

transcrição NF- κ B do citoplasma para o núcleo, fato que pode se relacionar tanto à menor resposta celular como à hiporreatividade traqueal. Estes dados mostram que exposição ao FA durante a gestação acarreta uma deficiência nos mecanismos de defesa da prole, devido a alterações estabelecidas no mecanismo de programação fetal. **Agradecimentos:** O presente estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: Beatriz Silva Ibrahim é bolsista de iniciação científica (2013/19708-3) e Adriana Lino dos Santos Franco recebeu auxílio Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes (2011/51711-9).

Referências

- CARLSON, R.M., SMITH, M.C. NEDOROST, S.T. Diagnosis and treatment of dermatitis due to formaldehyde resins in clothing. *Dermatitis*, 15, 169-175, 2004.
- FLÓ-NEYRET, C.; LORENZI FILHO, G.; MACCHIONE, M.; GARCIA M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 639-643, 2001.
- OSHA, 2001 (Occupational Safety & Health Administration).
- MIZUKI, M., TSUDA, T. Relationship between atopic factors and physical symptoms induced by gaseous formaldehyde exposure during an anatomy dissection course. *Arerugi*, 50, 21-28, 2001.
- WANTKE, F.; FOCKE, M.; HEMMER, W.; BRACUN, R.; WOLF-ABDOLVAHAB, S.; GÖTZ, M.; JARISCH, R. Exposure to formaldehyde and phenol during an anatomy dissecting course: sensitizing potency of formaldehyde in medical students. *Allergy*, v.55, p.84-87, 2000.
- RAHERISON C, PÉNARD-MORAND C, MOREAU D, CAILLAUD D, CHARPIN D, KOPFERSMITT C, LAVAUD F, TAYTARD A, ANNESI-MAESANO I. In utero and childhood exposure to parental tobacco smoke, and allergies in schoolchildren. *Respir Med.*, 101(1):107-17, 2007.
- BRIGHAM, K. L. and MEYRICK, B. Endotoxin and lung injury. *The American Review of Respiratory Disease*, v. 133, p. 913-27, 1986.
- CAROFF, M. and KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 338, p. 2431-4, 2003.
- POLTORAK, A.; SMIRNOVA, I.; HE, X.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; MCNALLY, O.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; DU, X.; THOMPSON, P.; CHAN, E. K.; LEDESMA, J.; ROE, B.; CLIFTON, S.; VOGEL, S. N.; BEUTLER, B. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, v. 24, p. 340-55, 1998
- DENG, L.; WANG, C.; SPENCER, E.; YANG, L.; BRAUN, A.; YOU, J.; SLAUGHTER, C.; PICKART, C.; CHEN, Z. J. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, v. 103, p. 351-61, 2000.
- MAIELLARO, M.; CORREA-COSTA, M.; VITORETTI, L.B.; GIMENES-JUNIOR, J.A.; CÂMARA, N.O.S.; DE LIMA, W.T.; FARSKY, S.H.P.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A. Exposure to low doses of formaldehyde during pregnancy suppresses the development of allergic lung inflammation in offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3): 266-274, 2014.

MESTRADO – MEDICINA VETERINÁRIA

A TERAPIA FOTODINÂMICA E OS EFEITOS PROMOVIDOS EM ÓRGÃOS IMUNOLÓGICOS E IMPLANTE SECUNDÁRIO DO TUMOR DE EHRLICH APÓS TRATAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO EM FOCO DISTANTE

DEL-GRANDE, M.P.¹; DAGLI, M.L.Z.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil. e-mail: murilo.p.grande@gmail.com

Introdução: A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy - PDT*) é um método empregado para tratar neoplasias baseado na interação entre luz, oxigênio molecular e um agente fotossensibilizador. Após a administração

do fotossensibilizante, o tumor é iluminado com luz visível de comprimento de onda específico (Laser), ativando o agente, e produzindo espécies reativas de oxigênio, altamente citotóxicas, que provocam morte celular por necrose e apoptose, e destruição do tecido tumoral [1]. A característica singular da PDT é a participação ativa do sistema imunológico no combate às células tumorais. Os efeitos fototóxicos na membrana celular liberam uma série de mediadores inflamatórios levando a ativação do sistema imune inato. A inflamação local e a invasão por neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* junto à destruição das células neoplásicas determinam a condição necessária para a apresentação de antígenos tumorais às células dendríticas e demais células apresentadoras de antígenos. A apresentação antigênica promove ativação do sistema imune adaptativo e há a sensibilização dos linfócitos T efetores (CD8+), determinando uma resposta específica para a neoplasia tratada, envolvida na erradicação de focos disseminados e/ou metastáticos. Além disso, há a sensibilização de linfócitos B (de memória) aos antígenos tumorais, promovendo um controle em longo prazo do tumor. A produção de anticorpos antitumorais pelos plasmócitos pode ser sugerida, porém ainda não foi demonstrada em modelo experimental [2,3,4,5]. O presente trabalho foi delineado para avaliar o comportamento de um foco tumoral secundário após o tratamento com a PDT, ou a excisão cirúrgica, em um tumor primário e as possíveis alterações em órgão linfóides, utilizando-se para tanto o tumor de Ehrlich na sua forma sólida. **Material e Métodos:** Inicialmente trinta camundongos foram inoculados com solução contendo $2,5 \times 10^6$ células tumorais no tecido subcutâneo da região do dorso (Tumor primário). Após dez dias os animais foram divididos em três grupos de tratamento: grupo PDT [Azul de Metileno 1% intratumoral e irradiação com laser vermelho (660nm) totalizando 54 joules de energia], grupo CIRURGIA (excisão cirúrgica do tumor) e grupo CONTROLE (sem tratamento do tumor). Os animais receberam então uma nova inoculação de células tumorais no coxim plantar do membro posterior esquerdo (Tumor secundário). Os animais foram avaliados durante 17 dias, comparando-se os grupos. Os parâmetros avaliados foram o crescimento tumoral, peso relativo e análise histopatológica dos órgãos linfóides (Baço e Linfonodo poplíteo), contagem de leucócitos sanguíneos e morfometria do tumor secundário (determinação da fração volumétrica dos componentes da massa tumoral: células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose). A análise dos resultados obtidos foi efetuada com os programas estatísticos Minitab 16° e GraphPad Prism5.00°. Para os dados paramétricos foi utilizada a ANOVA seguida do teste de Turkey. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A curva de crescimento do tumor de Ehrlich secundário foi analisada por ANOVA de duas vias. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. **Resultados:** O Gráfico 1 ilustra a curva de crescimento do tumor secundário no coxim plantar esquerdo nos grupos tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

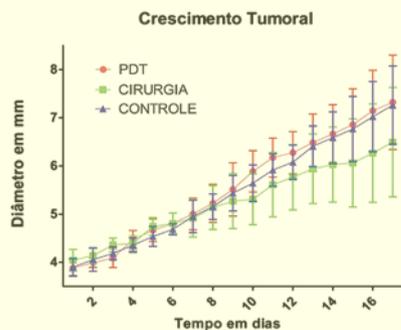


Gráfico 1 - Curva de crescimento do diâmetro (mm) do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle), pelo tempo (dias) nos diferentes grupos

A figura 1 ilustra os dados referentes à fração volumétrica (FV) dos componentes da massa tumoral. Os dados são expressos em porcentagem. Os componentes considerados foram células tumorais, infiltrado inflamatório, necrose e outras estruturas presentes (vasos, músculos, etc.). A FV de células tumorais é maior no grupo cirurgia e a FV de infiltrado inflamatório menor neste grupo. A FV de necrose não apresentou diferença entre os grupos.

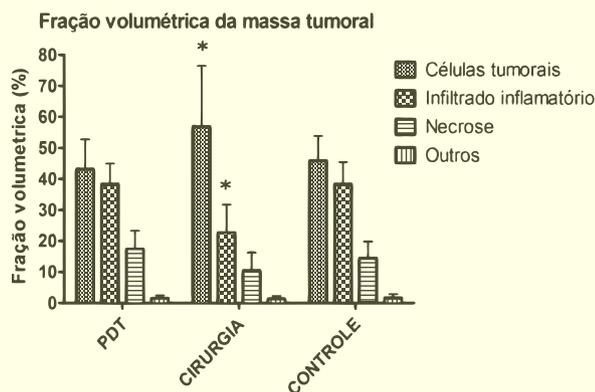


Figura 1 - Fração volumétrica de cada componente da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle)

A figura 2 ilustra os dados referentes à porcentagem da área em necrose na massa tumoral. O grupo cirurgia apresentou uma porcentagem de área em necrose menor que os grupos PDT e controle.



Figura 2 - Área em necrose (%) da massa tumoral no coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle)

A figura 3 ilustra os dados referentes ao peso relativo do baço. O peso relativo do baço no grupo cirurgia foi menor quando comparado aos grupos PDT e controle.

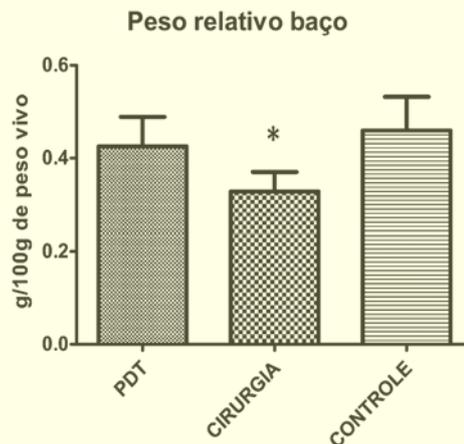


Figura 3 - Peso relativo do baço (g/100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle)

A figura 4 ilustra o padrão histológico encontrado no baço dos camundongos. Os animais do grupo cirurgia não apresentaram alterações morfológicas importantes nas estruturas do órgão (Figura 23 A). Nos animais que receberam o tratamento com a PDT (Figura 23 B) e nos animais que não receberam tratamento algum (Figura 23 C), foi observado que a arquitetura do órgão estava preservada, entretanto os folículos linfóides, os respectivos centros germinativos e a sua zona marginal apresentavam-se aparentemente mais proeminentes, com áreas de coalescência dos folículos. Observou-se a manutenção da arquitetura das regiões de polpa vermelha. Os achados sugerem uma discreta hiperplasia linfóide do baço nestes animais.

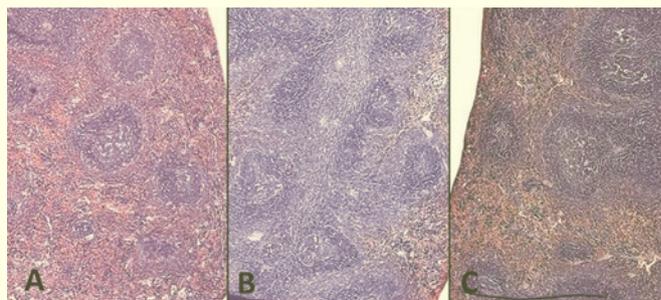


Figura 4 - Fotomicrografia de corte histológico do baço de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) (H&E objetiva 4x)

O peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo e sua análise histológica não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais, assim como a contagem total de leucócitos circulantes. **Conclusão:** A terapia fotodinâmica foi capaz de produzir efeitos sobre o crescimento de um tumor de Ehrlich sólido secundário, inoculado em camundongos, previamente tratados em tumor primário à distância. Houve indução de necrose e inflamação aguda, assim como diferenças no padrão de resposta imunológica quando comparado aos animais tratados cirurgicamente.

Referências

- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2004.
- GOMER, C. J.; FERRARIO, A.; MURPHREE, A. L. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 56, p. 27-32, 1987.
- KORBELIK M. Induction of Tumor Immunity by Photodynamic Therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p. 329-334, 1996.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizers pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 91-106, 2005.

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

CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃO COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES

RAMOS S.D.; CRUZ, R.M.A.; MIGLINO M.A.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B, PIGNATARI, G.C.

Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo

Introdução: A Ceratoconjuntivite Seca (KCS – *Keratoconjunctivitis Sicca*) é uma condição multifatorial que geralmente resulta de alterações quantitativas do componente aquoso do filme lacrimal, podendo ainda, decorrer de deficiência dos componentes lipídicos e mucoso, normalmente atribuída a uma desordem imunomediada. O diagnóstico da KCS é baseado nos sinais clínicos tais como: secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, blefaroespasm, fotofobia, incômodo, dor, vascularização, pigmentação e opacidade corneana. Para tanto, dois testes oftalmológicos simples podem ser realizados: o teste de Schirmer e o Butt. O tratamento convencional preconizado hoje são aplicações diárias de pomada ou, então de colírio oftálmicos à base de Ciclosporina 0,2% ou Tacrolimus 0,03%. Esses tratamentos são custosos, não curativos e exigem muito a colaboração do proprietário. Nos últimos anos a terapia celular com células-tronco trouxe uma nova esperança para o cenário da medicina veterinária quanto ao tratamento de doenças que ainda não possuem um tratamento efetivo. A obtenção de células-tronco de anexos embrionários, nos quais os tecidos são comumente descartados no momento do nascimento ou em campanhas de castração, está se tornando muito interessante. Já foi descrito que as células-tronco obtidas da membrana amniótica humana possuem propriedades regenerativas e imunomoduladoras observadas em células-tronco mesenquimais obtidas de outras fontes. O isolamento e a caracterização de células-tronco de membrana amniótica de cães em diferentes períodos gestacionais já foram obtidos com sucesso. Além da caracterização, estas células foram testadas quanto sua capacidade tumorigênica, quando da sua injeção de aproximadamente um milhão destas células-tronco pela via subcutânea na região cervical de camundongos imunossuprimidos e não foi constatada a formação tumoral, após 60 dias da injeção. O presente trabalho foi delineado para avaliar a eficiência do emprego de células-tronco da membrana amniótica para o tratamento da KCS em cães. Foram empregados os parâmetros clínicos rotineiros em oftalmologia para os sinais clínicos bem como, os testes oftálmicos, de Schirmer e Butt. Além disso, o potencial imunomodulador das células foi investigado com a avaliação citológica de um raspado antes e após o tratamento com as células, tendo em vista o controle da evolução do processo inflamatório. **Material e métodos:** Dois animais de espécie canina, sexo feminino da raça *Golden Retriever* provenientes do canil da Faculdade de Medicina Veterinária com idade média de sete anos e em grau crônico de KCS foram selecionados. Após a seleção, esses animais foram submetidos ao tratamento com células-tronco de membrana amniótica após aprovação pelo comitê de ética CEUA/Vet nº 3122/2013. As células-tronco de membrana amniótica foram injetadas em ambas as glândulas lacrimais da terceira pálpebra, duas vezes com intervalo de 30 dias cada. Na primeira injeção foram utilizadas $0,5 \times 10^6$ células em cada glândula e na segunda 1×10^6 . Após o tratamento, os animais foram avaliados semanalmente por exame oftalmológico e testes oftálmicos. **Resultados:**

Antes da injeção celular, os dois animais incluídos no estudo foram submetidos a um exame oftalmológico que novamente confirmou o padrão crônico da KCS (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da avaliação oftalmológica dos animais incluídos no tratamento com células-tronco de membrana amniótica antes da injeção nas caninas 1 e 2

Testes/Avaliação Oftalmológica	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	02/03	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração +++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	11/13	13/11
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Mudanças significativas não foram observadas nos parâmetros oftalmológicos após sete dias de tratamento. Entretanto, o aspecto das glândulas lacrimais destes animais se apresentaram mais próximos da normalidade após sete dias do tratamento (tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da avaliação oftalmológica após sete dias de tratamento com as células-tronco de membrana amniótica nas caninas 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	03/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração: ++ AO	Degeneração: +++ AO
PIO	12/13	13/13
Aspecto corneano	Opacidade: ++OD +++OE Pigmentação: +++ AO	Opacidade: ++++ AO Pigmentação: ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Conforme mostra a tabela 3, após 14 dias de tratamento com as células-tronco, os dois animais apresentaram um aumento no teste de Schirmer, sendo este bem mais significativo no animal 1. Além disso, a secreção mucopurulenta mostrou-se reduzida nos olhos do animal 2.

Tabela 3 - Resultados da avaliação oftalmológica 14 dias após tratamento com células-tronco de membrana amniótica nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	09/09	00/01
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Após 21 dias da implantação, a quantidade da secreção continuava a mesma, porém houve uma redução em torno de 50% no teste lacrimal de Schirmer. Nenhuma mudança no aspecto das glândulas lacrimais da terceira pálpebra essa fase foi distinta do observado aos após sete dias de tratamento.

Tabela 4 - Resultados da avaliação oftalmológica aos 21 dias de tratamento dos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	04/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++ OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

O exame oftalmológico 30 dias após implantação demonstrou que o Teste de Schirmer apresentou valores iguais ao do início do estudo e as glândulas lacrimais da terceira pálpebra voltaram também ao seu aspecto inicial, ou seja, o que eram antes da implantação. No entanto, notou-se nos dois animais a