



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS

MILENA DO CARMO ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A
DISSEMINAÇÃO DE TUMOR DE WALKER 256 IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO
DO RATO WISTAR.

FORTALEZA
2018

MILENA DO CARMO ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A
DISSEMINAÇÃO DE TUMOR DE WALKER 256 IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO
DO RATO WISTAR.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechinne Jamaru.

FORTALEZA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)
A69a Araújo, Milena do Carmo Araújo.

Avaliação do efeito do ultrassom sobre tumor de Walker 256 para o desenvolvimento de
metástase /

Milena do Carmo Araújo Araújo. – 2018.

78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-

Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechinne Jamaru.

1. Ultrassom. 2. Neoplasias. 3. Linhagem celular tumoral. 4. Metástase neoplásica. I. Título.

CDD 617

MILENA DO CARMO ARAÚJO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A
DISSEMINAÇÃO DE TUMOR DE WALKER 256 IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO
DO RATO WISTAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada em 27/06/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Digno és, Senhor, de receber glória, e honra, e poder;
porque tu criaste todas as coisas, e por
tua vontade são e foram criadas.

(Apocalipse 4:11)

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Instituto Claude Bernard (INCB)

AGRADECIMENTOS.

Ao Prof. Dr. LUSMAR VERAS RODRIGUES, coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Agradeço por ter me incentivado a ingressar no Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Cirurgia.

Ao Prof. Dr. PAULO LEITÃO DE VASCONCELOS, vice-coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Agradeço a atenção e o apoio nos momentos dos insucessos experimentais.

Ao Prof. Dr. MANOEL ODORICO DE MORAES FILHO, orientador. Agradeço à sábia e firme orientação do presente trabalho, a disponibilidade, atenção, e por ter acreditado na minha capacidade de aprender e de recomeçar. Agradeço pelas muitas palavras de encorajamento que foram ditas nos momentos difíceis e por prover recursos necessários para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. VAGNALDO FECHINNE JAMACARU, co-orientador, agradeço a atenção, a disponibilidade e os conhecimentos científicos ministrados que contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. NIVALDO ANTONIO PARIZOTTO, professor titular da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), que gentilmente nos orientou sobre o delineamento do uso do ultrassom na pesquisa experimental. Agradeço também a amizade, a ministração de conhecimentos científicos sobre o assunto estudado e por fazer parte da minha banca examinadora (qualificação e mestrado).

Ao Prof. Dr. ALEJANDRO PEDRO AYALA, professor associado II do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, cuja ajuda e participação foram importantíssimos para o sucesso da pesquisa.

À Profa. Dra. ANA PAULA NEGREIROS NUNES ALVES, por sua importante e valiosa participação na análise das lâminas de histopatologia.

À Profa. Dra. CONCEIÇÃO APARECIDA DORNELAS, professora adjunta IV do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Agradeço por aceitar fazer parte da minha banca de qualificação e por compartilhar comigo tantos conhecimentos científicos ao longo dessa jornada e, sobretudo, a amizade.

Ao Prof. Dr. ROBERTO WAGNER BEZERRA DE ARAÚJO, professor associado do Departamento de Patologia e medicina Legal da UFC. Agradeço por aceitar fazer parte da minha banca de qualificação e contribuir para o meu aprendizado e aperfeiçoamento de técnicas e conhecimentos científicos sobre o assunto.

Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO CARLOS OTAVIANO DAVID MORANO, professor associado I DO DEPARTAMENTO DE Morfologia da UFC. Agradeço a valiosa ajuda com a troca de informações científicas e equipamentos.

Ao FRANCISCO JOSÉ OLIVEIRA DE QUEIROZ, ALCEU MACHADO DE SOUZA, biólogos e técnicos de laboratório de anatomopatológico da UFC e Hospital Albert Sabin. Agradeço a disponibilidade em me ajudar com o corte e preparo das lâminas de histopatologia

Às estudantes VALERIA CRISTINA DUARTE BARRETO E AUDINNE FERREIRA E SILVA, alunas do curso de Medicina da UFC e bolsistas voluntárias da pesquisa. Agradeço a amizade, o companheirismo e a preciosa participação que, com eficiência, me auxiliaram nas atividades laboratoriais do trabalho. Sem a participação de vocês teria sido impossível chegarmos ao fim desta pesquisa.

Ao Dr. ARMANDO DE LEMOS RIBEIRO, médico-veterinário, e ao ANTÔNIO HAROLDO PINHEIRO FERREIRA, técnico de laboratório em biotério do Departamento de farmacologia e Fisiologia da UFC, pela grande ajuda na aquisição dos animais.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em cirurgia pelos ensinamentos ministrados.

Às bibliotecárias da Biblioteca Ciências da Saúde, NORMA CARVALHO LINHARES, diretora, e ROSANE MARIA COSTA e ao assistente administrativo RAIMUNDO CEZAR CAMPOS DO NASCIMENTO. Agradeço a atenção, todo o suporte na orientação e busca dos

periódicos, assim como na correção e formatação desta dissertação conforme as normas da ABNT.

Às secretárias do Departamento de Pós-Graduação em Cirurgia, MARIA ELUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA FONTENELE DE SOUSA, pela ajuda com os assuntos acadêmicos.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, ADELÂNIA ROQUE MARINHO GUEDES, SHEYLA PRADO DOS SANTOS, AURA RHANES FARIAS NOGUEIRA YDA e FLÁVIA MARIA MARTINS AGUIAR, pela amizade, atenção e delicadeza sempre estampada no trato com os alunos. Um agradecimento particular para ADELÂNIA ROQUE MARINHO GUEDES que tantas vezes ministrou palavras de força, solidariedade e encorajamento.

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE), especialmente a ADRIANA ANDRADE CARVALHO, HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHÃES e ERIVANDA FRANÇA RIOS. Uma grande equipe, forte, perseverante e, sobretudo, divertida. Agradeço a oportunidade de ter conhecido cada um de vocês, a convivência e a troca de informações.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“É Deus quem me reveste de força e torna perfeito o meu caminho.
Ele me faz correr veloz como a gazela e me firma os passos nos lugares altos.
É ele que treina as minhas mãos para a batalha,
e assim os meus braços vergam o arco de bronze.
Tu me dás o teu escudo de livramento; a tua ajuda me fez forte.
Alargas sob mim o meu caminho, para que os meus tornozelos não se torçam”.

2 Samuel 22:33-37

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO SOBRE A DISSEMINAÇÃO DE TUMOR DE WALKER 256 IMPLANTADO NO SUBCUTÂNEO DO RATO WISTAR.

MILENA DO CARMO ARAÚJO. Pós-Graduação “strictu sensu” em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). 2018. Orientador: Manoel Odorico de Moraes. Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará.

Os resultados para aplicação de ultrassom terapêutico em modelos experimentais de câncer são inconclusivos no que tange o crescimento tumoral e a indução de metástases. A presença de neoplasia maligna constitui contraindicação para aplicação de ultrassom terapêutico, apesar da ausência de fundamentação científica convincente. O estudo objetivou avaliar o efeito do ultrassom terapêutico no carcinossarcoma de Walker, notadamente sobre o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases. O carcinossarcoma de Walker foi inoculado na região subcutânea do dorso de ratos Wistar. Distribuíram-se os animais aleatoriamente em três grupos: Contínuo (n=12), em que o ultrassom foi usado no modo contínuo; Pulsado (n=11), cujos animais foram tratados com ultrassom no modo pulsátil; e Controle (n=11), em que foi realizada a aplicação simulada do ultrassom. O tratamento deu-se em 7 dias, com aplicação do ultrassom por 9 a 15 minutos, com frequência 1 MHz, nos modos de emissão contínuo e pulsátil, com intensidade de 1 W/cm² SATA (média temporal e espacial / spatial average temporal average) e 1 W/cm² SATP (máximo pico temporal e espacial media / spatial average temporal peak), respectivamente. O tratamento nos modos contínuo e pulsátil não alterou a progressão temporal nem a velocidade de crescimento tumoral; tampouco teve influência na sobrevivência dos animais. Ademais, o acometimento metastático dos órgãos foi semelhante nos três grupos. Ultrassom, nos modos citados, não interferiu no crescimento do carcinossarcoma de Walker, nem no desenvolvimento de metástases.

Palavras-chave: Neoplasias induzidas por radiação; Modalidades de Fisioterapia; Terapia por ultrassom; Carcinoma 256 de Walker.

ABSTRACT

EFFECT OF THERAPEUTIC ULTRASOUND ON THE DISSEMINATION OF SUBCUTANEOUSLY IMPLANTED WALKER-256 TUMORS IN WISTAR RATS.

MILENA DO CARMO ARAÚJO. Pós-Graduação “strictu sensu” em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). 2018. Orientador: Manoel Odorico de Moraes. Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará.

Results for the use of therapeutic ultrasound in experimental models of cancer are inconclusive regarding tumor growth and metastasis induction. The presence of malignancy is a contraindication for therapeutic ultrasound use, despite the absence of well-established scientific reasons. The study aimed to evaluate the effect of therapeutic ultrasound on Walker carcinosarcoma, notably on tumor growth and metastasis development. Walker carcinosarcoma was inoculated subcutaneously on the back of Wistar rats. The animals were randomly distributed into three groups: Continuous (n = 12), submitted to ultrasound in the continuous mode; Pulsed (n = 11), in which the animals were treated with pulsed mode ultrasound; and control (n = 11), in which the sham use of ultrasound was performed. Treatment was carried out for seven days, with the application of ultrasound for 9-15 minutes at a frequency of 1 MHz, in the continuous and pulsed emission modes, with an intensity of 1 W/cm² SATA (spatial average temporal average) and 1 W/cm² SATP (spatial average temporal peak), respectively. The treatment using continuous and pulsed US did not change the temporal progression or tumor growth rate; it did not influence animal survival, either. Additionally, metastatic organ involvement was similar in all groups. The use of ultrasound in aforementioned modes, did not affect the growth of Walker carcinosarcoma, or the development of metastases.

Keywords: radiation-induced neoplasms; Physical Therapy Modalities; Ultrasound Therapy; Walker Carcinoma 256.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Pintura de um manuscrito do século XVI.....	02
FIGURA 02 - Divulgação do rascunho do genoma.....	07
FIGURA 03 - Capa dos periódicos Nature e Science.....	07
FIGURA 04 - Processo metastático.....	18
FIGURA 05 - Rato Wistar.....	27
FIGURA 06 - Tricotomia do dorso dos animais.....	28
FIGURA 07 - Implante macroscópico do carcinossarcoma de 256 Walker.....	28
FIGURA 08 - Registro do crescimento tumoral através do paquímetro digital.....	29
FIGURA 09 - Módulo de aquisição de dados com conectores para termopares.....	29
FIGURA 10 - Software de aquisição de dados.....	30
FIGURA 11 - Conectores registrando a temperatura do animal, do ambiente e da região.....	30
FIGURA 12 - Equipamento Sonacel Expert 1 MHz com transdutor com área reduzida.....	31
FIGURA 13 - Necropsia e separação dos órgãos para análise macroscópica.....	34
FIGURA 14 - Aspecto macroscópico do tumor com 21 dias após a inoculação.....	36
FIGURA 15 - Ferida cutânea em fase de cicatrização após a regressão do tumor.....	42
FIGURA 23 - Fotomicrografias de preparados histológicos do tumor dos grupos.....	44
FIGURA 24 - Fotomicrografias de preparados histológicos em órgãos.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 13 - Curvas temporais da temperatura corporal, tumoral e do ambiente.....	35
GRÁFICO 14 - Aumento da temperatura verificado nos grupos.....	35
GRÁFICO 15 - Progressão temporal do volume tumoral nos grupos.....	38
GRÁFICO 16 - Taxa média de crescimento tumoral relativa ao período de 1 a 4 dias.....	38
GRÁFICO 17 - Taxa média de crescimento tumoral relativa ao período de 4 a 7 dias.....	39
GRÁFICO 17 - Taxa média de crescimento tumoral relativa ao período de 1 a 7 dias.....	39
GRÁFICO 20 - Curvas de sobrevida referentes aos grupos Controle e Pulsado.....	42
GRÁFICO 21 - Curvas de sobrevida referentes aos grupos Controle e Contínuo.....	42
GRÁFICO 22 - Curvas de sobrevida referentes aos grupos Pulsado e Contínuo.....	43
GRÁFICO 24 - Número de órgãos acometidos por metástases observado nos grupos.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Progressão temporal do volume tumoral nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo nos dias 1 a 7 do período de tratamento.....	38
TABELA 02 - Principais alterações verificadas na análise histopatológica dos tumores nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo.....	45
TABELA 03 - Ocorrência de metástases nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SATA	Média temporal e espacial / spatial average temporal average
SATP	Máximo pico temporal e espacial media / spatial average temporal peak
a.C	Antes de Cristo
US	Ultrassom
USt	Ultrassom terapêutico
HIFU	Ultrassom focalizado de alta intensidade
TENS	Estimulação elétrica transcutânea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
W256	Walker256
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEPA	Comissão de ética em Pesquisa Animal
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
UFC	Universidade federal do Ceará
Gc	Grupo controle
USpul	Grupo ultrassom pulsátil
UScont	Grupo ultrassom contínuo
HE	Hematoxilina e Eosina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	24
2.2 Específicos.....	24
3 MÉTODO.....	26
3.1 Aspectos éticos.....	26
3.2 Local do procedimento.....	26
3.3 Animais.....	26
3.4 Material biológico.....	27
3.4.1 Implante macroscópico no dorso do animal.....	27
3.5 Registro do crescimento tumoral.....	28
3.6 Medição das temperaturas	29
3.7 Aparelho Ultrassom.....	31
3.8 Delineamento experimental.....	31
3.8.1 Piloto I: Ultrassom contínuo.....	31
3.8.2 Piloto II: Crescimento tumoral no grupo controle.....	32
3.8.3 Grupos experimentais.....	32
3.8.4 Modelo de aplicação do ultrassom terapêutico	33
3.8.5 Procedimento cirúrgico.....	33

3.8.6 Preparo das lâminas e análise histológica.....	34
3.8.7 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Implante heterotópico do carcinossarcoma de Walker.....	36
4.2 Método de aplicação do ultrassom	36
4.3 Crescimento tumoral.....	38
4.4 Análise de sobrevida.....	41
4.5 Disseminação metastática.....	43
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
APÊNDICES.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 A evolução da ciência oncológica e a teoria da disseminação tumoral

O termo "metástase" é derivado de uma palavra grega “*metastasis*” que significa mudanças de lugar, transferência. Em Medicina, a origem do emprego data dos anos 400-500 a.C no contexto da Teoria da Fisiologia Humoral, que acreditava que o equilíbrio da homeostase corporal era dado pelo perfeito balanceamento entre os quatro fluidos corporais ou humores: sangue, bile preta, bile amarela e fleuma (muco). Cada humor era ligado a um órgão diferente (coração, baço, fígado, cérebro), a um temperamento pessoal (sanguíneo, melancólico, colérico, fleumático), a um elemento físico terrestre (ar, terra, fogo e água) e uma estação específica (primavera, verão, outono, inverno). Se a mistura (*krasis*) destes quatro humores estivesse em equilíbrio (*eukrasia*), o corpo disporia de um estado de saúde. No entanto, o desequilíbrio (*dyskrasia*) entre os humores do corpo era visto como causador de várias doenças. Também conhecida por Teoria Humoral Hipocrática, surgiu em analogia à Teoria dos Quatro Elementos e foi estabelecida no tratado "Natureza do Homem", escrito por Hipócrates de Cós (460 – 377 a.C.). Médico grego, nascido na ilha de Cós ao largo da costa da Turquia, acreditava que o excesso de bile negra em um determinado órgão poderia causar câncer. O objetivo do tratamento nessa época era direcionado para restaurar o equilíbrio dos humores através da dieta, exercício e uso sensato de ervas, óleos, compostos terrestres (ocasionalmente metais pesados) ou cirurgia. A teoria perdurou durante toda a Idade Média. Durante este período autópsias foram proibidas por razões religiosas, limitando assim o conhecimento sobre o câncer (DIEL, 1994; SUDHAKAR, 2009; FAGUET, 2015).

O grande legado de Hipócrates, considerado o Pai da Medicina, foi ter rejeitado que as causas das doenças eram sobrenaturais e que as curas advinham de rituais e ofertas. Tinha a intuição e sabia que as doenças, até então atribuída aos deuses ou a magia, tinha sua origem em causas naturais, terrenas. Ele separou a Medicina da Mitologia e Filosofia e criou termo “*kakrinos*” (caranguejo) para definir o câncer. As projeções centrais e espinhosas de tumores observadas por ele lembrava o crustáceo (Figura 1), pois câncer significa caranguejo ou lagostim em latim (MOULD, 2008; MORA, 2013; FAGUET, 2015).

Figura 1 - Pintura de um manuscrito do século XVI que é preservado em Praga. A inscrição é em alemão e significa câncer no peito



Fonte: Mould (2008).

Claudio Galeno, mais conhecido como Galeno de Pérgamo (cidade onde nasceu), cuja vida decorreu entre os anos 131 e 200 da era cristã, foi o mais notável sucessor de Hipócrates que impulsionou tal legado por quase 15 séculos. A maior contribuição de Galeno para a compreensão do câncer foi a classificação dos tumores em três categorias que vai desde as neoplasias benignas até as malignas e que permaneceu até o século XVII (HAJDU, 2006; MORA, 2013; FAGUET, 2015).

Curiosamente, na medicina antiga o curso da doença acontecia em três fases: na primeira fase, o equilíbrio dos humores no corpo sofria uma transformação e o material doente era visto como “cru” (*apepsis*). Na segunda etapa, uma harmonia entre os humores era restaurada através de uma reação do corpo que levava a “cozinhar” (*pepsis*) os humores em excesso. Na terceira fase, o material que foi “cozinhado” era eliminado, seja fisiologicamente com as fezes, urina ou menstruação, seja através de processos patológicos, tais como vômitos, supuração ou expectoração (*krisis, lysis*). O material doente que era incompletamente “cozido” era eliminado ou depositado (*apostasis*) ou deslocado para alguma outra área dentro do corpo. O último

processo, referido como *metastasis*, e a sua ocorrência, muitas vezes trazia o início de um novo episódio de doença. Este conceito de metástase prevaleceu durante séculos (DIEL, 1994).

Galeno de Pérgamo, sobre as cirurgias do câncer, explicava:

Se você tentar curar o câncer por cirurgia comece por limpar o tumor melancólico. Faça incisões precisas em torno de todo o tumor para não deixar uma única raiz. Permita o sangue fluir, mas faça pressão sobre as veias circundantes de modo a espremer o sangue espesso. Em seguida, trate como outras feridas – Claudio Galeno (MOULD, 2008, p. 108).

Com fervor revolucionário, um médico suíço, Paracelso (1493-1541), pseudônimo de Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus Von Hohenheim, foi o primeiro a se opor à Teoria Humoral e quase conseguiu, mas seus oponentes alcançaram-no em Salzburgo, Áustria, e foi espancado até a morte. Ele propôs que o acúmulo de sal de enxofre e arsênico no sangue causava câncer, particularmente em mineiros, pedreiros, químicos e metalúrgicos. Seu importante legado foi a primeira descrição da associação entre doenças profissionais e câncer (HAJDU, 2006).

Um novo conceito de oncogênese e metástase foram desenvolvidos em resposta aos avanços da ciência médica durante o Iluminismo. Este período, dando prioridade à razão, trouxe grandes avanços, descobertas e invenções. Nos domínios da anatomia e fisiologia, a descoberta da circulação sanguínea em 1628 por William Harvey (1578 – 1657) e a descrição do sistema linfático por Thomas Bartholin em 1656. A descoberta do microscópio por Anton Van Leeuwenhoek em 1673 revolucionou a compreensão das doenças e o desenvolvimento de novas técnicas de investigação (DIEL, 1994; HAJDU, 2006; MORA, 2013).

Durante séculos o câncer era considerado uma doença sistêmica - desequilíbrio dos humores - que, por fim, iria se manifestar localmente. Seria a escola cirúrgica francesa que iria inverter a ordem dos fatores (MORA, 2013). Em 1757 que Henri François Le Dran (1685 – 1773), o cirurgião oncológico mais iluminado do século XVIII, descreveu com grande clareza o caminho da metástase no carcinoma da mama, incluindo o envolvimento dos pulmões. Sabia que se espalhava através dos linfáticos para os linfonodos regionais e daí para a circulação sistêmica, tornando a doença inoperável e fatal. Ele percebeu que a única esperança de cura residia no início da doença, isto é, se fosse possível uma ablação loco-regional completa o câncer poderia ser vencido. Estavam criados os fundamentos da mastectomia com esvaziamento axilar (MOULD, 2008; MORA, 2013; FAGUET, 2015).

Em 1773 a Academia de Lyon ofereceu um prêmio para a melhor tese sobre o tema “Qu'est-ce que le cancer” (O que é o câncer?). Bernard Peyrilhe (1735-1804), um dos precursores da Oncologia Experimental, ganhou o concurso com sua tese de doutorado em que investigou sistematicamente as causas, a natureza, o crescimento e o tratamento do câncer. Ele descreveu o câncer como uma doença primária local que se espalhava através dos vasos linfáticos e designou o termo “doença distal” o que hoje chamamos de metástase. No entanto, foi em 1829 que Joseph Récamier (1774 – 1852), um ginecologista francês, descreveu pela primeira vez a invasão local e venosa dos tumores e cunhou o termo "metástase" para definir disseminação à distância da doença. Na história ele se tornou mais conhecido por defender o uso do espéculo vaginal para examinar a genitália feminina (MOULD, 2008; MORA, 2013; FAGUET, 2015).

Em 1858 o grande patologista alemão Rudolf Virchow (1821 – 1920) defendia o conceito de que as metástases axilares funcionavam como uma barreira à invasão tumoral do organismo. Os seus compatriotas Karl Thiersch (1822-1895) e Wilhelm Waldeyer (1837-1921), reconheciam a embolização das células através dos linfáticos e das veias como sendo o mecanismo básico da metastatização. Ambos estruturaram as bases da Teoria Mecanicista que ganhou espaço a partir do século XIX através da comprovação morfológica de êmbolos metastáticos de células epiteliais em vasos linfáticos e linfonodos. De acordo com esta teoria, plenamente aceita no final do século XIX, as células tumorais disseminavam-se através dos vasos sanguíneos e linfáticos formando colônias tumorais no local onde fossem depositadas (DIEL, 1994; MORA, 2013).

Apesar de todo o avanço da ciência até aos dias atuais, metástase continua sendo a maior causa de morte em pacientes com câncer (MORENO-SMITH; LUTGENDORF; SOOD, 2010; SONNENSCHNEIN; SOTO, 2015; MENDOZA; KHANNA, 2009). Durante este processo, células cancerosas deixam o tumor primário, adentram a corrente sanguínea, ou linfática, e, conseqüentemente, são levadas até órgãos distantes para, eventualmente, evoluírem em locais secundários. Toda esta cadeia de eventos, um intrincado processo, é influenciada por inúmeros fatores e interações celulares e microambiente tumoral descrito pela primeira vez em 1889 por Stephen Paget (1855-1926). Este cirurgião inglês desenvolveu e publicou a teoria “Semente e Solo”, um enigma da especificidade tecidual. Propôs que o processo de metástase não ocorre por acaso: certas células tumorais com potencial metastático (a “semente”) possuem afinidades com o meio que favoreça seu crescimento em órgãos específicos (o “solo”) e este proporciona

um ambiente apropriado para o crescimento tumoral. Ele concluiu que as metástases se desenvolvem apenas quando a “semente” e o “solo” são compatíveis, ou seja, o local de metástase depende da afinidade do tumor ao microambiente (RIBATTI; MANGIALARDI; VACCA, 2006; CHU; ALLAN, 2012; FOKAS et al., 2007; MATHOT; STENNINGER, 2012).

As sementes de uma planta são transportadas em todas as direções; mas eles só podem viver e crescer, se cair em solo adequado. A distribuição do crescimento em outros lugares não é uma questão de sorte – Stephen Paget, 1889. (MATHOT; STENNINGER, 2012; RAMAKRISHNA; ROSTOMILY, 2013, p. 626).

Em 1928, James Stephen Ewing (1866 – 1943), patologista e oncologista, desafiou a teoria de Paget e defendeu que as metástases ocorrem por fatores puramente mecânicos, como resultado da estrutura anatômica do sistema vascular. Os êmbolos tumorais seriam mecanicamente presos à rede circulatória do órgão mais próximo e este receberia a maior carga de colonização metastática. Outros órgãos receberiam uma menor quantidade de células e desenvolveriam menos colônias metastáticas. Esta teoria prevaleceu por várias décadas. Sua proposta não explicou por que alguns órgãos, como o osso, cérebro e glândulas suprarrenais, são alcançados por uma fração muito pequena do sistema circulatório e, no entanto, são frequentemente envolvidos por tumores secundários de alguns tipos de câncer (RIBATTI; MANGIALARDI; VACCA, 2006).

A disseminação dos cânceres pode ocorrer através de uma dentre três vias; (1) implante direto das cavidades ou superfícies corpóreas, (2) disseminação linfática e (3) disseminação hematológica. Sobre a disseminação vascular, diversos fatores influenciam os padrões de distribuição das metástases. Conforme mencionado anteriormente, muitas observações sugerem que as células tumorais frequentemente se detêm no primeiro leito capilar que encontram – (Teoria de Ewing). Sendo assim, o fígado e os pulmões seriam os órgãos mais frequentemente envolvidos nesse tipo de disseminação. Porém, tal teoria não explica por completo as distribuições sistêmicas das metástases. Os músculos esqueléticos e o baço, por exemplo, apesar da grande porcentagem de fluxo sanguíneo que recebem e da presença de enormes leitos vasculares, raramente são acometidos por implantes secundários (STRICKER; KUMAR, 2010).

Embora estas teorias entrem em controvérsia com suas idéias, essas podem estar corretas a depender do tipo de tumor e microambiente (MILES et al., 2008; CHU; ALLAN, 2012).

Hoje, a teoria de Paget parece ser confirmada e apoiada por inúmeras publicações (HOON et al., 2006; FOKAS et al., 2007; MENDOZA; KHANNA, 2009; CHU; ALLAN, 2012; MATHOT; STENNINGER, 2012; RAMAKRISHNA; ROSTOMILY, 2013; SONNENSCHNEIN; SOTO, 2015). Durante os últimos anos, estudos através da biologia molecular identificaram importantes interações moleculares entre as células tumorais (“sementes”) e o microambiente tecidual (“solo”). Essas interações determinam a especificidade tecidual para formação de metástases (FOKAS et al., 2007; FIDLER; KIM; LANGLEY, 2007).

Todos os cânceres surgem como resultado de mudanças que ocorreram na sequência de DNA dos genomas das células cancerosas. Ao longo dos anos, muitas descobertas surgiram sobre essas mutações e genes anormais. Atualmente estamos passando por uma época em que é possível obter a sequência completa de DNA de um grande número de genomas de câncer (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

Esse conhecimento orienta e indicará o desenvolvimento de abordagens mais eficazes para reduzir a morbidade e mortalidade por câncer (VOGELSTEIN et al., 2013). Em abril de 2003, o Projeto Genoma Humano (PGH), que havia sido iniciado em 1989, foi finalizado. O Projeto Genoma Humano (PGH) teve como objetivo o sequenciamento dos 3,1 bilhões de bases nitrogenadas do genoma humano (GÓES; OLIVEIRA, 2014).

A apresentação do rascunho do Projeto Genoma Humano, em rede mundial, aconteceu em uma cerimônia no ano 2000 na Casa Branca (Figura 2). Os diretores dos dois grupos rivais, Francis Collins e J. Craig Venter declararam uma vitória conjunta e anunciaram uma trégua em suas corridas para decifrar o livro da vida (PORCIONATTO, 2006).

Figura 2 – A divulgação do rascunho do genoma, no ano 2000, em cerimônia na Casa Branca. Legenda: da esquerda para a direita: Craig Venter, o presidente dos Estados Unidos Bill Clinton e Francis Collins.



Fonte: Góes; Oliveira (2014).

Porém, a publicação desse rascunho só ocorreu em fevereiro de 2001, dias 15 e 16, respectivamente pelas revistas *Nature* e *Science* (Figura 3). A conclusão oficial do projeto aconteceu em abril de 2003, junto às comemorações dos cinquenta anos de descrição da estrutura molecular do DNA (GÓES; OLIVEIRA, 2014).

Figura 3 – Capas dos periódicos *Nature* e *Science*, respectivamente, de 15 e de 16 de fevereiro de 2001



Fonte: Góes; Oliveira (2014).

1.2 Tumor de Walker

O carcinossarcoma 256 de Walker (W256) foi primeiramente descrito por Earle em 1935. Recebeu este nome em homenagem ao Professor George Walker quando em seu laboratório, em 1928, observou massa tumoral que surgiu espontaneamente na glândula mamária de uma rata albina prenha. Conforme descrição de Walker, esta massa tumoral regredia durante o período de lactação e após este período voltava a agravar-se. Foi descrito histologicamente como adenocarcinoma e sua transplantabilidade foi comprovada pelo próprio Walker com um índice de aproximadamente de 56% de pega em ratos albinos adultos (EARLE, 1935). O tumor se desenvolve melhor em machos, que nas fêmeas, fato este relacionado à influência hormonal (GONZAGA et al., 2002). Devido a passagens sucessivas em animais de laboratório, foi reconhecido serem três as variantes histológicas do tumor de Walker, conforme o local de implantação: carcinoma, carcinossarcoma e sarcoma (IWAMA; FRANCO; LEMONICA, 1973).

Trata-se de uma neoplasia bem caracterizada, facilmente mantida em laboratório, de crescimento rápido e uniforme. Raramente apresenta regressões. Durante todas as transferências em laboratório no período de 1928-1932, o Dr. Walker observou apenas quatro casos de regressão do tumor. A regressão espontânea do W256 pode ocorrer e é um fenômeno pouco documentado (GUIMARÃES, 2010).

É muito utilizado na investigação experimental de neoplasias e várias são as publicações sobre o tumor de Walker mostrando a sua aplicabilidade, com índices de pega de 100%, em diversos modelos experimentais em rato Wistar: bexiga (DORNELAS et al., 2006), vagina e cérvix (BRITO et al., 2007), pulmão (GOMES NETO et al., 2002), estômago (OLIVEIRA et al., 1998), rim (GONZAGA et al., 2002), fígado (ZARUR et al., 2004), cavidade oral (ALVES et al., 2004) e subcutâneo (MORANO et al., 2011), entre outros.

Em 2018, foi desenvolvido um modelo com inóculo de carcinossarcoma de Walker em bolsa jugal de hamster para estudar os efeitos da própolis vermelha e *L*-lisina no tumor e na angiogênese tumoral (JUANES et al., 2018).

O W256 é considerado como um recurso valioso no auxílio à pesquisa básica em Oncologia (DORNELAS et al., 2006). Caracteriza-se por possuir comportamento biológico

agressivo com aspecto invasivo e alto poder de metástase por via linfática e hematogênica (MATTOS; MONTENEGRO; SILVA, 1980). Além disso, o tumor distingue-se por sua capacidade de crescimento contínuo, característica amplamente divulgada pelo Professor George Walker que foi o primeiro a conseguir o transplante sucessivo na região subcutânea em ratos. Earle (1935) relatou que depois de vários transplantes seriados do tumor na região subcutânea do rato doador original para grupos de ratos receptores jovens, foi possível, finalmente, obter cem por cento de crescimento tumoral em cada passagem na mesma região (EARLE, 1935).

Sobre a histopatologia do tumor de Walker alguns trabalhos observaram metástase nos rins, suprarrenais, coração e gânglios linfáticos (IWAMA; FRANCO; LEMONICA, 1973). Em outro artigo, Iwama de Mattos e colaboradores (1980), constataram envolvimento tumoral nos rins, fígado, suprarrenais, medula óssea, sangue circulante e, ocasionalmente, coração e língua (MATTOS; MONTENEGRO; SILVA, 1980). Villas-Bôas (1988) também identificou, ao exame microscópico, a existência de metástase e, em muitos casos, a presença de êmbolos tumorais indicando que o mecanismo da disseminação metastática foi vascular, principalmente venoso (VILLAS-BÔAS et al., 1988).

1.3 A história do ultrassom

O fascínio humano com som e ecos remonta a 1794, quando o pesquisador italiano Lazzaro Spallanzini demonstrou que os morcegos se orientavam mais pela audição do que pela visão para localizar obstáculos e presas. Após inúmeras experiências com morcegos cobertos por capuzes e com esferas de cera em seus ouvidos, esse investigador postulou que a capacidade de orientação durante o voo desses animais estaria ligada à audição. Seus contemporâneos o ridicularizaram e consideraram sua idéia absurda. Apenas em 1940 a ciência provou a existência desta relação, não somente em morcegos, como também em alguns mamíferos aquáticos que emitiam alguns impulsos ultrassônicos para reconhecer e avaliar o ambiente através de seus ecos. Ecolocalização ou Biosonar é uma sofisticada capacidade biológica de detectar a posição e/ou distância de objetos ou animais através de emissão de ondas ultrassônicas, no ar ou na água, e análise ou cronometragem do tempo gasto para essas ondas serem emitidas, refletirem no alvo e voltarem à fonte sobre a forma de eco (ondas refletidas) (KALKO; CONDON, 1998; IM SUK; WALKER; CARTWRIGHT, 2013; SEOANE; GARCIA; FROES, 2011).

O estudo do ultrassom (US) não se originou nos domínios da Medicina, mas da Física. Suas primeiras aplicações eram militares e industriais. Mesmo em Medicina, seu uso foi mais de ordem terapêutica do que de diagnóstico (NEWMAN; ROZYCKI, 1998; NYBORG, 2000; HAAR, 2007). No final dos anos 1800 os físicos trabalhavam no sentido de uma definição sobre a física da vibração do som, transmissão, propagação e refração (SEOANE; GARCIA; FROES, 2011).

Em 1877, John William Strutt (também conhecido como Sir Rayleigh) publicou a Teoria do Som, que se tornou a base para a ciência da Ultrassonografia. Suas contribuições foram consideradas tão significativas que Lord Rayleigh foi nomeado para o Conselho da Grã-Bretanha e da Invenção e Pesquisa, equipe que supervisionou a evolução do SONAR (SOund Navigation And Ranging) na II Guerra Mundial (NEWMAN; ROZYCKI, 1998).

Anos depois, em 1880, Pierre e Jacques Curie fizeram uma descoberta importante que eventualmente levou ao desenvolvimento do transdutor do ultrassom moderno. Demonstraram que se gerava um potencial elétrico quando se comprimia cristais, a piezoelectricidade. Além disso, eles demonstraram a existência do efeito inverso: que os cristais podiam ser deformados quando submetidos rapidamente a um campo elétrico, causando vibração. O termo deriva da palavra grega “*piezein*” que significa espremer ou pressionar. No entanto, devido ao pouco desenvolvimento da Engenharia Eletrônica da época, estes efeitos não foram totalmente utilizados (NEWMAN; ROZYCKI, 1998).

Depois que os materiais piezoelétricos se tornaram disponíveis, no início do ano de 1900, foi possível produzi-los em intensidade suficiente para que esse recurso se tornasse uma nova e interessante modalidade terapêutica. Nas décadas de 1920 e 1930 investigadores criaram certa expectativa sobre os relatos dos efeitos físicos, químicos e biológicos que poderiam advir do equipamento, variando-se as intensidades e as frequências. Isso levou ao desenvolvimento de várias aplicações da energia ultrassônica envolvendo uma gama de intensidades e frequências disponíveis com o objetivo de buscar o conhecimento do mecanismo básico envolvido. As aplicações em pesquisas foram mais diretamente relacionadas ao uso do ultrassom na Cirurgia e na Fisioterapia (NYBORG, 2000). Em 1927 foi reconhecido que o ultrassom pode produzir alterações perduráveis em sistemas biológicos e esse foi, então, o início dos estudos da terapia com ultrassom, incentivado por Wod & Loomis (HAAR, 2007; PARIZOTTO et al., 2003). O calor, como efeito terapêutico do ultrassom, foi sugerido em 1932

e uma das primeiras aplicações de ultrassom terapêutico (USt) ocorreu em Berlim em 1938 com Pohlman, em sua publicação sobre o efeito do US em tecidos humanos. Sugeriu que o poder do transdutor deveria ser limitado a 5 W/cm e que deveria ser mantido em movimento sobre os tecidos. Desde então sua utilização começou em Fisioterapia (KREMKAU, 1979; MASON, 2011; SEOANE; GARCIA; FROES, 2011).

Quase imediatamente após a 2ª Guerra Mundial, os equipamentos de diatermia por ultrassom foram introduzidos pela empresa Siemens e foram rapidamente divulgados e utilizados pelos países europeus (SCHWAN, 1982). Nas décadas de 1950 e 1960, a promessa para o uso em diagnóstico tornou-se cada vez mais evidente juntamente com a necessidade de definir as condições necessárias para a sua prática segura. Os avanços da tecnologia para o uso do US em diagnóstico trouxeram grandes possibilidades para as aplicações no campo da Medicina (NYBORG, 2000). Como vimos, as aplicações terapêuticas do ultrassom surgiram antes da sua utilização como técnica de Imaginologia (HAAR, 2007).

O US constitui um campo de pesquisa em expansão contínua. Novas aplicações clínicas são pesquisadas e desenvolvidas constantemente. Sua utilização em determinadas áreas já é bem definida, tais como Fisioterapia, diagnóstico, instrumentos cirúrgicos (bisturi ultrassônico) e litotripsia para a dissolução de cálculos renais (MASON, 2011; O'REILLY; HYNYNEN, 2015). Novas abordagens sobre o uso da energia ultrassônica no tratamento do câncer avançaram e estudos relatam o ultrassom focalizado de alta intensidade (HIFU) e o ultrassom de baixa intensidade (low-intensity ultrasound) (WOOD; SEHGAL, 2015).

HIFU é a sigla, em inglês, de ultrassom focalizado de alta intensidade (High Intensity Focused Ultrasound). Consiste em uma terapia minimamente invasiva para o tratamento do câncer de próstata localizado, em que a energia ultrassônica é emitida por um transdutor e dessa forma induz dano tecidual por efeitos mecânicos e térmicos. Os tecidos são destruídos pela necrose coagulativa, aquecendo os tecidos a $> 65^{\circ} \text{C}$. HIFU está se tornando cada vez mais aceito para o tratamento do câncer de próstata (BLANA et al., 2009).

O ultrassom de baixa intensidade tem sido usado em diversas aplicações terapêuticas. Juntamente com determinadas moléculas, tem sido usado para afetar as células tumorais (terapia sonodinâmica / sonodynamic therapy); para melhorar a atividade de moléculas quimioterápicas (quimioterapia mediada por ultrassom / ultrasound-mediated chemotherapy) e

para afetar células e seus componentes diretamente (sonoporação / sonoporation) (WOOD; SEHGAL, 2015).

Diferentemente das duas abordagens acima citadas, o ultrassom terapêutico, utilizado na Fisioterapia, é um tipo de energia não invasiva. Seus efeitos terapêuticos têm se mostrado benéficos no tratamento de uma grande variedade de condições, como cicatrização de úlceras, estímulo à neovascularização em tecidos isquêmicos, integração de enxertos de pele total, consolidação de fraturas, pseudoartroses e na cicatrização tendinosa (OLSSON et al., 2008).

1.4 O uso do ultrassom terapêutico em neoplasias

O ultrassom terapêutico (UST) é um dos recursos da eletroterapia mais utilizados na prática clínica do fisioterapeuta. Os efeitos do ultrassom têm sido explorados em diversas condições, incluindo fraturas, osteoartrite, artrite reumatóide, alívio da dor e tratamento de úlceras crônicas de difícil tratamento (LEITE et al., 2013; CULLUM; LIU, 2017). Embora de aplicação corrente na Fisioterapia, o ultrassom é um recurso físico ainda controverso quanto aos seus efeitos e as suas interações com o meio biológico (DURIGAN et al., 2006). Apesar da ampla utilização, muitas questões relacionadas aos efeitos sobre os sistemas vivos até hoje não foram respondidas. Na Medicina ou na Fisioterapia, devem-se levar em conta as influências do recurso terapêutico em tecidos neoplásicos (FORÝTKOVÁ; HRAZDIRA; MORNSTEIN, 1995).

Em uma revisão sistemática da literatura realizada entre 1980-2012 do MEDLINE, Cochrane Library, LILACS e SciELO, cujo objetivo foi avaliar o efeito da estimulação elétrica transcutânea (TENS), ou terapia de ultrassom, no tratamento de linfedema pós-mastectomia do membro superior, nenhum dos estudos referidos atestou segurança quanto ao uso do ultrassom ou TENS nas áreas ativas ou com elevado potencial de metástase de câncer de mama (SOUSA et al., 2014).

Conforme a prática do tratamento fisioterapêutico convencional, a terapia através do uso do ultrassom deve ser evitada em pacientes com câncer. Se há suspeita de malignidade na área a ser aquecida, não se recomenda a aplicação devido à possibilidade de exacerbação do crescimento tumoral ou aumentar a possibilidade de formação de metástases resultantes do aumento do fluxo sanguíneo e da vascularidade (FERREIRA et al., 2012; LEHMANN; DE

LAUTER, 1994; SICARD-ROSENBAUM et al., 1995; SICARD-ROSENBAUM et al., 1998). No entanto, esta afirmação não está adequadamente apoiada na literatura científica (SICARD-ROSENBAUM et al., 1995).

Foi em 1933 que o uso da terapia ultrassônica para o tratamento do câncer foi mencionado pela primeira vez na literatura e foi noticiado que o ultrassom não tinha qualquer efeito específico sobre carcinoma Ehrlich's (SZENT-GYORGY, 1933 apud HAAR, 1999).

O primeiro relatório de aplicação bem sucedida em metástases da pele humana aconteceu em 1944. Horvath (1944) afirmou que o câncer humano poderia ser curado através da terapia por US e as investigações nesse período acerca do efeito da energia ultrassônica sobre o tecido tumoral foram consideravelmente estimulados. No entanto, nesse mesmo ano, durante o Congresso Internacional em Erlangen, foi consenso que esse tipo de energia não poderia ser usado para tratamento de tumores. A regressão do crescimento tumoral poderia ser obtida em apenas alguns casos. Em outros, a terapia por US poderia causar um crescimento tumoral mais rápido e, portanto, foi considerada potencialmente perigosa. Por fim, concluiu-se que o uso dessa modalidade terapêutica para o tratamento de tumores não seria recomendado uma vez que o modo de ação desse tipo de energia sobre células tumorais não foi devidamente compreendido (LEHMANN; KRUSEN, 1955; SMACHLO et al., 1979; HAAR, 1999).

Em 1979, revisão publicada por Kremkau, relaciona 45 anos de pesquisa envolvendo o uso de US em tumores. A maioria dos estudos mostrava redução no crescimento tumoral. Porém, outros não indicaram o decréscimo ou o aumento do tumor. Kremkau atribuiu esses resultados a diferentes modelos experimentais de tumor e aos diferentes esquemas de tratamento utilizados nos estudos (KREMKAU, 1979).

Uma quantidade considerável de trabalhos experimentais durante muitos anos mostrou que o crescimento tumoral em animais experimentais poderia ser parcialmente inibido. As curas eram a exceção. No entanto, pequenas doses pareciam contribuir para o aumento a taxa de crescimento tumoral (LEHMANN; KRUSEN, 1955).

A publicação de Smachlo et al. (1979) foi a primeira a investigar o efeito do tratamento de US sobre o desenvolvimento de metástase. Utilizando uma linhagem de fibrossarcoma de

ratos, o estudo comparou o grupo submetido ao tratamento com US e outro com excisão cirúrgica apenas (SMACHLO et al., 1979).

Em 1988, Haar (1988) afirma que a aplicação do US sobre tumores é contraindicada, presumivelmente porque acreditava-se que haveria aumento do risco de desenvolver metástase. Para apoiar esta hipótese, faltavam evidências científicas que a defendesse diretamente. Não havendo tais comprovações se aumentaria o risco ou não, advertiu-se evitar o uso de US sobre os tecidos tumorais (HAAR, 1988 apud MAXWELL, 1995).

Muitos questionamentos foram levantados sobre os efeitos do US em diversos sistemas e os riscos potenciais da sua aplicação, sobretudo em Ginecologia e Obstetrícia. Uma maior atenção foi prestada sobre as interações do US diagnóstico e terapêutico com os tumores. Lejbkovicz, Zwiran e Salzberg (1993, p. 76) afirmaram:

É razoável assumir que as células cancerosas serão mais susceptíveis ao ultrassom do que as células normais, uma vez que foram detectadas alterações na adesão célula-célula, além de alterações cromossomiais. Com efeito, os diferentes tecidos sofrem alterações tanto na adesão da célula como quando expostos ao ultrassom.

Forýtková et al. (1995) citou que as células tumorais são influenciadas pelo ultrassom semelhantemente às células dos tecidos saudáveis. Levantaram a hipótese de que o US poderia prejudicar/pertubar o processo de reparação celular, ou causar estimulação do crescimento celular, induzindo danos nos processos de síntese do DNA. (A proliferação celular, bem como os processos de reparação, está ligada à síntese de DNA). A formação de metástases também poderia ser estimulada acidentalmente através da terapia om US (FORÝTKOVÁ; HRAZDIRA; MORNSTEIN, 1995).

Nesse mesmo ano, Sicard-Rosenbaum (1995) afirmou que o uso do US, na presença de neoplasias malignas, continua sendo contraindicado na prática da Fisioterapia. No estudo realizado, buscaram determinar se a aplicação do US fisioterapêutico contínuo alteraria o crescimento ou induziria metástases em camundongos. Os resultados confirmaram a hipótese evidenciando um aumento significativo do crescimento tumoral em fibrossarcoma. (SICARD-ROSENBAUM et al., 1995). Em 1998 realizaram outro estudo. Desta vez com o objetivo de determinar se o crescimento tumoral seria dependente da energia total aplicada e se existiria uma diferença de comportamento do tumor na forma de energia contínua ou pulsada. Concluíram que o US pode estimular o crescimento tumoral em camundongos. Porém,

reduzindo-se a quantidade total de energia ultrassônica poder-se-ia obter uma menor resposta do crescimento tumoral. Ao aplicar potências semelhantes, em ondas pulsadas e contínuas, os efeitos produzidos poderiam ser semelhantes. O crescimento tumoral pode estar relacionado com a quantidade total de energia ultrassônica aplicada sobre o tumor (SICARD-ROSENBAUM et al., 1998).

Linda Maxwell (1995), em uma revisão bibliográfica, explorou mecanismos que envolvem a metástase tumoral e expôs hipóteses de como o US poderia acelerar o crescimento tumoral e promover a disseminação de células neoplásicas. Este processo ocorreria por meio da angiogênese estimulada pelo US assim como através do estímulo mecânico sobre as células tumorais ocasionando a separação de algumas células do tumor primário. No entanto, não há evidências claras para apoiar essas hipóteses (MAXWELL, 1995).

A dor é um sintoma freqüente nas neoplasias malignas. É talvez o sintoma mais temido da doença neoplásica. Os sintomas álgicos somam-se às incapacidades primariamente relacionadas à neoplasia e seu tratamento. Essa sintomatologia pode causar insônia, anorexia, confinamento ao leito, perda do convívio social, redução das atividades profissionais e de lazer. A dor relacionada ao câncer acomete cerca de 50% dos doentes em todos os estágios da doença e em torno de 70% dos indivíduos com doença avançada. (PIMENTA; KOIZUMI; TEIXEIRA, 1997). O fisioterapeuta é um dos profissionais que trabalha de forma direta com o paciente oncológico, não só durante seu processo de reabilitação, mas também na fase paliativa da doença, quando a dor é o sintoma mais freqüente e causa de sofrimento desse paciente.

O controle da dor aumenta a tolerância dos pacientes aos procedimentos diagnósticos e terapêuticos do câncer. Dessa forma, é de fundamental importância proporcionar ao paciente maior bem estar, melhora funcional e melhor qualidade de vida (SAMPAIO; MOURA; RESENDE, 2005). Inerente ao profissional fisioterapeuta, o Código de Ética e Deontologia da Fisioterapia determina as responsabilidades do fisioterapeuta:

Art. 8º. O fisioterapeuta deve se atualizar e aperfeiçoar seus conhecimentos técnicos, científicos e culturais, amparando-se nos princípios da beneficência e da não maleficência, no desenvolvimento de sua profissão, inserindo-se em programas de educação continuada e de educação permanente (COFFITO, 2013, p. 85).

Beneficência representa promover o bem estar, prevenir ou remover danos. O princípio da não maleficência visa a não infligir mal, causar dano ou injúria (PIMENTA et al., 2001). Mesmo argumentando a contraindicação do uso do ultrassom em condições neoplásicas, Sicard-Rosenbaum (1998) menciona que os pacientes poderiam se beneficiar do recurso terapêutico caso surja aplicação segura desta modalidade (SICARD-ROSENBAUM et al., 1998). A ação mecânica aumenta a permeabilidade celular, diminui a resposta inflamatória, reduz a dor por meio da diminuição da velocidade de condução nas fibras nervosas e facilita o processo de cicatrização dos tecidos moles. O US contínuo tem ação térmica que contribui para o aumento da vasodilatação local e, conseqüentemente, melhora a inflamação crônica, reduz o espasmo muscular e a dor (RICCI; DIAS; DRIUSSO, 2010).

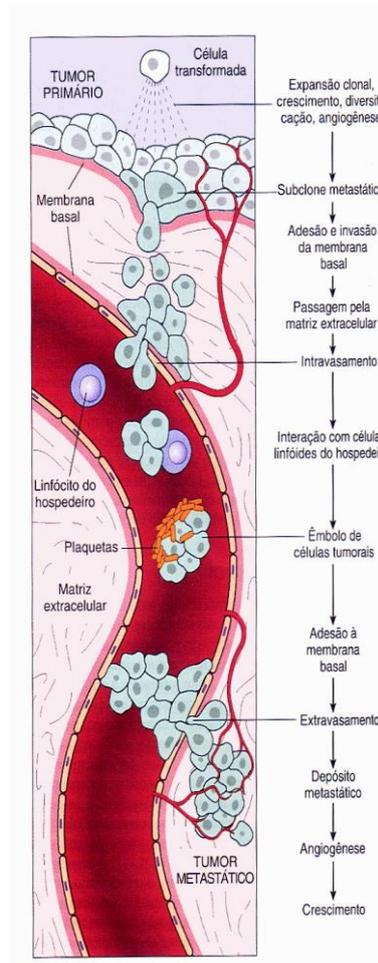
O uso da US em cicatrizes cirúrgicas em pacientes com câncer de mama no pós-operatório teria uma indicação teórica devido aos efeitos bem conhecidos de promover a cicatrização tecidual acompanhada de extensibilidade do tecido colágeno. O US também promove reparação tecidual e uma cicatrização mais uniforme, sem pontos de tecido fibroso (FERREIRA et al., 2012). Outra possível aplicação benéfica do uso do ultrassom seria no tratamento do linfedema de membro superior pós-mastectomia. Através do aumento do metabolismo e da microcirculação, acredita-se que esses processos possam melhorar o fluxo linfático e possivelmente reduzir a fibrose, comumente observadas após Fisioterapia Complexa Descongestiva. Porém, devemos sempre considerar o risco de aplicar este recurso, lembrando a ameaça de recorrência quando não se tem conhecimento se a doença está ativa ou não (SOUSA et al., 2014). É uma atitude ética, pois não se sabe qual o efeito que esse recurso terapêutico irá produzir.

Utilizado com frequência nos protocolos de Fisioterapia para o pós-operatório de abdominoplastia, o uso do ultrassom está vinculado diretamente ao processo de cicatrização. Seu objetivo de utilização precoce é promover uma melhora tanto na circulação sanguínea quanto na linfática, possibilitando assim uma melhor nutrição celular. No caso de aderências e fibroses instaladas, o ultrassom pode ser utilizado como coadjuvante na diminuição dessas sequelas e no aumento da elasticidade do tecido conjuntivo (SILVA et al., 2012).

Metástase é um processo complexo que exige várias etapas para ser bem sucedido: angiogênese, proliferação, invasão, embolização e evasão de vigilância do sistema imunológico (Figura 4). O crescimento de um tumor para além de 2 mm de tamanho requer vascularização

do tumor, que também fornece vias para a disseminação de células metastáticas. Portanto, a angiogênese é requerida não somente para o crescimento continuado, mas também para o acesso à vasculatura e posterior formação de metástase. Esse é o processo através do qual as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários ao fornecimento dos nutrientes essenciais para seu crescimento acelerado. Isso acontece de forma complexa e é crucial para o crescimento do tumor e da metástase (STRICKER; KUMAR, 2010). Além disso, uma célula de tumor deve ganhar a capacidade de desprender do tumor primário, invadir através da membrana basal, embolizar para a corrente sanguínea e fugir da vigilância do sistema imunológico. A célula, então aprisionada em leitos capilares, deve ser capaz de extravasar da corrente sanguínea e aderir aos tecidos do parênquima em um órgão distante. Uma vez instalada, a célula metastática interage com seu novo microambiente, multiplica-se e, finalmente, desenvolve o seu próprio suprimento sanguíneo. Quando a célula tumoral deixa de seguir qualquer uma destas etapas ela será incapaz de produzir metástase e o processo é abortado (MORENO-SMITH; LUTGENDORF; SOOD, 2010).

Figura 4 - Processo metastático



Fonte: Robbins e Cotran (2005).

Uma teoria defendida por Ter Haar (1987) é a de que o US teria o potencial mecânico de lesionar os tumores de diversas formas e assim aumentar a possibilidade de desenvolver metástase. A aplicação do US requer contato direto através de um meio de transmissividade e recomenda-se que o transdutor seja movido de forma contínua durante todo o tratamento. Esta técnica agiria como uma “massagem superficial”. Existiria a possibilidade de que os movimentos suaves do US alterariam o estroma tumoral que é frágil, constituído com pouco tecido conjuntivo de sustentação (HAAR, 1987 apud MAXWELL, 1995). Uma vez que o US é recomendado no tratamento de aderências visando acelerar a degradação do tecido fibroso, o US poderia provocar a separação de células tumorais, fracamente ligadas, e causar o rompimento dos delicados vasos tumorais. A célula tumoral, sendo então destacada do tumor primário, invadiria as membranas, os vasos sanguíneos e linfáticos e, posteriormente, implantar-se-ia em um novo microambiente para formar tumores secundários (MAXWELL, 1995).

Wood et al. (2005) realizaram um estudo visando explorar os efeitos do US utilizado na Fisioterapia sobre a vasculatura tumoral. Nesse estudo foi observado um efeito antivascular e com ação predominantemente sobre as estruturas vasculares intratumorais. Houve rompimento das paredes dos vasos sanguíneos com hemorragia associada, congestão vascular e consequente trombose. Decorrente da energia ultrassônica, particularmente sobre os vasos tumorais, observou-se redução da vascularidade do tumor que persistiu por 24 horas conduzindo a uma isquemia. A atividade angiogênica tumoral pode ser singularmente sensível a intensidades de US idênticas às aquelas usadas na prática da Fisioterapia Clínica.

Morano et al. (2011) desenvolveu um modelo para avaliar os efeitos do ultrassom como fonte de calor para o tratamento de tumores de Walker subcutâneos implantados em ratos. Nesse estudo avaliaram o efeito antitumoral e antiangiogênico da hipertermia por US, isolado e em combinação com drogas antiangiogênicas (etoricoxibe e pegaptanibe). Para alcançar esse objetivo realizaram o implante do tumor Walker 256 na tela subcutânea do animal, randomizados em dois grupos: controle e hipertermia com ultrassom. Os animais foram tratados com hipertermia aplicada através do aparelho de ultrassom, mantida em temperatura de 45 ° C, durante cinco minutos, aplicação única, no terceiro dia após a inoculação. Observaram que a aplicação do US induziu o crescimento tumoral nos primeiros cinco dias, sendo notória nos dias subsequentes, a diminuição do tamanho dele. Segundo os autores, o efeito pode estar relacionado com a morte celular induzida por leve hipertermia. O resultado da contagem dos vasos em lâminas histológicas ou histomorfometria demonstrou uma significativa diminuição da densidade microvascular dos tumores submetidos à hipertermia. Os autores não investigaram o desenvolvimento de metástase.

Ferreira et al. (2012) induziu câncer mamário em 68 ratos Sprague-Dawley, fêmeas. Doze grupos de animais foram usados e classificados da seguinte forma: 1) Indução de câncer mamário com a glândula mamária removida: 1.1. Grupo Contínuo US; 1.2. Grupo Pulsado US; 1.3. Grupo sem US; 2) Sem indução de câncer mamário com a glândula mamária removida: 2.1. Grupo Contínuo US; 2.2. Grupo Pulsado US; 2.3. Grupo sem US; 3) Indução de câncer mamário sem a glândula mamária removida: 3.1. Grupo Contínuo US; 3.2. Grupo Pulsado US; 3.3. Grupo sem US; 4) Sem indução de câncer mamário sem a glândula mamária removida: 4.1. Grupo Contínuo US; 4.2. Grupo Pulsado US; 4.3. Grupo sem US. Dias depois da indução de câncer, os cânceres foram removidos. Após 03 semanas, os animais foram tratados com US contínuo e pulsado durante 10 dias. Os resultados mostraram que 44,4% dos ratos tratados com

US contínuo desenvolveram recorrência local, enquanto entre os ratos tratados com os US pulsado, 22,2% apresentaram recidiva tumoral local.

1.4.1 Efeito do ultrassom sobre fluxo sanguíneo e vascularização

Todos os tumores malignos apresentam dois componentes básicos: (1) parênquima, constituído por células neoplásicas clonais e (2) estroma, feito de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, macrófagos e linfócitos. As células neoplásicas determinam grande parte do comportamento tumoral e suas consequências patológicas, porém, seu crescimento e evolução são criticamente dependentes do seu estroma. Um suprimento sanguíneo estromal adequado é requisito para as células tumorais viverem e se dividirem, e o tecido conjuntivo estromal provê o molde estrutural essencial para as células em crescimento (STRICKER; KUMAR, 2010).

Existem alguns pré-requisitos para o crescimento neoplásico. Os tumores sólidos, por exemplo, não são capazes de crescer além de 2 mm de diâmetro a menos que sejam vascularizados. À medida que um tumor se desenvolve, a elevação do fator angiogênico resulta no surgimento de novos vasos sanguíneos para suprir o tumor. Contudo, a vasculatura tumoral é anormal. São frágeis, dilatados e possuem um padrão de conexão aleatório. As células endoteliais são fracamente aderidas umas às outras, ou seja, são formadas por células neoplásicas com baixa adesividade entre si. A membrana basal dos vasos é descontínua ou não se forma por completo (STRICKER; KUMAR, 2010). Essa proliferação vascular gera, então, uma rede facilmente invadida pelas células tumorais com condições favoráveis à penetração e migração celular através da corrente sanguínea (WOOD et al., 2005; CAMPOS, 2000).

A irradiação ultrassônica aumenta o fluxo sanguíneo local. Amâncio et al. (2006) realizou um estudo histológico experimental sobre a influência do ultrassom terapêutico na integração de enxertos de pele em 20 coelhas adultas. O trabalho demonstrou que o ultrassom induz alterações morfológicas nos processos biológicos envolvidos na integração do enxerto de pele, como a proliferação das células germinativas e a formação de novos vasos sanguíneos, e sugerem que há potencial para uso clínico em seres humanos. Mendonça et al. (2006) também observou um incremento da angiogênese ao avaliar os efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização de lesão cutânea produzida na região dorsal de ratos (AMÂNCIO et al., 2006; MENDONÇA et al., 2006).

Uma vez na circulação, as células tumorais são particularmente vulneráveis à destruição pelas defesas imunes naturais e adaptativas do hospedeiro. Os êmbolos tumorais parecem aumentar a sobrevivência das células tumorais na circulação, funcionando como uma “máscara” para o sistema imunológico, além de facilitar sua implantação nos capilares sanguíneos (CAMPOS, 2000).

1.4.2 Efeito do ultrassom sobre a membrana basal

Para que as células se soltem do tumor primário, entrem nos vasos sanguíneos ou linfáticos e produza um segundo crescimento em um sítio distante, elas devem invadir primeiramente a matriz extracelular (MEC). Os tecidos são organizados em compartimentos separados um do outro por dois tipos de MEC: a membrana basal e o tecido conjuntivo intersticial. O tumor rompe a membrana basal, atravessa o tecido conjuntivo intersticial, para ter acesso à circulação através da penetração da membrana basal vascular. As células tumorais secretam enzimas proteolíticas, ou induzem as células estromais (p.ex., fibroblastos e células inflamatórias) a elaborar proteases. Muitas famílias de proteases diferentes, tais como as metaloproteinases (MMP), que estão relacionados à invasão por células tumorais. Portanto, as MMP regulam a invasão tumoral através da remodelação de componentes insolúveis da membrana basal e da matriz intersticial. Esse processo é repetido ao contrário quando um êmbolo de células tumorais extravasa em um sítio distante. A invasão da MEC, portanto, inicia a cascata metastática mencionada acima e é um processo ativo que pode ser separado em diversos passos (STRICKER; KUMAR, 2010).

Um efeito terapêutico significativo do ultrassom está relacionado à estimulação da atividade dos fibroblastos, que produz um aumento na síntese protéica, aumento do fluxo sanguíneo e angiogênese, entre outros (OLIVEIRA et al., 2015).

O microfluxo, um dos efeitos não térmicos do ultrassom, corresponde a movimentos unilaterais que ocorrem em fluidos submetidos a um campo ultrassônico. Esses movimentos originam forças e tensões que podem modificar a posição de partículas intra e extracelulares, ou mesmo a configuração normal das células, e conseqüentemente podem afetar a atividade celular. Desse modo, o microfluxo pode alterar organelas celulares e membranas de maneira reversível ou irreversível, dependendo de sua magnitude. Dependendo do tipo de célula, a alteração produzida pelo ultrassom pode desenvolver modificações na motilidade, síntese ou

secreção celular (BERTOLINI et al., 2012; SPEED, 2001; BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001).

Já cavitação, a formação e pulsação de bolhas de gás ou vapor no interior dos fluidos, surge como resultado das mudanças de pressão no campo acústico induzidas pelas ondas do US. Ela também exerce influência para promover a melhora do microfluxo acústico. A cavitação pode ser estável (que parece ocorrer em doses terapêuticas) ou instável, sendo que a primeira é decorrente de uma vibração estável, em resposta às alterações de pressão regularmente repetidas, enquanto a segunda ocorre quando há alterações irregulares de pressão e altas temperaturas na região da bolha colapsada e pode desintegrar localmente os tecidos (JOHNS, 2002). Devido ao efeito mecânico gerado, o efeito de micro-massagem pode ser observado resultando em um aumento no metabolismo celular, fluxo de sangue e suprimento de oxigênio (FERREIRA et al., 2012). Sabemos que o estroma dos tumores é frágil com pouco tecido conjuntivo de suporte. Este efeito (micro-massagem) poderia causar a separação de células tumorais fracamente ligadas e o rompimento dos frágeis vasos tumorais (HAAR, 1987 apud MAXWELL, 1995).

A literatura fornece vários exemplos nos quais a exposição de células ao ultrassom terapêutico sob condições não térmicas modifica as funções celulares, modulam as propriedades da membrana e alteram a proliferação celular (ARTILHEIRO et al., 2012).

Sobre proliferação celular, na camada basal ocorre uma constante renovação celular, com intensa atividade mitótica. Essas células sofrem diferenciação, sendo empurradas para a camada espinhosa e lúcida até chegarem à primeira camada da epiderme (camada córnea). De Bem et al. (2010) observaram aumento da espessura da epiderme que provavelmente ocorreu por estímulo na mitose das células da camada basal da epiderme. Para tais resultados, os autores utilizaram 5 grupos, irradiados com diferentes intensidades (0,0 W/cm²; 0,5 W/cm²; 01,0 W/cm²; 1,5 W/cm²; 2,0 W/cm²), frequência de 3 MHz, divididos em duas partes: lado esquerdo controle do animal e lado direito experimental. As alterações mostraram-se visíveis a partir das amostras irradiadas com 1 W/cm², quando comparadas ao grupo controle. *“Além da escassa literatura sobre efeitos do US em tecidos sadios, não se sabe ao certo que fatores causam essas modificações no tecido biológico”* (DE BEM et al., 2010).

Em condições térmicas, o processo inflamatório produzido pelo calor caracteriza-se por: vasodilatação local, com conseqüente excesso de fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade dos capilares, permitindo o extravasamento de grande quantidade de líquido nos espaços intersticiais (LOPES et al., 2005).

Conforme o exposto, o ultrassom terapêutico teria potencial para estimular o fluxo sanguíneo, a angiogênese e romper mecanicamente a membrana basal dos tumores e, assim, aumentar a possibilidade de metástase (MAXWELL, 1995).

Tradicionalmente, os efeitos biofísicos do US são separados em mecanismos térmicos e não térmicos. Porém, esta separação tem sido feita apenas para classificar o mecanismo. Na prática, entretanto, é extremamente difícil distingui-los, pois as alterações mecânicas e térmicas ocorrem simultaneamente (DEMMINK et al., 2003; BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001). O ultrassom afeta os tecidos biológicos normais e lesionados. Os tecidos lesionados podem ser mais receptivos ao ultrassom do que os tecidos normais. Quando o ultrassom é aplicado por seus efeitos térmicos, os efeitos biofísicos do ultrassom não térmicos também ocorrem e podem lesionar os tecidos normais (DRAPER; PRENTICE, 2014).

Os efeitos do US dependem de muitos fatores físicos e biológicos, tais como a intensidade, o tempo de exposição e o estado fisiológico da estrutura a ser tratada. Tais fatores complicam a compreensão exata do mecanismo de ação do US na interação com os tecidos biológicos (LOPES et al., 2005; DURIGAN et al., 2006). Além disso, os efeitos atribuídos ao tratamento ultrassônico são dependentes de mediadores químicos e mecanismos moleculares, os quais não são bem conhecidos (LOPES et al., 2005).

1.4.3 Relevância e Justificativa

Observa-se uma escassez de trabalhos fazendo referência ao uso do US principalmente aos que se refere à investigação do crescimento tumoral e desenvolvimento de metástase. Ao longo dos anos de pesquisa percebe-se a utilização de diferentes modelos experimentais e esquemas de tratamentos utilizados, os quais resultam em diferentes resultados concernentes ao crescimento tumoral e desenvolvimento de metástase.

Atualmente prevalece a contraindicação do uso do USt se há suspeita de malignidade na área a ser aquecida e se a temperatura a ser usada estiver abaixo daquelas terapêuticas utilizadas no combate ao câncer. Nessa situação, em temperaturas abaixo de 42°C, situadas na faixa terapêutica $> 37^{\circ}\text{C}$ e $< 42^{\circ}\text{C}$, existe a possibilidade de acelerar o crescimento tumoral. Isso seria resultante do aumento do fluxo sanguíneo, da vascularidade, seja através do uso da modalidade contínua ou pulsada (SICARD-ROSENBAUM et al., 1995).

Embora os efeitos de ultrassom terapêutico no crescimento de tumores e metástase ainda não tenham sido comprovados, o uso do ultrassom continua sendo uma contraindicação em pacientes portadores de câncer.

De fato, muitos trabalhos foram realizados utilizando o ultrassom como uma ferramenta na terapia do câncer. É difícil comparar os resultados de vários investigadores, uma vez que muitos esquemas diferentes tratamentos e sistemas de modelos têm sido usados. Fica evidente a necessidade de mais investigações para determinar parâmetros físicos adequados e as suas interações com o tecido neoplásico.

É preciso ter cautela ao tentar reproduzir em ambiente clínico os resultados de pesquisas experimentais, pois as condições podem não ser equivalentes. Os efeitos do ultrassom em processos/tecidos neoplásicos ainda permanecem obscuros, existindo a necessidade de mais estudos para o entendimento da questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliação do efeito do ultrassom terapêutico (utilizado na fisioterapia) no desenvolvimento de metástases quando aplicado em tumor de Walker em rato Wistar.

2.2 Específicos

- Avaliação do ultrassom terapêutico (pulsado e contínuo) na temperatura tumoral;
- Avaliação do ultrassom terapêutico indução do crescimento tumoral em diferentes períodos;
- Analisar a sobrevivência dos animais;
- Analisar a disseminação metastática nos órgãos: pulmões, coração, estômago, fígado, baço, rins e intestinos.

3 MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O estudo está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) sob protocolo número 69/08 (APÊNDICE). O projeto foi aprovado em reunião realizada em 03 de setembro de 2009.

3.2. Local do procedimento:

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE), localizado no departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.3. Animais

Foram utilizados 46 ratos adultos (idade: 120 dias), machos, albinos, da linhagem Wistar, com peso médio de 243 g com desvio padrão de 28,6 g, procedentes do Biotério Central da UFC. Recebíamos os ratos com poucos dias de nascidos (em torno de 30 dias) e aguardávamos cerca de dois meses para que alcançassem o peso desejado para o experimento (Figura 05).

Os animais foram distribuídos e mantidos, aleatoriamente, em gaiolas de polipropileno, com tampa de grade metálica, cada uma contendo grupos de três até cinco ratos com livre acesso à ração alimentar e água. Eram submetidos regularmente à pesagem. O ambiente era mantido em refrigeração com temperatura média de 24-25°C, observando-se a alternância dos ciclos claro-escuro a cada 12 horas. As gaiolas eram higienizadas regularmente pela pesquisadora e alunas de graduação do curso de Medicina da UFC.

Os ratos foram observados e cuidados durante todo o período em que foram mantidos pela pesquisadora no biotério do LOE até atingirem a idade adulta. Acompanhamos até o óbito do animal para registro de sobrevivência do experimento.

Figura 05 - Rato Wistar



3.4. Material biológico:

Foi utilizada a suspensão de células neoplásicas do W256 para implante heterotópico, macroscópico, na tela subcutânea do dorso do animal. O tumor nos foi gentilmente cedido, em 1992, pelo professor Rui Curi, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e vem, desde então, sendo mantido no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, através de implantes i.m. sucessivos a cada sete dias.

3.4.1. Implante macroscópico do W256 no dorso do animal:

Para a obtenção do inóculos de células de Walker, após uma semana, os tumores i.m foram retirados de dois animais doadores e colocados em uma placa de Petri contendo 05 mL de Ringer lactato e 01 mL de solução de Gentamicina (10 mg/mL). Este material foi fragmentado e macerado na mesma solução e feitas as diluições para obtenção de uma concentração final de $2,0 \times 10^6$ células /mL.

Os animais foram anestesiados com doses adequadas através de uma associação de Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), administradas simultaneamente por via intramuscular. O dorso dos animais foi tricotomizado (Figura 06).

Figura 06 - Tricotomia do dorso dos animais



Foi escolhido o dorso do animal para o local do implante e inoculada a solução neoplásica na região subcutânea do dorso do animal (Figura 07).

Figura 07 - Implante macroscópico do carcinossarcoma Walker 256



3.5. Registro do crescimento tumoral:

Foi registrado o crescimento do tumor através de paquímetro digital em todo o período do experimento (Figura 08). As anotações sobre o crescimento do tumor eram registradas diariamente em uma planilha e em seguida transferidas para o Excel. Para o cálculo do volume tumoral foi utilizado a seguinte fórmula:

$$V = \frac{\pi \cdot D \cdot d^2}{6}$$

Onde:

D - diâmetro maior

d - diâmetro menor

V - volume tumoral

Figura 08 - Registro do crescimento tumoral através do paquímetro digital.



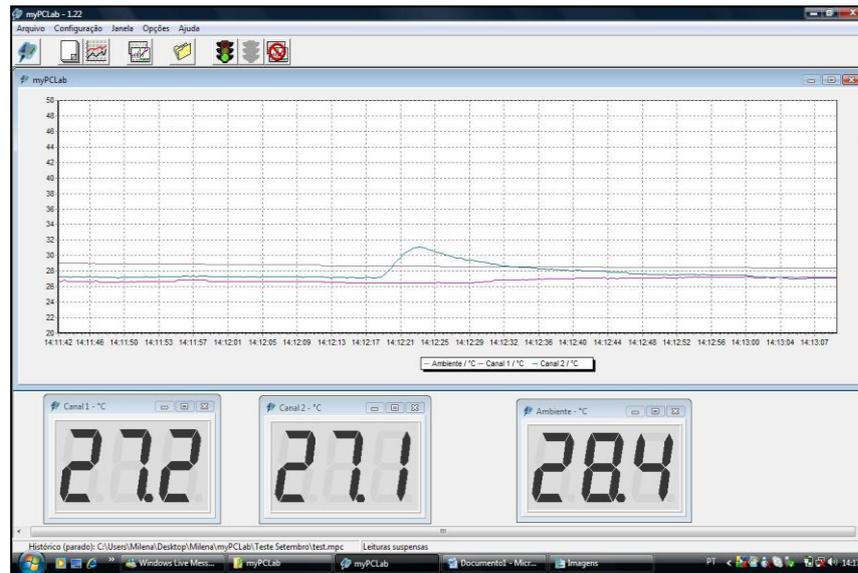
3.6. Medição das temperaturas

Utilizamos o myPCLab, um módulo de aquisição de variáveis analógicas compacto, com duas entradas analógicas configuráveis e interface USB para comunicação com o computador portátil (Figura 09). Este módulo, quando adaptado ao computador, dispõe de ferramentas que possibilitam a monitoração e registro da temperatura medida em termopares de tipo T (cobre/constantan). Acompanha aplicativo Windows para exibição das leituras instantâneas da temperatura em função do tempo. O aplicativo permite o registro das leituras do myPCLab com recursos para visualização gráfica e exportação de dados em diferentes formatos (Figura 10). Foi adquirido no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, com a colaboração do Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala e seus alunos. A participação dos colegas da Física contribuiu sobremaneira para a realização do experimento e sucesso do experimento.

Figura 09 - Módulo de aquisição de dados com conectores para termopares.



Figura 10 - Software de aquisição de dados.



Em cada entrada dos dois conectores foram inseridas duas agulhas, uma delas posicionada no sentido paralelo ao dorso do animal, inserida no tumor, e outra na parte interna da pata traseira, onde era fixada por fita adesiva (Figura 11). O medidor registrava a temperatura do animal, do ambiente e da região tumoral. Os animais foram anestesiados antes da colocação das agulhas. Os termopares foram introduzidos antes do início do experimento. Ao término da aplicação era feita a higienização do dorso do animal, a retirada e a higienização das agulhas do termopar e cabeçote do ultrassom para a seguinte aplicação com outro animal. O módulo myPCLab realizava a leitura instantânea das temperaturas em função do tempo a partir em que o ultrassom era ligado.

Figura 11 - Conectores registrando a temperatura do animal, do ambiente e da região tumoral.



3.7. Aparelho Ultrassom:

O equipamento utilizado em nosso experimento foi um ultrassom portátil de uso clínico, SONACEL EXPERT 1 MHz, fabricado pela empresa BIOSET – Indústria de tecnologia Eletrônica Ltda., onde foi comprado e devidamente calibrado. O transdutor do equipamento foi especialmente confeccionado para o experimento para ter uma área de radiação efetiva (ERA) de 0,5 cm², tornando adequada a aplicação do aparelho nos animais estudados (FIGURA 12). Nos tecidos biológicos, quanto menor a frequência das ondas sonoras, maior a profundidade de penetração. Ondas sonoras de maior frequência são absorvidas nos tecidos mais superficiais. Com 3 MHz, a energia é absorvida três vezes mais rápido do que a frequência do ultrassom de 1 MHz. Esse índice de absorção mais rápido resulta em um aquecimento mais rápido nos tecidos superficiais. A energia de ultrassom gerada a 1 MHz é transmitida através de tecidos mais superficiais e absorvidas primariamente nos tecidos mais profundos, em profundidades de 2 a 5 cm, útil quando se deseja um efeito nas estruturas profundas (DAVID; WILLIAM, 2014).

Figura 12 - Equipamento Sonacel Expert 1 MHz.



3.8 Delineamento experimental

3.8.1. Piloto I: Ultrassom contínuo (n=05)

Inicialmente estabelecemos um grupo piloto que teve como objetivo: (1) determinar a intensidade e duração de US necessário para elevar a temperatura do tecido tumoral de 1° a 5

° C (mudança similar ao que é observado em humanos após tratamento com US terapêutico);
(2) Observar crescimento tumoral.

3.8.2. Piloto II: Crescimento tumoral no grupo controle (n=10)

Em virtude do insucesso do crescimento tumoral no grupo piloto, foi necessário estabelecermos este grupo para acompanhar o crescimento tumoral no grupo controle.

3.8.3. Grupos experimentais (n=31)

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos conforme o tratamento a ser realizado, como se segue:

- Grupo controle (Gc), constituído por 10 animais, de sexo masculino, com implantes tumorais de Walker 256 e submetidos à simulação do tratamento com ultrassom por sete dias.
- Grupo ultrassom pulsado (USpul), constituído por 10 animais e submetidos à modalidade pulsado por sete dias.
- Grupo ultrassom contínuo (UCctn), constituído por 11 animais e submetidos à modalidade contínua por sete dias.

Os parâmetros físicos utilizados no experimento foram: onda contínua com frequência 1,0 MHz e intensidade de 1 W/cm² SATA (intensidade média temporal-média espacial / spatial average temporal average) e onda pulsada com ciclo de trabalho 1:4, frequência 1,0 MHz e intensidade de 1 W/cm² SATP (intensidade de pico temporal-média espacial / spatial average temporal peak). Para melhor acoplamento entre cabeçote do ultrassom e a região tratada foi utilizado um gel hidrossolúvel. O contato entre o transdutor e a superfície de tratamento manteve-se constante, movimentando o transdutor de forma circular e linearmente, com ritmo lento. O tratamento consistiu em 01 aplicação por dia por 7 dias consecutivos. Efeitos térmicos significativos podem ser obtidos usando intensidades de 1 W/cm² (SATA).

3.8.4. Modelo de aplicação do ultrassom terapêutico em tumores experimentais

Iniciamos o experimento no 5º dia após a inoculação das células no dorso do animal, momento em que o tumor se tornava visível. Com o animal anestesiado, delimitamos a área de tratamento e efetuamos a colocação dos canais do termopar mediante o uso de duas agulhas, como já indicado. Uma área quadriculada de 3 x 3 cm contendo nove quadrados de 1 x 1 cm foi inscrita no dorso do animal, que foi desenhada com caneta e com auxílio de uma régua. O tumor localizava-se no quadrado central dessa área. Para o primeiro dia determinamos o tempo de 9 minutos de tratamento e no sétimo (último dia de tratamento) 15 minutos de aplicação. A cada dia que o tumor crescia, a área de tratamento aumentava e acrescentávamos 1 min ao tratamento, sendo o primeiro dia 9 minutos, o segundo 10 minutos e assim sucessivamente até o sétimo dia com 15 minutos de irradiação. Recomenda-se que o tempo de tratamento de 1 a 2 minutos por zona de aproximadamente 1,5 vezes a área do transdutor até um tempo máximo de 15 minutos, e que pelo menos 1 minuto seja dispendido no tratamento de uma área de 1 cm². O tumor era mensurado previamente ao uso do US, diariamente, durante os sete dias seguidos do experimento. Ao término da aplicação era feita a higienização do dorso do animal, agulhas do termopar e cabeçote do ultrassom para a seguinte aplicação com outro animal. Seguiu-se com cada animal, antes do experimento, a rotina de verificar se o mesmo estava devidamente anestesiado, selecionar o arquivo no programa myPCLab, realizar o desenho no dorso do animal, colocar as agulhas do termopar e em seguida o gel sobre o dorso do animal e selecionar os parâmetros do US. Todos os dados referentes à temperatura do animal, do tumor e o ambiente eram registrados pelo software e em seguida transferidos para o programa Excel.

3.8.5. Procedimento cirúrgico:

Após a morte espontânea dos animais para a análise de sobrevida, foi realizada a necropsia e retirados os órgãos (pulmão, coração, estômago, fígado, baço, rins, intestinos, testículos) e tumor para análise ao microscópio óptico (FIGURA 13). Os órgãos foram pesados ainda frescos em uma balança analítica AG 200 e, posteriormente, foram fixados em formol a 10%. Em outro momento, realizamos os cortes dos órgãos que apresentassem alguma aparência de anormalidade, para o preparo das lâminas e análise histológica.

Figura 13 - Necropsia do animal e separação dos órgãos para análise macroscópica.



3.8.6 Preparo das lâminas e análise histológica

O material designado para a análise histológica foi devidamente identificado. Em seguida submetido ao processador automático histológico e demais etapas do preparo das lâminas: central de inclusão, microtomia e estufa. As lâminas foram coradas pelo H.E (hematoxilina e eosina).

3.9 Análise estatística:

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Como tal requisito foi observado em todos os casos, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, assim como foram empregados testes paramétricos para a análise dos dados. Comparações entre os três grupos de tratamento (Controle, Pulsado e Contínuo) foram feitas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) para um fator de classificação associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares (ARMITAGE; BERRY, 1994).

Variáveis qualitativas nominais, por seu turno, foram expressas como frequência absoluta e relativa e analisadas pelo teste de qui-quadrado. As curvas de sobrevivência foram construídas conforme o método de Kaplan-Meier, sendo os dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou o estudo. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank (ARMITAGE; BERRY, 1994).

Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05. O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Implante heterotópico do carcinossarcoma de Walker

A inoculação heterotópica de uma alíquota de $2,0 \times 10^6$ células /mL de W256 na região subcutânea dorsal de ratos Wistar resultou em uma taxa de pega de 100%. O tumor tornava-se palpável por volta do 5º dia após a inoculação, momento em que os tratamentos eram iniciados. Nesse dia, o tumor apresentava aspecto nodular, móvel, sem sinais de aderência aos tecidos circunvizinhos e com volume médio de $1,72 \text{ cm}^3$ no grupo Controle. Nos dias subsequentes, o volume tumoral aumentava linearmente. À medida que o tumor crescia, ocorria a aderência aos tecidos subjacentes e necrose da pele suprajacente, com subsequente formação de crosta e ulceração (Figura 14).

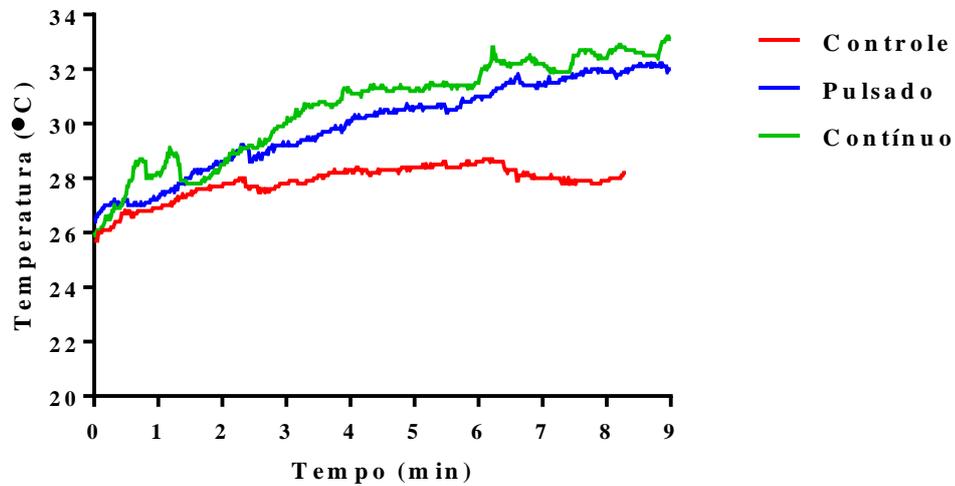
Figura 14 – Aspecto macroscópico do tumor com 21 dias após a inoculação.



4.2 Método de aplicação do ultrassom

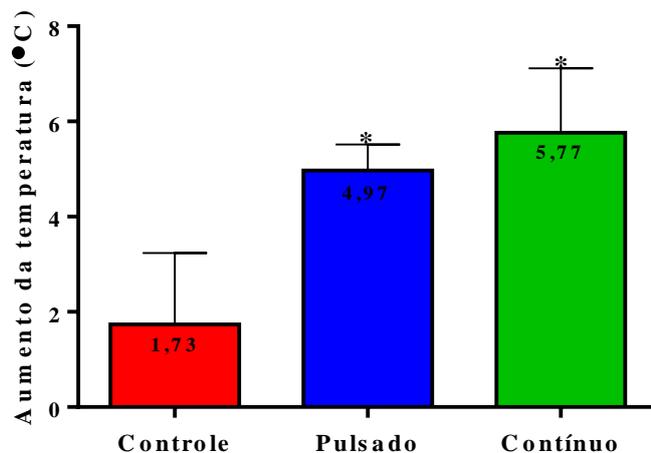
A temperatura intratumoral foi monitorada durante o tempo de aplicação do ultrassom com o intuito de verificar o ganho de calor local. A figura 15 ilustra a progressão temporal da temperatura tumoral durante a aplicação do tratamento. Constatou-se um aumento crescente da temperatura intratumoral ao longo do tempo nos grupos tratados com ultrassom contínuo e pulsado. Todavia, no grupo controle a temperatura se manteve praticamente inalterada.

Figura 15 – Curvas temporais da temperatura tumoral relativas a um animal dos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Os dados correspondem à temperatura medida a cada segundo durante os nove minutos de aplicação dos tratamentos no primeiro dia do experimento.



De fato, a aplicação do ultrassom pulsado e contínuo induziu um aumento médio de $4,97 \pm 0,55$ °C e $5,77 \pm 1,35$ °C, respectivamente, na temperatura do tumor (Figura 16). Tais aumentos foram significativamente maiores ($P < 0,05$) que o observado no grupo controle ($1,73 \pm 1,50$ °C).

Figura 16 – Aumento da temperatura verificado nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo no primeiro dia de tratamento, correspondente à diferença entre a temperatura mensurada após e antes da aplicação do ultrassom. Dados correspondem à média e o desvio padrão. O símbolo *($P < 0,05$) denota diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).



4.3 Crescimento tumoral

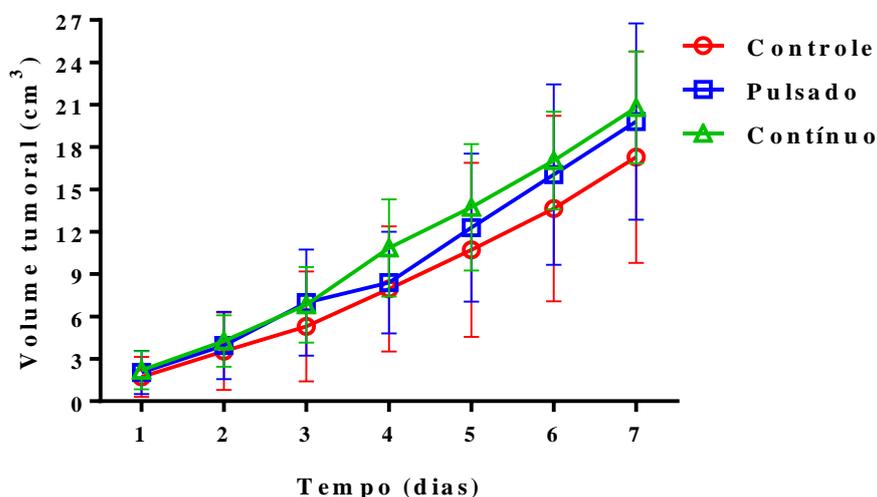
Para verificar o efeito do ultrassom no crescimento tumoral, os volumes dos tumores foram avaliados diariamente durante os sete dias de tratamento. A tabela 1 descreve os valores enquanto a figura 17 ilustra a progressão temporal dos volumes tumorais nos três grupos de tratamento. Observou-se um padrão de crescimento quase linear ao longo do tempo.

Tabela 1 – Progressão temporal do volume tumoral nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo nos dias 1 a 7 do período de tratamento. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos dias (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).

Dia	Controle Média ± DP (n)	Pulsado Média ± DP (n)	Contínuo Média ± DP (n)	Significância (ANOVA)
1	1,72 ± 1,43 (11)	2,03 ± 1,54 (11)	2,19 ± 1,37 (12)	P = 0,7345
2	3,54 ± 2,75 (11)	3,94 ± 2,39 (11)	4,26 ± 1,83 (12)	P = 0,7666
3	5,30 ± 3,90 (10)	6,98 ± 3,76 (11)	6,82 ± 2,69 (12)	P = 0,4818
4	7,95 ± 4,43 (10)	8,41 ± 3,61 (11)	10,85 ± 3,44 (12)	P = 0,1697
5	10,72 ± 6,16 (10)	12,29 ± 5,24 (10)	13,74 ± 4,48 (12)	P = 0,4207
6	13,64 ± 6,59 (10)	16,06 ± 6,40 (10)	17,04 ± 3,48 (12)	P = 0,3585
7	17,28 ± 7,51 (10)	19,80 ± 6,97 (10)	20,80 ± 3,96 (11)	P = 0,4317

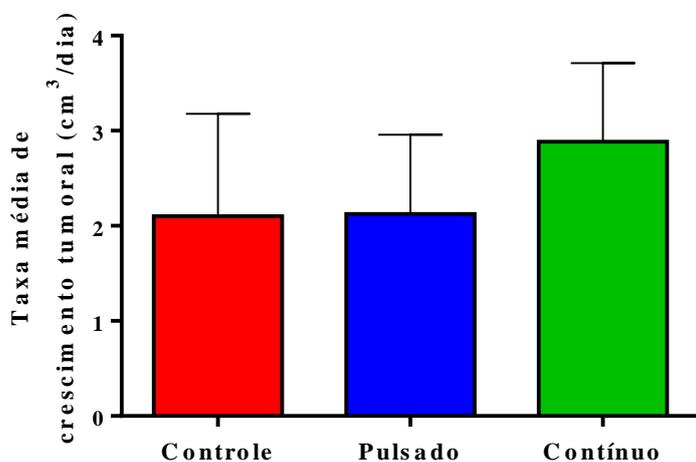
DP: desvio padrão; ANOVA: análise de variância.

Figura 17 – Progressão temporal do volume tumoral nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo nos dias 1 a 7 do período de tratamento. Em cada tempo, os dados correspondem à média e o desvio padrão das medições efetuadas em, no mínimo, 10, 10 e 11 ratos dos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, respectivamente. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos dias (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).



As curvas de crescimento foram similares nos três grupos estudados, tendo em vista que não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre eles em nenhum dos dias avaliados, denotando que o ultrassom não interferiu no padrão de crescimento natural do tumor de Walker. A análise da taxa média de crescimento tumoral corrobora esse achado. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos em relação à taxa média de crescimento tumoral referente à primeira metade do tratamento (dias 1 a 4, Figura 18).

Figura 18 – Taxa média de crescimento tumoral relativa ao período de 1 a 4 dias (primeira fase do estudo), expressa em cm^3/dia , mensurada nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Dados correspondem à média e o desvio padrão das medições efetuadas em 10, 11 e 12 ratos, respectivamente, dos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle ($2,10 \pm 1,07 \text{ cm}^3/\text{dia}$), Pulsado ($2,13 \pm 0,83 \text{ cm}^3/\text{dia}$) e Contínuo ($2,89 \pm 0,83 \text{ cm}^3/\text{dia}$) (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).



Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos em relação à taxa média de crescimento tumoral referente à segunda metade do tratamento (dias 4 a 7, Figura 19) ou aos 7 dias de aplicação do ultrassom (Figura 20).

Figura 19 – Taxa média de crescimento tumoral relativa ao período de 4 a 7 dias (segunda fase do estudo), expressa em cm^3/dia , mensurada nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Dados correspondem à média e o desvio padrão das medições efetuadas em 10, 10 e 11 ratos, respectivamente, dos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle ($3,11 \pm 1,17 \text{ cm}^3/\text{dia}$), Pulsado ($3,70 \pm 1,48 \text{ cm}^3/\text{dia}$) e Contínuo ($3,27 \pm 1,30 \text{ cm}^3/\text{dia}$) (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).

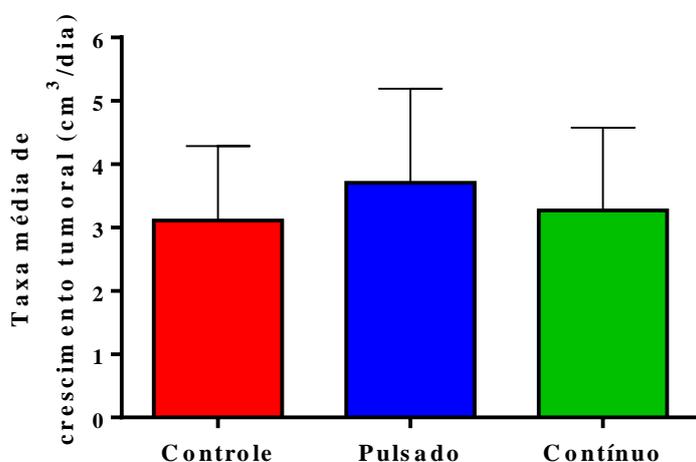
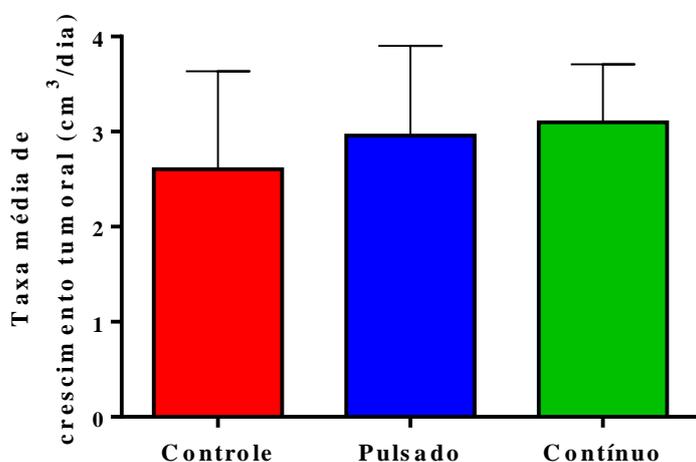


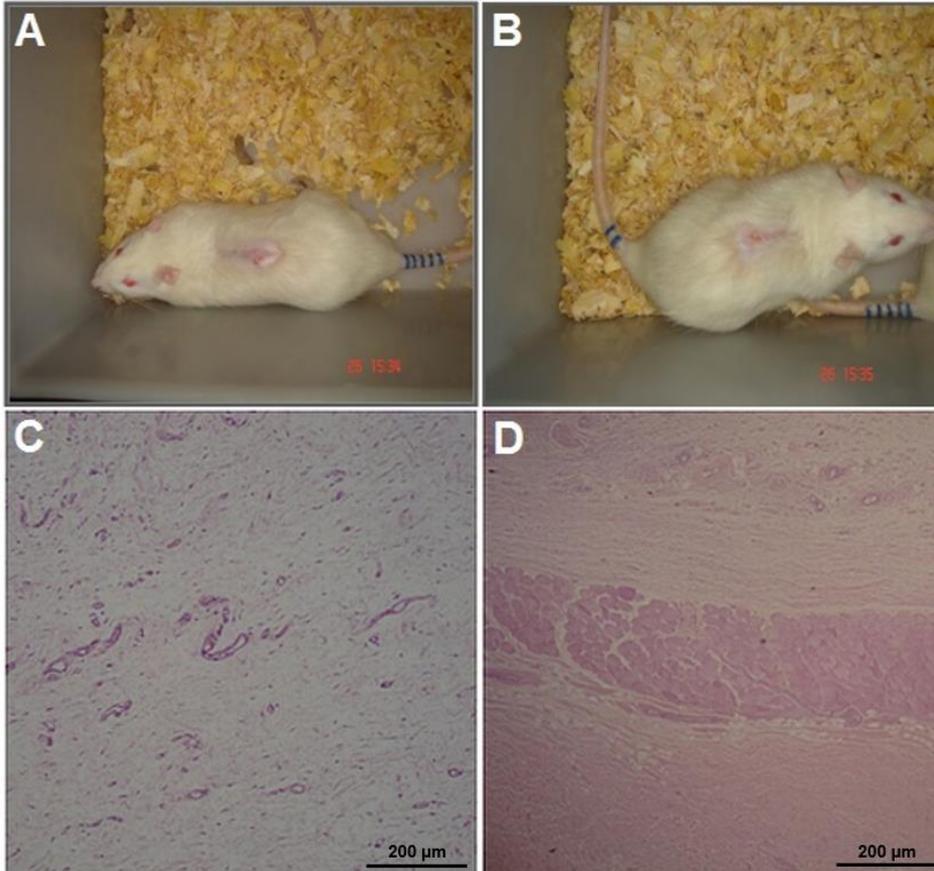
Figura 20 – Taxa média de crescimento tumoral relativa ao período de 1 a 7 dias (todo o estudo), expressa em cm^3/dia , mensurada nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Dados correspondem à média e o desvio padrão das medições efetuadas em 10, 10 e 11 ratos, respectivamente, dos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle ($2,61 \pm 1,03 \text{ cm}^3/\text{dia}$), Pulsado ($2,96 \pm 0,94 \text{ cm}^3/\text{dia}$) e Contínuo ($3,10 \pm 0,61 \text{ cm}^3/\text{dia}$) (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).



4.4 Análise de sobrevida

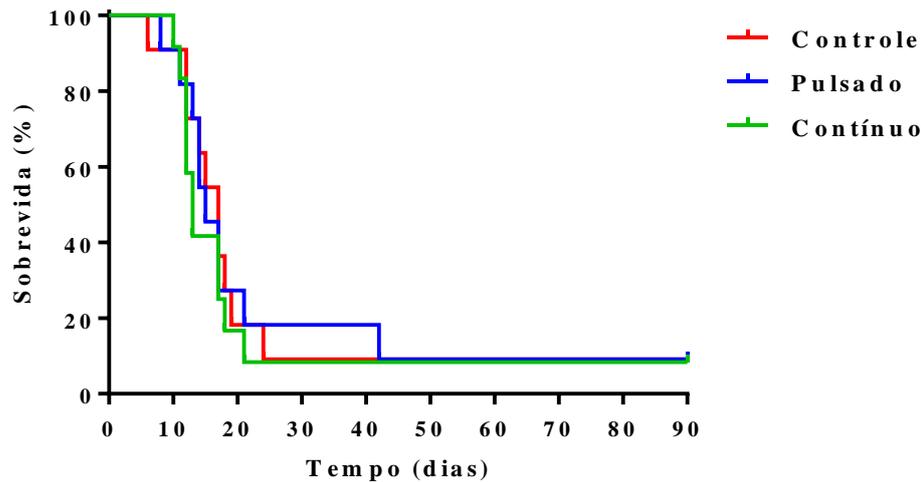
Nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, 45,5%, 54,5% e 58,3% dos animais, respectivamente, morreram em até 15 dias após a inoculação. Em até 3 semanas, haviam morrido, nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, 81,8%, 81,8% e 91,7% dos animais, respectivamente. Apenas 5 ratos morreram ainda durante o período de tratamento: 1 no grupo Controle e 2 nos grupos Pulsado e Contínuo. Três animais, um de cada grupo, evoluíram com regressão do tumor e permaneceram vivos até o 90º dia (Figura 21), ocasião em que foram sacrificados.

Figura 21 – Aspecto da ferida cutânea em fase de cicatrização após a regressão do tumor em um rato do grupo Controle (A) e outro do grupo Contínuo (B). Fotomicrografias de cortes histológicos da pele cicatrizada dos animais dos grupos Controle (C) e Contínuo (D), demonstrando a ausência de neoplasia. Preparados histológicos corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Magnificação de 100x.



A figura 22 mostra as curvas de sobrevida relativas aos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, não sendo evidenciada diferença estatisticamente significativa entre elas ($P = 0,8255$). A sobrevida mediana para os grupos Controle, Pulsado e Contínuo foi, respectivamente, 17, 15 e 13 dias. A sobrevida no 90º dia do estudo foi de 9,09%, 9,09% e 8,33%, respectivamente, nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, correspondendo a um rato de cada grupo que evoluiu com regressão do tumor.

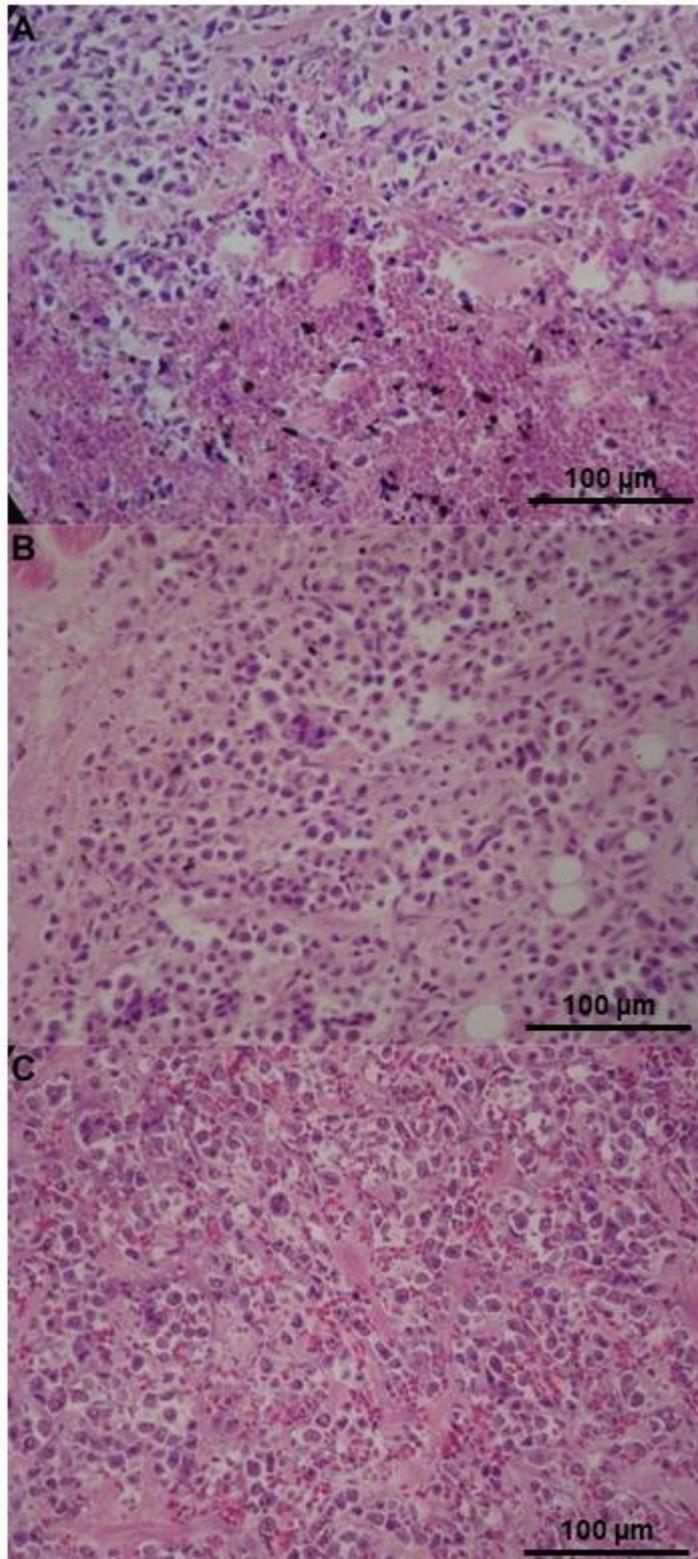
Figura 22 – Curvas de sobrevida referentes aos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando os primeiros 90 dias do experimento. Dados expressos como o percentual do número de animais vivos em relação ao número de ratos que iniciou o estudo (11 ratos nos grupos Controle e Pulsado e 12 animais no grupo Contínuo). Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank que não evidenciou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,8255$). A sobrevida mediana para os grupos Controle, Pulsado e Contínuo foi, respectivamente, 17, 15 e 13 dias. A sobrevida no 90º dia do experimento foi de 9,09%, 9,09% e 8,33%, respectivamente, nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo.



4.5 Disseminação metastática

Na necropsia, constatou-se que as características morfológicas dos tumores eram semelhantes nos três grupos, observando-se uma região central de necrose, destruição da pele sobrejacente e infiltração da musculatura subjacente. O exame histopatológico dos tumores revelou ordinariamente a presença de neoplasia maligna constituída por células poligonais pleomórficas, exibindo anisocariose e hiperchromatismo, em meio a extensas áreas de necrose de coagulação, hemorragia e pigmentos de hemossiderina (Figura 23).

Figura 23 – Fotomicrografias de preparados histológicos do tumor dos grupos Controle (A), Pulsado (B) e Contínuo (C). Nos três grupos, observa-se a presença de neoplasia maligna constituída por células poligonais pleomórficas, exibindo anisocariose e hiperchromatismo, em meio a extensas áreas de necrose de coagulação e hemorragia. Cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Magnificação de 200x.



Dentre as lesões que poderiam decorrer da ação direta do ultrassom, verificou-se que necrose de coagulação e hemorragia foram as alterações mais frequentes. Todavia, a ocorrência desses achados histológicos foi semelhante nos três grupos ($P > 0,05$), indicando que eles não foram consequência do efeito do ultrassom sobre o tecido tumoral (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais alterações verificadas na análise histopatológica dos tumores nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Dados expressos como frequência absoluta e relativa referente à quantidade de animais que desenvolveram alterações histopatológicas.

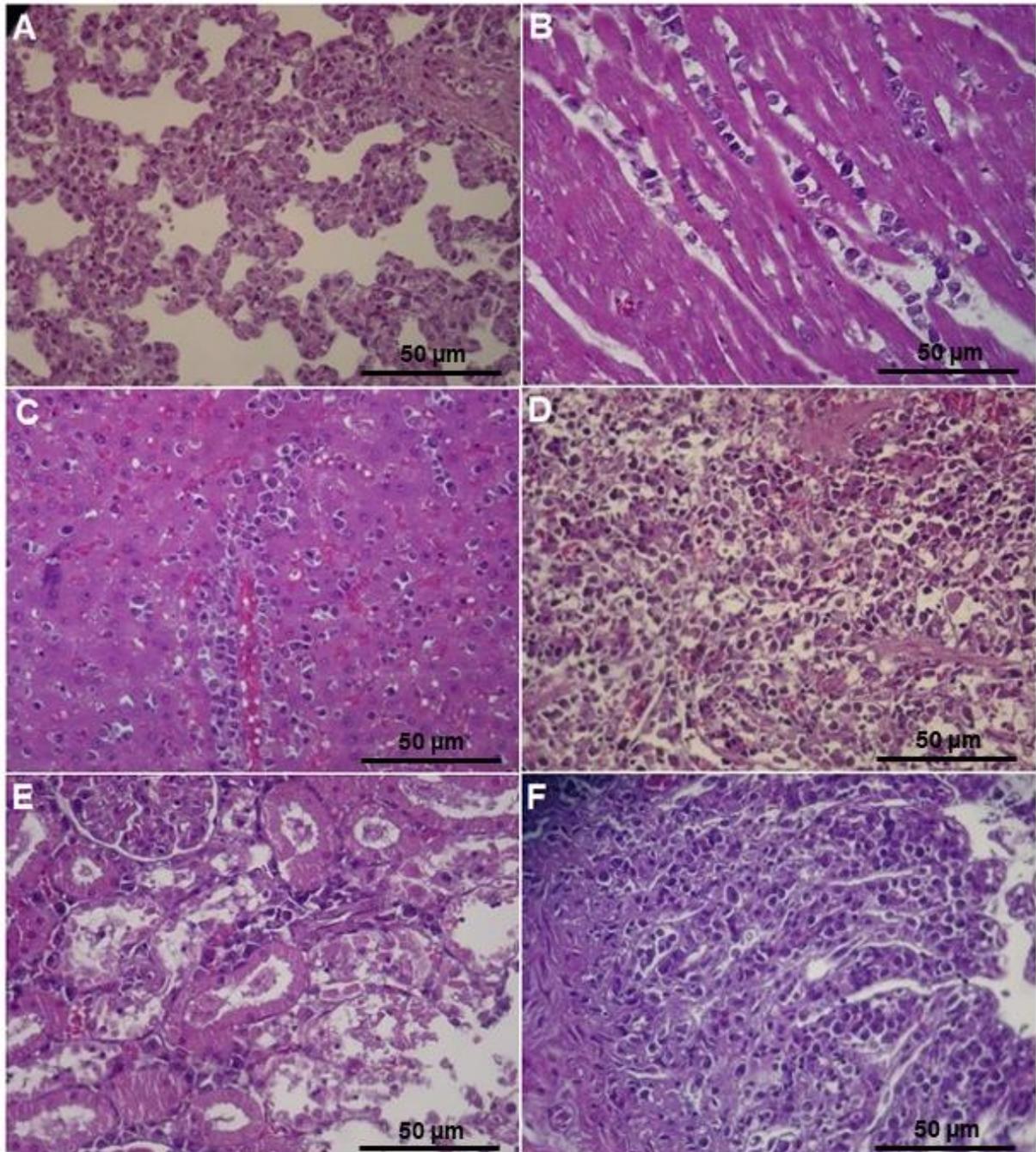
Achados histopatológicos	Controle (n = 10)	Pulsado (n = 11)	Contínuo (n = 12)	Significância (Teste de Qui-quadrado)
Necrose de coagulação	7 (70,0%)	10 (90,9%)	9 (75,0%)	P = 0,4648
Hemorragias	6 (60,0%)	4 (36,4%)	7 (58,3%)	P = 0,4671

A disseminação à distância foi avaliada em órgãos que, durante a necropsia, foram julgados suspeitos de possuírem lesões metastáticas. O exame histopatológico indicou a presença de metástases nos seguintes órgãos: pulmões, fígado, baço, rins, coração, estômago e intestinos (Tabela 3 e Figura 24). Os órgãos mais frequentemente acometidos por lesões metastáticas foram os pulmões e o fígado. Todavia, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos em relação à proporção de animais com metástases em nenhum dos órgãos analisados. Igualmente, não houve diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,8192$) entre os grupos Controle (80,0%), Pulsado (72,7%) e Contínuo (83,3%) em relação à proporção de animais com pelo menos um órgão com presença de metástases. Dentre os três animais em que houve regressão do tumor e que foram sacrificados após 90 dias, em apenas um rato, pertencente ao grupo Contínuo, observou-se metástase à distância e em um único órgão (intestino).

Tabela 3 – Ocorrência de metástases nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo, considerando os diversos órgãos analisados. Dados expressos como frequência absoluta e relativa referente à quantidade de animais que desenvolveram metástases em um órgão específico ou em qualquer órgão.

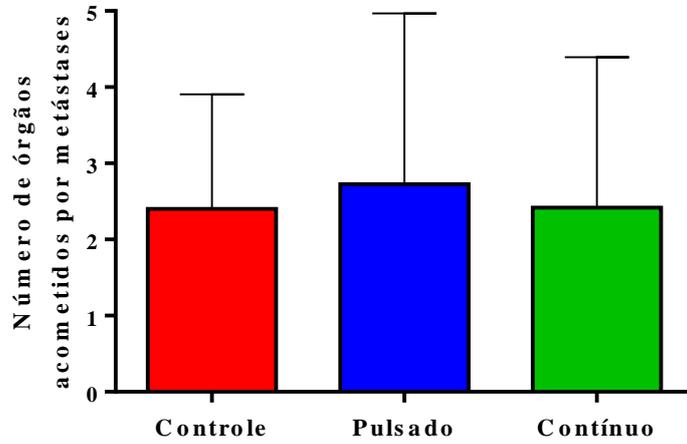
Órgão	Controle (n = 10)	Pulsado (n = 11)	Contínuo (n = 12)	Significância (Teste de qui-quadrado)
Pulmões	7 (70,0%)	8 (72,7%)	9 (75,0%)	P = 0,9662
Fígado	8 (80,0%)	6 (54,5%)	7 (58,3%)	P = 0,4283
Baço	2 (20,0%)	2 (18,2%)	1 (8,3%)	P = 0,7063
Rins	2 (20,0%)	5 (45,5%)	4 (33,3%)	P = 0,4660
Coração	1 (10,0%)	3 (27,3%)	4 (33,3%)	P = 0,4275
Estômago	3 (30,0%)	4 (36,4%)	1 (8,3%)	P = 0,2574
Intestinos	1 (10,0%)	2 (18,2%)	3 (25,0%)	P = 0,6620
Qualquer órgão	8 (80,0%)	8 (72,7%)	10 (83,3%)	P = 0,8192

Figura 24 – Fotomicrografias de preparados histológicos do pulmão (A), coração (B), fígado (C), baço (D), rim (E) e intestino (F) revelando infiltração de células tumorais. Cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Magnificação de 400x.



Ademais, ao se compararem os tratamentos em relação ao número médio de órgãos acometidos por metástases (Figura 25), também não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,9067$) entre os grupos Controle ($2,40 \pm 1,51$), Pulsado ($2,73 \pm 2,24$) e Contínuo ($2,42 \pm 1,98$).

Figura 25 – Número de órgãos acometidos por metástases observado nos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Dados correspondem à média e o desvio padrão da quantidade de órgãos com metástases verificada em 10, 11 e 12 ratos, respectivamente, dos grupos Controle, Pulsado e Contínuo. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,9067$) entre os grupos Controle ($2,40 \pm 1,51$), Pulsado ($2,73 \pm 2,24$) e Contínuo ($2,42 \pm 1,98$) (ANOVA associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey).



5 DISCUSSÃO

Vários estudos sobre a ocorrência de neoplasias espontâneas em animais de laboratório levaram ao desenvolvimento de modelos animais e serviram como base de dados para trabalhos sobre carcinogênese. Esses valiosos modelos de estudos são importantes, pois existem similaridades com as neoplasias encontradas em seres humanos (TROTTE; MENEZES; TORTELLY, 2008).

A opção de se trabalhar com tumores experimentais utilizando o modelo experimental W256 mostrou-se exequível e importante por servir de base para o estudo dos principais tópicos da patologia dos tumores: o conceito de neoplasia, os critérios de benignidade e malignidade, as diferentes formas de crescimento neoplásico, as vias de disseminação, os caracteres citológicos de malignidade, pois fornece uma demonstração objetiva do comportamento de um tumor maligno (IWAMA; FRANCO; LEMONICA, 1973). As células do W256 têm sido amplamente utilizadas em estudos de fisiopatologia do câncer (GUIMARÃES et al., 2010).

O crescimento tumoral mostrou um padrão de desenvolvimento semelhante aos vários animais transplantados pela mesma via de inoculação. Os nódulos são visíveis e palpáveis no 5º dia após a inoculação das células no dorso do animal e tornam-se extensos e exuberantes nos dias seguintes, alcançando grandes volumes. O estudo de Morano et al (2011) demonstrou ser factível a realização do nosso estudo quando o autor desenvolveu um modelo para avaliar os efeitos da hipertermoterapia por ultrassom associada a agentes antiangiogênicos no tratamento do tumor experimental de Walker, inoculado na região subcutânea utilizando a suspensão neoplásica de 2.0×10^6 cels/mL (MORANO et al., 2011). A mesma concentração de células foi utilizada em nosso estudo.

Os parâmetros físicos utilizados no experimento, ou seja, frequência 1,0 MHz e intensidade de 1 W/cm² SATA (intensidade média temporal-média espacial / spatial average temporal average) resultou no aumento previsto da elevação da temperatura do tecido tumoral (superficial) 1° a 5 ° C. A mesma elevação da temperatura foi observada por Rosenbaum et al (1995) em estudo piloto para determinar a intensidade e a duração de ultrassom necessário para elevar a temperatura do tecido normal de um tumor induzido no dorso do rato por 1 a 5° C (SICARD-ROSENBAUM et al., 1995).

Pelas particularidades do tumor de W 256 de invadir estruturas e alto poder de metástase, optamos por uma frequência de 1 MHz para atingir tecidos profundos e promover um aquecimento adequado, em função da frequência relativamente baixa empregada (LOPES et al., 2005). A utilização de uma frequência de 3 MHz resultaria em um aquecimento mais rápido nos tecidos superficiais, podendo lesionar os novos vasos sanguíneos tumorais (DAVID; WILLIAM, 2014).

Utilizamos a técnica de aplicação direta dinâmica/deslizante, recomendada para evitar o aumento excessivo da temperatura. O gel foi usado como meio de acoplamento por apresentar características de transmissividade mais adequadas para a técnica utilizada (LEHMANN; DE LAUTER, 1994; ITAKURA et al., 2012). O cabeçote ultrassônico em nosso estudo foi mantido em constante movimento para evitar zonas de aquecimento localizado que pudesse lesionar a região, de forma particular os novos vasos sanguíneos tumorais. Quando a energia do ultrassom é refletida nas interfaces dos tecidos com diferentes impedâncias acústicas, a intensidade da energia aumenta à medida que a energia refletida encontra a nova energia que está sendo transmitida, criando o que se chama de “onda permanente” ou “ponto quente” (DAVID; WILLIAM, 2002).

Apesar do padrão de crescimento quase linear ao longo do tempo, as curvas de crescimento foram similares nos três grupos estudados (Controle, Contínuo, Pulsado), não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre eles em nenhum dos dias avaliados. Os resultados de Sicard-Rosenbaum (1998) demonstraram que a redução da quantidade de energia ultrassônica, seja por uma menor intensidade ou pelo modo pulsado, pode resultar em uma diminuição do crescimento tumoral quando comparado ao uso do ultrassom contínuo utilizando alta intensidade (1.0 W/cm^2). Em 1995 os resultados de Sicard-Rosenbaum demonstraram aumento significativo do crescimento tumoral do grupo contínuo, comparado ao grupo controle, quando utilizou 1.0 W/cm^2 . Ao comparar esses resultados com os de 1998, observou-se crescimento tumoral significativo do grupo tratado com 1 W/cm^2 , seguido pelo crescimento tumoral do grupo tratado com ultrassom pulsado ($1,5 \text{ W/cm}^2$) que cresceu com menor intensidade. No entanto, o grupo contínuo de menor intensidade ($0,75 \text{ W/cm}^2$) sofreu menor crescimento ao ser comparado com 1 W/cm^2 mas com crescimento semelhante quando comparado ao grupo pulsado ($1,5 \text{ W/cm}^2$). Ambos os grupos, contínuo de baixa intensidade e pulsado, obtiveram crescimento tumoral mais semelhante ao do grupo

controle. Os resultados de Sicard-Rosenbaum (1998) demonstraram que a redução da quantidade de energia ultrassônica, seja por uma menor intensidade ou pelo modo pulsado, pode resultar em uma diminuição do crescimento tumoral quando comparado ao uso do ultrassom contínuo utilizando alta intensidade (1.0 W/cm^2) (SICARD-ROSENBAUM et al., 1995; SICARD-ROSENBAUM et al., 1998). Nossos resultados demonstraram que o efeito do ultrassom terapêutico sobre a disseminação de tumor de Walker 256 implantado no subcutâneo do rato Wistar não interferiu no crescimento do carcinossarcoma de Walker, nem na disseminação de implantes secundários. O tratamento deu-se em 7 dias, com aplicação do ultrassom por 9 a 15 minutos, com frequência 1 MHz, nos modos de emissão contínuo e pulsátil (ciclo de trabalho 1:4), com intensidade de 1 W/cm^2 SATA (média temporal e espacial / spatial average temporal average) e 1 W/cm^2 SATP (máximo pico temporal e espacial media / spatial average temporal peak), respectivamente. A intensidade e duração de US necessário para elevar a temperatura do tecido tumoral de 1° a 5° C (mudança similar ao que é observado em humanos após tratamento com US terapêutico);

A publicação de Smachlo et al. (1979) relatou erradicação tumoral ao utilizar temperaturas elevadas ($60\text{-}70^\circ \text{ C}$), onda contínua, frequência de 5 MHz a 3 W/cm^2 , durante 6 a 8 min. O modelo utilizado foi um fibrossarcoma de hamster, fêmea, inoculado por via subcutânea no quadrante inferior do abdômen. Onda contínua, frequência de 5 MHz e 3 W/cm^2 por 6 a 8min causou um aumento de temperatura tecidual entre $60\text{-}70^\circ \text{ C}$. Os animais foram observados por um período de 12 semanas. No estudo de Morano (2011), em que foi aplicado hipertermia por ultrassom a 45° C durante 5 min, aplicação única, constatou-se o aumento do crescimento tumoral nos dias iniciais do experimento até dia 07. O calor foi aplicado diretamente no tumor por um equipamento de ultrassom terapêutico utilizando 3 MHz e $1,5 \text{ W/cm}^2$. Nos dias subsequentes observou-se diminuição do crescimento tumoral (MORANO et al., 2011).

Conclui-se que os parâmetros físicos utilizados nos estudos mencionados diferem uns dos outros resultando também em respostas distintas a respeito do crescimento tumoral. De fato, parece haver realmente uma relação dependente entre crescimento tumoral, quantidade de energia aplicada pelo ultrassom, daí a necessidade de maior investigação entre a relação entre doses e respostas fisiológicas e de como o US pode atuar em tecidos neoplásicos.

Há uma tendência nos últimos anos no sentido do uso de tratamentos de intensidades mais baixas. A recomendação aos fisioterapeutas é usar sempre a intensidade mais baixa que produza o efeito terapêutico desejado, já que intensidades mais altas podem ser lesivas (MENDONCA et al., 2006; DE BEM et al., 2010).

Sabemos que é extremamente difícil distinguir os mecanismos térmicos dos não térmicos, pois tais alterações ocorrem simultaneamente (DEMMINK et al., 2003; BAKER; ROBERTSON; DUCK, 2001). Ultrassom contínuo caracteriza-se pela forte produção de calor, que também está presente no pulsado, porém de forma reduzida, devido às interrupções na propagação da onda. A elevação da temperatura tecidual produzida através da absorção da energia ultrassônica pode trazer benefícios através de uma vasodilatação local ou até queimar os tecidos irradiados (DURIGAN et al., 2006). Sendo assim, aumentar a intensidade pode elevar excessivamente a temperatura do tecido, e conseqüentemente ter efeitos indesejáveis, como desvitalização da região irradiada. Não existem dados científicos que indiquem a utilização de níveis de US acima de 1 W/cm² para promover um efeito significativo em tecidos lesionados. Efeitos térmicos significativos podem ser obtidos usando intensidade entre 0,5 e 1,0 w/cm² (OLSSON et al., 2008; DE BEM et al., 2010).

Para este estudo, foi escolhido o rato Wistar (*Rattus norvegicus albinos*) pela facilidade de aquisição, manuseio e manutenção da alimentação e higiene nas gaiolas, além de grande resistência orgânica às infecções e baixo custo (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004). É uma estirpe de ratos albinos standard para estudos toxicológicos, teratológicos e de carcinogênese. Esta linhagem foi desenvolvida no instituto Wistar na Filadélfia pelo fisiologista americano Henry Donaldson, sendo este o designado típico rato de laboratório para uso em pesquisa biológica e médica. Possui um comportamento dócil e um tamanho grande o suficiente para que permita o seu uso em procedimentos cirúrgicos (BOTELHO, 2016). Apresenta baixa prevalência de neoplasias espontâneas. As regressões espontâneas do W256 são pouco frequentes. Os machos foram escolhidos em virtude de apresentarem menor desenvolvimento de tumores espontâneos malignos, que são mais frequentes em fêmeas adultas (TROTTE; MENEZES; TORTELLY, 2008). O rato Wistar é maior que o camundongo, com tamanho bastante satisfatório para acompanhar o crescimento do tumor de Walker.

Escolhemos iniciar o experimento no 5º dia após a inoculação das células no dorso do animal, momento em que o tumor se tornava visível, tamanho em torno de 1,72 cm³ com o objetivo de ser beneficiado com a estimulação da neo-angiogenese, proliferação celular, tanto do tumor, quando do ultrassom. Uma formação tumoral maior que 2 mm requer vascularização, que também fornece vias para a disseminação de células metastáticas. Então, recebendo suporte dos novos vasos sanguíneos (provenientes do estímulo tumoral e ultrassônico) e pelo aumento do fluxo sanguíneo promovido pelo ultrassom, representaria um passo crítico para o crescimento e para a disseminação metastática (STRICKER; KUMAR, 2010; AMÂNCIO et al., 2006; MENDONCA et al., 2006; MAXWELL, 1995).

A absorção da energia do US produz um efeito térmico e o organismo responde a isso com vasodilatação. Quando a pele é aquecida, a superfície fica avermelhada (eritema) e os vasos sanguíneos sofrem dilatação, o que leva a um aumento no fluxo sanguíneo. Com o incremento da elevação da temperatura ocorre consequente aumento na atividade metabólica (lei de Vant't Hoff). A taxa metabólica pode sofrer uma elevação de cerca de 13% para cada elevação de 1°C na temperatura do tecido, e aumento do metabolismo será maior na região onde é gerada a maior parte do calor (COLLINS, 1998).

Um fato que nos surpreendeu foi a regressão espontânea do W256 em três animais, um em cada grupo. A literatura refere que esse fenômeno é possível de ocorrer. Embora pouco documentado, alguns autores relacionam à linhagem de ratos, como os ratos Sprague-Dawley, Buffalo e Fischer. Contudo, outros relatam a geração de uma variante W256 regressiva chamada AR. O mecanismo preciso subjacente à origem da variante AR W256 é desconhecido (GUIMARÃES et al., 2010).

A observação de sobrevida serve de parâmetro para analisar se um determinado medicamento ou droga (em nosso caso o tratamento com ultrassom) está fazendo efeito acelerador ou retardador da morte, ou se está curando o animal. A sobrevida mediana para os grupos Controle, Pulsado e Contínuo foi, respectivamente, 17, 15 e 13 dias. Contudo, em nosso estudo observamos que não houve diferença com significância estatística entre os grupos. Sicard-Rosenbaum et al (1995), Sicard-Rosenbaum et al (1998) e Smachlo et al. (1979) não fizeram análise de sobrevida em seus estudos (SICARD-ROSENBAUM et al., 1995; SICARD-ROSENBAUM et al., 1998; SMACHLO et al., 1979). Morano et al (2011) mostrou que a

sobrevida dos animais portadores de tumor subcutâneo no dorso e submetidos a tratamento com hipertermia por ultrassom foi maior do que os que fizeram parte do grupo controle. Embora não significativo do ponto de vista estatístico (MORANO et al., 2011).

A quantidade de metástases em diferentes órgãos superou aquelas que já foram citadas por alguns autores a respeito do comportamento biológico do tumor de Walker. Todavia, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos em relação à proporção de animais com metástases em nenhum dos órgãos analisados. Iwama, Franco e Lemonica (1973) observaram metástase nos rins, suprarrenais, coração e gânglios linfáticos (IWAMA; FRANCO; LEMONICA, 1973). Em outro trabalho, Iwana de Mattos e Montenegro (1980), constataram envolvimento tumoral nos rins, fígado, suprarrenais, medula óssea, sangue circulante e ocasionalmente no coração e língua (MATTOS; MONTENEGRO; SILVA, 1980). Villas-Bôas (1988) também identificou a existência de metástase, mas não citaram a localização. Nosso estudo resultou em desenvolvimento de metástases em vários órgãos e em quantidades diferentes: pulmão, fígado, baço, rins, coração, estômago e intestinos. Houve uma expressão maior de metástase no pulmão e no fígado. Curiosamente, outros órgãos ricamente vascularizados (baço, rins e coração) tiveram um menor percentual de metástase. Órgãos que recebem pouco aporte sanguíneo, como intestino e estômago, também receberam um percentual menor de metástases (VILLAS-BÔAS et al., 1988).

No estudo de Sicard-Rosenbaum (1995), apenas dois casos de metástases dos 37 animais do grupo US contínuo foram identificados, não sendo suficientes para estabelecer significância estatística. O estudo foi aplicado utilizando o rabdmiossarcoma em camundongos, um tipo de tumor conhecido por desenvolver metástase facilmente. Smachlo et al. (1979) não encontrou nenhuma evidência de metástase após o tratamento de um fibrossarcoma em hamster utilizando US de onda contínua com temperaturas elevadas em torno de 60-70° C, consideravelmente mais elevados do que aquelas utilizadas na prática fisioterapêutica (SMACHLO et al., 1979).

Ferreira et al (2012) avaliou o efeito de ultrassom terapêutico contínuo e pulsado no aparecimento de recorrência de câncer mamário em ratos Sprague-Dawley. Após sacrifício dos animais, não foram constatadas metástase à distância em nenhum dos animais, independente do grupo a que pertenciam (FERREIRA et al., 2012).

Em virtude dos resultados obtidos não podemos afirmar que o uso do ultrassom possa favorecer (ou não) o crescimento tumoral e/ou disseminação de implantes secundários. É preciso a realização de novas pesquisas em que subtraia as falhas surgidas em nosso estudo. Nosso estudo constou de um tempo de observação do crescimento tumoral curto (07 dias) em virtude do comportamento agressivo do tumor de Walker. O modo de ação desse tipo de energia sobre células tumorais não foi devidamente compreendido (LEHMANN; KRUSEN, 1955; SMACHLO et al., 1979; HAAR, 1999).

A contraindicação do uso do ultrassom em lesões malignas, e até mesmo pré-cancerígenas, continua sendo uma recomendação, embora não se baseiem em qualquer evidência científica firme. Contudo, mesmo que haja uma chance remota de que possa ocorrer dano, o ultrassom não deve ser usado. Pelo risco de se produzir implantes secundários e pela falta de base científica parece prudente evitar o uso de US sobre tecidos neoplásicos (MAXWELL, 1995).

Considero que, em Cuidados Paliativos, a utilização do US poderia trazer benefícios ao paciente minimizando a dor e algumas sequelas do tratamento oncológico (aderências e fibroses). Este é o momento em que o objetivo é promover o bem estar, prevenir ou remover danos ao paciente. Os princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência e justiça devem nortear as decisões de toda equipe de saúde (PIMENTA et al., 2001). Ainda que atualmente evidências não sejam conclusivas a respeito do crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases, a respeito do uso do ultrassom, poderíamos pensar nos aspectos éticos envolvidos na indicação de métodos utilizados para o manejo da dor, fibroses e aderências. O doente deve ser informado de tratamentos alternativos, entender a técnica que se pretende utilizar e conhecer riscos associados ao tratamento de escolha.

6 CONCLUSÃO

A aplicação do ultrassom, nos modos contínuo e pulsado, no carcinosarcoma de Walker em ratos, não interferiu no crescimento tumoral, tampouco na disseminação de implantes secundários. Tal achado pode decorrer da natureza agressiva desse tumor, que não pôde ser suplantada pelo tratamento com ultrassom.

Em virtude dos resultados obtidos, não se pode afirmar que o uso do ultrassom favorece ou não o crescimento tumoral e/ou disseminação do tumor para outras regiões. A contraindicação do uso deste recurso fisioterapêutico continua sendo uma recomendação, embora sem evidência científica firme. No entanto, em Cuidados Paliativos pode-se pensar que o paciente seria beneficiado com o recurso do ultrassom com o objetivo de minimizar a dor e algumas sequelas do tratamento oncológico (aderências e fibroses). O fisioterapeuta é um dos profissionais que trabalha de forma direta com o paciente oncológico na fase paliativa da doença, quando a dor é o sintoma mais frequente e causa de sofrimento desses pacientes. Em uma equipe multidisciplinar, os princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência e justiça devem nortear as decisões de toda equipe. O doente deve ser informado de tratamentos alternativos, entender a técnica que se pretende utilizar e conhecer os riscos associados ao tratamento de escolha.

Continua a indagação se o ultrassom pode ser aplicado em áreas neoplásicas, sem trazer malefícios ao paciente. Novas pesquisas devem ser realizadas para que as abordagens fisioterapêuticas continuem sendo empregadas baseadas em fortes evidências científicas.

REFERÊNCIAS

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994.

DIEL, I. J. Historical Remarks on Metastasis and Metastatic Bone Disease. In: DIEL, Ingo J.; KAUFMANN, M.; BASTERT, G. **Metastatic bone disease: fundamental and clinical aspects**. Berlin: Springer, 1994, p.1-2.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of cancer science & therapy**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 1, dez. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927383>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International journal of cancer**, [S. l.], v. 136, n. 9, p. 2022-2036, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113657>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

MOULD, R. Evolution of the knowledge of cancer from earliest times to the end of the 18th century. **Nowotwory Journal of Oncology**, [S. l.], v.58, p.172-185, 2008. Disponível em: <[file:///C:/Users/patricia.barros/Downloads/52355-125040-1-PB%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/patricia.barros/Downloads/52355-125040-1-PB%20(3).pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2018.

HAJDU, S. I. Thoughts about the cause of cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 106, n. 8, p. 1643-1649, abr. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534793>>. Acesso em: 20 set. 2017.

MORA, L. D. História do Tratamento Cirúrgico do Cancro da Mama: empirismo e ciência. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, Lisboa, n. 27, p. 41-58, dez. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1646-69182013000400007>. Acesso em: 01 mar. 2018.

MORENO-SMITH, M.; LUTGENDORF, S. K.; SOOD, A. K. Impact of stress on cancer metastasis. **Future Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 1863-1881, dez. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037818/>>. Acesso em: 29 out. 2017.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. Cancer metastases: so close and so far. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 107, n. 11, p. djv236, nov. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26283653>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

MENDOZA, M.; KHANNA, C. Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [S. l.], v. 41, n. 7, p. 1452-1462, jul. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401145>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

RIBATTI, D.; MANGIALARDI, G.; VACCA, A. Stephen Paget and the ‘seed and soil’ theory of metastatic dissemination. **Clinical and Experimental Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 145-149, dez. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191105>>. Acesso em: 30 out. 2017.

CHU, J. E.; ALLAN, A. L. The role of cancer stem cells in the organ tropism of breast cancer metastasis: a mechanistic balance between the “seed” and the “soil”? **International Journal of Breast Cancer**, [S. l.], v. 2012, p. 1-12, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijbc/2012/209748/>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

FOKAS, E. et al. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 26, n. 3-4, p. 705-715, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17786535>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

MATHOT, L.; STENNINGER, J. Behavior of seeds and soil in the mechanism of metastasis: a deeper understanding. **Cancer Science**, [S. l.], v. 103, n. 4, p. 626-631, abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212856>>. Acesso em: 16 set. 2017.

RAMAKRISHNA, R.; ROSTOMILY, R. Seed, soil, and beyond: the basic biology of brain metastasis. **Surgical neurology international**, v. 4, n.4, p.256, mai. 2013. Suplemento. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717797>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

STRICKER P. T.; KUMAR V. Neoplasia. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p.259-330.

MILES, F. L. et al. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. **Clinical & experimental metastasis**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 305-324, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17906932>>. Acesso em: 23 set. 2017.

HOON, D. S. B. et al. Molecular mechanisms of metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 203-220, jun. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16770533>>. Acesso em: 23 set. 2017.

FIDLER, I. J.; KIM, S. J.; LANGLEY, R. R. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 101, n. 4, p. 927-936, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17177290>>. Acesso em: 9 abr. 2018.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, [S. l.], v. 458, n. 7239, p. 719-724, abr. 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07943>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, [S. l.], v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539594>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

GÓES, A. C. de S.; OLIVEIRA, B. V. X. de. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. **Ciência & Educação**, Bauru, v. 20, n. 3, p. 561-577, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-73132014000300561&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 19 set. 2017.

PORCIONATTO, M. A. Projeto Genoma Humano: uma leitura atenta do livro da vida? In: ALFONSO-GOLDFARB, Ana Maria; BELTRAN, Maria Helena Roxo. **O Saber Fazer e Seus Muitos Saberes: experimentos, experiências e experimentações**. São Paulo: Editora Livraria da Física; EDUC; Fapesp, 2006, p. 379-399.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. **The American Journal of Cancer**, [Philadelphia], v. 24, n. 3, p. 566-612, 1935. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/24/3/566>>. Acesso em: 23 set. 2017.

GONZAGA, Silva Lúcio Flávio et al. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n.1, p. 62-66, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-86502002000100009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 3 dez. 2017.

IWAMA, M. C. F.; FRANCO, M. F.; LEMONICA, L. Tumor de Walker. Um bom modelo experimental para o ensino de neoplasias. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 23, p. 267-271, 1973.

GUIMARÃES, F. et al. Tumor growth characteristics of the Walker 256 AR tumor, a regressive variant of the rat Walker 256 A tumor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, Curitiba, n. 5, p. 1101-1108, set./out. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000500014>. Acesso em: 10 abr. 2018.

DORNELAS, C. A. et al. Modelo experimental do carcinossarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 38-42, jan./fev. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000100009>. Acesso em: 10 jan. 2018.

BRITO, N. M. B. et al. Experimental inoculation model of Walker 256 carcinoma into vagina and cervix uteri of female rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 495-498, nov./dez. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502007000600014>. Acesso em: 19 set. 2017.

GOMES NETO, A. et al. Modelo de tumor de pulmão em rato com o carcinossarcoma de Walker. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, p. 12-22, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502002000100003&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 19 ago. 2017.

OLIVEIRA, P. F. de M. et al. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 242-247, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86501998000400008&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 1º mar. 2108.
SILVA, Lúcio Flávio Gonzaga et al. Modelo de tumor experimental em rim de ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 62-66, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000100009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 Nov. 2020.

ZARUR, J. M. et al. Quimioembolização transarterial hepática: modelo experimental de tumor em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 511-516, set./out. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502004000500009>. Acesso em: 19 ago. 2017.

ALVES, A. P. N. N. et al. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 354-60, jul./ago. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502004000400011>. Acesso em: 10 jan. 2018.

MORANO, J. A. C. O. D. et al. Experimental model of ultrasound thermotherapy in rats inoculated with Walker-236 tumor. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 26, p. 53-56, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971658>>. Acesso em: 16 set. 2017.

JUANES, Camila de Carvalho et al. Própolis vermelha e L-lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 17, n. 2, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082019000200211&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 nov. 2019.

MATTOS, Iwana de; MONTENEGRO, M. R.; SILVA, C. R. V. Walker 256 carcinossarcoma: pathologic microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciência e Cultura**, v. 32, p. 849-57, 1980.

IWAMA, M. C.F.;FRANCO, M. F.; LEMONICA, L. tumor de Walker. Um bom modelo experimental para o ensino de neoplasias. **Ciência e Cultura**, v.32, p. 849-57, 1980.

VILLAS-BÔAS, F.I.P. et al. A sobrevivência de ratos com tumor de Walker. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 17, n. único, p. 165-168, 1988. Disponível em: <<http://www.revodontolunesp.com.br/article/588017467f8c9d0a098b464b>>. Acesso em: 30 jul. 2017.

KALKO, E. K. V.; CONDON, M. A. Echolocation, olfaction and fruit display: how bats find fruit of flagelliferous cucurbits. **Functional Ecology**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 364-372, jun. 1998. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/2390337>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

SUK, J. I.; WALKER, F. O.; CARTWRIGHT, M. S. Ultrasonography of peripheral nerves. **Current neurology and neuroscience reports**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 328, fev. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675797/>>. Acesso em: 30 out. 2017.

SEOANE, M. P. dos R.; GARCIA, D. A.; FROES, T. R. **Archives of Veterinary Science**, [Curitiba], v. 16, n. 1, p. 54-61, 2011. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/17646>>. Acesso em: 23 set. 2017.

NEWMAN, P. G.; ROZYCKI, G. S. The history of ultrasound. **Surgical clinics of north America**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 179-195, abr. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9602842>>. Acesso em: 3 dez. 2017.

NYBORG, W. L. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines: Part I: personal histories. **Ultrasound in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 911-964, jul. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996695>>. Acesso em: 9 set. 2017.

TER HAAR, G. Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in biophysics and molecular biology**, [S. l.], v. 93, n. 1, p. 111-129, jan./abr. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930682>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

PARIZOTTO, N. A. et al. Utilização da fonoforese em distúrbios músculo-esqueléticos: uma meta-análise. **Brazilian Journal Physical Therapy**, São Carlos, v. 7, n. 1, p. 9-15, jan./abr. 2003. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=344303&indexSearch=ID>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

KREMKAU, F. W. Cancer therapy with ultrasound: a historical review. **Journal of Clinical Ultrasound**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 287-300, ago. 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/112118>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

MASON, T. J. Therapeutic ultrasound an overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 847-852, jul. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316286>>. Acesso em: 8 jan. 2018.

AMÂNCIO, A. C. G. et al. Estimulação ultra-sônica da integração de enxertos de pele total. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 5, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-78522006000500010&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 9 mar. 2018.

SCHWAN, H. P. Ultrasound and electromagnetic radiation in hyperthermia--a historical perspective. **The British journal of cancer. Supplement**, [S. l.], v. 5, p. 84-92, mar. 1982. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7039653>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

O'REILLY, M. A.; HYNENEN, K. **International Journal of Hyperthermia**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 310-318, mar. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702262/>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

WOOD, A. K. W. et al. The antivasular action of physiotherapy ultrasound on murine tumors. **Ultrasound in Medicine & Biology**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 1403-1410, out. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2442571/>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

BLANA, A. et al. High-intensity focused ultrasound for prostate cancer: comparative definitions of biochemical failure. **BJU international**, [S. l.], v. 104, n. 8, p. 1058-1062, out. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388986>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

WOOD, A. K. W.; SEHGAL, C. M. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy. **Ultrasound in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 905-928, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4362523/>>. Acesso em: 21 out. 2017.

OLSSON, D. C. et al. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1199-1207, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n4/a51v38n4.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

LEITE, A. P. B. et al. Efetividade e segurança do ultrassom terapêutico nas afecções musculoesqueléticas: overview de revisões sistemáticas Cochrane. **Acta Fisiátrica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 157-160, set. 2013. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/actafisiatrica/article/view/103787>>. Acesso em: 15 jan. 2018

CULLUM, N.; LIU, Z. Therapeutic ultrasound for venous leg ulcers. **The Cochrane Library**, [S. l.], mai. 2017. Não paginado. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28504325>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DURIGAN, J. L. Q. et al. Mecanismos de interação do ultra-som terapêutico com tecidos biológicos. **Fisioterapia Brasil**, [Rio de Janeiro], v. 7, n. 2, p. 142-148, 2006. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=491120&indexSearch=ID>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

FORÝTKOVÁ, L.; HRAZDIRA, I.; MORNSTEIN, V. Effect of ultrasound on DNA synthesis in tumor cells. **Ultrasound in Medicine & Biology**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 585-592, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7571152>>. Acesso em: 3 dez. 2017.

SOUSA, M. A. G. de et al. Terapia de ultrassom e estimulação elétrica transcutânea neuromuscular para a tratamento do linfedema de membro superior pós-mastectomia. **Revista Acta Fisiátrica**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 189-194, dez. 2014. Disponível em: <http://www.actafisiatrica.org.br/detalhe_artigo.asp?id=564>. Acesso em: 9 set. 2017.

FERREIRA, AS et al . Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultra-som de baixa intensidade em pele de rato. **Rev. bras. fisioter.**, São Carlos , v. 12, n. 5, p. 351-358, out. 2008 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-35552008000500003&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 05 nov. 2020.

LEHMANN, J. F.; DE LAUTER, B. J. Diatermia e calor superficial, laser e crioterapia. KOTTKE FJ, LEHMANN JF. In: **Tratado de Medicina Física e Reabilitação de Krusen**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1994, p. 277-356.
SICARD-ROSENBAUM, L. et al. Effects of continuous therapeutic ultrasound on growth and metastasis of subcutaneous murine tumors. **Physical therapy**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 3-11, jan. 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809195>>. Acesso em: 13 abr. 2018.

TER HAAR, G. Therapeutic ultrasound. **European Journal of Ultrasound**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 3-9, mar. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099161>>. Acesso em: 20 ago. 2017.

SICARD-ROSENBAUM, L. et al. Effects of energy-matched pulsed and continuous ultrasound on tumor growth in mice. **Physical Therapy**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 271-277, mar. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520972>>. Acesso em: 25 set. 2017.

LEHMANN, J. F.; KRUSEN, F. H. Biophysical effects of ultrasonic energy on carcinoma and their possible significance. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 452-459, jul. 1955. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14388907>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

SMACHLO, K. et al. Ultrasonic treatment of tumors: I. Absence of metastases following treatment of a hamster fibrosarcoma. **Ultrasound in Medicine & Biology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 45-49, 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/483466>>. Acesso em: 30 out. 2017.

MAXWELL, L. Therapeutic ultrasound and tumour metastasis. **Physiotherapy**, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 272-275, mai. 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031940605668228>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

LEJBKOWICZ, F.; ZWIRAN, M.; SALZBERG, S. The response of normal and malignant cells to ultrasound in vitro. **Ultrasound in Medicine & Biology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 75-82, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8456531>>. Acesso em: 3 dez. 2017.

PIMENTA, C. A. de M.; KOIZUMI, M. S.; TEIXEIRA, M. J. Dor no doente com câncer: características e controle. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 43, n. 1, p. 21-44, jan.-mar. 1997. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_43/v01/artigo2.html>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SAMPAIO, L. R.; MOURA, C. V. de M.; RESENDE, M. A. de. Recursos fisioterapêuticos no controle da dor oncológica: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 339-346, out./nov./dez. 2005. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_51/v04/pdf/revisao5.pdf>. Acesso em: 9 set. 2017.

CONSELHO FEDERAL DE FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL. Estabelece o Código de Ética e Deontologia da Fisioterapia. Resolução n.º 424, de 8 de julho de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1 ago. 2013. Seção 1, p.85.

PIMENTA, C. A. de M. et al. Controle da dor no pós-operatório. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, [São Paulo], v. 35, n. 2, p. 180-183, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ee.usp.br/reeusp/upload/pdf/584.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

RICCI, Natalia A.; DIAS, Carolina N. K.; DRIUSSO, Patrícia. A utilização dos recursos eletrotermofototerapêuticos no tratamento da síndrome da fibromialgia: uma revisão sistemática. **Rev. bras. fisioter.**, São Carlos, v. 14, n. 1, p. 1-9, Feb. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-35552010000100002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 Nov. 2020.

SILVA, R. M. V. da et al. Protocolo fisioterapêutico para o pós-operatório de abdominoplastia. **Terapia Manual**, [S. l.], v. 10, n. 49, p. 294-299, 2012. Disponível em: <<http://patriciafroes.com.br/gestao/img/publicacoes/1b0837c4f4414f923110c33db9c87ae9.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2017.

CAMPOS, P. B. C. **Avaliação da interferência de imunossupressores no desenvolvimento de metástases em ratos inoculados com fibro-histiocitoma maligno de baixo índice metastático**. 2000. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MENDONÇA, A. C. et al. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 152-157, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-78522006000300007&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 10 abr. 2018.

OLIVEIRA, P. D. de et al. Efeito da terapia ultrassônica de baixa intensidade em cultura celular de fibroblastos. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 112-118, jun. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1809-29502015000200112&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 16 set. 2017.

BERTOLINI, G. R. F. et al. Comparação do ultrassom pulsado e contínuo no reparo tendíneo de ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fp/v19n3/a09v19n3>>. Acesso em: jan, 2018.

SPEED, C. A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. 1331-1336, dez. 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/rheumatology/article/40/12/1331/1787872>>. Acesso em: 12 jan. 2018

BAKER, K. G.; ROBERTSON, V. J.; DUCK, F. A. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical Therapy**, [S. l.], v. 81, n. 7, p. 1351-1358, jul. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11444998>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

JOHNS, L. D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. **Journal of Athletic Training**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 293-299, jul.-set. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164359/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

ARTILHEIRO, P. P. et al. Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 25, n. 1, p.21-29, jan./mar. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-51502012000100003>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DE BEM, D. M. et al. Análise histológica em tecido epitelial sadio de ratos Wistar (in vivo) irradiados com diferentes intensidades do ultrassom. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 14, n. 2, p. 114-120, mar./abr. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-35552010000200005>. Acesso em: 21 fev. 2018.

LOPES, L. G. et al. Análise morfométrica de tecido muscular de coelhos submetido a ultrassom pulsado e contínuo de 1 MHz I. **Fisioterapia e Pesquisa**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 15-21, set.-dez. 2005. Disponível em: <[file:///C:/Users/patricia.barros/Downloads/76594-104773-1-SM%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/patricia.barros/Downloads/76594-104773-1-SM%20(1).pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2018.

DEMMINK, J. H. et al. The variation of heating depth with therapeutic ultrasound frequency in physiotherapy. **Ultrasound in medicine & biology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 113-118, jan. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12604122>>. Acesso em: 3 dez. 2017.

DRAPER, O. D.; PRENTICE, E. W. Ultrassom Terapêutico. In: PRENTICE, W. E. **Modalidades terapêuticas em medicina esportiva**. Barueri: Manole Ltda, 2014. p. 2017-244.

DE REZENDE, L. F. et al. Effect of continuous and pulsed therapeutic ultrasound in the appearance of local recurrence of mammary cancer in rats. **Journal of Buon**. Athens: Zerbini Medical Publ, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 581-584, jul.-set. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23033303>>. Acesso em: 19 set. 2017.

TROTTE, M. N. de S.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, Rogerio. Neoplasias espontâneas em ratos Wistar de um centro de criação de animais de laboratório do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2549-2551, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n9/a30cr405.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2017.

MORAES, Sandra Pedrosa de et al . Modelo experimental de tumor de Walker. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo , v. 15, n. 4, p. 00, Dec. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000400008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 Nov. 2020.

ITAKURA, D. A. et al. Alteração da temperatura nos tecidos biológicos com a aplicação do ultrassom terapêutico: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, [Curitiba], v. 25, n. 4, p. 857-868, out./dez. 2012. Disponível em: <<https://periodicos.pucpr.br/index.php/fisio/article/view/21441/20545>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

BOTELHO, R. S. T. **Elementos da macroscopia em patologia experimental**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra.

COLLINS, K. Efeitos térmicos. In: KITCHEN, Sheila. **Eletroterapia de Clayton**. 10.ed. São Paulo: Manole, 1998, p.89-104.

SILVA, N. de S. F.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Correlação entre concentração líquórica e efeitos colaterais após injeção de morfina por via subaracnóidea em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, p. 53-59, jan./fev. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-70942004000100007&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 9 set. 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabelas de registro ponderal dos ratos desde a chegada no biotério até o óbito

TABELA 1 - 1ª Fase - Registro ponderal dos ratos: chegada dos ratos no biotério até a inoculação - Dia da inoculação: 18/02/2010 (5ª feira)

	<i>Rato 01</i>	<i>Rato 02</i>	<i>Rato 03</i>	<i>Rato 04</i>	<i>Rato 05</i>	<i>Rato 06</i>	<i>Rato 07</i>	<i>Rato 08</i>	<i>Rato 09</i>	<i>Rato 10</i>
Dia 18/01/10	102 g	82 g	74 g	80 g	96 g	98 g	96 g	84 g	80 g	100 g
Dia 22/01/10	90 g	82 g	108 g	82 g	98 g	102 g	94 g	88 g	86 g	102 g
Dia 25/02/10	114 g	104 g	126 g	108 g	122 g	136 g	132 g	120 g	116 g	138 g
Dia 27/01/10	126 g	120 g	142 g	122 g	136 g	138 g	132 g	122 g	126 g	144 g
Dia 01/02/10	152 g	158 g	176 g	162 g	172 g	180 g	168 g	152 g	160 g	182 g
Dia 03/02/10	166 g	176 g	192 g	174 g	186 g	186 g	180 g	162 g	164 g	192 g
Dia 05/02/10	168 g	184 g	202 g	188 g	170 g	194 g	190 g	168 g	176 g	200 g
Dia 08/02/10	174 g	198 g	214 g	192 g	194 g	208 g	198 g	180 g	186 g	214 g

Observações:

Animais não divididos nos grupos.

TABELA 2 - 1ª Fase - Registro ponderal dos ratos: inoculação do tumor até o óbito - Dia da inoculação: 18/02/2010 (5ª feira)

	<i>Rato 01 controle</i>	<i>Rato 02 pulsátil</i>	<i>Rato 03 controle</i>	<i>Rato 04 óbito</i>	<i>Rato 05 contínuo</i>	<i>Rato 06 contínuo</i>	<i>Rato 07 desap.</i>	<i>Rato 08 pulsátil</i>	<i>Rato 09 óbito</i>	<i>Rato 10 controle</i>
Dia 18/02/10				X			X		X	
Dia 23/02/10	230 g	160 g	264 g		246 g	240 g		252 g		258 g
Dia 24/02/10	232 g	158 g	268 g		262 g	250 g		246 g		258 g
Dia 25/02/10	230 g	162 g	252 g		254 g	246 g		236 g		242 g
Dia 26/02/10	232 g	172 g	244 g		256 g	244 g		242 g		246 g
Dia 27/02/10	230 g	150 g	244 g		254 g	248 g		218 g		248 g
Dia 28/02/10	234 g	162 g	244 g		256 g	244 g		234 g		246 g
Dia 01/03/10	232 g	146 g	242 g		252 g	240 g		234 g		238 g
Dia 02/03/10	234 g	óbito	244 g		248 g	238 g		236 g		242 g
Dia 04/03/10	240 g		250 g		óbito	óbito		250 g		254 g
Dia 05/03/10			óbito							
Dia 08/03/10	226 g							274 g		282 g
Dia 09/03/10	óbito									
Dia 11/03/10								274 g		282 g
Dia 13/03/10								270 g		270 g
Dia 15/03/10								286 g		óbito
Dia 18/03/10								292 g		
Dia 24/03/10								316 g		
Dia 29/03/10								338 g		
Dia 07/04/10								356 g		
Dia 14/04/10								370 g		
Dia 24/04/10								386 g		

Dia 25/04/10	328 g
Dia 26/04/10	384 g
Dia 27/04/10	392 g
Dia 03/05/10	398 g
Dia 07/05/10	394 g
Dia 13/05/10	360 g
Dia 17/05/10	419 g
Dia 18/05/10	420 g
Dia 24/05/10	432 g
Dia 25/05/10	420 g

Observações:

Perdemos os ratos 04,07 e 09. O rato 02 morreu precocemente apresentando perda gradual de peso desde sua entrada no biotério.

Rato 08 apresentou regressão espontânea do tumor e foi sacrificado no dia 25/05/10.

TABELA 3 - 2ª Fase - Registro ponderal dos ratos: chegada dos animais no biotério até a inoculação - Dia da inoculação: 08/04/2010 (5ª feira)

	<i>Rato 01</i>	<i>Rato 02</i>	<i>Rato 03</i>	<i>Rato 04</i>	<i>Rato 05</i>	<i>Rato 06</i>	<i>Rato 07</i>	<i>Rato 08</i>	<i>Rato 09</i>	<i>Rato 10</i>
Dia 22/02/10	54 g	44 g	42 g	62 g	76 g	82 g	94 g	108 g	104 g	
Dia 24/02/10	60 g	50 g	óbito	74 g	86 g	94 g	108 g	120 g	120 g	100 g
Dia 26/02/10	72 g	60 g	X	84 g	94 g	104 g	118 g	130 g	130 g	110 g
Dia 27/02/10	74 g	64 g	X	88 g	100 g	108 g	126 g	138 g	136 g	118 g
Dia 28/02/10	82 g	70 g	X	94 g	106 g	112 g	128 g	142 g	140 g	124 g
Dia 01/03/10	86 g	74 g	X	100 g	100 g	118 g	132 g	144 g	144 g	126 g
Dia 02/03/10	96 g	82 g	X	104 g	114 g	120 g	136 g	146 g	148 g	132 g
Dia 03/03/10	114 g	100 g	X	124 g	122 g	134 g	148 g	160 g	164 g	146 g
Dia 04/03/10	108 g	96 g	X	118 g	122 g	130 g	146 g	158 g	158 g	142 g
Dia 08/03/10	130 g	118 g	X	122 g	136 g	150 g	164 g	178 g	180 g	164 g
Dia 11/03/10	150 g	138 g	X	104 g	132 g	144 g	144 g	180 g	180 g	168 g
Dia 13/03/10	160 g	146 g		98 g	146 g	166 g	136 g	202 g	200 g	186 g
Dia 15/03/10	172 g	158 g	X	óbito	156 g	178 g	122 g	212 g	212 g	198 g
Dia 18/03/10	186 g	168 g	X	X	170 g	196 g	óbito	222 g	222 g	212 g
Dia 22/03/10	216 g	190 g	X	X	192 g	216 g	X	224 g	236 g	228 g
Dia 23/03/10	214g	196 g	X	X	198 g	212 g	X	230 g	242 g	232 g
Dia 24/03/10	218 g	198 g	X	X	204 g	216 g	X	234 g	244 g	238 g
Dia 29/03/10	212 g	198 g	X	X	184 g	194 g	X	210 g	222 g	216 g
Dia 07/04/10	214 g	200 g	X	X	240 g	260 g	X	178 g	190 g	174 g
Dia 08/04/10	246 g	234 g	X	X	256g	274 g	X	206 g	220 g	198 g

TABELA 4 - 2ª Fase - Registro ponderal dos ratos: inoculação do tumor ao órbito - Dia da inoculação: 08/04/2010 (5ª feira)

	<i>Rato 01 controle</i>	<i>Rato 02 controle</i>	<i>Rato 03 órbito</i>	<i>Rato 04 órbito</i>	<i>Rato 05 contínuo</i>	<i>Rato 06 contínuo</i>	<i>Rato 07 contínuo</i>	<i>Rato 08 pulsátil</i>	<i>Rato 09 pulsátil</i>	<i>Rato 10 pulsátil</i>
Dia 08/04/10	246 g	234 g	X	X	256 g	274 g	X	206 g	220 g	198 g
Dia 12/04/10	266 g	254 g	X	X	254 g	274 g	X	240 g	244 g	236 g
Dia 13/04/10	268 g	260 g	X	X	258 g	272 g	X	242 g	252 g	242 g
Dia 14/04/10	268 g	258 g	X	X	256 g	274 g	X	242 g	252 g	242 g
Dia 15/04/10	264 g	258 g	X	X	242 g	268 g	X	234 g	244 g	240 g
Dia 16/04/10	252 g	254 g	X	X	242 g	268 g	X	234 g	242 g	240 g
Dia 17/04/10	254 g	252 g	X	X	238 g	268 g	X	234 g	244 g	240 g
Dia 18/04/10	250g	244g	X	X	238g	262g	X	236g	240g	244g
Dia 19/04/10	254 g	248 g	X	X	234 g	264 g	X	236g	238 g	242 g
Dia 22/04/10	192 g	234 g	X	X	224 g	246 g	X	órbito	242 g	222 g
Dia 23/04/10	264 g	252 g	X	X	240 g	272 g	X	X	256 g	244 g
Dia 24/04/10	270 g	256 g	X	X	248 g	274 g	X	X	260 g	órbito
Dia 26/04/10	280 g	268 g	X	X	252 g	280 g	X	X	262 g	X
Dia 27/04/10	órbito	268 g	X	X	254 g	290 g	X	X	258 g	X
Dia 28/04/10	X	272 g	X	X	256 g	órbito	X	X	254 g	X
Dia 30/04/10	X		X	X		X	X	X	órbito	X
Dia 03/05/10	X	246 g	X	X	260 g	X	X	X	X	X
Dia 04/05/10	X	278 g	X	X	266 g	X	X	X	X	X
Dia 05/05/10	X	278 g	X	X	266 g	X	X	X	X	X
Dia 07/05/10	X	288 g	X	X	256 g	X	X	X	X	X
Dia 10/05/10	X	276 g	X	X	262 g	X	X	X	X	X
Dia 13/05/10	X	258g	X	X	228 g	X	X	X	X	X

Dia 17/05/10	X	302 g	X	X	256 g	X	X	X	X	X
Dia 18/05/10	X	310 g	X	X	260 g	X	X	X	X	X
Dia 24/05/10	X	298 g	X	X	254 g	X	X	X	X	X
Dia 25/05/10	X	320 g	X	X	272 g	X	X	X	X	X
Dia 31/05/10	X	336 g	X	X	284 g	X	X	X	X	X
Dia 22/06/10	X	346g	X	X	320g	X	X	X	X	X
Dia 23/06/10	X	348g	X	X	324g	X	X	X	X	X
Dia 24/06/10	X	354g	X	X	326g	X	X	X	X	X
Dia 27/06/10	X	356g	X	X	336g	X	X	X	X	X
Dia 28/06/10	X	350g	X	X	330g	X	X	X	X	X
Dia 30/06/10	X	252 g	X	X	334 g	X	X	X	X	X
Dia 01/07/10	X	354g	X	X	332g	X	X	X	X	X
Dia 02/07/10	X	362 g	X	X	340 g	X	X	X	X	X
Dia 05/07/10	X	362 g	X	X	336 g	X	X	X	X	X
Dia 06/07/10	X	364 g	X	X	236 g	X	X	X	X	X

Observações:

Os ratos 02 e 05 tiveram regressão espontânea do tumor e foram sacrificados no dia 06/07/10.

TABELA 5 - 3ª Fase - Registro ponderal dos ratos: chegada dos animais no biotério até a inoculação -**Dia da inoculação: 17/06/2010 (5ª feira)**

	<i>Rato 01</i>	<i>Rato 02</i>	<i>Rato 03</i>	<i>Rato 04</i>	<i>Rato 05</i>	<i>Rato 06</i>	<i>Rato 07</i>	<i>Rato 08</i>	<i>Rato 09</i>	<i>Rato 10</i>
Dia 14/04/10	48 g	56 g	60 g	56 g	56 g	58 g	50 g	62 g	48 g	48 g
Dia 16/04/10	58 g	66 g	68 g	68 g	66 g	70 g	58 g	72 g	60 g	58 g
Dia 17/04/10	62 g	72 g	74 g	72 g	70 g	76 g	62 g	78 g	64 g	64 g
Dia 19/04/10	72 g	82 g	86 g	80 g	80 g	88 g	72 g	88 g	90 g	74 g
Dia 23/04/10	72 g	80 g	84 g	78 g	80 g	86 g	70 g	88 g	74 g	72 g
Dia 24/04/10	66 g	72 g	78 g	70 g	74 g	80 g	64 g	82 g	68 g	64 g
Dia 26/04/10	98 g	98 g	110 g	102 g	108 g	116 g	94 g	110 g	98 g	92 g
Dia 27/04/10	102 g	104 g	114 g	102 g	112 g	116 g	100 g	116 g	102 g	98 g
Dia 28/04/10	112 g	108 g	120 g	110 g	118 g	124 g	100 g	120 g	112 g	104 g
Dia 03/05/10	88 g	88 g	98 g	88 g	96 g	100 g	90 g	100 g	88 g	80 g
Dia 04/05/10	110 g	108 g	120 g	110 g	122 g	128 g	112 g	122 g	114 g	102 g
Dia 05/05/10	120 g	112 g	128 g	120 g	130 g	138 g	122 g	130 g	122 g	108 g
Dia 10/05/10	136g	126 g	142 g	136 g	146 g	146 g	124 g	130 g	130 g	116 g
Dia 13/05/10	130 g	126 g	120 g	118 g	138 g	140 g	126 g	98 g	82 g	90 g
Dia 17/05/10	190 g	172 g	198 g	186 g	204 g	200 g	188 g	186 g	182 g	162 g
Dia 18/05/10	196 g	176 g	200 g	190 g	206 g	206 g	196 g	188 g	188 g	172 g
Dia 24/05/10	186 g	168 g	202 g	178 g	196 g	198 g	176 g	178 g	172 g	154g
Dia 25/05/10	220 g	192 g	232 g	206 g	222 g	226 g	210 g	204 g	198 g	182 g
Dia 31/05/10	218 g	194 g	230 g	230 g	230 g	224 g	210 g	196 g	192 g	178 g
Dia 17/06/10	260	250	260	254	210	240	256	260	253	250

TABELA 7 - 4ª Fase - Registro ponderal dos ratos: chegada dos animais no biotério até a inoculação - Dia da inoculação: 17/06/2010 (5ª feira)

	<i>Rato 01</i>	<i>Rato 02</i>	<i>Rato 03</i>	<i>Rato 04</i>	<i>Rato 05</i>	<i>Rato 06</i>	<i>Rato 07</i>	<i>Rato 08</i>	<i>Rato 09</i>	<i>Rato 10</i>
Dia 29/09/10	80 g	85 g	75 g	75 g	80 g	90 g	75g	90 g	80g	90 g
Dia 04/10/10	115 g	110 g	115g	110 g	115 g	120g	110g	125g	115 g	125g
Dia 11/10/10	110g	105g	105g	100g	105g	190g	190g	195g	195g	195g
Dia 18/10/10	185g	190g	195g	190g	195g	190g	190g	195g	195g	195g
Dia 21/10/10	200g	205g	215g	205g	220g	210g	200g	210g	205g	215g
Dia 11/11/10	215g	205g	230g	205g	220g	210g	205g	205g	200g	225g
Dia 31/05/10	218 g	194 g	230 g	230 g	230 g	224 g	210 g	196 g	192 g	178 g
Dia 17/06/10	260	250	260	254	210	240	256	260	253	250

TABELA 8 - 4ª Fase - Registro ponderal dos ratos: inoculação do tumor o óbito - Dia da inoculação: 17/06/2010 (5ª feira)

	<i>Rato 01 controle</i>	<i>Rato 02 controle</i>	<i>Rato 03 pulsátil</i>	<i>Rato 04 pulsátil</i>	<i>Rato 05 controle</i>	<i>Rato 06 contínuo</i>	<i>Rato 07 contínuo</i>	<i>Rato 08 contínuo</i>	<i>Rato 09 contínuo</i>	<i>Rato 10 contínuo</i>
Dia 16/11/10	255g	240g	265g	245g	265g	250g	235g	255g	245g	265g
Dia 17/11/10	260g	250g	285g	255g	275g	240g	225g	240g	230g	235g
Dia 18/11/10	250g	240g	260g	240g	255g	245g	240g	255g	255g	245g
Dia 19/11/10	250g	235g	255g	225g	250g	240g	240g	250g	245g	240g
Dia 20/11/10	245g	240g	255g	óbito	255g	240g	240g	260g	250g	245g
Dia 21/11/10	250g	240g	255g	X	255g	240g	235g	255g	250g	245g
Dia 22/11/10	255g	245g	250g	X	265g	225g	225g	250g	óbito	230g
Dia 23/11/10	260g	250g	240g	X	250g	210g	óbito	250g	X	215g
Dia 24/11/10				X		óbito	X	270g	X	óbito
Dia 25/11/10				X	óbito	X	X		X	X
Dia 26/11/10			óbito	X	X	X	X		X	X
Dia 27/11/10		óbito	X	X	X	X	X		X	X
Dia 29/11/10	óbito	X	X	X	X	X	X	óbito	X	X

APÊNDICE B - Tabelas dos valores dos volumes tumorais

TABELA 1 - Tabela dos volumes tumorais durante tratamento com ultrassom (1-7 dias)

Dia 1			Dia 2			Dia 3		
Controle	Pulsátil	Contínuo	Controle	Pulsátil	Contínuo	Controle	Pulsátil	Contínuo
1,1023	0,5835	0,8410	2,4963	2,0739	3,0651	4,8225	3,5758	7,2518
0,5677	0,4297	1,2838	0,7921	0,9125	3,6861	2,7658	2,2482	6,3043
0,1196	0,3088	0,9238	0,3908	1,2759	3,5431	1,7582	3,0868	6,6318
0,4524	0,71906	0,5769	0,9048	1,7907	2,0436	1,4017	4,3622	2,7881
0,0541	1,5699	3,4061	0,5009	3,0367	5,6561	0,8667	8,8255	8,8753
3,8265	3,3916	2,6330	7,7772	5,7296	4,0142	12,7276	7,6876	6,0831
2,4372	2,6892	4,4720	5,6724	5,2802	8,0698		12,3587	13,2437
3,0990	4,7623	1,5388	6,5373	7,7506	2,5678	9,0158	12,5405	3,8856
3,7728	4,1353	4,6702	6,2267	7,4211	7,3042	8,9444	11,1252	9,0314
1,1314	1,8352	2,2342	2,9033	4,1396	3,6510	4,8064	5,4156	6,5491
2,3229	1,9144	1,8106	4,7774	3,9713	3,6039	5,9324	5,5942	5,6919
		1,8510			3,8740			5,4761

Dia 4			Dia 5			Dia 6		
Controle	Pulsátil	Contínuo	Controle	Pulsátil	Contínuo	Controle	Pulsátil	Contínuo
7,1703	7,0965	12,3640	8,5272	7,2819	13,8919	12,6412	8,9795	15,4226
6,6824	4,0453	10,8320	9,7545	6,2240	11,3674	8,4940	6,7508	16,3267
4,7360	5,1175	9,2157	4,7164	10,1041	13,6726	6,1842	14,5698	16,3390
2,7376	5,6307	5,1310	4,7120	6,8684	5,6374	9,5614	10,2196	10,4701
1,4488	11,4461	13,7111	1,6437	13,4296	14,9049	3,4939	18,8138	16,9139
12,6184	10,8598	13,6029	19,2006	14,3440	16,2856	20,7893	16,9446	18,7425
	6,0378	15,9250		12,5369	23,1970		15,8772	21,7011
15,9255	14,5988	6,9761	19,0312	18,7772	10,0111	19,1071	23,8836	13,8442
10,6840	13,2401	15,6817	16,5707	22,3744	19,1626	22,7891	27,1713	24,0436
8,3835	8,8624	9,5505	10,0463	10,9754	13,4321	15,1486	17,4393	17,6919
9,1521	5,5822	9,1814	13,0401		11,7418	18,1936		15,6775
		7,9766			11,6204			17,3351

Dia 7

Controle	Pulsátil	Contínuo
16,0540	8,8766	18,8309
16,0244	11,4053	19,3081
10,3345	19,7949	23,7504
9,0611	13,1623	14,3924
5,0795	23,9816	21,3990
23,5767	23,3175	26,1785
	20,6359	17,4720
27,2380	28,8707	17,1581
26,7507	29,2698	25,826
18,2452	18,6589	25,2450
20,4193		

Controle	Pulsátil	Contínuo
Animal 01	Animal 02	Animal 05
Animal 03	Animal 08	Animal 06
Animal 10	Animal 08	Animal 05
Animal 01	Animal 09	Animal 06
Animal 02	Animal 10	Animal 02
Animal 05	Animal 01	Animal 09
Animal 06	Animal 03	Animal 10
Animal07	Animal 04	Animal 06
Animal 01	Animal 08	Animal 07
Animal 02	Animal 03	Animal 08
Animal 05	Animal 04	Animal 09
		Animal 10

Legenda:

Óbito em grupo Controle ■
 Óbito em grupo Pulsátil ■
 Óbito em grupo Contínuo ■

Regressão espontânea:

Controle - Animal 02 - 5,0795
 Pulsátil - Animal 08 - 11,4053
 Contínuo - Animal 05 - 23,7504

APÊNDICE C - Tabelas de quantificação de metástases

TABELA 1 – Metástase no pulmão

Metástase no pulmão			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	7	3	10
Pulsátil	8	3	11
Contínuo	9	3	12
Total			33

TABELA 2 – Metástase no coração

Metástase no coração			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	1	9	10
Pulsátil	3	8	11
Contínuo		8	12
Total			33

TABELA 3 – Metástase no estômago

Metástase no estômago			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	3	7	10
Pulsátil	4	7	11
Contínuo	1	11	12
Total			33

TABELA 4 – Metástase no fígado

Metástase no fígado			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	8	2	10
Pulsátil	6	5	11
Contínuo	7	5	12
Total			33

TABELA 5 – Metástase no baço

Metástase no baço			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	2	8	10
Pulsátil	2	9	11
Contínuo	1	11	12
Total			33

TABELA 6 – Metástase nos rins

Metástase nos rins			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	2	8	10
Pulsátil	5	6	11
Contínuo	4	8	12
Total			33

TABELA 7 – Metástase no intestino

Metástase no intestino			
Grupo	Presente	Ausente	Total
Controle	1	9	10
Pulsátil	2	9	11
Contínuo	3	9	12
Total			33