior. Redução de nitrogênio da uréia é encontrada em doenças associadas com insuficiência hepática e dietas hipoproteicas (FOX, 2006). Nos grupos B e C os resultados de uréia, assim como os de TGO, indicam uma possível interferência de condições pré-renais (inflamação), resultados compatíveis também com as diferenças significativas observadas para bilirrubina direta em relação aos animais saudáveis e com o leucograma. Tais diferenças apareceram a partir da inoculação do tumor e tanto o laser quanto a TFD retornaram os valores de uréia aos valores normais diferindo significativamente do tumor.

A gama-glutamil transferase (GGT), também conhecida como gama-glutamil transpeptidase (GTP), está presente em quase todas as células com exceção das musculares. Apresenta grande atividade nos rins e no fígado, mas somente aquela de origem hepática é normalmente encontrada no plasma, pois a de origem renal é excretada na urina. Sua importância clínica está ligada no diagnóstico da colestase e de lesões hepáticas de caráter inflamatórias e tóxicas (VIDAL, *et al.*, 2009). Neste contexto, diferenças significativas em relação aos animais saudáveis só foram observadas nos animais administrados com a amostra PAF-B, cujo grupo constitui um dos controles específicos da terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica, por sua vez, não induziu diferenças estatisticamente significativas deste marcador, tanto em relação aos animais saudáveis quanto em relação aos portadores de tumor, o que representa resultado favorável no uso deste tratamento.

A creatinina é o produto de degradação da creatina e creatina fosfato e representa um produto final do metabolismo muscular. Os níveis séricos basais estão diretamente relacionados ao condicionamento muscular e a massa muscular total, que variam entre os indivíduos. Patologicamente, os níveis séricos elevados são causados pelos mesmos fatores,

pré renal, renal e pós renal, que elevam o nitrogênio da uréia no soro. Assim, a quantificação da creatinina no soro não oferece vantagem significativa em relação ao nitrogênio da uréia (THRALL, 2007). Neste trabalho, nenhum dos tratamentos induziu diferença estatisticamente significativa deste parâmetro.

A fosfatase alcalina é uma enzima induzível cuja atividade sérica é aumentada de acordo com sua síntese. Sua função fisiológica não é conhecida, mas acredita-se que sirva para o transporte de metabólicos através da membrana. Existem duas formas em camundongos: a intestinal, localizada nos enterócitos e a tecido não-específico, encontrada em vários tecidos tais como osso, cartilagem, rins e fígado (FOX, 2006). Neste trabalho, a redução significativa dos níveis séricos de fosfatase alcalina no grupo A foi associada, particularmente, à inoculação do tumor. Entretanto, no grupo B, que difere do grupo A apenas pelo maior tempo de coleta dos dados (A10 dias x B 15 dias), não mais se observa alteração nos níveis séricos de fosfatase alcalina nos animais inoculados com o tumor, mas redução deste marcador, tanto para a amostra PAF, quanto para a TFD,

4.5 Considerações sobre o tumor: volume, peso

Apesar do aumento não significativo do peso e volume tumoral dos animais tratados com a terapia fotodinâmica (TFD-B) em relação aos animais portadores de tumor (T-B), tal aumento provavelmente foi em decorrência de edema causado pelo infiltrado de células inflamatórias nos sete dias sem tratamento após a última exposição ao laser. Na terapia fotodinâmica dos grupos A (TFD-A) e C (TFD-C) os animais foram sacrificados 24 horas após o último tratamento o que poderia justificar não terem apresentado resultados semelhantes ao do grupo TFD-B.

4.6 Considerações sobre as observações macroscópicas e as morfométricas

Neste trabalho, a observação macroscópica, ainda que subjetiva, teve como objetivo simular o que é corrente na prática médica, pois dependendo do resultado da observação clínica, o paciente é subsequentemente direcionado para diferentes formas de tratamento. Esta analogia teve, portanto, a intenção de acompanhar a atual tendência da literatura que mostra o uso de terapia alvo e preservação de órgão, pois a redução clínica do tumor é muito importante para realizar os protocolos, bem como ser utilizada como parâmetro de sobrevida para os pacientes.

Para se tratar tumores avançados de laringe, por exemplo, são feitos, inicialmente, dois ciclos de quimioterapia e observa-se a resposta clínica do tumor. Caso o mesmo tenha sido totalmente reduzido, a resposta é considerada **total**. Caso tenha ocorrido redução acima de 50%, considera-se resposta **parcial**. Por outro lado, redução abaixo de 50% é considerada **ausência** de resposta ao tratamento. Assim, caso haja resposta total ou parcial, o paciente é submetido ao tratamento pleno com doses diferenciadas de quimioterapia e/ou radioterapia.

Nosso estudo mostrou, do ponto de vista clínico, uma redução parcial do tumor (59%) com o tratamento da TFD (TFD-A) e ausência de resposta clínica (38%) para o tratamento com doxorrubicina (Tdx-A) denotando, do ponto de vista biológico, resultados iguais em relação à necrose, 66% e 64%, entre TFD e doxorrubicina, respectivamente. Assim, a terapia fotodinâmica mostrou uma resposta clínica que pode ser considerada superior em relação ao tratamento com o quimioterápico. Com base nesses resultados e fazendo um paralelo com os

tratamento em seres humanos, podemos inferir que o tratamento com a TFD foi superior em relação ao da doxorubicina, uma vez que a resposta parcial é de suma importância para definir o tratamento de preservação de órgão bem como para melhorar a qualidade de vida do indivíduo.

4.7 Considerações sobre o tratamento com doxorubicina

A doxorubicina, descoberta em 1960, é um antineoplásico da família das antraciclinas, muito utilizado na terapêutica para tratamento de leucemias e tumores sólidos como câncer de ovário, mama e bexiga (MITRA *et al.*, 2001). Seu efeito citotóxico em células malignas e seus efeitos tóxicos em vários órgãos são atribuídos ao seu mecanismo de ação. Em sua estrutura, apresenta um anel capaz de se intercalar entre os pares de nucleotídeos de dupla fita de DNA nas fases de transcrição e replicação. Na literatura, são várias as hipóteses da ação das antraciclinas nas células malignas, porém a interação da doxorubicina com a enzima topoisomerase II parece explicar sua principal ação antitumoral (LIU *et al.*, 1989; INJAC; STRUKELJ, 2008). A intercalação bloquearia o sítio de ligação da topoisomerase II ao DNA interrompendo sua função normal e induzindo danos ao DNA. Outro mecanismo de ação antitumoral desse quimioterápico é por meio da produção de espécies reativas de oxigênio. A doxorubicina reage com o ferro Fe^{3+} reduzindo o oxigênio a peróxido de hidrogênio, podendo formar outras espécies reativas de oxigênio, que se ligam ao DNA e quebram suas fitas (GIANNI *et al.*, 1985; ELIOT; GIANNI; MYERS, 1984).

Neste experimento, utilizamos a doxorubicina para validar o tratamento da terapia fotodinâmica. Nossos resultados sugerem que a terapia fotodinâmica, quando realizada três vezes num período de nove dias, induziu o mesmo efeito da doxorubicina, levando em consideração os dados de porcentagem de necrose tumoral, validando, assim, o tratamento da TFD ao mesmo patamar do quimioterápico. Na verificação de atividades sinérgicas ou antagônicas destes dois tratamentos, observa-se que quando a doxorubicina foi utilizada juntamente com a TFD (TFDdx-A) não houve aumento de necrose no tumor quando comparado aos resultados dos dois tratamentos realizados separadamente (TFD-A e Tdx-A). A ausência de efeito sinérgico poderia ser explicada pelo fato de não haver oxigênio suficiente no tecido tumoral para a realização dos dois tratamentos simultaneamente.

5 CONCLUSÕES

- (i) O implante de $5,5 \times 10^4$ células do tumor de Ehrlich na cabeça dos camundongos leva, em 48 horas, ao desenvolvimento de tumor sólido adequado para a realização de magnetohipertermia;
- (ii) O implante de $2,75 \times 10^4$ células do tumor de Ehrlich na orelha dos camundongos leva, em 48 horas, ao desenvolvimento de tumor sólido adequado para a realização da terapia fotodinâmica;
- (iii) As células tumorais de Ehrlich quando aplicadas na cabeça na concentração de $5,5 \times 10^4$ células tumorais induzem desenvolvimento acelerado após 10 dias de implante, não sendo mais adequado para investigações antitumorais;
- (iv) As células tumorais de Ehrlich quando aplicadas na orelha na concentração de $2,75 \times 10^4$ células tumorais induzem desenvolvimento mais apropriado para investigações antitumorais pelo menos até 15 dias após o implante;
- (v) Nanoesferas de albumina magnéticas (PAM) são eficazes no procedimento de magnetohipertermia, levando a expressiva necrose do tumor sólido de Ehrlich e aparente ausência de proliferação celular;
- (vi) Nanoesferas de albumina contendo zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAF) são eficazes no processo de terapia fotodinâmica, levando a expressiva necrose do tumor sólido de Ehrlich;
- (vii) O procedimento de terapia fotodinâmica não resulta em distúrbios hematológicos e bioquímicos, corroborando com as análises histológicas do fígado e rim.

A terapia fotodinâmica induz necrose equiparável ao tratamento com doxorrubicina, com menos efeitos adversos; estes dois tratamentos não apresentam efeito sinérgico ou antagônico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Ao verificar a eficiência de amostras baseadas em nanoesferas de albumina em realizar a magnetohipertermia e a terapia fotodinâmica, este trabalho mostrou que, dependendo do protocolo experimental, ambos os procedimentos causam pelo menos 60% de necrose tumoral. Embora não tenham causado a remissão total do tumor, as terapias revelaram significativa atividade antiproliferativa, equiparável à atividade antitumoral do quimioterápico doxorrubicina sem, contudo, ter os seus efeitos adversos.

Uma tendência atual no tratamento anticâncer é a de terapias combinadas. A magnetohipertermia tem sido empregada em conjunto com a quimioterapia e a radioterapia, com resultados bastante favoráveis. Atuando por diferentes mecanismos de ação, é possível que a combinação da magnetohipertermia com a terapia fotodinâmica atinja graus de necrose ainda mais expressivos do que o observado para cada uma das terapias isoladas, potencializando, assim, o efeito terapêutico. As vantagens das terapias combinadas são ainda mais expressivas pelo uso de materiais nanoestruturados.

As nanoesferas de albumina, além de encapsular as nanopartículas magnéticas, podem também carrear a zinco-ftalocianina tetrassulfonada. Uma nova amostra contendo tanto as nanopartículas magnéticas, como a zinco-ftalocianina tetrassulfonada (PAMF) já foi desenvolvida e testes preliminares mostram que pode realizar as duas terapias (MHT e TFD) simultaneamente.

As atividades que uma amostra nanoestruturada, como a PAMF, podem executar são notáveis. Suas dimensões são compatíveis com uma distribuição por todos os tecidos do organismo. São mais tardiamente reconhecidas pelo sistema imunitário por terem em sua composição a albumina. Como as células tumorais superexpressam vários receptores para proteínas plasmáticas, pois as utilizam como fonte de nitrogênio (SIMIONI *et al.*, 2006), PAMF pode se acumular preferencialmente na tecido alvo. Além disso, a albumina apresenta propriedades interessantes como a capacidade de ser conjugada a uma diversidade de ligantes e fármacos de forma reversível transportando, por meio do sistema circulatório, inúmeras substâncias fisiológicas com ácidos graxos, cortisol, e pequenos íons como o cálcio, o cobre e o zinco (SANTOS *et al.*, 2004). Por incorporar nanopartículas magnéticas, além de realizar a magnetohipertermia, PAMF pode ser atraída ao alvo por meios magnéticos, aumentar o contraste em imagens de ressonância magnética e ainda atuar como sistema de entrega de

drogas, a exemplo do carreamento da zinco-ftalocianina. Pelo fato de encapsular a zinco-ftalocianina, PAMF realiza a TFD. Uma característica bastante importante das nanoesferas de albumina magnéticas foi recentemente descrita. Elas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, mostrando potencial para tratamento de doenças neurológicas e câncer cerebral (ESTEVANATO, 2011; CINTRA *et al.*, 2011). PAMF pode representar, portanto, um importante instrumento no combate contra o câncer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter Editora, 2003.

AKTAS, M.; DE JONG, D.; NUYTTENS, J. J.; ZEE, J. V. D.; WIELHEESEN, D. H. M.; BATMAN, E.; BURGER, C. W.; ANSINK, A. C. Concomitant radiotherapy and hyperthermia for primary carcinoma of the vagina: A cohort study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 2006.

ALLISON, R. R. Photosensitizers in clinical PDT, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1; p. 27-42, 2004.

ALMERSJÖ, O.; BENGMARK, S.; ENGEVIK, L.; HAFSTRÖM, L. O.; LOUGHRIDGE, B. P.; NILSSON, L. A. Serum enzyme changes after hepatic dearterialization in man. **Annals of Surgery**, v. 167, n.1, p.9-17, 1968.

AMES B.N, SHIGENAGA M.K, HAGEN I.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

BACRI, J. C., DA SILVA, M. F., PERZYNSKY, R., PONS, J. N., ROGER, J., SABOLOVIC, D., HALBREICH, A. Use of a magnetic nanoparticles for thermolysis of cells in a ferrofluid. **In Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: An Overview**, p. 597-606, 1997.

BAIOCHI, E., BIGONHA, J. G., HEYMANN, R. E., FEDER, D., CABRAL, M., ZYNGIER, S. B. Estrógeno em tumor de Ehrlich: estudo da sobrevida e avaliação da resposta imunológica. **Arq med ABC**, v. 9, n. 1-2, p. 22-27, 1986.

BARBOSA, L. S. **Estudo dos processos de magnetohipertermia e terapia fotodinâmica mediados por magnetolipossomas fotossensibilizados em camundongos**. Tese (Doutorado) Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BERRY, C. C; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D – applied Physics**, V 36, n. 13, p. 198-206, 2003.

BICALHO, L. S. **Remissão completa de tumores de língua induzidos com células do tumor de Ehrlich por meio da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal**. (Mestrado) Universidade de Brasília, 2010.

BLASIAK, J., WIDERA, K., PERTYŃSKI, T. Hyperthermia can differentially modulate the repair of doxorubicin-damaged DNA in normal and cancer cells. **Acta Bioquímica Polonica**, v. 50, p. 191-195, 2003.

BRUCE, R.; TODD, J. K.; LE DUNE, L. (1958). Serum Transaminase: Its Clinical Use in Diagnosis and Prognosis. **British Medical Journal** v.2, n. 5105, p. 1125-1128, 1958.

BRUGIN, A. **Avaliação da Biocompatibilidade/ toxicidade de fluido magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas** *Swiss*. 86f. (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

BRUGNERA, Jr. A.; PINHEIRO, A. L. B.; **Laser na Odontologia**. São Paulo. Pancast, 1998.

BRUSENTOV, N. A., KUZNETSOV, V. D., BRUSENTOV, T. N., GLENDER, T. S., NOVAKOVA, A. A., VOLTER, E. R., HALIULINA, E. A., DANILKIN, M. I. Magnetization of ferrofluid and effects of intracellular deposition of ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, p. 272-276, 2004.

BUSCH, T. M. Local physiological changes during photodynamic therapy. **Lasers Surg Med**. v. 38, n.5, p.494-9, 2006.

CASTANO, A.P., MROZ, P., HAMBLIN, M. R., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, **Nature Reviews Cancer**. v.6, n. 535, 2006.

CHALIFOUX, A.; LAGACÉ, A. (1969). Enzymes Sériques pour le Diagnostic de la Nécrose Hépatique Aigüe Expérimentale. *Can. Journal of Comparative Medicina* v. **33**, n.3, p. 178-186, 1969.

CHATTERJEE, J.; BETTGE, M.; HAIK, Y.; CHEN, C. J. Synthesis and characterization of polymer encapsulated Cu–Ni magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 293, p. 303–309, 2005.

CHAVES, S. B.; LACAVA, L. M.; LACAVA, Z. G. M.; SILVA, O.; PELEGRINI, F. BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P.C.; AZEVEDO, R.B. Light microscopy and magnetic resonance characterization of DMSA – coated magnetic fluid in mice. **IEEE Transactions Magnetics**. v. 38, p. 3231-3233, 2002.

CHERUKURI, P., GLAZER, E. S., CURLEY, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 339-345, 2010.

CHUNFU, Z.; JINQUAN, C.; DUANZHI, Y.; YONGXIAN, W.; YANLIN, F.; JIAJÜ, T. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA) coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. **Applied Radiation and Isotopes**. V. 61, n. 6, p. 1255-1259, 2004.

CINTRA, D. O. S., ESTEVANATO, L. L. C., , Andreza R. SIMIONI, A. R, RODRIGUES, M. M. A. R., LACAVA, B. M., LACAVA, Z. G. M., , TEDESCO, A. C., MORAIS, P. C., and BÁO, S, N. Successful strategy for targeting the central nervous system using magnetic albumin nanospheres. **Journal of Biomedical Nanotechnology** , 2011, in press.

CSEH, S. B. Bioquímica clínica en medicina veterinária: critérios a tener em cuenta em el laboratório. **Ver. Agr. Prod. Anim.** V. 23, n. 3-4, 2003.

DE ROSA, F. S., MARCHETTI, J. M., THOMAZINI, J. A., TEDESCO, A. C. Influence Of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo accumulation of protoporphyrin IX in hairless mice skins: study of a vehicle for photodynamic therapy of skin cancer. **Journal Controlled Release**, v. 65, p. 359-66, 2000.

DE ROSA, F. S., TEDESCO, A. C., LOPEZ, R. F. V., PIERRE, M. B. R., LANGE, N., MARCHETTI, J. M., ROTTA, J. C. G., BENTLEY, M. V. L. B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal Controlled Release**, v.89, p. 261-9, 2003.

DEWAR, H. A.; ROWELL, N. R.; SMITH, A. J. Serum glutamic oxalacetic transaminase in acute myocardial infarction. **British Medical Journal** v.2 n.5105, p. 1121–1125, 1958.

DIAL, S.M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v.25, p.257-273, 1995.

DOUGHERTY TJ; KAUFMANN JE; GOLDFARB A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**. V. 38, p. 2628-35,1978.

DURÁN, N., MATTOSO, L. H. C., MORAIS, P. C. Indução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. **Nanotecnologia**, p. 15, 2006.

DURSun, H., BILICI, M., UYANIK, A., OKCU, N., AKYÜZ, M. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in erythrocytes of patients with oesophageal and gastric cancer. **Journal of International Medical Research**, v. 34, p.193-9, 2006.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. **Berliner Klinischer Ocheschrift**, v. 28, p. 871-874, 1905.

ELIOT, H., GIANNI, L., MYERS, C., Oxidative destruction of DNA by adriamycin–iron complex. **Biochemistry**, Washington, v. 23, p. 928-936, 1984.

ESTEVANATO, L. L. C. **Investigação da biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos em camundongos**. 102f. (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FERREIRA, H. S., RANGEL, M. C., Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**. v. 32, n. 7, 2009.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S., Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira** v. 43: p. 61-8, 1997.

FERREIRA, S. D. R. M.; *et al.*, Analysis of mitochondria endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AlpcS4. **Lasers in Medicinal Science**, v. 18, p. 207-212, 2004

FILHO, J. M. Nanotecnologia: fundamentos e aplicações. Departamento de física – Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Campus de Rio Claro, 2006.

FOX, J. G.; Barthold, S. W., Davison, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W.; Smith, A. L. **The Mouse in Biomedical Research – Normative Biology, Husbandry, and Models** – vol. III. 2^a ed., California/USA, Ed. Academic Press, 2006.

FREITAS, M. L. L.; SILVA, L. P.; AZEVEDO, R. B.; GARCIA, V. A. P.; LACAVA, L. M.; GRISÓLIA, C. K.; LUCCI, C. M.; MORAIS, P. C.; DA SILVA, M. F.; BUSKE, N.; CURI, R.; LACAVA, Z. G. M. A double coated magnetite-based magnetic fluid evaluation by cytometry and genetic tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 396-398, 2002

GARCIA, V. A. P. **Avaliação da biocompatibilidade/toxicidade e biodistribuição de fluido magnético estabilizado por ácido cítrico e de magnetolipossomas convencionais em camundongos.** (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2002.

GIANNI, L., ZWEIER, J. L., LEVY, A., MYERS, C. E., Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from Adriamycin to molecular oxygen. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 11, p. 6820-6, 1985.

GOFRIT, O. N., SHAPIRO, A., PODE, D., SIDI, A., NATIV, O., LEIB, Z., WITJES, J. A., HEIJDEN, A., G., NASPRO, R., COLOMBO, R. Combined local bladder hyperthermia and intravesical chemotherapy for the treatment of high-grade superficial bladder cancer. **Urology**, v. 63, n. 3, 2004

GUEDES, M. H. A., GUEDES, M. E. A., MORAIS, P. C. S., SANTOS, M. F., T. S., ALVES JÚNIOR, J. P., BERTELLI, C. E., AZEVEDO, R. B., LACAVA, Z. G. M. Proposal of a magnetohyperthermia system: preliminary biological tests. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.272, p.2406 - 2407, 2004.

GUEDES, M. H. A., SADEGHIANI, N., PEIXOTO, D. L. G., COELHO, J. P., BARBOSA, L. S., AZEVEDO, R. B., KÜCKELHAUS, S., SILVA, M. F., MORAIS, P. C., LACAVA, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyl-dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.293, p.283 - 286, 2005.

GUPTA, K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical application. **Biomaterials**, V. 26, p. 3995-4021, 2005.

HAYWOOD-SMALL, S. L. *et al.*; Phtalocyanine-mediated photodynamics therapy induces cell death and G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 339; p. 569-576, 2006.

HE, X. M., CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. v. 358, p. 209-215, 1992.

HENDERSON, B.W, GOLLNICK, S. O, SNYDER, J. W, BUSCH, T.M, KOUSIS PC, CHENEY, R. T, *et al.* Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. **Cancer Research**. V.15; n.64, p. 2120-6, 2004.

HENRIQUES, A. C. G.; MAIA, A. M. A.; CIMÕES, R.; CASTRO, J. F. L.; A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 7, n. 3, p. 197-200, 2008.

HILGER, I., HERGT, R., KAISER, W. A. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. *IEE Proceedings Nanobiotechnology*, v. 152, n. 1, 2005.

INCA – Instituto Nacional do Câncer – **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 28 nov. 2007.

INJAC, R., STRUKELJ, B., Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. **Technology in cancer research & treatment**. Schenectady, v. 7., n. 6, p. 497-516, 2008.

ITO, A., TANAKA, K., HONDA, H., ABE, S., YAMAGUCHI, H., KOBAYASHI, T., Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 96, n. 4, p. 364-369, 2003.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, P.; FAEHLING, H.; FELIX, R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 413-419, 1999.

JUNIOR, D. V., MELO, M. M., CASSALI, G. D., DANTAS-BARROS, A. M., JUNIOR, P. G. P. S. Influência da *Agaricus Blazei* Murrill sobre tumor sólido de Ehrlich e linfonodos polplíteos de camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v. 59, n. 1, p. 150-154, 2007.

KALKA K; MERCK H; MUKHTAR. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, p. 389-413, 2000.

KARST-PASSOS, S., TEDESCO, A. C, LACAVA, Z. G. M. Bowen disease treated with PDT using ALA in nanostructured vehicle and two light deliveries: a case report. **Journal of the american Academy of dermatology**, v.64. p.AB141 - AB141, 2011

KENDALL, C. A.; MORTON, C. A. Photodynamic therapy for the treatment of skin disease. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 2, n. 4, p. 283-288, 2003.

KIM, B.Y.S; RUTKA, J.T.; CHAN, C.W. Nanomedicine. **The New England Journal of Medicine** 363: 2434-43, 2010.

KIM, K. H., PARK, J. J., The Effects of Photodynamic Therapy in Upper-Gastrointestinal Malignant Diseases. **Gut and Liver**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 2010.

KONOPKA, K., GOSLINSKI, Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**. V. 86, p. 694-707, 2007.

KÜCKELHAUS, S. A. S. **Avaliação biológica de materiais magnéticos à base de ferrita de cobalto desenvolvidos para tratamento alternativo de câncer**. 133f. (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

KURACHI, C., *et al.*, Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Um Breve Histórico e Resultados Alcançados. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.5, n. 20, p. 33-41, 2002.

LACAVAL, B. M., AZEVEDO, R. B., SILVA, L. P., LACAVAL, Z. G. M., SKEFFNETO, K., BUSKE, N., BAKUZIS, A., MORAIS, P. C. Particle sizing of magnetite based magnetic fluid using atomic force microscope. **Applied Physics Letters**, v.77, p.1876 - 1878, 2000.

LACAVAL, L. M.; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; CHAVES, S. B.; GARCIA, V. A. P.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; DA SILVA, M. F.; MORAIS, P. C. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 252, p. 367-369, 2002.

LACAVAL, Z. G. M., MORAIS, P. C. Aplicações Biomédicas de nanopartículas magnéticas. In: **Parcerias Estratégicas**, n. 18, Brasília: CGEE, p. 73-81, 2004

LI, K. M.; SUN, X.; KOON, H. K.; LEUNG, W. N.; FUNG, M. C.; WONG, R. N. S.; LUNG, M. L.; CHANG, C. K.; MAK, N. K. Apoptosis and expression of cytokines triggered by pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photodynamic therapy in nasopharyngeal carcinoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 3, p. 247-258, 2006.

LIU, C., WANG, X. D., BRONSON, R. T., SMITH, D.E., KRINSKY, N. I., RUSSELL, R. M., Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 12, p. 2245-2253, 2000.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials**, v. 28, p. 354-369, 2007.

LIZARELLI, R. F. Z. **Protocolos Clínicos Odontológicos**. 2ª edição. São Paulo: Bons Negócios Editora, 2005.

LONGO, J. P. **Avaliação da aplicação da terapia fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro ftalocianina em formulação lipossomal sobre câncer bucal em modelos experimentais in vivo e in vitro**. (Mestrado), 2008

MA, M., WU, Y., ZHOU, J., SUN, Y., ZHANG, Y., GU, N. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, p. 33-39, 2004.

MACDONALD, I.; DOUGHERTY, T. J.; Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phtalocyanines**, v. 5; p. 105-129, 2001.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química nova**. v. 23 n. 2, 2000.

MANG, T. S.; SULLIVAN, M.; COOPER, M.; LOREE T.; RIGUAL, N. The use of photodynamic therapy using 630nm laser light and porfimer sodium for the treatment of oral squamous cell carcinoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 3, p. 272-275, 2006.

MANTHE, R. L.; FOY, S. P.; KRISHNAMURTHY, N.; SHARMA, B.; LABHASETWAR, V. Tumor Ablation and Nanotechnology. **Molecular Pharmaceutics**. V. 7, n. 6, p. 1880-1898, 2010.

MARKS, G.; MOHIUDDIN, M.; EITAN, A. Sphincter preservation surgery for rectal-cancer utilizing high-dose preoperative radiation. **Lyon Chirurgie**, v, 87, p.25 -28, 1991.

MARMUR E.S.; SCHMULTS C.D.; GOLDBERG D. J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatmentf nonmelanoma skin cancer. **Dermatologic Surgery**., 30, 264-271, 2004.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. In: **Parcerias estratégicas**. n.18. Brasília: CGEE, p. 9-21, 2004.

MIRANDA-VILELA, A. L; PORTILHO, F. A.; ARAUJO, V. G. B.; ESTEVANATO, L. L.; MEZZOMO, B. P.;SANTOS, M. F. M.; LACAVAL, Z. G. M. The protective effects of nutritional antioxidant therapy on Ehrlich solid tumor-bearing mice depend on the type of antioxidant therapy chosen: histology, genotoxicity and hematology evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, *in press*, 2011.

MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P. C.; MAITRA, N. A., Tumor target delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal Controlled Release**, Arlington, v.74, p. 317-323, 2001.

MOGNETTI, B.; Di Carlo, F; BERTA, G. N; Animal models in oral cancer research. **Oral Oncology** v. 42, n. 5, p. 448-60, 2006.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**, sétima edição, 2010.

MÜLLER, F. **Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana Contra Bactérias Gram-Positivas: Estudo Comparativo Entre Fotosensibilizantes**. (Mestrado), Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2006.

NASCIMENTO, F. R. F; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, E. S.B.; GUERRA, R. N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. **Treatment Life Sciences**. V. 78 p. 2650 – 2653, 2006.

NEILSEN, O. S.; HORSMAN, M.; OVERGAARD, J. A future hyperthermia in cancer treatment? *European Journal of Cancer*, v. 37, p. 1587-1589, 2001.

OLIVEIRA, D. M.; **Estudos sinérgicos de fármacos fotosensibilizadores utilizados na terapia fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em hipertermia celular**. (Doutorado), USP – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2006.

ORENSTEIN, A. *et al.*; A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorine e6, photofrin II and ala-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. **British Journal of Cancer**, v. 73; n. 8; p. 937-944, 1996.

PASZKO, E.; EHRHARDT, C.; SENGE, M. O.; KELLEHER, D. P.; REYNOLDS, J.V. Nanodrugs applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, p. 14-29, 2011.

PAVANI, C. **Porfirinas tetracatiônicas alquiladas: sistemas porfirínicos fotosensibilizadores para o uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele**. (Doutorado). Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

PIERRE, M. B., TEDESCO, A. C., MARCHETTI, J. M., BENTLEY, M. Potential incorporation of 5-aminolevulinic acid in micelles and stratum corneum lipids liposomes: fluorescence quenching studies. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 37, p. 355-61, 2001a.

PIERRE, M. B., TEDESCO, A. C., MARCHETTI, J. M., BENTLEY, M. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5- aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study. **BMC Dermatology**, v. 1, p.5, 2001b.

PORTILHO-CORRÊA, F. A. **Avaliação da Biocompatibilidade de Fluido Magnético à Base de Nanopartículas de Maghemita Recobertas com Polifosfato em Camundongos**. 74f. (Mestrado), Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

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

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOOR, P. K.; **Farmacologia**. 5^a edição. Rio de Janeiro. Elsevier, p. 789-809, 2004.

RAU, B.; WUST, P.; TILLY, W.; GELLERMANN J.; HARDER, C.; RIESS H.; BUDACH, V.; FELIX, R.; SCHLAG, P. M. Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal câncer: regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics** v. 48, n. 2, p. 381–391, 2000.

RIBEIRO, J. N., JORGE, R. A., SILVA, A. R., FLORES, A. V., RONCHI, L. M., TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação triptofano. **Eclética Química**, v. 32, n. 1, p. 07-14, 2007.

RICHEL, O., VÖRDING, P. J. Z. V. S., RIETBROEK, R., VAN DER VELDEN, J., VAN DIJK, J. D. P., SCHILTHUIS, M. S., WESTERMANN, A. M. Phase II study of carboplatin and whole body hyperthermia (WBH) in recurrent and metastatic cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 95, p. 680-685, 2004.

RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. Fourth edition, 2007.

SADEGHIANI, N: **Avaliação dos efeitos de nanopartículas magnéticas recobertas com ácido Poliáspártico no tumor sólido de Ehrlich na presença de campo magnético**. (Doutorado). Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SALDANHA, C. A. **Avaliação IN VITRO da citotoxicidade e Genotoxicidade dos Polímeros de Albumina Magnéticos**. (Mestrado). Universidade de Brasília, 2007.

SANTOS, E. V., FILHO, J. M. Plaquetograma em Gestantes Normais e com Pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** - v. 26, nº 3, 2004.

SANTOS, N. S. J., DRAIBE, S. A., KAMIMURA, M. A., CUPPARI, L. **Revista de nutrição**, Campinas, v. 17, n.3, p. 339-349, 2004.

Scheffer, J.F. e González, F.H.D. Seminário de Bioquímica Clínica. Faculdade de Veterinária, UFRGS, 2003. Citado em http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/outras_publicacoes.php?tipo=4&id_publicacao=73

SEBAK, S., MIRZAEI, M, MALHOTRA, M., KULAMARVA, A., PRAKASH,S., Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis. **International Journal of Nanomedicine**. p. 525-532, 2010.

SHINKAI, M. Functional Magnetic Particles for Medical Application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, n. 6, p. 606-613, 2002.

SHINKAI, M., UEDA, K., OHTSU, H., HONDA, H., KORHI, K., KOBAYASHI, T. Effect of functional magnetic particles on radiofrequency capacitive heating. *Jpj Cancer Research*, v. 90, p. 699-704, 1999.

SIBATA, C. H. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, p. 869-880, 2000.

SIGIURA, K. Tumor transplantation. In: WILLIAN, I.G. Methods of animal experimentation. **London Academic Press**, v. 2. p. 171-222, 1965.

SIMIONI, A. R.; MARTINS, O. P.; LACAVAL, Z. G.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C.; LACAVAL, B. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 8, p. 2413-2415, 2006.

SIMIONI, A. R., RODRIGUES, M. M. A., PRIMO, F. L., MORAIS, P. C., TEDESCO, A. C. Effect of Diode-Laser and AC Magnetic Field of Bovine Serum Albumin Nanospheres Loaded with Phthalocyanine and Magnetic Particles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.11, n. 4, p. 3604-3608, 2011.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801- 807, 2002.

SIMPLICIO, F.; I., MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, 2002.

SMETANA, Z., PASTERNAK, E., VAN LIER, J. E., BEN HUR, E., SALZBERG, S., MALIK, Z., Photodynamic inactivation of herpes viruses with phtalocyanine derivatives. **Photochemistry and Photobiology**, v. 1, p. 37-43, 1994.

SOARES, J. L. **Dicionário etimológico e circunstanciado de biologia**. Ed. Scipione. São Paulo, 1993.

SOUZA, L. C., **Efeitos antibacterianos da terapia fotodinâmica usando dois diferentes fotossensibilizadores em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*: Estudo *in vitro***. Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2009.

STAUFFER, P. R. Evolving technology for thermal therapy of cancer. **International Journal of Hyperthermia** v. 21, n. 8, p. 731-744, 2005.

SUN, Y., OBERLEY, L. W., ELWEL, H., SIERRA-RIVERA, E., Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mouse liver cells. **International Journal of cancer**. v. 44: p. 1028-33, 1989.

SUTHERLAND, R.J.; Biochemical evaluation of the hepatobiliary system in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v.19, p.899-927, 1989.

SUZUKI, M., SHINKAI, M., YNASE, M., ITO, A., HONDA, H., KOBAYASHI, T. Enhancement of uptake of magnetoliposomes by magnetic force and hypertermic effect on tumor. **Japanese Journal of Cancer Hypertermic Oncol**, v. 15, p. 78-87, 1999.

TARTAJ, P., MORALES, M. P., GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., SERNA, C. J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, p. 28-34, 2005.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo, editora Roca, 2007.

TOMAZINI, M. V., GARCIA, S. B., SOUZA, C. S., TEDESCO, A. C., Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 82, n. 6. p. 535-41, 2007.

TRIESSCHEIJN, M. *et al.* Photodynamic Therapy in Oncology. **The Oncologist**, v. 11, p. 1034-1044, 2006.

TURCHIELLO, R. F., VENA, F. C. B., MAILLARD, P., SOUZA, C. S., BENTLEY, M. V. B. L., TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 70,1-6, 2003.

VAN DER ZEE, J.; GONZALES, G.D.; VANRHOOU, G.C.; Comparison of radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomize, multicenter trial. **Lancet Oncological**, v. 335, p. 1119-1125, 2000.

VASANTHAN, A.; MITSUMORI, M.; PARK, J. H.; ZHI-FAN, Z.; YU-BIN, Z.; OLIYNYCHENKO, P.; TATSUZAKI, H.; TANAKA, Y.; HIRAOKA, M. Regional hyperthermia combined with radiotherapy for uterine cervical cancers: a multi-intitutional prospective randomized trial of the international atomic energy agency. **Journal of Radiation Oncology Biology Physics** v. 61, n. 1, p. 145-153, 2005.

VASSEURA, S.; DUGUETA, E.; PORTIERA, J.; GOGLIOA, G.; MORNETA, S.; HADOVÁ, E.; KNÍŽEK, K.; MARYŠKO, M.; VEVERKAB, P.; POLLERTB, E. Lanthanum manganese perovskite nanoparticles as possible in vivo mediators for magnetic hyperthermia. **Journal Magnetism Magnetic Materials** v. 302, p. 315-320, 2006.

VIDAL, I. F., MARTINS, I. V., LIRA, R. A. TEIXEIRA, M. N. FAUSTINO, M. A. G., ALVES, L. C. Níveis séricos da gama-glutamyltransferase em cães com e sem infecção natural por *Leishmania Chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 749-751, 2009.

WANG, X., WANG, Y., CHEN, Z., SHIN, D. M. Advances of cancer therapy by nanotechnology. **Cancer Research and Treatment**. v.41, n. 1, 2009.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. São Paulo, Editora Artmed, 2008.

WUST, P., HILDEBRANDT, B., SREENIVASA, G., RAU, B., GELLERMAN, J., REISS, H., FELIX, R., SCHIAG, P. M. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **Lancet Oncological**, v. 3, p. 487-497, 2002.

YAN, S.; ZHANG, D.; GU, N.; ZHENG, J.; DING, A.; WANG, Z.; XING, B.; MA, M.; ZHANG, Y. Therapeutic effect of F₂O₃ nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, p. 1185- 1192, 2005.

YNASE, M., SHINKAI, M., HONDA, H., WAKABAYASHI, T., YOSHIDA, J., KOBAYASHI, T. Intracellular hyperthermia for câncer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 89, p. 463-470, 1998.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia - Fundamentos e Prática**. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.

ZEE, J. V. D.; GONZÁLEZ, D. G.; RHOON, G. C. V.; DIJK, J. D. P. V.; PUTTEN, W. L. J. V.; HART, A. A. M. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. **The Lancet**. v. 355, p. 1119-1125, 2000.