

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**LESÃO NO DNA E TERAPIA FOTODINÂMICA EM NEOPLASIA
MAMÁRIA DE RATAS (*Sprague-Dawley*) INDUZIDA
QUIMICAMENTE**

ISABELLE FERREIRA

Botucatu– SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**LESÃO NO DNA E TERAPIA FOTODINÂMICA EM NEOPLASIA
MAMÁRIA DE RATAS (*Sprague-Dawley*) INDUZIDA
QUIMICAMENTE**

ISABELLE FERREIRA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para a obtenção
do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Noeme Sousa
Rocha

Nome do Autor: Isabelle Ferreira

Título: ANÁLISE DA LESÃO NO DNA E TERAPIA FOTODINÂMICA PARA O TRATAMENTO DE TUMORES MAMÁRIOS EM RATOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

ProfªDrª Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa.Dra. Cláudia Valéria Sellner Brandão
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa.Dra. Cristina Kurachi
Membro
Departamento de Física e Engenharia de Produção
IFSC – USP – São Carlos

Data da Defesa: 8 de dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Cláudio Ferreira e Auriete B. C. Ferreira.
"Difícil expressar por palavras tudo o que tenho para agradecer
por isso faço da minha conquista uma forma de
gratidão, por tudo quanto recebi de vocês".

Agradecimentos

A minha orientadora Professora Noeme Sousa Rocha por ter me aceitado como sua orientada, pelos ensinamentos passados, que com certeza não serão esquecidos.

A Professora Sheila Canevese Rahal pelos ensinamentos que me passou durante sua orientação na iniciação científica e que continuou me passando durante o mestrado através de sua colaboração nesse trabalho.

Á minha irmã, Juliana Ferreira, para mim, exemplo de pesquisadora, pela colaboração direta nesse trabalho, sem a qual, com certeza não seria possível realizá-lo e pelo carinho e compreensão.

Ao Professor Vanderlei Salvador Bagnato por ter me dado a possibilidade de trabalhar com a Terapia Fotodinâmica e pelos ensinamentos sobre essa técnica.

Aos pesquisadores do Cepof em especial ao Clóvis Grecco, ao José Dirceu Vollet - Filho, a Lílian Tan Moryama e a Natalia M. Inada pela colaboração na realização desse trabalho.

Aos Professores Renée Laufer Amorim e Julio Sequeira Lopes por participarem da minha formação e por me receberem de braços abertos no Departamento .

A Professora Lídia Raquel de Carvalho pela acessoria estatística

Aos pós-graduandos Sandra Bassani Silva, Luciano Santos da Fonseca, Fernanda Carmelo Figueroa, Fabio Henrique Evangelista de Andrade, Mario Bariane, Érika Maria Terra, Paulo Ricardo O. Berossano pela auxílio e companheirismo.

Aos pós-graduandos Marcela Marcondes, Leandro Bertoni Texeira, Celmira Calderón, Rafael Torres, Pedro Pinczowski, Giuliana Brasil Croce, Mariana Marras Vidale, Ana Paula Masseno, Camila Dias Porto, Edna Teresa de Lima e Adriano S. Okamoto, pela agradável convivência.

A pós-graduanda Veridiana Silveira pela amizade e ajuda direta na realização desse trabalho.

Ao pós-graduando Tony F. Grassi pelo auxílio e esclarecimentos sobre a indução química.

A pós-graduanda Khadije Hette pelo apoio nas cirurgias.

Aos residentes Didier Quevedo Cagnine, Arita de Cássia Cremasco, Freddi Bardela, Anita Menconi, Ticiane Silva Rocha, pelo apoio e companheirismo.

Aos funcionários do serviço de Patologia Veterinária Maury Raul e Noel Melo pela ajuda e boa convivência.

Aos funcionários do biotério da Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu Paulo César Georgetti e Juliana Semim Cavalheiro pela boa vontade e presença constantes durante a execução da parte experimental desse trabalho.

A Professora Dayse Maria Fávero Salvadori e seus orientados do Laboratório de Toxicogenômica e Epidemiologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Unesp Botucatu pelos ensinamentos e orientações sobre o teste do cometa.

"Aos animais

Foste um instrumento de nosso aprendizado?

Foste apenas um objeto de experiência?

Não!

Foste para nós, vítimas solicitadas pela ciência, para benefício da humanidade, porém, apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre: muito obrigado."

(Autor desconhecido)

A DEUS Inteligência Suprema e Causa Primeira de Todas as Coisas.

Deus tem uma resposta positiva para todas as coisas negativas que dizemos para nós mesmo.

Quando dizes "não posso resolver as coisas"...Deus te diz "Eu guio teus passos.

Quando dizes "é impossível"... Deus te diz "Tudo é possível".

Quando dizes "me sinto muito sozinho ...Deus te diz "Não te deixarei nem desampararei".

Quando dizes "eu não posso fazer... Deus te diz "Tudo podes fazer"

Deus te diz "Eu te ensinarei o caminho" quando disser "não sei como seguir".

(Autor desconhecido)

O presente trabalho foi realizado com o suporte financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.
Processo 06/056895-2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico e localização anatômica da neoplasia	27
Tabela 2	Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, referentes à variável tail intensity	40
Tabela 3	Média e desvio-padrão referentes às variáveis segundo classificação	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização Topográfica	12
Figura 2	Ativação do agente fotossensibilizador pela luz	12
Figura 3	Agulha de gavagem para ratos.	16
Figura 4	Gavagem	16
Figura 5	TNM	19
Figura 6	Coleta de exame citológico por capilaridade	19
Figura 7	Exame citológico por capilaridade-Giemsa	20
Figura 8	Exame citológico por capilaridade-Papanicolaou	20
Figura 9	Delineamento Experimental	25
Figura 10	Photogem®	25
Figura 11	Amostra citológica	29
Figura 12	Frequência de diagnóstico histopatológico	29
Figura 13	Amostra citológica-Carcinoma ductal	30
Figura 14	Carcinoma ductal HE	30
Figura 15	Teste do Cometa-pequena lesão	32
Figura 16	Teste do Cometa-grande lesão	32
Figura 17	Tumor de mama em <i>Sprague-Dawley</i> induzido pelo DMBA	35
Figura 18	Tumor de mama em <i>Sprague-Dawley</i> pós TFD	35
Figura 19	Desenvolvimento dos tumores mamários em <i>Sprague-Dawley</i>	36
Figura 20	Recidiva de tumor de mama em <i>Sprague-Dawley</i> HE	36
Figura 21	Recidiva de tumor de mama em <i>Sprague-Dawley</i>	37
Figura 22	Ausência de recidiva de tumor de mama em <i>Sprague-Dawley</i>	37

Figura 23	Tumor de mama pós-tratamento com TFD –CID e necrose- HE	38
Figura 24	Tumor de mama pós-tratamento com TFD-morte celular- HE	38
Figura 25	Intensidade de luz entregue a diferentes áreas	39
Figura 26	Células tumorais viáveis adjacente ao tecido adiposo pós TFD	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido desoxirribunucleico

TVT – Tumor Venéreo Transmissível

DMBA – 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

PHA – hidrocarboneto aromático policíclico

IUAC – International Union Against Cancer

TFD – Terapia Fotodinâmica

FS – Fotossensibilizador

FS's – Fotossensibilizadores

ALA – ácido 5-aminolevulinico

Laser – do inglês, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LED - do inglês, light emitting diodes

HpD – do inglês, Hematoporphyrin Derivative

HE - Hematoxilina e eosina

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
2	Revisão de Literatura	
2.1	Desenvolvimento de Mama de Rata	3
2.2	Modelo Experimental de Carcinogênese Química <i>in vivo</i>	4
2.3	Sistema de Gradação TNM Clínico	5
2.4	Diagnóstico Microscópico de Neoplasia	6
2.5	Lesão no DNA	6
2.6	Protocolo Terapêutico para Neoplasia	7
3	Objetivos	14
4	Material e Método	
4.1	Animais	15
4.2	Indução Química-Etapa de Iniciação	15
4.3	Estadiamento Clínico e Diagnóstico Microscópico	17
4.4	Teste do cometa	21
4.5	Protocolo Terapêutico	22
4.5.1	Terapia Fotodinâmica	23
4.5.1.1	Fotossensibilizador	23
4.5.1.2	Fonte de Luz	23
4.6	Consistência da Resposta a TFD	23
4.7	Estatística	24

4.8	Registro dos Dados pela Informática	24
5	Resultados	26
5.1	Sistema TNM Clínico e Diagnóstico Microscópico	26
5.2	Teste do Cometa	31
5.3	Resposta ao Protocolo Terapêutico	33
5.4	Consistência da Resposta a TFD	33
5.5	Estatística	40
6	Discussão	
6.1	Linhagem de Rato Utilizada	41
6.2	Carcinogênese Química de Média Duração	41
6.3	Efeitos do DMBA na Sexta Semana	42
6.4	Lesão no DNA	42
6.5	Terapia Fotodinâmica	43
7	Conclusão	48
8	Perspectivas	48
9	Referências	49

Trabalho Científico

Anexo

FERREIRA, I. **Lesão no DNA e Terapia Fotodinâmica em neoplasia mamária de ratas (*Sprague-Dawley*) induzida quimicamente**. Botucatu, 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Neoplasia é um processo anormal que compromete a proliferação e diferenciação celular de início localizado, podendo disseminar pelo organismo do hospedeiro levando a sua morte. As características desse processo devem ser investigadas para se estabelecer um protocolo terapêutico, para isso, uma importante ferramenta é o Teste do Cometa que detecta a lesão do DNA. Quanto ao protocolo terapêutico a Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma nova modalidade utilizada para o tratamento de neoplasia. Consiste na indução da citotoxicidade, através da interação da luz de comprimento de onda adequado, de um fotossensibilizador e do oxigênio molecular presente nas células. Com o objetivo de quantificar a lesão no DNA das neoplasias mamárias pelo Teste do Cometa; avaliar a resposta desse tumor à Terapia Fotodinâmica como tratamento único e adjuvante a cirurgia utilizamos 20 ratas *Sprague-Dawley* divididas em quatro grupos durante 12 semanas: os grupos G1 a G4 receberam dose única de DMBA 50 mg/kg por gavagem para indução do tumor de mama. Quando da manifestação da neoplasia aplicou-se nos animais de todos os grupos citados o TNM clínico, exame citológico e Teste do Cometa. O G1 foi acompanhado clinicamente, o G2 submetido à TFD, o G3 à cirurgia associada a TFD, G4 à cirurgia. Os animais do grupo 2 foram submetidos a uma única sessão da TFD, após 8 semanas, tiveram o estadiamento clínico e lesão no DNA menores quando comparado ao grupo controle. Os animais do grupo 3 não apresentaram recidivas até o final de 12 semanas quando foram comparados com os animais do grupo 4 o qual apresentou 60% de taxa de recidiva após 11 semanas, embora os animais do grupo 3 tenham apresentado menor lesão no DNA. A TFD pode ser usada no modelo experimental de tumor de mama como terapia única e adjuvante a cirurgia para redução da evolução do tumor e evitar recidivas respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia Fotodinâmica, Lesão no DNA, tumor de mama experimental.

FERREIRA, I. **DNA damage and Photodynamic Therapy in chemical induce mammary tumor in rats (*Sprague-Dawley*)**. Botucatu, 2008. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Neoplasm is a process that results from an the abnormal proliferation and cell differentiation initially localized, but can metastize leading to death. The characteristics of this process should be investigated to establish a therapeutic protocol Comet assay is an important tool that detects the DNA damage. Photodynamic Therapy (PDT) is a therapeutic modality that can be used to treat cancer, where the cytotoxic effect is induced by the interaction of light at adequate wavelength, a photosensitizer and molecular oxygen present in cells. Aiming to quantify the DNA damage by Comet assay in mammary tumor assess the tumor response after Photodynamic Therapy as a single treatment or adjuvant modality to surgery, 20 *Sprague-Dawley* rats were used. The animals were divided into four groups all animals received a single dose of DMBA, 50 mg / kg by gavage to induce the mammary tumors the TNM clinical, cytological and Comet assay classifications were performed. The animals of were clinically monitored, the animals were treated by PDT, the animals were treated with surgery and PDT, and the animals of only surgery. The animals in group 2 were subjected to a single session of PDT, and after 8 weeks, clinical staging and DNA damage were less when compared to the control group. The animals in group 3 showed no tumor recidive until the end of the 12th week. The animals of group 4 showed 60% rate of tumor recurrence after 11 weeks. The animals in group 3 showed less DNA damage when compared to group 4. PDT can be used in an experimental model of mammary tumor as single and as adjuvant therapy to reduce the development of tumors and to prevent recurrences, respectively.

KEY WORDS: Photodynamic Therapy, lesion in DNA, induced mammary tumor.

1. INTRODUÇÃO

Neoplasia é um processo anormal que compromete a proliferação e diferenciação celular de início localizado, podendo disseminar pelo organismo do hospedeiro levando a sua morte.

O sucesso do tratamento dos tumores está relacionado com vários fatores entre eles o tempo de evolução, estadiamento clínico da doença e agressividade do tumor. Para avaliação de tais critérios utilizamos o estadiamento clínico (TNM), o exame citopatológico, histopatológico e uma importante ferramenta é o Teste do Cometa que é um método rápido, simples e sensível de se detectar a lesão do DNA auxiliando traçar o perfil do comportamento biológico do tumor.

O protocolo convencional para o tratamento das neoplasias é a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, utilizadas individualmente ou associadas. Exceto a cirurgia, o mecanismo de ação sobre as células é a sua destruição, não é seletivo, age tanto nas neoplásicas como nas normais, conseqüentemente há efeitos colaterais indesejáveis. Em vista disso, novas modalidades terapêuticas têm sido pesquisadas para o tratamento de tumores.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma recente modalidade utilizada para o tratamento de neoplasia. Consiste na indução da citotoxicidade, através da interação da luz de comprimento de onda adequado, de um fotossensibilizador e do oxigênio molecular presente nas células. A TFD tem diversas vantagens, a principal é a destruição tecidual seletiva. Os efeitos colaterais são reduzidos, mantém a estética, não se observa resistência a droga. Pode ser usada sozinha ou em associação a outras terapias.

Dos maiores grupos de neoplasias diagnosticadas atualmente, o tumor de mama aparece com frequência tanto na mulher como na cadela. O rato como modelo experimental é o mais utilizado para estudos de carcinogênese mamária, por estar bem padronizado e ser comparável a doença espontânea na mulher.

Considerando os aspectos supracitados, este estudo tem o objetivo de utilizar o modelo experimental de tumor de mama induzido pelo DMBA em ratas *Sprague-Dawley* para quantificar a lesão no DNA das

neoplasias pelo Teste do Cometa; bem como avaliar a resposta do tumor à Terapia Fotodinâmica como tratamento único e adjuvante a cirurgia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento da Mama de Rata

O desenvolvimento da mama durante a vida intra-uterina é semelhante à de qualquer mamífero inclusive, ao da mulher (CARDIFF e WELLINGS, 1999).

Na rata apresenta-se como um espessamento ectodérmico na forma de botão que se estende ao longo de cada lado da superfície ventral do feto. Contém perfil de células-tronco, originam tipos celulares distintos, formando células secretoras, mioepiteliais e basais, que irão formar ductos, lóbulos e o tecido fibroso interlobular (RUSSO e RUSSO, 1996 (a); STERNLICHT, 2006).

Durante a formação, a região mais próxima dos mamilos é chamada de *Zona A*, a intermediária de *Zona B* e a mais distante de *Zona C*, esta é a estrutura que apresenta elevado índice proliferativo, conseqüentemente suscetível à transformação neoplásica. O conjunto forma o parênquima da glândula que está envolvido em tecido adiposo, predominantemente branco, que varia consideravelmente com a idade e a localização anatômica das glândulas (RUSSO *et al.*, 1990 (b); RUSSO e RUSSO, 1991; MANN *et al.*, 1996).

Este tecido quando maduro, sua grande característica é a inclusão lipídica que ocupa de 60 a 85% do peso do adipócito e contém principalmente triacilgliceróis, pequena quantidade de ácido graxo livre, colesterol fosfolipídios e monoacilgliceróis. A composição dos ácidos graxos dos triacilgliceróis reflete a composição da gordura da dieta (SHELDON *et al.*, 1962, CARPENTER *et al.*, 1977; GELOEN *et al.*, 1989; CORNELIUS *et al.*, 1994).

Nos animais, inclusive na rata, a taxa lipídica consiste de aproximadamente um terço de adipócito, os demais são combinação de vasos sanguíneos, tecido nervoso, fibroblasto e pré-adipócito. Este em fases diferentes de desenvolvimento. Adipócito jovem ou adulto secretam diferentes fatores, entre eles: produtos de genes relacionados à obesidade, citocinas, fatores de crescimento e hormônios (SHELDON *et al.*, 1962, CARPENTER *et al.*, 1977; GELOEN *et al.*, 1989; CORNELIUS *et al.*, 1994).

A anatomia da mama da rata é complexa, distribuída aos pares paralelamente a linha *Alba*. O primeiro par é localizado na região cervical, seguida pela torácica, abdominal e por fim inguinal, **Figura 1** (RUSSO *et al.*, 1990(B)).

As mamas são apócrinas túbulos-alveolares compostas, sudoríparas modificadas, altamente especializadas e complexas. É um tecido que sofre mudanças contínuas, desde a sua formação até a senescência, dentre elas o fator hormonal (RUSSO *et al.*, 1990(B); RUSSO e RUSSO, 1996(A); STERNLICHT, 2006)

2.2. Modelo Experimental de Carcinogênese Química *in vivo*

Os agentes químicos foram identificados como fatores etiológico do câncer para o homem a partir do século XVIII. Porém, somente no século XX que se desenvolveram modelos utilizando os animais para se investigar a carcinogênese química (COHEN e ELLWEIN 1991; GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Estes estudos trouxeram informações que possibilitaram a identificação de novos agentes cancerígenos. A natureza química dos cancerígenos é variada. A maioria possui ação genotóxica, ou seja, são capazes de induzir lesão no DNA da célula, que se não for reparado leva ao desenvolvimento da neoplasia (COHEN e ELLWEIN 1991; BUTTERWORTH *et al.*, 1992; HASEGAWA *et al.*, 1998; ROCHA, 1998; CAMARGO *et al.*, 1999; KLAUNIG *et al.*, 2000; SPINARDI-BARBISAN *et al.*, 2004).

O potencial genotóxico de um agente químico pode ser detectado em modelo experimental em laboratório, *in vivo* e *in vitro*. O 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) é um exemplo de uma substância genotóxica, composto de hidrocarboneto aromático policíclico (PHA) que necessita de ativação metabólica para causar lesão no DNA (ROCHA, 1998; WHO, 1998; NGUYEN-BA e VASSEUR, 1999; HELFINGER *et al.*, 2000; THOMPSON *et al.*, 2000; TROSKO, 2001; WILLIAMS, 2001; BARROS, 2004; COCCA *et al.*, 2005, OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A carcinogênese mamária na rata tem o DMBA como composto químico indutor de tumor. As características deste processo fazem esse modelo

comparável a doença espontânea na mulher. Quando se pretende estudar o tumor de mama em modelos experimentais *in vivo* no sentido de comparar com outra espécie, inúmeros fatores devem ser levados em consideração, tais como: linhagem, idade, fator hormonal, dose e via de administração (McCORMICK *et al.*, 1982; CLINTON *et al.*, 1984; RUSSO *et al.*, 1990 (B); RUSSO e RUSSO, 1996(B); HEFFELFINGER, 2000; KUBATKA *et al.*, 2002; BARROS, 2004; GEAR *et al.*, 2007).

A via de administração por gavagem é a mais utilizada por ser efetiva (MANN *et al.*, 1996; RUSSO e RUSSO 2000 KUBATKA *et al.*, 2002; BARROS, 2004).

A rata mostra sensibilidade máxima a carcinogênese por DMBA entre 35 e 55 dias de idade por ser esse o período de rápido desenvolvimento tecidual das mamas como consequência as lesões podem se apresentar desde uma hiperplasia a adenomas e carcinomas (RUSSO e RUSSO, 1987; RUSSO *et al.*, 1990 (B); TERADA, 1995; HEFFELFINGER, 2000; KOCDOR *et al.*, 2000; KUBATKA *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2004; GEAR *et al.*, 2007).

2.3. Sistema de Graduação TNM Clínico

O sistema TNM foi criado pela International Union Against Cancer (IUAC) em uma Conferência realizada na França por volta de 1943 e 1952, tendo como presidente Pierre Denoix. O objetivo do encontro foi classificar clinicamente os tumores malignos. Assim, é possível planejar e monitorar a neoplasia, indicar prognóstico e facilitar informação e contribuir com as pesquisas sobre a neoplasia.

A classificação pelo TNM dos tumores no paciente inicia-se com exame físico completo, palpação da lesão e linfonodos regionais. Os parâmetros considerados são:

T – tamanho do tumor primário onde:

T1 < 2cm de diâmetro,

T 2 = 2 – 5 cm,

T 3 > 5 cm

T 4 = tumor aderido.

N – linfonodos regionais palpáveis ou não.

M – com ou sem evidencia de metástases à distância

Todos os casos devem ser confirmados microscopicamente. (DENOIX P., 1952; FERNANDES, 1996; FERREIRA, 2003; HATAKA, 2003; PEREZ *et al.*; 2005.).

2.4 Diagnóstico Microscópico de Neoplasia

Os exames convencionais para o diagnosticado dos tumores é o histopatológico e o citopatológico (ARAUJO *et al.*, 1999; RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2001; HATAKA, 2003; ROCHA, 2008).

O diagnóstico dos tumores leva em consideração o padrão tecidual e suas características citológicas. Assim são classificados em ductal, papilar, tubular e sólido. O diagnóstico e a classificação dos diferentes tipos de tumores são importantes, pois confirma o TNM clínico e indica o seu comportamento biológico (RUSSO *et al.*, 1990(B); FERNANDES, 1996; RUSSO & RUSSO, 1996(B); RUSSO e RUSSO, 2000; BURINI, 2002; HATAKA, 2003; PEREZ *et al.*, 2005; LEVINE *et al.*, 2006; KARIM *et al.*, 2008).

2.5 Lesão no DNA

O DNA presente no núcleo de uma célula pode sofrer mutação ou recombinação sob ação de agentes químicos. As enzimas de reparo de DNA presentes nas células normais quando atuantes removem as lesões.

Existem várias formas de detectar essa lesão dentre elas, o Teste do Cometa. Que é um método rápido, simples e sensível. Além disso, há necessidade de pequena quantidade de células para ser realizado.

Por isso vem sendo utilizado para identificar quebras de DNA em células individuais de mamíferos (SINGH *et al.* 1988; KREJA *et al.*, 1996; MARTIN *et al.*, 1997; HEATON e RANSLEY, 2001; SPEIT e HARTMANN, 2006; GRASSI *et al.*, 2007).

Ele evidencia, sob condições alcalinas, fragmentos de DNA que migram do núcleo na eletroforese, resultando na formação de uma imagem que lembra um cometa, com cabeça e cauda, permitindo a detecção, em células isoladas, de quebras e sítios álcali – lábeis no DNA (POLI *et al.* 1999). Este

contendo mais quebras irá migrar a distância maior no campo eletroforético devido à massa de menores fragmentos. Quanto maior for a migração maior será a extensão da lesão genômica (HEATON e RANSLEY, 2001; COLLINS, 2004).

No tumor de mama em mulheres, o teste já foi utilizado para identificar a instabilidade genômica, seu comportamento biológico e conseqüentemente a indicação da conduta terapêutica. É também utilizado para detectar pacientes que estão em situação de risco de desenvolver neoplasia (Colleu-Durel *et al.* 2004; Kopjar *et al.* 2006; Shahidi *et al.* 2007; Wozniak *et al.* 2007).

Em nosso grupo de pesquisa esse teste foi utilizado para detectar lesão no DNA em células da bexiga de cães com cistite e para avaliar o grau de agressividade das células do Tumor Venéreo Transmissível (ALVES *et al.*, 2004; AMARAL, 2005).

2.6. Protocolo Terapêutico para Neoplasia

O protocolo convencional para o tratamento das neoplasias é a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, utilizadas individualmente ou associadas. Excetuando-se a cirurgia, o mecanismo de ação sobre as células é a sua destruição, não é seletivo, age tanto nas neoplásicas como nas normais, conseqüentemente há efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, a resposta esperada dos pacientes a esse protocolo corresponde a 60% de cura. Portanto, novas modalidades terapêuticas têm sido pesquisadas para o tratamento de tumores, inclusive de mama (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2001; NOVOSAD, 2003; CHANG *et al.*, 2005).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma recente modalidade utilizada para o tratamento de neoplasia. Consiste na indução da citotoxicidade, através da interação da luz de comprimento de onda adequado, de um fotossensibilizador (FS) e do oxigênio molecular presente nas células (DANIELL e HILL, 1991; LUI *et al.*, 1992; WILSON *et al.*, 1992; RUSLANDER *et al.*, 1997; FRITSCH *et al.*, 1998; KALKA *et al.*, 2000; MERKEL e BIEL, 2001; NOWIS *et al.*, 2005).

No entanto, para o sucesso da TFD é primordial conhecer a distribuição da luz dentro dos tecidos biológicos, pois essa modalidade terapêutica depende da penetração e da quantidade mínima de luz no tecido-alvo

(WILSON *et al.*, 1986). A propagação da luz nos tecidos é influenciada pelas suas propriedades ópticas (PRAHL *et al.*, 1993; HOURDAKIS *et al.*, 1995). Fibras ópticas podem ser utilizadas em contato com a superfície e também serem inseridas no meio a ser investigado, de forma que permitam medir a intensidade local da luz (ZHU *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 1986; TSAI *et al.*, 2001; LUALDI *et al.* 2001; STAR, 1988).

A TFD tem diversas vantagens, a principal é a destruição tecidual seletiva. Os efeitos colaterais são reduzidos, mantém a estética, não se observa resistência a droga. Pode ser usada sozinha ou em associação a outras terapias. Portanto a resposta dos pacientes submetidos a TFD é satisfatória (DANIELL e HILL, 1991; MERKEL e BIEL, 2001).

A técnica que utiliza a propriedade de seletividade da luz no tratamento do câncer emprega uma substância fotossensível (aquela que é alterada quando iluminada) que pode ser administrada por via endovenosa ou tópica, localizando-se preferencialmente, nas células tumorais malignas. O mecanismo envolvido na distribuição preferencial dos fotossensibilizadores no tecido maligno ainda não está completamente elucidado (LUCROY *et al.*, 2000; DOUGHERTY, 2002). Alguns fatores são descritos como responsáveis sendo eles: alteração da permeabilidade da membrana das células malignas; a presença de fibras de colágeno imaturas que integram o tumor, semelhantes às observadas em tecidos embrionários e em processo de cicatrização recente. Essas fibras imaturas apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas, constituindo um local para retenção e acúmulo do FS (NELSON *et al.*, 1997; LUI *et al.*, 1999; TOREZAN, 2000).

Outros fatores como a rede linfática, pouco desenvolvida, a ligação das porfirinas a lipoproteínas, a presença de macrófagos e o menor pH intracelular, também levam a uma maior concentração do FS em células neoplásicas malignas (SPIKES, 1991; NELSON, *et al.*, 1997; LUI *et al.*, 1999).

Os fotossensibilizadores (FSs) devem apresentar propriedades específicas como: não toxicidade sistêmica; seletividade para o tecido neoplásico maligno; eficácia em gerar espécies reativas de oxigênio quando excitado por uma luz de comprimento de onda adequado; e rápida eliminação pelo tecido normal.

Há vários fotossensibilizadores de primeira geração aprovados por órgãos governamentais e sendo utilizados em tratamentos clínicos tanto no homem como nos animais, sendo os mais utilizados os derivados de hematoporfirina (HpD). Essa droga é ativada pela luz no comprimento de onda de 630 nm. A maior preocupação em relação aos FSs sistêmicos de primeira geração, é a prolongada fotossensibilização cutânea e ocular que pode durar ao redor de 4 semanas (MACHADO, 2000; MERKEL e BIEL, 2001; LUCROY, 2002).

Vários outros FSs estão sendo testados em experimentos com animais. Dentre eles os FSs de segunda geração, o objetivo é obter compostos que sejam excitados com radiação em comprimentos de onda maiores (onde o tecido biológico absorve menos e, portanto a profundidade de penetração é maior), e que apresentem um período de eliminação mais curto (MENEZES, 2006; PAGEM *et al.*, 1999).

Qualquer fonte de luz que tenha características espectrais apropriadas pode ser utilizada em TFD, tais como lâmpadas de tungstênio ou halogênio, laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) e LED (Light Emitting Diode) (WILSON *et al.*, 1986). As fontes de radiação utilizadas, geralmente, são lasers, que apresentam como desvantagem o elevado custo. Desta forma fontes de luz não-laser para a TFD vêm se tornando viáveis, por serem de mais fácil acesso e de baixo custo (DOUGHERTY, 1993; MACHADO, 2000; BRANCALEON *et al.*, 2002; LUCROY, 2002).

A TFD é baseada na administração de uma substância fotossensível, uma das vias utilizadas é a endovenosa, ao qual percorre todo o corpo, sendo absorvido por todas as células. As células sadias eliminam essa droga em um período de tempo que varia entre 24h à 36h, diminuindo consideravelmente sua concentração. Já as células neoplásicas, por apresentarem um metabolismo e características morfológicas diferentes, retêm este FS por um tempo mais prolongado. Assim, esperando mais de 24h (normalmente de 24h à 48h) após a administração do FS, este estará mais concentrado nas células neoplásicas, estabelecendo uma diferenciação entre estas células e as demais (MARCASSA *et al.*, 2002).

Os FSs são moléculas heterocíclicas grandes, que absorvem luz. Quando estas moléculas são irradiadas com luz visível, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singleto. Este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou progredir na cadeia de reações químicas transformando-se na espécie reativa chamada tripleto, de menor energia (COLUSSI, *et al.*, 1996; COLUSSI, 1997; CARVALHO, 2001; ZECELL, 1987; ZECELL, 1991; BRAULT, 1990).

Como o tempo de vida do estado tripleto é relativamente longo (10^{-3} a 10 segundos) o fotossensibilizador excitado pode interagir diretamente com substratos biológicos formando radicais livres; esta reação é chamada de reação tipo I ou pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio celular, formando o oxigênio singleto, altamente reativo e responsável pela morte celular, chamada de reação tipo II (GIBSON *et al.* 1988; DANIELL e HILL, 1991; HENDERSON e DOUGHERTY, 1992; LUCROY *et al.*, 2000; MACHADO, 2000; LIM *et al.*, 2006).

A eficiência com a qual um fotossensibilizador transfere a energia absorvida da luz para o oxigênio no estado tripleto é definida como o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto e constitui outra propriedade fotofísica importante, **Figura 2** (MELO, 2003).

Tanto o dano celular direto como o vascular contribuem para a destruição do tumor, e recentemente o papel do processo inflamatório e do sistema imune envolvido nessa terapia é alvo de estudos recentes (HENDERSON e DOUGHERTY, 1992; DOUGHERTY, 2002).

Há vários relatos demonstrando a eficácia do uso clínico da TFD na regressão de tumores, tanto os induzidos quimicamente como os espontâneos. Acredita-se que essa eficácia está relacionada com os mecanismos que envolvem a formação de radicais livres com liberação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, levando a isquemia e por fim a necrose das células tumorais malignas (GIBSON *et al.*, 1988; LUCROY *et al.*, 2000).

Estes mecanismos são dependentes tanto do fotossensibilizador utilizado como do tipo de tumor tratado. No protocolo de tratamento oncológico

veterinário esta técnica já foi aplicada em cães e gatos com tumores primários e metastáticos, epiteliais, mesenquimais, e de células redondas.

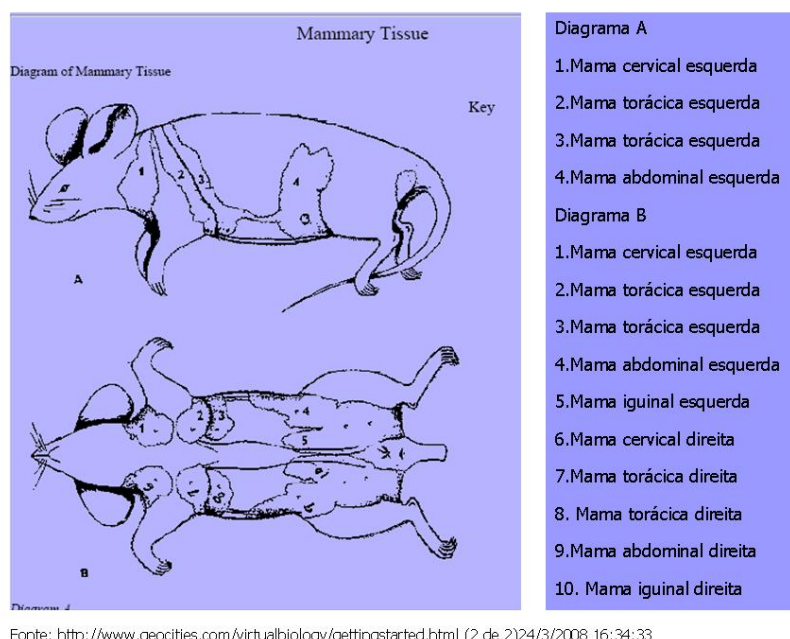


Figura 1. Localização topográfica: mama da rata.

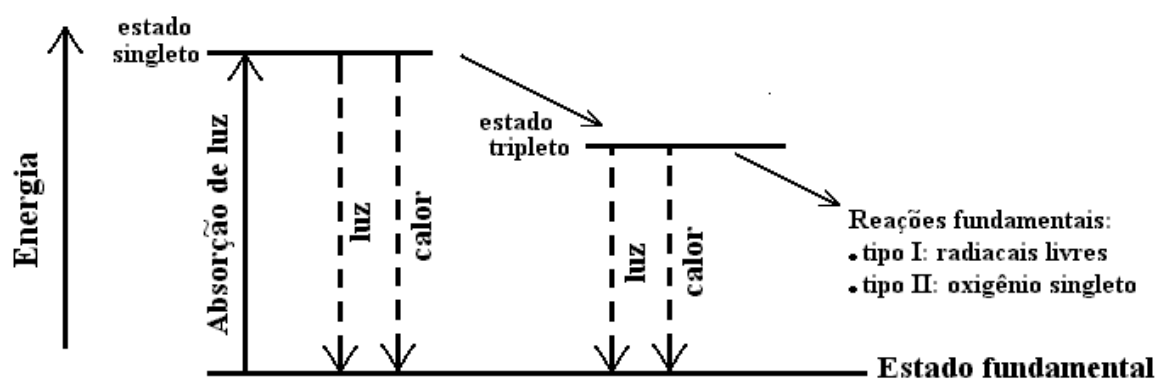


Figura 2. Diagrama de Jablonski modificado. Ativação do agente fotossensibilizador pela luz (Torezan 2000).

A resposta desses animais ao tratamento foi satisfatória em 86% dos casos (LUCROY *et al.*, 2000).

Como se pode observar o modelo experimental de carcinogênese química *in vivo* para tumor de mama já é bastante estudado; a TFD tem sido aplicada em diferentes neoplasias e tem obtido resultados satisfatórios, porém a eficácia dessa modalidade associada a lesão de DNA até o momento não foi investigada, em vista disso o objetivo do trabalho foi:

3. OBJETIVOS

Após indução de tumor de mama utilizando-se modelo experimental do DMBA por gavagem em ratas *Sprague-Dawley*: quantificar a lesão no DNA das neoplasias pelo teste do cometa; avaliar a resposta do tumor à terapia fotodinâmica como tratamento único e adjuvante a cirurgia; correlacionar a eficácia dessa modalidade terapêutica com a lesão no DNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

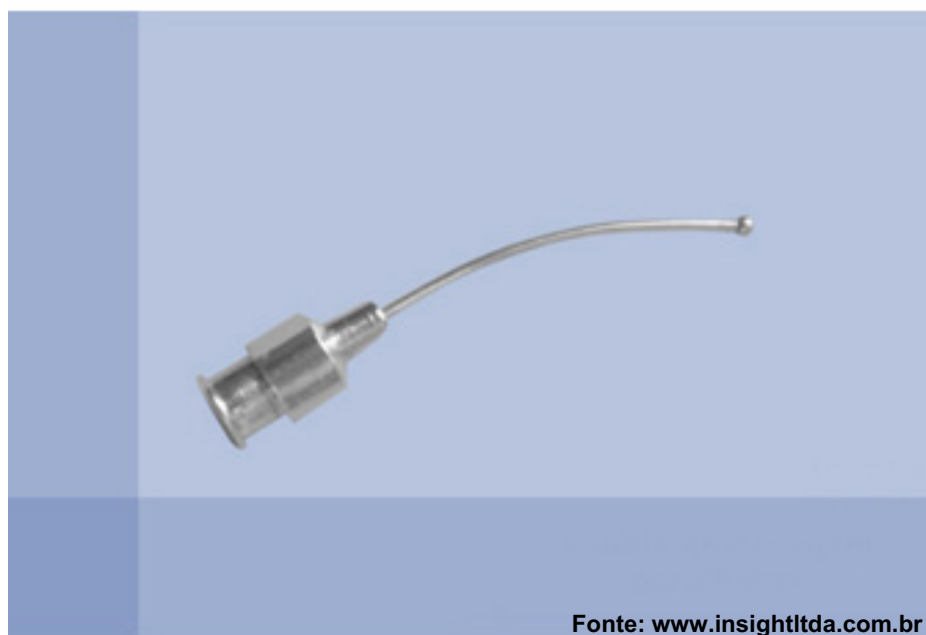
Este trabalho está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Unesp- Botucatu (Protocolo:85/2006-Anexo).

4.1. Animais

Foram utilizadas 20 ratas *Rattus Novergicus* da linhagem *Sprague-Dawley*, com média de 47 dias de idade, virgens, média de peso 182g. Adquiridas do biotério de criação CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP), permaneceram no Biotério experimental da Patologia FMB-UNESP que segue as normas de boas práticas de laboratório. Durante o experimento o período de luz (12h claro/12 horas escuro), temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) eram controlados. Além disso, os animais eram mantidos em ambiente com quatro períodos de exaustão do ar ambiente e o nível máximo de amônia ≤ 5 ppm., em gaiolas de polietileno, com tampas metálicas e forradas com maravalha de pinho branco trocadas três vezes por semana. A ração fornecida foi em forma de pellets (Guabi- S.P.), e água *ad libidum*.

4.2 Indução Química-Etapa de Iniciação

Os animais receberam dose única de DMBA, 50mg/Kg dissolvido em óleo de girassol, por gavagem, caracterizando esse período para a etapa da iniciação e promoção da carcinogênese química. **Figuras 3 e 4.**



Fonte: www.insightltda.com.br

Figura 3. Tratamento: agulha de gavagem para ratos.



Figura 4. Administração do carcinógeno em rata Sprague-Dawley por gavagem.

4.3 Estadiamento Clínico e Diagnóstico Microscópico.

Após a indução do tumor mamário os animais foram submetidos à inspeção de viabilidade diária e ao exame clínico semanalmente até o desenvolvimento do tumor. Posteriormente, aplicado o TNM para o tumor de mama de ratas adaptado de Denoix (1952). **Figura 5.**

Os tumores mamários obtidos nos animais do grupo 1 (controle) e do grupo 2 (submetidos à TFD) foram mensurados durante 8 semanas utilizando um paquímetro. Para análise dos dados utilizou-se o software Origin versão 7.5.

Após a aplicação do TNM seguiu-se o exame citológico, por capilaridade **Figura 6.** Para tal foi utilizado algodão embebido em álcool iodado para anti-sepsia local, agulhas 13x4,5, seringas descartáveis de 10 ml e lâminas histológicas. O material obtido pela capilaridade foi colocado em lâmina histológica com auxílio da seringa e distendido por uma lâmina extensora.

Foram feitas 4 lâminas distribuídas da seguinte forma: 2 secas ao ar ambiente e posteriormente fixadas pelo metanol e 2 colocadas imediatamente no álcool 95, para serem coradas pelo Giemsa e Papanicolaou, respectivamente. **Figuras 7 e 8.**

A leitura das lâminas foi realizada no microscópio óptico (Carl Zeiss-Alemanha) utilizando 4 aumentos, no menor aumento, 3,2x, para verificação da celularidade da amostra, padrão de coloração e distribuição das células seguindo-se para os aumentos subsequentes (10x, 25x e 40x) para o detalhamento das características celulares e verificação das características de malignidade. Após a varredura inicial, as áreas com melhor padrão de distribuição celular e coloração eram analisadas em aumento de 40x sendo analisado em cada lâmina dez campos aleatórios nos quais foram avaliados:

1. O arranjo das células: alta celularidade, disposição das células na lâmina, assim como sua coesão.
2. O núcleo: anisocariose, padrão da cromatina, tamanho do núcleo, espessura da membrana nuclear, tamanho do nucléolo, ranhura, amoldamento e figuras de mitose.

3. O citoplasma: canibalismo

4. O fundo da lâmina: presença de secreção, necrose e inflamação.

O tumor foi considerado maligno quando era observado mais de 3 critérios de malignidade na lâmina. O critério citológico utilizado foi o de Karim *et al* (2008) adaptado.

A coleta de material para o exame histopatológico foi realizada em dois momentos, nos grupos G3 e G4 logo após a retirada do tumor na cirurgia e nos grupos G1 e G2 na eutanásia dos animais na décima segunda semana após a indução química, para tal o material foi fixado com formalina tamponada a 10% e posteriormente embebidos em blocos de parafina, os cortes foram confeccionados em micrótomo rotativo com espessura de três μm , e colocados em estufa para desparafinizar e posteriormente corados pela coloração de Hematoxilina e eosina (HE).

A leitura histológica das lâminas foi realizada em microscópio óptico com a mesma especificação do que foi realizada a leitura do exame citológico (Carl Zeiss-Alemanha), e o critério do diagnóstico para animais de experimentação seguiu o preconizado por Russo *et al.* (2000).

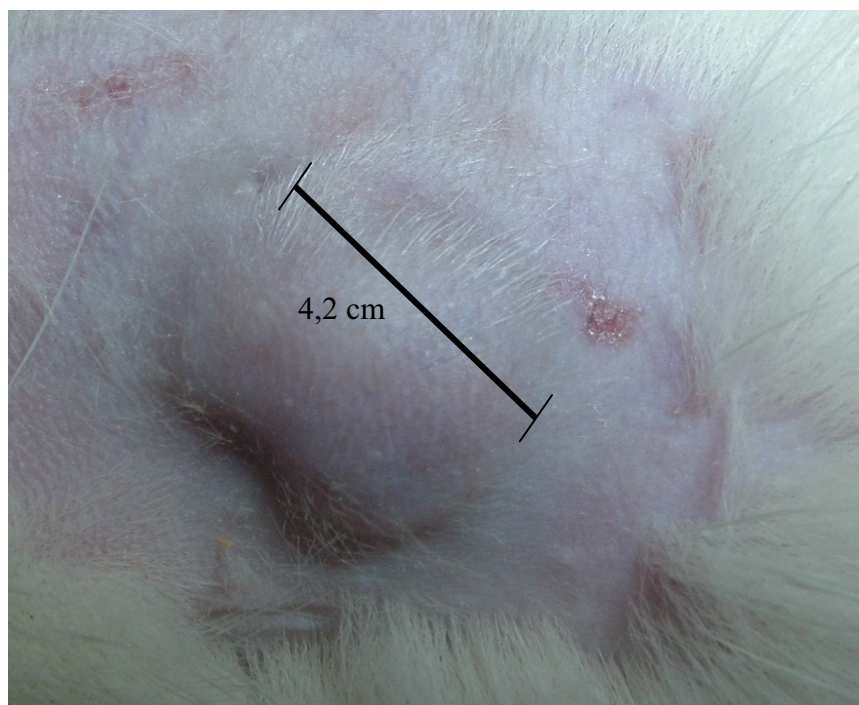


Figura 5.TNM: Animal do grupo 1. Observar a aplicação do estadiamento clínico. T= 4,2cm.



Figura.6. *Sprague-Dawley*. Coleta do exame citológico por capilaridade de tumor de mama induzido pelo DMBA.

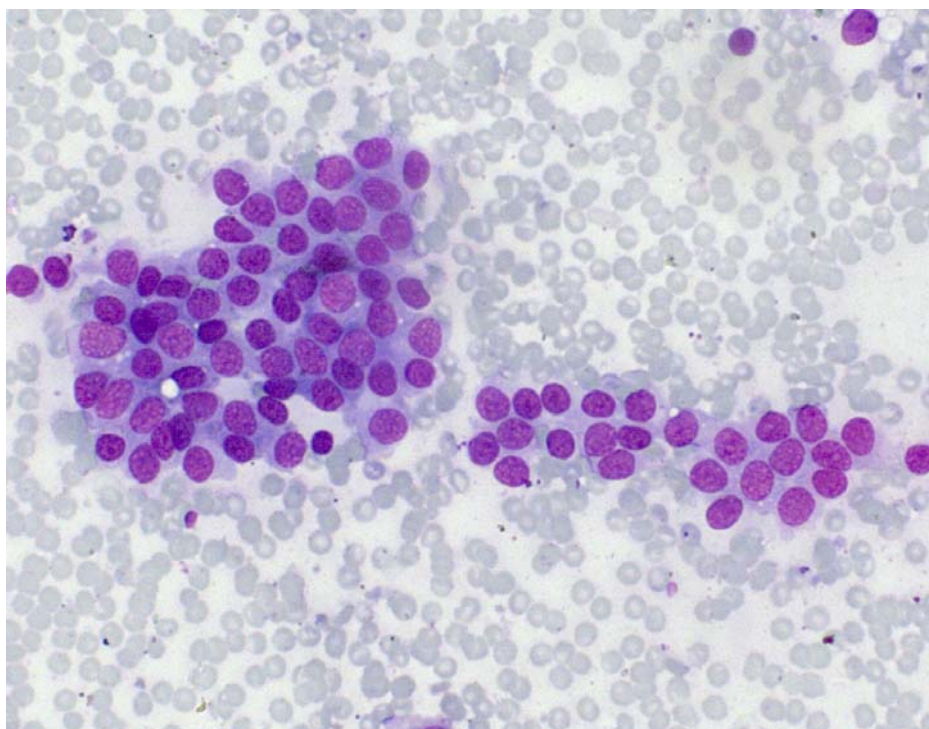


Figura 7. Exame citológico por capilaridade, Giemsa, 40x

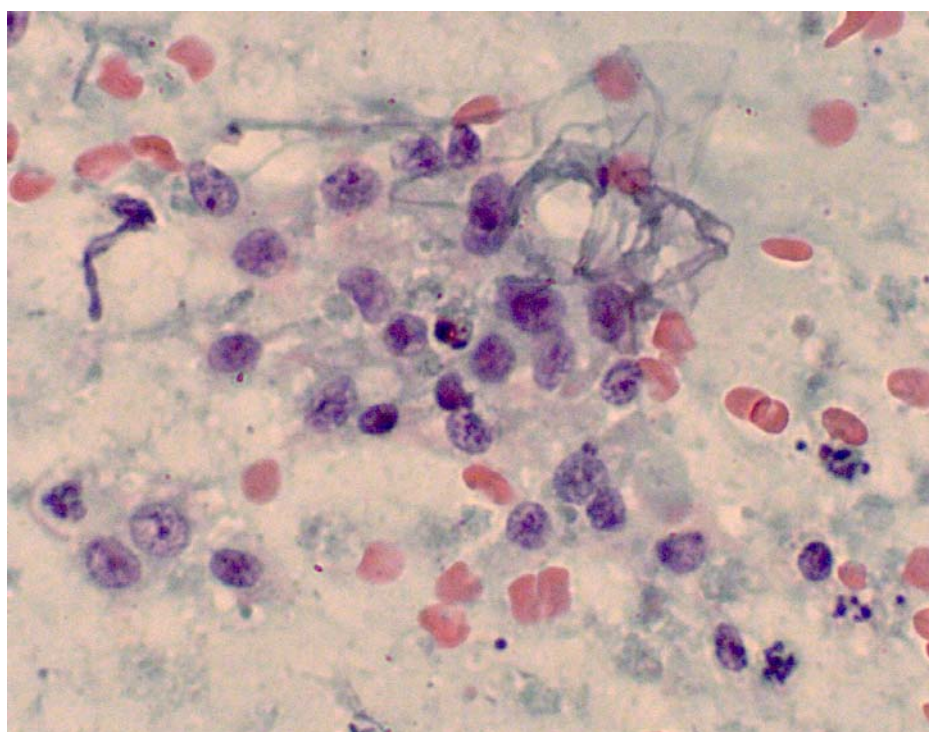


Figura 8. Exame citológico por capilaridade, Papanicolaou, 40x

4.4 Teste do Cometa

Após o diagnóstico citológico de neoplasia, amostra do tumor foi colhida para o Teste do Cometa de acordo com a técnica descrita por Singh *et al.* (1988). A viabilidade das células foi realizada pelo método de exclusão com Azul Tripán 0,2% (Merck Kgak, Darmstadt, Alemanha), sendo utilizadas apenas amostras com viabilidade superior a 65%. Este teste foi realizado ao abrigo da luz sob condições alcalinas.

Coletada as células tumorais e sua suspensão em PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} gelado e ao abrigo da luz, a amostra foi centrifugada na centrífuga de ependorf centrífuga 5415 R, por 2 minutos na velocidade de 800rpm, a maior parte do sobrenadante foi retirado, a amostra foi homogeneizada e 5 μl da suspensão foram misturados a 100 μl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) (*Low melting point*, LPM, Sigma, St Louis, MO, EUA) a 37°C, misturados delicadamente, estendidos sobre uma lâmina histológica pré-revestida com agarose 1,5% de ponto de fusão normal (PFN - Sigma), cobrindo-a com uma lamínula 24x60mm (Perfecta Ind. e Com. De lâminas de vidro, SP, Brasil), mantido a 4°C por cinco minutos para solidificar.

Após este período, a lamínula era retirada gentilmente e as células eram lisadas por imersão em solução de lise gelada (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris 1% N-Lauroyl sarcosine, pH10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO), recém preparada, permanecendo nessa solução por um período de no mínimo 24h e no máximo duas semanas a 4°C. Para cada amostra, foram feitas lâminas em duplicata.

Passado o período mínimo na solução de lise, as lâminas foram lavadas por 5 minutos com PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} passando por descanso em tampão alcalino (1mM EDTA e 300mM NaOH, pH >13) por 20 minutos para a ampliação e expressão dos sítios álcalis lábeis. Logo após, submeteu-se as lâminas à eletroforese sobre gelo por 20 minutos de corrida a 25V em 300mA.

Para avaliação da corrida eletroforética foram realizados controles positivos para cada cuba com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sigma, St Louis,

MO, EUA) 100 μ M a 4°C, para indução de dano no DNA e permitir a avaliação de cada corrida eletroforética.

O material controle era sangue de rato sadio, colhido com anticoagulante, acondicionado em gelo e ao abrigo da luz e processada da mesma maneira descrita para as células neoplásicas. Após a eletroforese, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol 100%. As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até a leitura em objetiva de 400X em microscópio de fluorescência (Axioplan II-Zeiss, Wolfville, N.S., Canadá) com 50 μ L de corante brometo de etídio (Sigma, St Louis, MO, EUA) diluído (20 μ g/mL), coberta com lamínula 24x60mm e a leitura foi realizada em analisador de imagens (Comet Assay II - Perceptive Instruments, Haverhill, Inglaterra) no Laboratório de Toxicogenômica e Epidemiologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Unesp Botucatu.

Para cada grupo as amostras foram avaliadas em duplicata e contadas 50 células, utilizando os parâmetros de *tail intensity* (intensidade do DNA contido na cauda do cometa).

4.5 Protocolo Terapêutico.

Os 20 animais induzidos com DMBA e que apresentaram tumor de mama, foram divididos ao acaso em 4 grupos cada um com 5 animais, sendo:

- ✓ Grupo 1 - controle: sem tratamento;
- ✓ Grupo 2: submetido a terapia fotodinâmica.
- ✓ Grupo 3: submetido a cirurgia e posteriormente a terapia fotodinâmica.

Os animais foram submetidos a mastectomia total unilateral. Uma semana após o procedimento cirúrgico foi realizada a TFD no local da cirurgia utilizando o mesmo protocolo do grupo 2.

Grupo 4: submetido a cirurgia.

A cirurgia foi realizada seguindo o mesmo protocolo do grupo 3.

O delineamento experimental está resumido na **Figura 9**.

4.5.1 Terapia Fotodinâmica

4.5.1.1 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado foi o **Photogem[®]**, um derivado de hematoporfirina (HpD) proveniente da Rússia – Moscou, aprovado pelo “Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation” sob autorização 42-3199-98 **Figura 10**. O Photogem é aprovado para uso em humanos pelo comitê estatal de Farmacologia da Federação Russa e recentemente aprovado pela ANVISA (data 08/ 04/ 2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). O FS foi previamente pesado e separado em alíquotas de 5 mg, no Instituto de Química de São Carlos – USP (IQSC), envolvidas em alumínio para proteção da luz e mantidas à temperatura de -4⁰C. O medicamento separado em alíquotas, antes de utilizado, foi diluído em 1 ml de solução estéril de cloreto de sódio (0.9%).

Os animais foram fotossensibilizados com Photogem[®] por injeção endovenosa através da veia caudal esquerda, na concentração de 4 mg/kg. Após 24 h da aplicação do fotossensibilizador a lesão foi iluminada com o dispositivo à base LEDs, com dose de luz 300 J/cm², durante 30 minutos;

4.5.1.2 Fonte de Luz

A região do espectro eletromagnético de emissão da fonte de luz para TFD foi escolhida levando em consideração as bandas de absorção dos FS's e a profundidade de penetração da luz nos tecidos biológicos.

Para a aplicação da TFD foi utilizado um dispositivo à base de LEDs vermelhos (diodos emissores de luz) desenvolvido no Instituto de Física da de São Carlos (IFSC) - USP com banda de emissão em 635 nm, potência de 1 W e 185 mW/cm² de intensidade.

Após 12 semanas de observação todos os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano e posteriormente submetidos á eutanásia por exsanguineação.

4.6 Consistência da Resposta a TFD

Para o estudo da distribuição da luz *in vivo*, foram utilizadas 2 ratas *Sprague-Dawley*, sem tumor mamário. Como fonte de luz foi usado o

dispositivo à base de LEDs vermelhos, descrito na seção 4.5.1.2 e os parâmetros de iluminação foram os mesmos utilizados para o tratamento das lesões na mesma seção.

A intensidade da luz tanto na superfície quanto no interior do tecido foram coletadas com o auxílio de uma fibra óptica isotrópica (modelo IP, Medlight S.A., Suíça). Esta fibra possui uma extremidade esférica de 0.85 mm de diâmetro capaz de coletar a intensidade da luz espalhada em tecidos biológicos de forma pontual. A fibra foi acoplada a um espectrofotômetro e a aquisição dos dados foi feita através de um computador. Para o tratamento dos dados e confecção do gráfico foi utilizado o programa científico OriginPro versão 7.5.

As regiões de investigação foram à superfície da pele, tecido subcutâneo e tecido adiposo adjacente à mama. De modo que em um dos animais (animal número 1) a mama investigada localizava-se na região torácica e no outro animal (animal número 2) na região inguinal. Deste modo avaliou-se a distribuição e penetração da luz no tecido alvo.

4.7 Estatística

O teste estatístico utilizado foi o não paramétrico de Kruskal-Wallis.

4.8 Registro dos Dados pela Informática

A forma de escrita do texto da presente dissertação foi pelo Sistema Operacional Microsoft Windows XP Professional. As imagens macroscópicas foram registradas em Câmera Digital Fujifilme A 210, 3.2 Megapixel, Zoom total 6,2x com alcance focal de 5,5 mm a 16,5 mm. As microscópicas foram digitalizadas com auxílio do programa de análise de imagens QWin v3,0 Leica e uma câmera digital Leica DFC acoplada a um microscópio Leica DMLD.

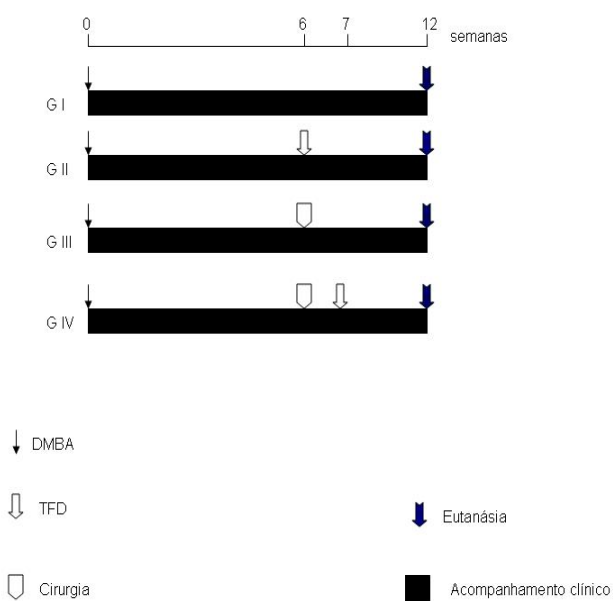


Figura 9. Delineamento Experimental

Figura 10. **Photogem[®]**, derivado de hematoporfina, fotossensibilizador de origem russa.

5. RESULTADOS

Dos 20 animais utilizados no experimento após 6 semanas da administração do DMBA, 20 (100%) desenvolveram tumor de mama. A indução foi bem tolerada pelos animais visto que não houve óbito ou interferência no consumo de água e ração, conseqüentemente o ganho de peso foi proporcional ao desenvolvimento do animal durante a fase experimental (180g-340g).

5.1. Sistema TNM Clínico e Diagnóstico Microscópico

O sistema TNM foi aplicado com sucesso nos tumores nas mamas das ratas. O T variou de 0,5 a 5 cm. Os maiores valores foram encontrados nos animais do grupo controle quando se compara com os animais dos demais grupos. Os menores valores foram encontrados no grupo TFD quando se compara com os animais dos demais grupos. Apesar da localização desse tumores ter sido variada houve um predomínio para região cervicotorácica correspondendo a 65,4% dos 20 animais independente do tempo do aparecimento clínico da lesão **Tabela 1**.

Tabela 1. Estadiamento clínico aplicado nas neoplasias mamárias de 20 ratas Sprague-Dawley induzidas com DMBA e submetidas a terapia cirúrgica e TFD bem como a localização anatômica da neoplasia.

<i>Grupo</i>	<i>TMN</i>	<i>Localização</i>
Controle		
	1 0,9 cm	abdomnal
	2 0,7 cm	torácica
	3 0,9 cm	torácica
	4 1,3 cm	cervical
	5 0,8cm	cervical
mastectomia		
	1 1 cm	cervical
	2 3,1 cm	torácica
	3 2,5 cm	torácica
	4 1,8 cm	abdominal
	5 2,4cm	torácica
TFD		
	1 1,2 cm	inguinal
	2 0,4 cm	cervical
	3 1,9 cm	inguinal
	4 1,3 cm	cervical
	5 0,7 cm	cervical
Mastectomia e TFD		
	1 2 cm	torácica
	2 3,2cm	torácica
	3 1,6 cm	inguinal
	4 2 cm	torácica
	5 3,5cm	cervical

Todas as neoplasias malignas desenvolvidas nos grupo tratados com DMBA foram diagnosticadas através do exame citológico por capilaridade. Na leitura dessas lâminas foi possível identificar os critérios de malignidade descritos por Karim *et al.* (2008). **Figura 11.** Nos exames histopatológicos realizados nos animais que desenvolveram tumor foi possível diagnosticar e classificar as neoplasias conforme preconizado por Russo *et al.* (2000) **Figura 12.**

O carcinoma ductal sólido e cribiforme foi a neoplasia predominante seguido pelo carcinoma ductal papilífero, carcinoma papilífero, carcinoma tubular e comedo independente do grupo **Figuras 13 e 14**.

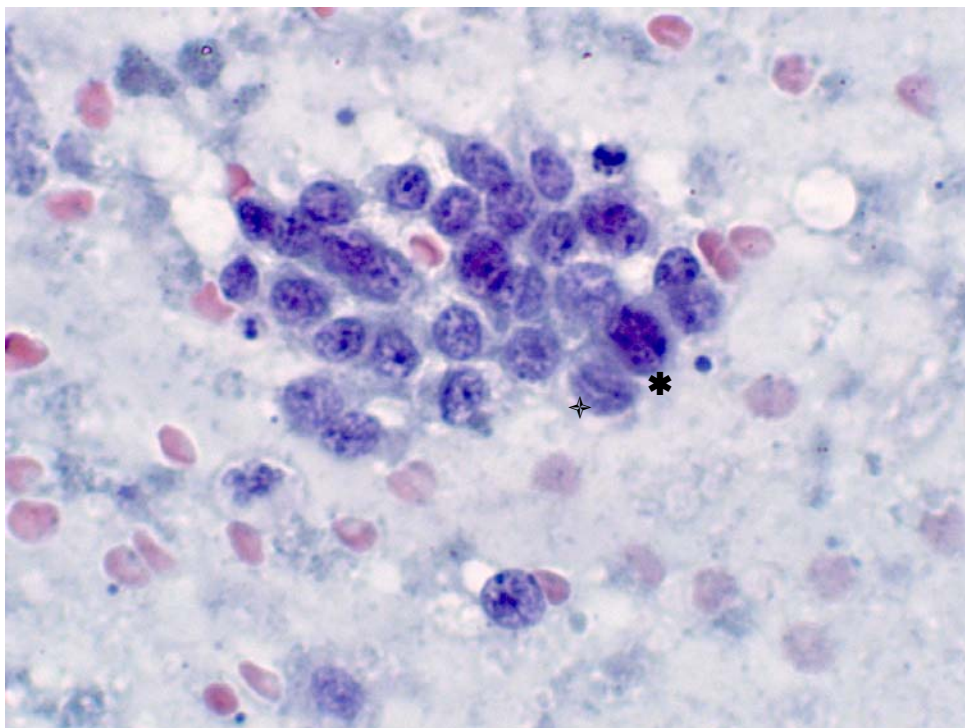


Figura 11. Amostra citológica. Observar os critérios de malignidade: Anisocitose, anisocariose, cromatina frouxa, amoldamento *, ranhura nuclear †, Papanicolaou, 40x

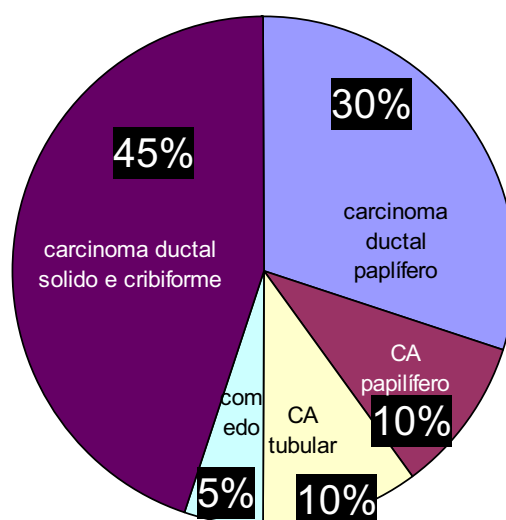


Figura 12. Frequência de diagnóstico histopatológico das 20 neoplasias mamárias estudadas.

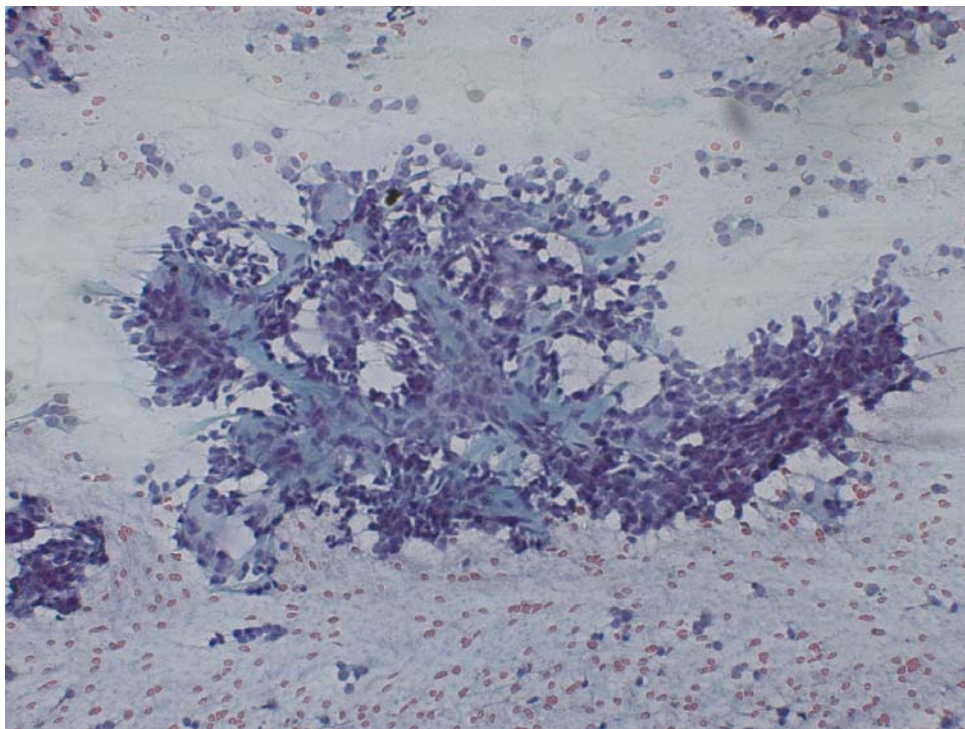


Figura 13. Amostra citológica: Carcinoma ductal, Papanicolaou, 20x

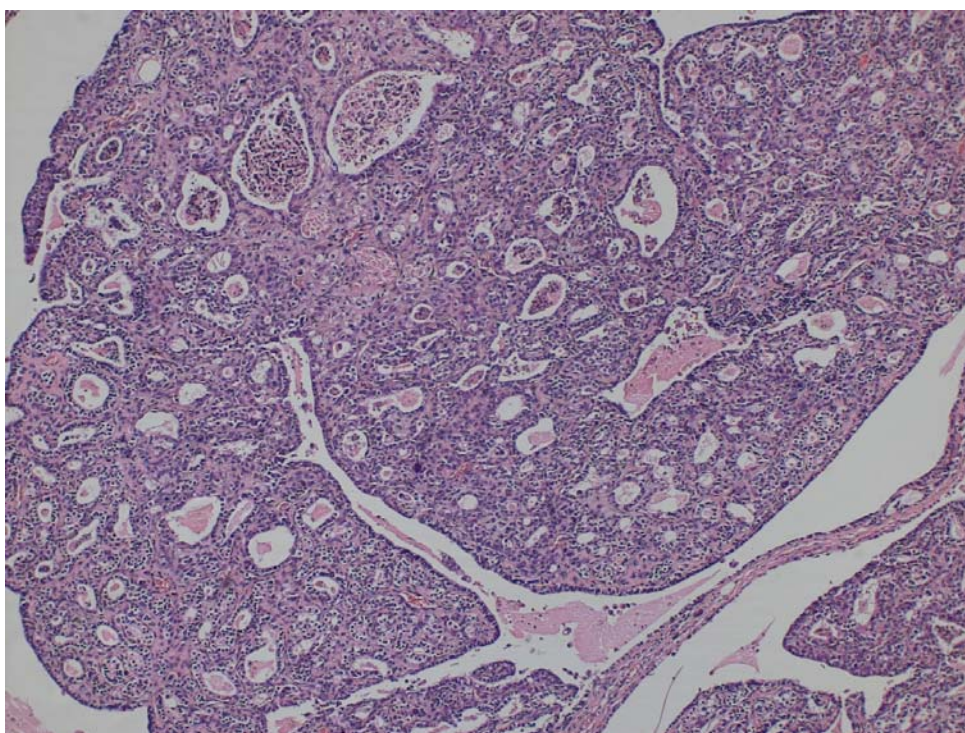


Figura 14. Carcinoma ductal HE 10x

5.2 Teste do Cometa

Os animais do grupo 1 apresentaram lesão no DNA pelo teste do cometa de mediana 1,9 de *Tail Intensity*. O grupo 2, demonstrou mediana 5,4 de *Tail Intensity*.

O grupo 3 apresentou lesão no DNA pelo teste do cometa de mediana 4,6 de *Tail Intensity*. Os animais do grupo 4 demonstrou mediana 1,7 de *Tail Intensity* **Figuras 15 e 16**.

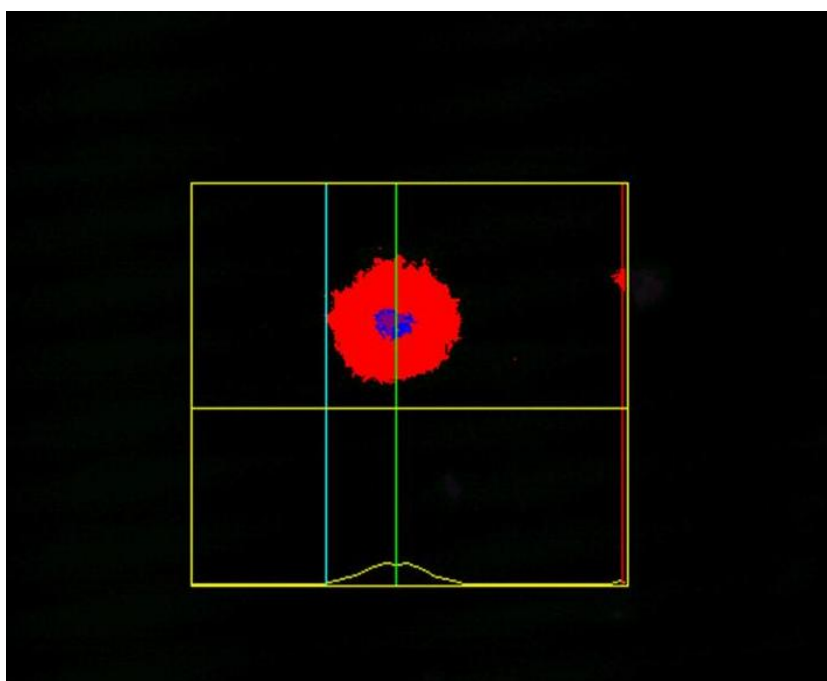


Figura 15. Teste do Cometa: *Sprague-Dawley* induzida pelo DMBA. Observar a pequena extensão da cauda da célula neoplasica, indicando pequena lesão.

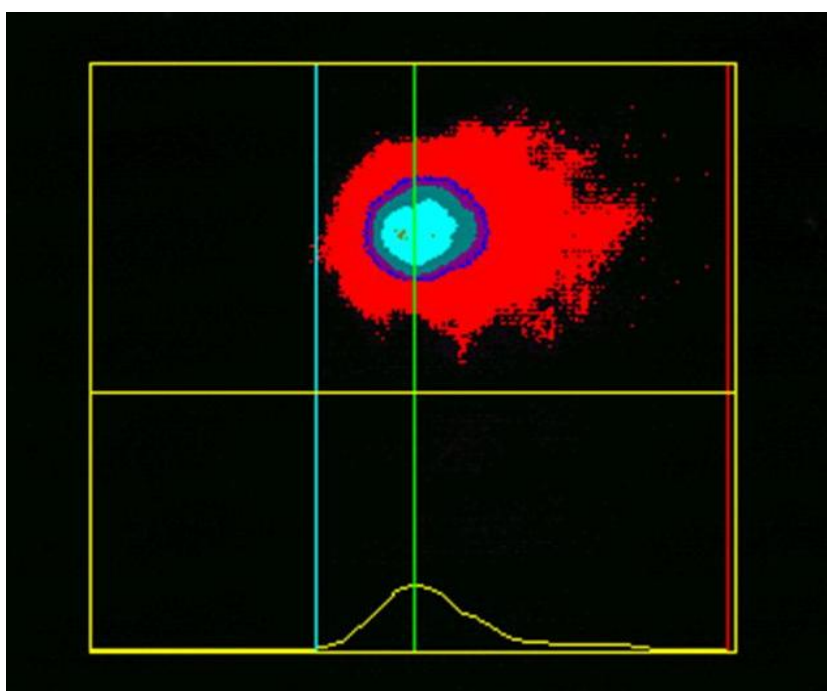


Figura 16. Teste do Cometa: *Sprague-Dawley* induzida pelo DMBA. Observar a grande extensão da cauda da célula neoplasica, indicando grande lesão.

5.3 Resposta ao Protocolo Terapêutico.

Foram realizadas 8 medidas dos tumores mamários obtidos nos animais do grupo 1 (controle) e do grupo 2 (submetidos à TFD) no decorrer de 6 semanas, utilizando-se um paquímetro. Para análise dos dados utilizou-se o software Origin versão 7.5.

Os animais do grupo 2 apresentaram média de estadiamento clínico de 1,1 cm. O grupo controle, demonstrou estadiamento clínico de 0,9 cm no início do experimento.

Os animais do grupo tratado com TFD foram submetidos a uma única sessão da TFD. Após a oitava medida, tiveram o estadiamento clínico menor (2,2 cm) quando comparado ao grupo controle (3,5 cm) **Figuras 17 e 18**.

A **Figura 19** mostra a média dos tamanhos dos tumores do grupo 1 e do grupo 2. Os animais do grupo 1 apresentaram um crescimento médio do diâmetro tumoral de aproximadamente 0,4 cm/semana. Já no grupo 2 observou-se um crescimento inferior a 0,15 cm/semana, o que sugere um significativo retardo no crescimento tumoral.

Os animais do grupo 3 não apresentaram recidiva ao final de 12 semanas após indução química quando se comparou com os animais do grupo 4 que apresentou 60% de taxa de recidiva após 12 semanas da indução química. Essa recidiva foi observada pelo estadiamento clínico e confirmada pelo exame microscópico a partir da 11ª semana após a indução química, sendo mais agressiva que o tumor primário. **Figuras 20, 21 e 22**.

Por vezes não foi possível verificar a arquitetura tecidual dos tumores sobre efeito da TFD na histopatologia devido a extensas áreas de necrose de coagulação, figura de apoptose, coagulação vascular disseminada e infiltração das células neoplásicas para o tecido adiposo **Figuras 23 e 24**.

5.4 Consistência da Resposta a TFD

Quanto a intensidade da luz entregue no tecido, no caso do animal 1 observa-se uma redução de 60% desta no tecido adiposo adjacente a mama quando comparado a superfície e de 40% quando comparado ao tecido subcutâneo, nesse caso a mama escolhida para realização da medida foi a mama torácica, próximo a região axilar. No outro animal observa-se uma

redução de 40% na intensidade da luz no tecido adiposo adjacente a mama quando comparado à superfície e de 25% quando comparado ao tecido subcutâneo, a medida foi realizada na mama inguinal direita **Figura 25 e 26**.



Figura 17. Tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do grupo 1.

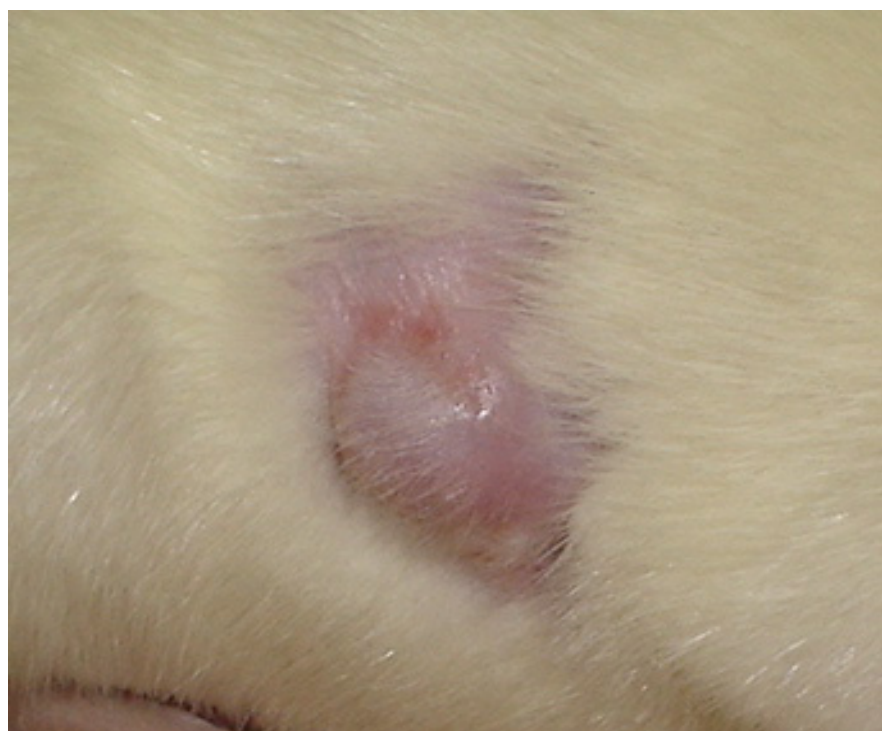


Figura 18. Tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do grupo 2.

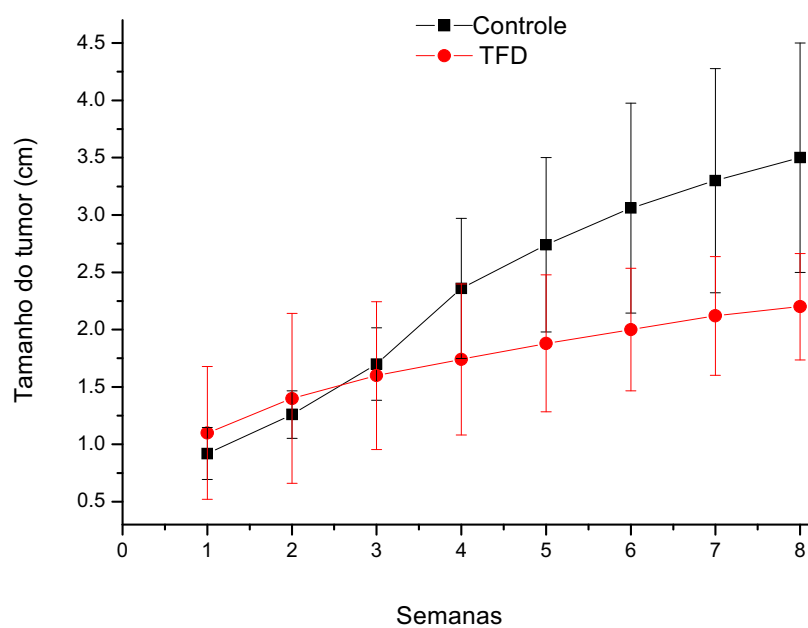


Figura 19. Desenvolvimento dos tumores mamários em ratas Sprague-Dawley dos grupos 1 e 2.

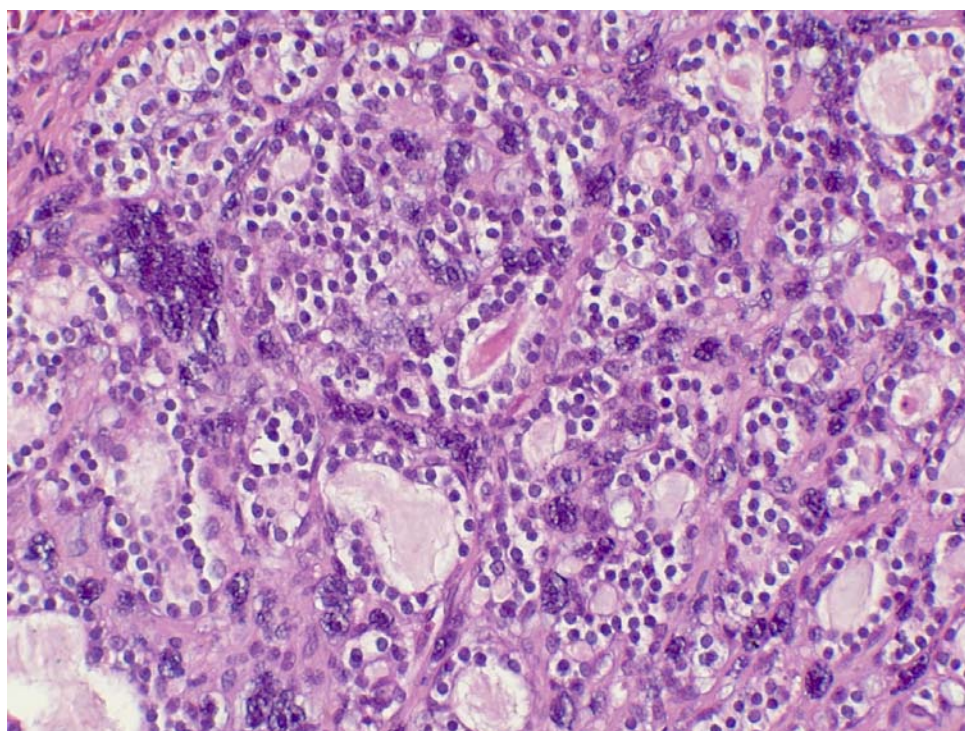


Figura 20. Recidiva de tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do grupo 3. H.E., 40x.



Figura 21. Recidiva de tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do grupo 3 após mastectomia radical unilateral.

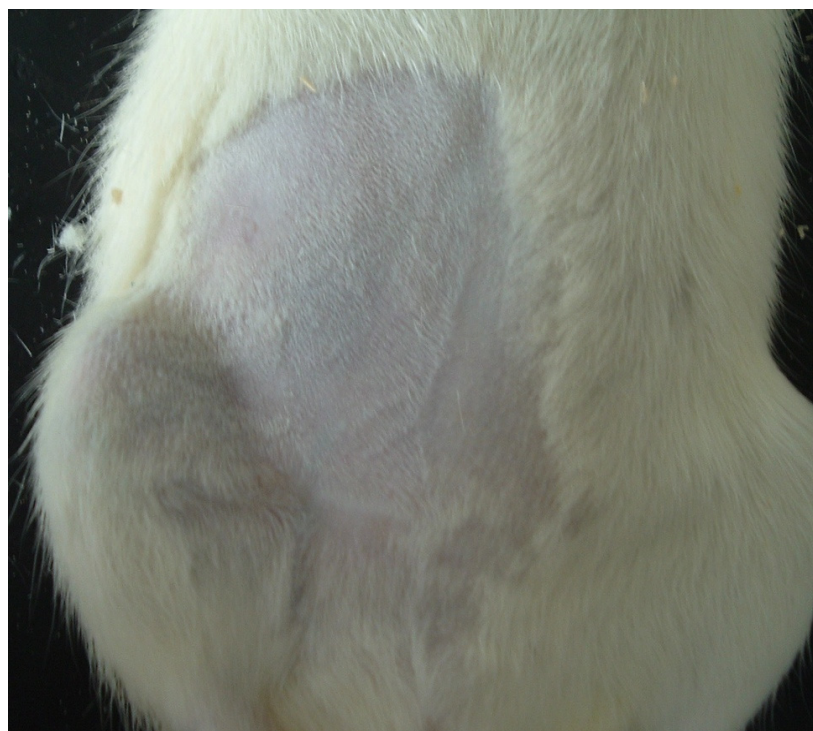


Figura 22. Ausência de recidiva de tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do grupo 4.

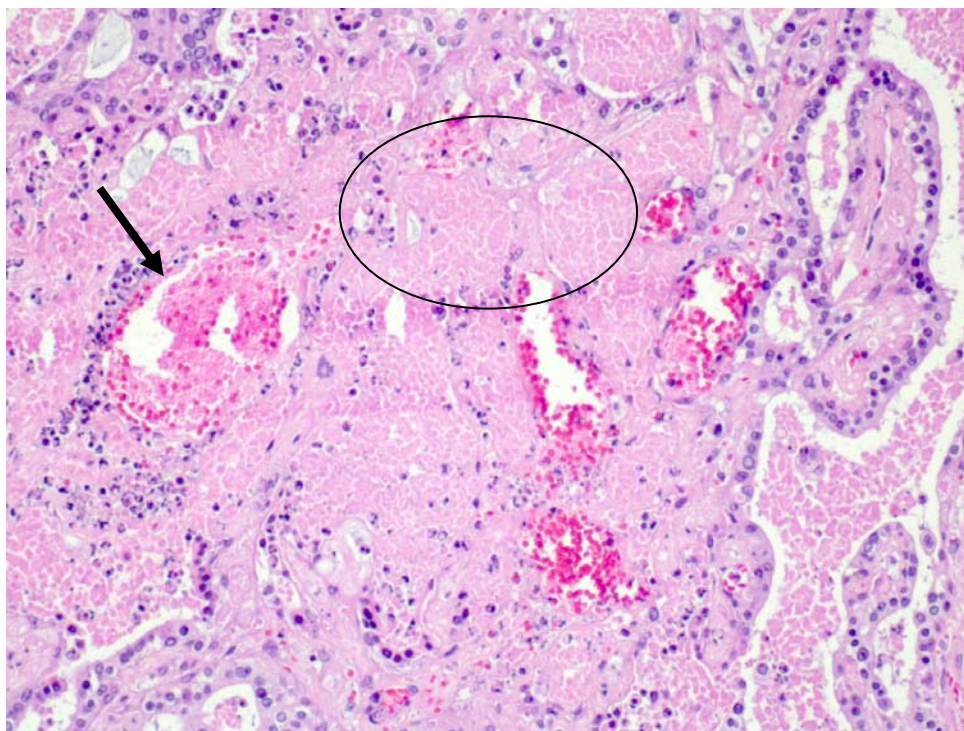


Figura 23. Tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do G2. Notar coagulação intravascular disseminada (seta) necrose de coagulação (área circundada). HE 20x.

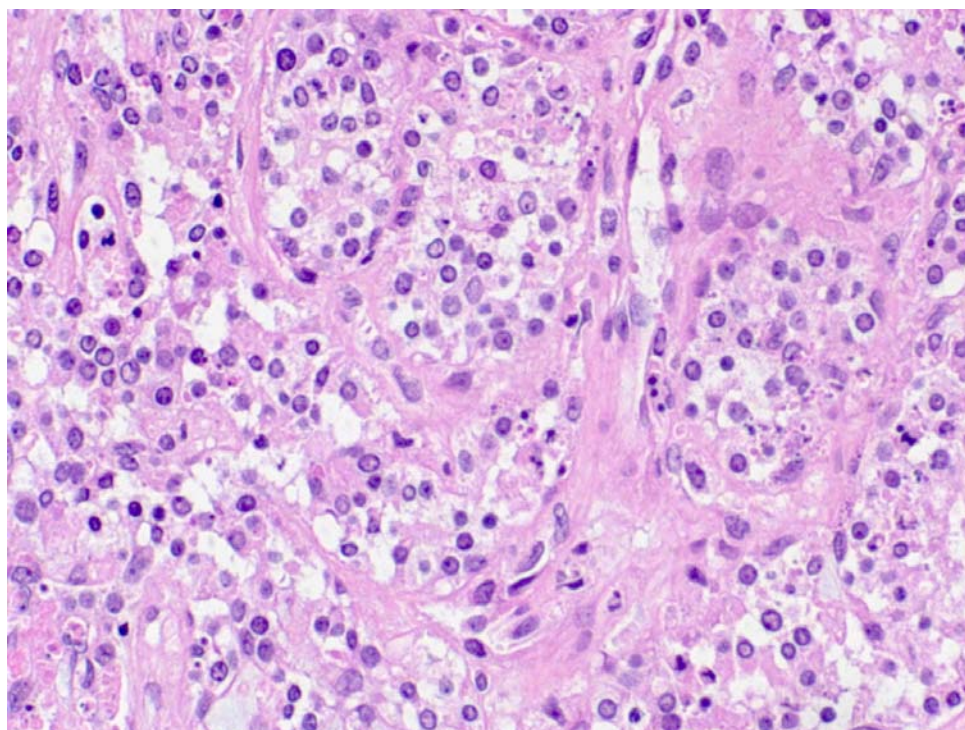


Figura 24. Tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* induzido pelo DMBA 50mg/kg e pós-tratamento com TFD. Notar as várias fases da morte celular H.E., 40x.

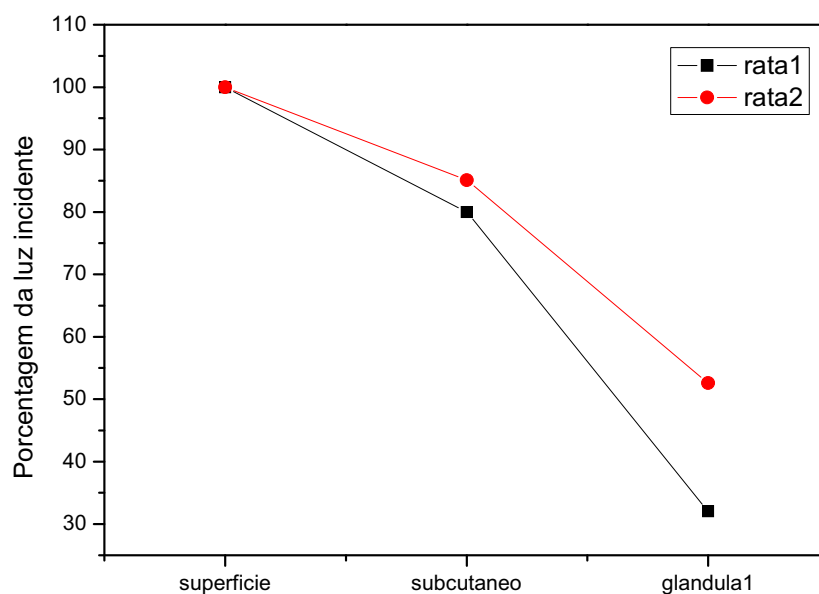


Figura 25. Intensidade de luz entregue a diferentes áreas.

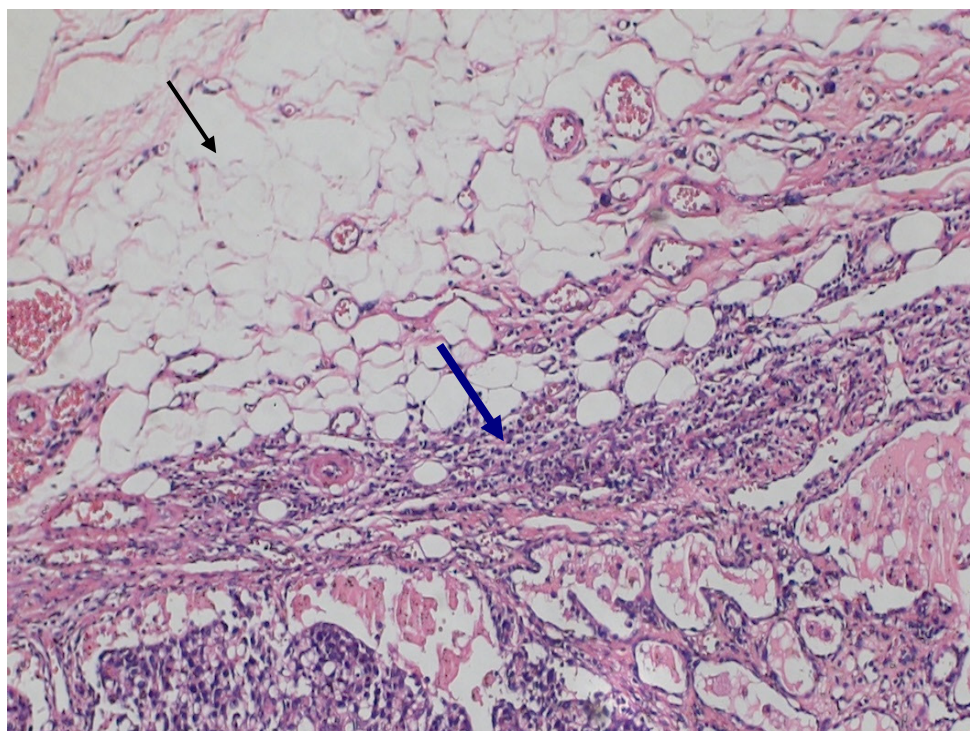


Figura 26. Tumor de mama em rata *Sprague-Dawley* do grupo 2. Notar células viáveis do tumor (seta azul) adjacente ao tecido adiposo (seta preta). H.E., 10x.

5.5 Estatística

Não houve diferença entre os grupos. **Tabela 2.**

Tabela 2- Mediana, referentes à variável tail intensity

Grupo	Mediana
1	1,9
2	5,4
3	4,6
4	1,7

H=2,84 P=0,42

Tabela 3 - Média e desvio-padrão referentes às variáveis segundo classificação

MED TAIL INTENSITY		
Classificação	Média	**dp
*CA ductal solido e		
cribiforme	4,5	2,9
CA ductal papilífero	3,3	2,4
CA papilífero	1,4	0,7
CA tubular	9,6	11,6
Comedo	15,8	0

*CA: carcinoma

**dp: desvio padrão

Por ter número pequeno de repetições nas classes, não se detecta diferenças estatísticas significativas. **Tabela 3.**

6. DISCUSSÃO

6.1. Linhagem de Rato Utilizada

A utilização do rato (*Rattus norvegicus*) em modelos de carcinogênese para compreender o comportamento biológico dos tumores em diferentes órgãos, inclusive o de mama vem sendo estudado devido a sua rápida reprodução e fácil manipulação em biotério. Além disso, há semelhanças anatômicas e fisiológicas com a mulher (RUSSO *et al.* 1990(A); HEFFELFINGER, 2000). De fato, os animais utilizados nesse trabalho permaneceram em biotério experimental por 12 semanas e não houve nenhuma intercorrência nesse período, pois os mesmos tiveram seu desenvolvimento biológico normal, todos os animais permaneceram saudáveis clinicamente, não havendo óbitos durante o período experimental.

No que diz respeito as semelhanças com relação a anatomia e fisiologia do modelo utilizado nesse estudo, não se tem na literatura especializada no assunto dados relacionados diretamente na cadela. Porém, os trabalhos científicos são unâimes em afirmar que a cadela é um modelo de estudo de câncer de mama para a mulher devido a sua fisiologia; optou-se por usar o modelo de carcinogênese experimental na rata *Sprague-Dawley* com o objetivo de comparar com a cadela e assim contribuir com a literatura tão escassa no assunto.

6.2 Carcinogênese Química de Média Duração

Existem várias linhagens de *Rattus norvegicus*, porém as mais utilizadas são o *Fisher-344*, *Wistar* e *Sprague-Dawley*. Considerando a característica genética desses animais pode-se separa-los em não isogênicos e isogênicos. O primeiro é o ideal quando se quer comparar seus resultados com os de outras espécies. Porém a grande dificuldade em se utilizar esse sistema é a padronização da dose do carcinógeno ideal para o desenvolvimento da neoplasia (RUSSO *et al.*, 1990(B); RUSSO e RUSSO 1996 (B); GEAR *et al.*, 2007). Realmente, a dificuldade encontrada nessa pesquisa foi estabelecer a dose ideal para iniciar e promover o tumor de mama nas ratas *Sprague-Dawley* não isogênica visto que o carcinógeno utilizado para o desenvolvimento da neoplasia, que foi o DMBA, é um carcinógeno químico completo, o que

dificultou ainda mais a padronização da dose, portanto, nas condições desse trabalho a dose única de 50mg/kg, por gavagem, foi a ideal para que se tivesse estabelecido todas as etapas da carcinogênese: iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica da doença durante o período experimental.

6.3 Efeitos do DMBA na Sexta Semana.

O DMBA é um agente genotóxico estimulador enzimático do fígado, atuando como iniciador e promotor de neoplasias, dentre elas, a mama (WHO, 1998; THOMPSON *et al.*, 2000; BARROS, 2004; COCCA *et al.*, 2005). Esse carcinógeno não influenciou o consumo de água e ração, consequentemente não interferiu no ganho de peso dos animais. Porém induziu neoplasia mamária em todos os animais a partir da sexta semana de estudo. Essas neoplasias foram confirmadas primeiramente pelo exame citológico por capilaridade. Essa técnica é bastante difundida para o diagnóstico do tumor de mama na mulher e na cadela. Porém, até o delineamento desse trabalho não havia na literatura trabalho semelhante aplicado na mama de rato. O que aconteceu posteriormente através do trabalho de Tanto os resultados encontrados por essa técnica na mulher, na cadela e na rata Sprague-Dawley foram semelhantes aos encontrados por esse estudo (McKeE *et al.*, 2001; HATAKA, 2003; Karim *et al.* 2008). De fato, a capilaridade é confiável para a averiguação da neoplasia mamária em modelos experimentais.

6.4 Lesão no DNA

O DNA é uma molécula que está exposta a diversos agentes, sejam naturais ou artificiais que podem lhe provocar danos. Esse dano pode induzir mutações. Na década de 80 foi padronizado um teste microeletroforético para avaliar a integridade estrutural do DNA, a técnica foi denominada teste do cometa. Este vem sendo utilizado para monitorar população de risco para neoplasia e na avaliação de células apoptótica (SINGH *et al.* 1988; MARTIN *et al.* 1997). Esse método auxilia na avaliação do comportamento biológico do tumor, através do conhecimento do comportamento biológico é que se determina a conduta terapêutica, o monitoramento e o prognóstico do paciente com câncer. Em nosso grupo de pesquisa este teste já foi utilizado para avaliação de grupo de risco para câncer de bexiga e comportamento biológico

do tumor. Porém esses trabalhos foram realizados em cães. Trabalhos esses pioneiros na literatura (ALVES *et al.*, 2004 AMARAL, 2005). Com teste do cometa aplicado as células de tumor de mama nas ratas Sprague-Dawley foi possível observar as lesões no DNA dessas células. Além disso, as lesões foram mais intensas nos tumores mais agressivos quando comparados com método convencional da histopatologia. Na literatura especializada no assunto não existe estudos comprovando a participação direta da lesão com agressividade do tumor de mama no que diz respeito a experimentação. De fato esse teste parece ter importância para auxiliar no entendimento do comportamento biológico de neoplasias.

6.5 Terapia Fotodinâmica

O sucesso do tratamento de neoplasias está relacionado com vários fatores entre eles o tempo de evolução, estadiamento clínico da doença e agressividade do tumor.

Na sexta semana após a indução química os animais do grupo 2 apresentaram média de estadiamento clínico de 1,1 cm e lesão no DNA pelo teste do cometa de mediana 5,4 de *Tail Intensity*. O grupo 1, demonstrou estadiamento clínico de 0,9 cm e exibiu mediana de 1,9 de *Tail Intensity*. Portanto os tumores dos animais do grupo 2 mostraram um estadiamento clínico maior e maior lesão no DNA em relação ao grupo 1.

Após 8 semanas da indução química verificou-se que o grupo 2, submetido a uma única sessão de TFD apresentaram o estadiamento clínico menor (2,2 cm) quando comparado ao grupo 1 (3,5 cm). Embora tenha havido crescimento este foi de 200% no grupo 2 e de 388% no grupo 1.

Os animais do grupo 1 apresentaram um crescimento médio do tamanho tumoral de aproximadamente 0,4 cm/semana. Já no grupo submetido à TFD observou-se um crescimento inferior a 0,15 cm/semana, o que sugere um significativo retardo no crescimento tumoral.

A principal ação da TFD é a morte celular. Assim, a investigação da fotoreação causada pela luz em um tecido fotossensibilizado depende, fortemente, da adequada quantidade de luz que atinge o tecido alvo, da concentração do FS nesse tecido e da formação do oxigênio singlete. Como

demonstram vários estudos, a penetrabilidade da luz é um fator dominante em qualquer tipo de estudo em TFD (MELO, 2000; FERREIRA, 2003; FERREIRA, 2004).

A TFD apresentou boa eficiência no tratamento dos tumores mamários porém é possível que durante a iluminação possam ter ocorrido fatores que possam ter limitado a quantidade de luz que atingiu a região tumoral, pois a mama apresenta tecido adiposo adjacente, o qual espalha preferencialmente a luz atenuando a intensidade efetiva na região tumoral.

Para dar consistência a esse dado foram feitas medidas comparando a intensidade de luz entregue na superfície, no tecido subcutâneo e no tecido adiposo adjacente a mama de ratas *Sprague-Dawley* e confirmou-se que houve redução da intensidade da luz que chega ao tecido adiposo. Desta forma, há apenas iluminação parcial do tumor com redução do seu desenvolvimento, mas não sua eliminação. Tal diminuição pode ser atribuída à diferença entre as propriedades ópticas dos diferentes tecidos.

Devido ao espalhamento da luz e a ação sistêmica do fotossensibilizador utilizado, pode ter ocorrido um dano maior no tecido sadio quando comparado ao tumoral. Desta forma, a redução da taxa de crescimento tumoral ocorreu devido, principalmente ao dano no tecido adjacente e não diretamente ao tecido tumoral.

Neste caso, o efeito fotodinâmico é indireto e as células tumorais preferencialmente destruídas foram aquelas com maior taxa metabólica e conseqüentemente com maior taxa multiplicativa. Desta forma, o crescimento tumoral ocorreu através da proliferação das células de menor taxa multiplicativa, crescendo de forma mais lenta. Isto explicaria a queda de crescimento tumoral do grupo tratado.

Os animais do grupo 3 apresentavam estadiamento clínico de 2,2 cm. O grupo 3 demonstrou estadiamento clínico de 1,8 cm.

Os animais do grupo 3 (tratado com a mastectomia associada à Terapia Fotodinâmica) não apresentaram recidivas até o final de 12 semanas quando foram comparados com os animais do grupo 4 (submetido somente a cirurgia) o qual apresentou 60% de taxa de recidiva após 11 semanas. No entanto, o

grupo 3 apresentou a mediana do *tail intensity* maior (4,6) do que o grupo submetido somente a cirurgia (1,7). Essa recidiva foi observada pelo estadiamento clínico e confirmada pelo exame microscópico.

Hillegersberg *et al.* (1995) implantaram células de carcinoma mamário no tecido subcutâneo de ratos. Após o seu desenvolvimento, realizou-se ressecção cirúrgica e imediatamente, no local da remoção, irradiou-se o tumor utilizando comprimentos de onda entre 320-450 nm, 0,1W/cm² e 60 J/cm² após sensibilização com Photofrin ou ácido 5-aminolevulínico (ALA). Após o tratamento a redução do tumor foi significativa, tanto no local do implante como para aqueles que desenvolveram metástase para linfonodos regionais. Os autores concluíram que cirurgia associada a TFD é um método seguro e eficiente de destruição do tumor residual, prevenindo recorrência local do tumor. Embora não tenham utilizado a mesma metodologia, o trabalho citado é um dos mais próximos deste estudo, e por isso é relevante considerá-lo ao discutir os resultados obtidos.

Após 12 semanas da indução química os animais foram eutanasiados e as neoplasias remanescentes coletadas para exame histopatológico. As neoplasias foram classificadas como preconizado por de Russo *et al.* (2000), encontrando 45% de carcinoma ductal sólido e cribiforme, 30% de carcinoma ductal papilífero, 10% de carcinoma papilífero 10% carcinoma tubular e 5% de comedo.

Porém não foi possível verificar a arquitetura tecidual das lesões após efeito da TFD devido às extensas áreas de necrose de coagulação, figura de apoptose, coagulação intravascular disseminada e infiltração das células neoplásicas para o tecido adiposo. Achados esses de acordo com CASAS *et al.* (1999) e COLLOMBO *et al.* (2005).

O mecanismo de ação da TFD é a indução da morte celular através da formação de espécies reativas do oxigênio (EROs), dentre elas o radical hidroxila, o ânion superóxido e principalmente, o oxigênio singlete, causando um estresse oxidativo via oxidação de lipídeos e proteínas de membranas e organelas e conseqüentemente, induzindo a hipóxia celular. Desta forma o resultado tecidual à agressão é a indução da morte celular por necrose de coagulação e/ou apoptose. A morte celular apoptótica ocorre de modo regulado

e dependente de energia, resultando em quebra do DNA nuclear, condensação celular e fagocitose, ao contrário da morte celular necrótica, que não requer ATP, em que pode haver aumento de volume celular e até extravasamento de material citosólico (KERR *et al.*, 1972). A morte tumoral ocorre pelo processo fotodinâmico com o fotossensibilizador associado às mitocôndrias (BERNS *et al.*, 1982) e também ao retículo endoplasmático (RICCHELLI *et al.*, 1999), à membrana plasmática (MORENO E SALET, 1985) e aos lisossomos (LEUNG *et al.*, 2002, ALI e OLIVO, 2002), sendo que todas essas organelas podem ser afetadas pela ação fotodinâmica.

Portanto, os resultados encontrados nesse trabalho podem inferir que houve ação da TFD sobre o tecido neoplásico.

Trabalhos na literatura estudam a ação da TFD sobre as células tumorais mamárias empregando diferentes fotossensibilizadores, parâmetros de iluminação e associado-a com outras terapias, como por exemplo:

Saleh *et al.* (2001) utilizaram a TFD associada com um inibidor da cisteína proteinase (CPI). Para a realização da TFD foi administrado por via intraperitoneal 20 mg/kg de HpD nos ratos da linhagem Wistar com carcinoma mamário transplantado, 24 horas depois as lesões foram iluminadas com lâmpada halógena com comprimento de onda de 630 +/- 20 nm, a dose total utilizada foi de 200J/cm². A CPI foi administrada por via subcutânea nas doses de 50mg e 200mg por animal. Em alguns animais houve regressão total do tumor, isso ocorreu com mais frequência no grupo que foi submetido a TFD e CPI na dose de 200mg. Os autores concluíram que a combinação da TFD e CPI pode uma promissora terapia antineoplásica.

Casas *et al.* (1999) mostraram que o ácido 5- aminolevulínico (ALA) administrado tanto topicamente como intratumoral em carcinoma mamário implantado em ratos sintetiza quantidade significativa de porfirina e consequentemente causa fotossensibilidade. O acúmulo da porfirina foi maior quando o ALA foi administrado intratumoral. A irradiação foi ótima entre 2 a 3h depois da aplicação tópica de 50 mg de pomada de ALA 20% e 2 a 4h depois da administração intratumoral de 30 mg ALA/cm³. A aplicação da TFD foi feita 1,2 ou 3 vezes nesse estudo. A resposta a sucessivas aplicações foi constante para o mesmo tumor, indicando que não houve resistência. Análise

microscópica mostrou focos de necrose e hemorragia, células em apoptose e ausência de células da resposta imune, semelhante ao observado no presente estudo.

O conjunto dos resultados indica que o modelo da carcinogênese química foi efetivo, pois todos os animais desenvolveram neoplasia de mama. Com isso foi possível empregar o protocolo terapêutico bem como analisar as lesões microscópicas além de avaliar a agressividade do tumor através do teste do cometa. Mesmo com um número pequeno de animais a metodologia foi eficaz, o que não exclui a necessidade de avaliar um número maior de animais bem como a realização de protocolos diferentes da TFD.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O exame citológico por capilaridade no modelo experimental pode ser utilizado como método diagnóstico de neoplasia mamária.
- O teste do cometa pode ser realizado no modelo experimental de tumor de mama para quantificar lesão no DNA das células neoplásicas.
- Não foi possível correlacionar a resposta a TFD, microscopia e teste do cometa devida a necessidade de amostragem mais significativa dos diversos estadiamentos clínicos.
- A TFD pode ser usada no modelo experimental de tumor de mama como terapia única ou adjuvante a cirurgia para redução da evolução do tumor e evitar recidivas respectivamente.
- O tecido adiposo adjacente ao tumor de mama interfere na intensidade da luz emitida pelo LED, que chega ao tecido neoplásico.

8. PERSPECTIVAS

As conclusões desse trabalho são promissoras, porém notou-se a necessidade de amostragem mais significativa dos diversos estadiamentos clínicos para melhorar a associação desse critério com os demais avaliados como a resposta a TFD, a microscopia e o teste do cometa. Assim como a necessidade de aumentar o período de observação dos animais, bem como o número de sessões da TFD.

Também se mostrou importante a realização da taxa de crescimento tumoral através de marcadores de proliferação celular e apoptose.

9. REFERÊNCIAS*

- ALI, S. M.; OLIVO, M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. **Int J Oncol**, v.21, n.3, p.531 - 40, 2002.
- ALVES, A.; GONTIJO, A. M. M C.; SALVADORI, D. M. F. ; ROCHA, N. S. Acute bacterial cystitis does not cause DNA damage detectable by the alkaline comet assay in urothelial cells of dog. **Vet. Pathol.**, v. 41, n. 3, p. 299-301, 2004.
- AMARAL, A.S. Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caracterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA. 2005, 228p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ARAUJO, R. W.; PAIVA, V.; GARTNER, F; AMENDOEIRA, I; OLIVEIRA J.M, SCHMITT F. C. Fine Needle Aspiration as a Tool To Establish Primary Human Breast Cancer Cultures in Vitro. **Acta Cytol.**v.43, p.985-990, 1999.
- BARROS, A.C.S.D.; MURANAKA, E.N.K.; MORI, J.L.; PELIZON, H.T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J.A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S P**, v. 59, n.5, p.257-261, 2004.
- BERNS, M. W.; DAHLMAN, A.; JOHNSON, F. M.; BURNS, R.; SPERLING, D.; GUILTINAN, A.; SIEMENS, A.; WALTER, R.; WRIGHT, W.; HAMMER-WILSON, M.; WILE, A. In vitro cellular effects of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res**, v.42, p.2325-2329, 1982.
- BRANCALEON, L. AND H. MOSELEY. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, 17(3): p. 173-86, 2002.
- BRAULT, D. Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 6, n. 1-2, p. 79-86, 1990.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BURINI, C.H.P. **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida**. 2002. 162p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BUTTERWORTH, B.E.; POPP J.A.; CONOLLY, R.B.; GOLDSWORTHY, T.L.. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. **IARC Sci Publ.** v.116, p.279–305, 1992.
- CAMARGO, J L. V. DE ; SALVADORI, D. M. F. ; ROCHA, N. S. ; BARBISAN, L. F.; RIBEIRO, L. R. . The detection of chemical carcinogens in an alternative medium-term bioassay. **Ciência e Cultura (SBPC)** v. 51, n. 1, p. 22-26, 1999.
- CARDIFF, R.D.; WELLINGS, S.R. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.** v. 4, n.1, p.105-122, 1999.
- CARPENTER, J.C.; PERRELET, A.; ORCI, L. Morphological changes of the adipocyte cell membrane during lipolyses. **J. Biol.** v. 72, p.98-104, 1977.
- CARVALHO, V. C. M. **Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep – 2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer**. 2001. 91f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- CASAS, A.; FUKUDA, H.; MEISS, R.; BATLLE, A.M. Topical and intratumoral photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in a subcutaneous murine mammary adenocarcinoma. **Cancer Lett.**, v.141, p.29-38, 1999.
- CHANG, S.C.; CHANG, C.C; CHANG T. J; WONG, M.L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **J Am Vet Med Assoc.**, v. 227, n.10, p.1625-1629, 2005.
- CLINTON, S.K; IMREY, P.B.; ALSTER, J.M.; SIMON, J.; TRUEX, C.R.; VISEK, W.J. The Combined Effects of Dietary Protein and Fat on 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Breast Cancer in Rats. **J. Nutr.** v.114, p.1213-1223, 1984.
- COCCA, C.; MARTIN, G.; NUNEZ, M.; GUTIERRES, A.; CRICCO, G.; MOHAMAD, N.; MEDINA, V.; CROCI, M.; CRESCENTI, E.; RIVERA, E.; BERGOC, R. Effect of glibenclamide on N-nitroso-N-methylurea-induced

- mammary tumors in diabetic and nondiabetic rats. **Oncol Res.**, v.15, n.6, p.301-311, 2005.
- COHEN, S.M.; ELLWEIN, L.B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. **Cancer Res.** v.51, p.6493–6505, 1991.
- COLLEU-DUREL, S.; GUITTON, N.; NOURGALIEVA, K.; LEGUE, F.; LEVEQUE, J.; DANIC, B.; CHENAL, C. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay): a simple technique to show genomic instability in sporadic breast cancer. **Eur J Cancer.**, v.40, n.3, p.445-451, 2004.
- COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol.** v.26, n.3, p.249-261. 2004.
- COLOMBO, L.L.; VANZULLI, S.I.; VILLANUEVA, A.; CAÑETE, M.; JUARRANZ A.; STOCKERT, J.C. Long-term regression of the murine mammary adenocarcinoma, LM3, by repeated photodynamic treatments using meso-tetra (4-N-methylpyridinium) porphine. **Int J Oncol.** v.27, n.4, p.1053-1059, 2005.
- COLUSSI, V.C.; NICOLA, E. M.; NICOLA, J.H. Phototherapy, photochemotherapy and various photosensitizers. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 42, n. 4, p. 229-236, 1996.
- COLUSSI, V.C. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos.** 1997. 100 f. Tese(Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CORNELIUS, P.; MACDOUGALD, O.A.; LANE, M.D. Regulation of adipocyte development. **Annu. Rev.Nutr.** v.14, p.99-129, 1994.
- DANIEL, M.D.; HILL, J.S. A history of photodynamic therapy. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v.61, p.340-348, 1991.
- DENOIX, P.F. Bull. Inst. Nat. Hyg (Paris) 1944;1:69. 1944 ;2:82. 1950;5:81. 1952; 7:743.
- DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.58, n.6, p.895-900, 1993.
- DOUGHERTY, T.J. An update of photodynamic therapy applications. **J Clin Laser Med Sur.**, v.20, n.1, p.3-7, 2002.
- FERNANDES, M.M.G. **Estudo da Patologia dos Tumores Mamários Caninos Através de Técnicas Imunohistoquímica e Citometria Estática.**

- 1996, 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- FERREIRA, E.; BREGUNCI, G.C.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumor. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, n.1, p. 13-17, 2003.
- FERREIRA, J. **Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós Terapia Fotodinâmica-Estudo em vivo.** 2003, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, J.; KURACHI, C.; MELO, C. A. S.; MORIYAMA L.T.; ZUCOLOTO S.; BAGNATO, V.S. Necrosis characteristics of photodynamic therapy in normal rat liver. **Laser Physics**, v. 14, n. 2, p. 209 – 212, 2004.
- FRITSCH, C.; GOERRZ, G.; RUZICKA, T. Photodynamic therapy in dermatology. **Arch. Dermatol.**, v.134, p.207-14, 1998.
- GEAR, R. B.; YAN, M.; SCHNEIDER, J.; SUCCOP, P.; HEFFELFINGER, S. C.; CLEGG, D. J. Charles River Sprague Dawley rats lack early age-dependent susceptibility to DMBA-induced mammary carcinogenesis. **Int J Biol Sci.**, v.3, n.7, p.408-416, 2007.
- GELOEN, A.; ROY, P.E.; BUKOWIECKI, L.J. Regression of white adipose tissue in diabetics rats. **Am. J. Physiol.** v. 257, p.547-553.
- GIBSON, S.L.; MURANT, R.S.; HILF, R. Photosensitizing Effects of Hematoporphyrin Derivative and Photofrin II on the Plasma Membrane Enzymes 5'-Nucleotidases, Na⁺ K⁺ -ATPase, and Mg²⁺ -ATPase in R3230 AC Mammary Adenocarcinomas. **Cancer Res.**, v.48, p.3360-3366, 1988.
- GRASSI, T.; CAMARGO, E. A. DE; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, M. E. A; RIBEIRO, D. A. DNA damage in multiple organs after exposure to chlorhexidine in Wistar rats. **Int. Journal Hyg and Environm Health**, v. 210, p. 163-167, 2007.
- GUTIÉRREZ, J.B.; SALSAMENDI, A.L. Fundamentos de ciência toxicológica. Diaz de Santos, Madrid, p.155–177, 2001.
- HASEGAWA, R.; FUTAKUCHI, M.; MIZOGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; SHIRAI, T.; ITO, N.; LIJINSKY, W. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. **Cancer Lett.**, v.123, p. 185–191, 1998.

- HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas**. 2003, 90p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HEATON, P.; RANSLEY, R. The comet assay: a measure of DNA protection in cats fed diets developed with WALTHAM science. **Waltham focus**, v.11, n.3, p.28-28, 2001.
- HENDERSON, B. W. and DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy works? **Photochem. Photobiol.**, v. 55, n. 1, p. 145 – 157, 1992.
- HEFFELFINGER, S. C.; GEAR, R. B.; TAYLOR, K.; MILLER, M. A.; SCHNEIDER, J.; LADOW, K.; WARSHAWSKY, D. DMBA-induced mammary pathologies are angiogenic in vivo and in vitro. **Lab Invest**. v.80, n.4, p. 485-492, 2000.
- HILLEGERSBERG, R.V.; HEKKING-WEIJMA, J.M.; WILSON, J.H.P.; EDIXHOVEN-BOSDIJK, A.; KORT,W.J. Adjuvant intraoperative photodynamic therapy diminishes the rate of local recurrence in a rat mammary tumor model. **Brit J Cancer**, v.71, p.733-737, 1995.
- KALKA, K.; MERCK, H.; MUKTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.42, p.389-413, 2000.
- KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A.; Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med** , v.48, n.2, p.85-96, 2001.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** v.26, p.239-257, 1972.
- KARIM, B.O.; ALI, S.Z.; LANDOLFI, J.A.; MANN, J.F.; LIU, G.; CHRISTIAN, A.; DICELLO, J.F.; ROSENTHAL, D.L.; HUSO, D.L. Cytomorphologic differentiation of benign and malignant mammary tumors in fine needle aspirate specimens from irradiated female Sprague-Dawley rats. **Vet Clin Pathol.**, v.37, n.2, p. 229-236, 2008.
- KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Hum Exp.Toxicol**. v.19,p.543–555, 2000.
- KOCDOR , H.; CEHRELI, R.; KOCDOR, M.A.; SIS, B.; YILMAZ, O.; CANDA, T.; DEMIRKAN, B.;RESMI, H.; ALAKAVUKLAR, M.; HARMANCIOGLU, O.

- Toxicity induced by the chemical carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and the protective effects of selenium in Wistar rats. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, v.68, n.9, p.693-701, 2000.
- KOPJAR, N.; MILAS, I.; GARAJ-VRHOVAC, V.; GAMULIN, M. Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. **Clin Exp Med.**, v.6, n.4, p.249-261, 2006.
- KREJA, L.; SELIG, C., NOTHDURFT, W. Assessment of DNA damage in canine peripheral blood and bone marrow after total body irradiation using the single cell gel electrophoresis technique. **Mutat. Res.**, v.359, n.1, p.63-70, 1996.
- KUBATKA, P.; AHLERSOVÁ, E.; AHLERS, I.; BOJKOVÁ, B.; KALICKÁ, K.; ADÁMEKOVÁ, E.; MARKOVÁ, M.; CHAMILOVÁ, M.; CERMÁKOVÁ, M. Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar:Han Rats: the Effect of Season and Age. **Physiol Res**, v.51, p.633-640, 2002.
- LEUNG, W. N.; SUN, X.; MAK, N. K.; YOW, C. M. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. **Photochem Photobiol**, v.75, n.4, p.406-411, 2002.
- LEVINE, P.; SIMSIR, A.; CANGIARELLA, J. Management issues in breast lesions diagnosed by fine-needle aspiration and percutaneous core breast biopsy. **Am J Clin Pathol.**, v.125, p.124-134, 2006.
- LIM, D.S.; KO, S.H.; LEE, C.H.; AHN, W.S.; LEE, W.Y. DH-I-180-3-mediated photodynamic therapy: biodistribution and tumor vascular damage. **Photochem Photobiol.**, v.82, n.2, p.600-605, 2006.
- LUALDI, M., *et al...*, A phantom with tissue-like optical properties in the visible and near infrared for use in photomedicine. **Lasers Surg Med**, v.28, n.3, p. 237-43, 2001.
- LUCROY, M.D. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. **Veterinary Clinics Small Animal Practice.**, v.32, n.3, p.693-702, 2002.
- LUCROY, M.D.; EDWARDS, B.F.; MADEWELL, B.R. Veterinary photodynamic therapy. **JAVMA**, v.216, n.11, p.1745-1751, 2000.
- LUI, H.; ANDERSON, R.R. Photodynamic therapy in dermatology [Editorial]. **Arch.Dermatol.**,v.128, p.1631-5, 1992.

- LUI, H., BLOSSONNETTE, R. Photodynamic therapy. In: GOLDMAN, M.P.; FITZPATRICK, R.E., ed. **Cutaneous Laser Surgery**. 2o edição Saint Louis, Mosby, p.437-58, 1999.
- MACHADO, A.E.H. Terapêutica fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v.23, n.2, p.237-243, 2000.
- MANN, P. C.; BOORMAN, G.A.; LOLLINI, L.O.; McMARTIN; GOODMAN, D.G. Proliferative Lesions of Mammary Gland in Rats. **Toxicol. Pathol.** 1996.
- MARCASSA, L.G.; CESTARI, G.A.; MARCASSA, J.C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. **Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores**. 1a.Edição, novembro de 2002.
- MARTIN, F. L.; VENITT, S. *et al.* "DNA damage in breast epithelial cells: detection by the single-cell gel (comet) assay and induction by human mammary lipid extracts." **Carcinogenesis**. v.18, n.12, p. 2299-2305, 1997.
- McKEE, G.T.; TAMBOURET, R.H.; FINKESTEIN, D. Fine-needle aspiration cytology of breast: Invasive vs. In situ carcinoma. **Diagnostic Cytopathol.**, v.25, p.73-77, 2001.
- McCORMICK, D.L.; MEHTA, R.G.; THOMPSON, C.A.; DINGER, N.; CALDWELL, J.A.; MOON, R.C. Enhanced Inhibition of Mammary Carcinogenesis by Combined Treatment with N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide and Ovariectomy. **Cancer Res.** v. 42, p.508-512, 1982.
- MELO, C.A.S.; IMA, A.L.L.A.; BRASIL, I.R.C.; CASTRO E SILVA, O.Jr; MAGALHÃES, D.V.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Characterization of light penetration in rat tissues. **J. Clin. Laser Medicine & Surgery**, v.19, n. 4, p.175-179, 2001.
- MELO, C. A. S. **Desenvolvimento dos conceitos básicos para dosimetria e aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2003. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- MENEZES, P. F. C. DE. **Estudo espectroscópico e citotóxico do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- MERKEL, L.K.; BIEL, M.A.C. Photodynamic therapy. In: WITHROW, S.J.; MAC EWAN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia, 2001. chap. 8, p.86-91.
- MORENO, G.; SALET, C. Citotoxic effects following micro-irradiation of culture cells sensitized with haematoporphyrin derivative. **Int J Radiat Biol relat Stud Phys Chem Med**, 47(4): 383-386, 1985.
- NELSON, J.S.; McCULLOUGH, J.L.; BERNIS, M.W. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In: ARDNT, K.A.; DOVER, J.S.; OLBRIGHT, S.M. **Laser in Cutaneous and Aesthetic Surgery**. Philadelphia, Lippincott-Raven, p.349-82, 1997.
- NGUYEN-BA, G.; VASSEUR P. Epigenetic events during the process of cell transformation induced by carcinogens (review). **Oncol Rep**. v.6, p.925–932, 1999.
- NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; TADEUSZ I.; GOŁĄB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Bioch.Pol.**,v. 52, n. 2, p. 339–352, 2005.
- NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clin Tech Small Anim Pract**, v.18, n.2, p.107-109, 2003.
- OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; HENRIQUE GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L.F.P; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. **An Acad Bras Cienc**. v.79, n.4, p.593-616, 2007.
- PAGEM, C. P., CURTIS, M. J., WALKER, M. J., HOFFMAN, B. B. **Farmacologia Integrada**. São Paulo: manole, p. 606, 1999.
- PEREZ-MARTINEZ, C.; GARCIA-IGLESIAS, M.J.; DURAN-NAVARRETE, A.J.; ESPINOSA-ALVAREZ, J.; GARCIA-FERNANDEZ, R.A.; LORENZANA-ROBLES, N.; FERNANDEZ-PEREZ, S. Histopathological and immunohistochemical characteristics of two canine lipid-rich mammary carcinomas. **Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.**, v.52, n.2, p.61-66, 2005.
- POLI, P.; BUSCHINI, A.; RESTIVO, F. M.; FICARELLI, A., CASSONI F.; FERRERO, I.; ROSSI C. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. **Mutagenesis**. v. 14, n.6, p. 547-556, 1999.

- PRAHL, S.A.; GEMERT, M.J.C.V.; WELCH, A.J. Determinig the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method. **Applied Optics.**, v. 3432, n.4, p.559-568.
- HOUDAKIS, C.J.; PERRIS, A. Monte Carlo estimation of tissue optical properties for use in laser dosimetry. *Phys.Med. Biol.*, v.40, n.3, p. 351-364.
- RIBEIRO-SILVA, A.; LUZZATTO, F.; CHANG, D.; ZUCOLOTO, S. Limitations of Fine-Needle Aspiration Cytology to Diagnose Metaplastic Carcinoma of the Breast. **Pathol. Onc Res.** v. 7, n. 4, 2001.
- RICCHELLI, F.; BARBATO, P.; MILANI, M.; GOBBO, S.; SALET, C.; MORENO, G. Photodynamic action of porphyrin on Ca²⁺ influx in endoplasmic reticulum: a comparison with a mitochondria. **Biochem. J**, 338: 221-227, 1999.
- ROCHA, N.S. Padronização Morfológica de Lesões Pré-neoplásicas e Neoplásicas em *Rattus Novergicus* (Wistar) Submetidos ao Protocolo de Carcinogênese de Média Duração em Múltiplos Órgãos. 1998, 95p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ROCHA, N.S. Exame citológico no diagnóstico de lesões da pele e subcutâneo. **Clín. Vet.**, n. 76, p. 76-80, 2008.
- RUSLANDER, D.; KASER, H.B.; SARDINAS, J.C. Cutaneous squamous cell carcinoma in cats. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.19, n.10, p.1119-1129, 1997.
- RUSSO, J.; GUSTERSON, B.A.; ROGERS, A.E.; RUSSO, I.H.; WELLINGS, S.R.; VAN ZWIETEN, M.J. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. **Lab. Invest.**, v.62, n.3, p. 244-278, 1990.(a)
- RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Lab Invest.** v.57, n.2, p.112-137, 1987.
- RUSSO, J.; RUSSO, I.H.; ROGERS, A.E.; VAN ZWIETEN, M.J.; GUSTERSON, B.A. Tumors of the mammary gland. **IARC Sci. Publ.**, v.99, p. 47-78, 1990.(b)
- RUSSO J.; RUSSO, I.H. Mammary tumorigenesis. In: Modification of Tumor Development in Rodents. **Prog. Exp. Tumor Res.**, v.33, p.175-191, 1991.
- RUSSO, I.H.; RUSSO, J. Review-Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.9, p.938-967, 1996. (a)

- RUSSO J.; RUSSO, I.H. Experimentally induced mammary tumors in rats. **Breast Cancer Res Treat**, v.39, p.7-20, 1996.(b)
- RUSSO, I.H.; RUSSO, J. Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. **J Mammary Gland Biol.**, v.5, n.2, p.187-200, 2000.
- SALEH. Y.; ZIOLKOWSKI, P.; SIEWINSKI, M.; MILACH, J.; MARSZALIK, P.; RYBKA, J. The combined treatment of transplantable solid mammary carcinoma in Wistar rats by use of photodynamic therapy and cysteine proteinase inhibitor. **In Vivo**. v.15, n.4, p.351-357, 2001.
- SHAHIDI, M.; MOZDARANI, H.; BRYANT, P. E. Radiation sensitivity of leukocytes from healthy individuals and breast cancer patients as measured by the alkaline and neutral comet assay. **Cancer Lett.** v.257, n.2, p.263-273, 2007.
- SHELDON, H.; HELLENBERG, C.H.; WINEGARD, A.I. Observation on the morphology of adipose tissue. **Diabetes**. v.11, 378-385, 1962.
- SINGH, N.P.; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, New York, v.175, p.184-191, 1988.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol Biol.**, v.314, p.275-286, 2006.
- SPIKES, J.D. The original and meaning of the term "Photodynamic" (as used in "Photodynamic Therapy", for example). **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.9, p. 369-374, 1991.
- SPINARDI-BARBISAN, A.L.; KANENO R.; BARBISAN, L.F.; VIANA DE CAMARGO, J.L.; RODRIGUES, M.A. Chemically induced immunotoxicity in a medium-term multiorgan bioassay for carcinogenesis with Wistar rats. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.194, n.2, p132-140, 2004 Jan.15.
- Star, W.M.; Marijnissen J.P.; van Gemert, M.J., Light dosimetry in optical phantoms and in tissues: I. Multiple flux and transport theory. **Phys Med Biol**, v.33, n.4, p. 437-54, 1988.
- STERNLICHT, M.D. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Res.**, v.8, n.1, 201 p., 2006.
- TERADA, S.; UCHIDE, K.; SUZUKI, N.; AKASOFU, K.; NISHIDA, E. Induction of ductal carcinomas by intraductal administration of 7,12-

- dimethylbenz(a)anthracene in Wistar rats. **Breast Cancer Res Tr**, v.34, n.1, p.35-43, 1995 Apr.
- THOMPSON, T.A.; HAAG, J.D.; GOULD, M.N. ras gene mutations are absent in NMU-induced mammary carcinomas from aging rats. **Carcinogenesis**, v.21, n.10, p.1917-1922, 2000 Oct.
- TOREZAN, L.A.R. **Avaliação da Eficácia da Terapia Fotodinâmica com Ácido 5-Delta Aminolevulínico (ALA) Tópico no Carcinoma Basocelular**. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TROSKO, J.E. Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? **Mol Carcinog**. v.30 p.131–137, 2001.
- TSAI, C.-L., *et al...*, Measurement and simulation of light distribution in biological tissues. **Applied Optics**, v.40, n.3, p. 5770-5777, 2001.
- WILLIAMS, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology**. v.16, p 3-10, 2001.
- WILSON, B.C.; ADAM, G. A Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue. **Med Phys**, v.10, n.6, p. 824-30, 1983.
- WILSON, B. C. and PATTERSON, M. S. The physics of photodynamic therapy. **Phys.Med. Biol.**, v.31, n 4, p. 327 – 360, 1986.
- WILSON, B.D.; MANG, T.S.; STOLL,H.; JONES, C.; COOPER, M.; DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. **Arch. Dermatol.**, v.128, p.1597-601, 1992.
- WHO, 1998. Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. WHO, Geneva.
- WOZNIAK, K.; KOLACINSKA, A.; BLASINSKA-MORAWIEC, M.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; ZADROZNY, M.; BLASIAK, J. The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. **Arch Toxicol**. v.81, n.7,p.519-527,2007.
- ZEZELL, D.M. **Hematoporfirina e derivados: propriedades ópticas e terapia fotodinâmica do câncer**. 1987. 97f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física"Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ZEZELL, D.M. **Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores**. 1991. 145f. Tese (Doutorado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

ZHU, T.C.; FINLAY, J.C.; HAHN, S.M. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B**, v.79, n.3, p. 231-241, 2005.

Esse artigo está nas normas da revista Laser Physics Letters.

General remarks

Regular submissions to **Laser Physics Letters** should be written in correct English. Please consult a native speaker or a knowledgeable colleague for help, if necessary. All contributions will be evaluated according to the standard procedures of peer review, usually by two referees. Only contributions which meet the scientific and formal standards of the journal can be accepted for publication.

For submissions, please follow our short Instructions for authors, given [here](#) or on the inside back cover page of the printed journal. Please accompany your submission by one archive file (ZIP or tar.gz). The manuscript length should be adequate to the content and they should be written concisely. Large numbers of figures should be avoided. The manuscript length usually should be about 6 pages, including abstract, figures, tables, acknowledgements, and references.

Title information

The manuscript title should be in lower case letters except for first letter, proper nouns, certain abbreviations, physical quantities etc.

Authors information

Authors information consists of the names of all authors (with first name initials or full names) and the corresponding institutions (from the smallest to the largest unit, e.g. group, department, university) with addresses, as given in the above example (street or P.O. box, city with zip codes, country). Countries should be written in English.

Please identify the corresponding author by the asterisk and add his/her electronic mail address. A corresponding address valid for the entire period from submission until publication of the paper will be given either in the manuscript.

Dates of receipt, acceptance and publication will be added by the publisher.

PACS numbers (a maximum of six classification codes in numerical order) must be given. Please use the full, recently updated classification system (PACS 2003) which is available at this site and online at <http://publish.aps.org/PACS/>.

Manuscript layout

File formats and templates

Please prepare your manuscript electronically using LaTeX 2e, the style file package with files wiley2sp.cls, stylefileLPL.tex, stylefileLPL.pdf, example.tex, and example.pdf is available [here](#). The file wiley2sp.cls must be installed in a place where LaTeX can find it. Please use the predefined styles from stylefileLPL.tex for title, authors, abstract, body etc.

The Microsoft Word (or compatible formats like RTF) may be used on emergency.

Figures and tables

Figures must be carefully prepared and submitted ready for reproduction. Lettering and symbols should be clear and large enough in the final figure size (the typical width of a figure in the journal is about 6 cm; smallest letters should not be smaller than 1.5 mm).

Avoid small open symbols, small dots, small decimal points, hairlines, close-dotted or short-dashed lines. Draw a closed axes frame in diagrams with the axis titles (quantity followed by the unit in brackets) parallel to the corresponding axis, outside the frame.

For numbers, use a decimal point instead of a comma.

Labeling in the form $2.1\text{E-}4$ is not permitted, write 2.1×10^{-4} or include the power in the axis title such as $R(10^{-4} \Omega)$ or using prefixes $R(\text{m}\Omega)$. For symbols and units, avoid writing alpha, Ohm, deg; use Greek and special characters instead: α , Ω , $^\circ$.

Figures and tables including captions should be embedded in the manuscript file, in order to indicate their appropriate position and required space (Fig. 1, see also Table 1). Further possible arrangements of figures and captions are shown in the document example.tex. Separate files of your figures (PS, EPS) should be attached. Please make sure to use only standard fonts (Arial, Times, Symbol) or include the fonts in the figure file.

In the text, the figures or tables are referred to as "... in Fig./Table 1" or as "Figure/Table 1 shows ..." at the beginning of a sentence.

Halftone figures should have 300 dpi, line drawings 1200 dpi minimum resolution in final size. Screen or web resolution, e.g. JPG-compressed format, is usually insufficient for publication. Color figures submitted in electronic format will generally remain in color in the internet PDF version of an article at no cost. The print version will be black/white unless color figures are purchased using the color print authorization on the Reprint Order form, when returning proof corrections.

Quantities, units, and equations

All physical quantities and constants should be given in *italic*, vectors in ***bold italic*** letters (both in the text and in equations). Care should be taken to distinguish subscripts, superscripts, and special symbols. Units (e.g. V/cm, K, Pa etc.) should be written in upright letters (not in italics) with a short space to the number before. SI units should be used throughout. Mathematical functions which are tabulated (e.g. sin, cos, exp, e, etc.) should be given in upright letters (not in italics).

Equations may be numbered sequentially. Except for small in-line equations, they should appear on separate lines.

In the text, equations may be referred to by writing "... in Eq. (1)". At the beginning of a sentence, use the full form "Equation (1) shows ...".

Formatting of literature citations

References should be numbered (in square brackets, such as [1, 2] or [1-3] and listed in the order of citations in the text at the end of the manuscript, using the corresponding LaTeX commands. Please apply the format used in Laser Physics Letters for journal article and book citations. The preferred citation scheme for journals is: Initials. Surnames, Journal Title (according to the INSPEC List of Journals abbreviations) **Vol. No.** (in **bold** face), starting page (year of publication in brackets) [1]. For books, the following order is required (skip irrelevant information): Authors of Article or Chapter, in: Book Authors or Editor[s] (ed[s].), Book Title, edited by Editors, Book Series Vol. No. (Publisher, Place, Year), Chap. No., p./pp. page numbers [2, 3]. When citing conference proceedings, please add all available data such as title, date, and place of the conference as well as publisher, place, and year of publication or, alternatively, the corresponding journal information [4, 5].

- [1] Q. Smith, Y. Braun, and R. Nikols, Laser Phys. Lett. **1**, 17 (2004).
- [2] P. Derak, Th. Frauenheim, and M. R. Pederson (eds.), Computer Simulation of Materials at Atomic Level (Wiley-VCH, Berlin, 2000), p. 89.
- [3] H. Ibach, Electron Energy Loss Spectrometers: The Technology of High Performance, Springer Series in Optical Sciences Vol. 63 (Springer, Berlin, 1990), chap. 5.
- [4] B. J. Ansell, I. Harrison, and C. T. Foxon, in: Proceedings of the 4th International Conference on Nitride Semiconductors, Denver, Colorado, USA, 2001, Part A (Wiley-VCH, Berlin, 2002), pp. 279-282.
- [5] B. J. Ansell, Proceedings of the 4th International Conference on Nitride Semiconductors, Denver, Colorado, USA, 16-20 July 2001, Part B.1.
- [6] ...
- [7] phys. stat. sol. (b) **235** ff. (2003); phys. stat. sol. (a) **195** ff. (2003); phys. stat. sol. (c) **0** (2003).

Acknowledgements

Acknowledgements Two authors (A.A.K. and S.N.B) acknowledge support from the Russian Academy of Sciences, the Russian Foundation for Basic Research and Ministry of Industry, Science and Technology, as well as the INTAS.

By development of the present **Manuscript preparation guidelines** materials of **phys. stat. sol.** Manuscript preparation guidelines are used.

PHOTODYNAMIC THERAPY FOR THE TREATMENT OF INDUCED MAMMARY TUMOR IN RATS

Isabelle Ferreira*¹, Juliana Ferreira², Dirceu Vollet Filho², Lilian T Moriyama², Vanderlei S Bagnato², Noeme S Rocha¹

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Clinical Sciences, Rubião Júnior s/n, Botucatu (SP) ZP: 18.600-000, Brazil.

²University of São Paulo (USP), São Carlos Physics Institute, Department of Physics and Science of the Materials, Av. Trabalhador São-carlense 400, São Carlos (SP) ZP: 13.560-000, Brazil.

*corresponding author: iferreira_16@hotmail.com

ABSTRACT

The present study evaluated photodynamic therapy (PDT) using hematoporphyrin derivative (Photogem[®]) as photosensitizer and Light Emitting Diodes (LEDs) as the light source in mammary tumors induced by DMBA to Sprague-Dawley (SD) rats. After 24 hours of photosensitizer administration, the lesions were illuminated with LEDs, at a dose of 300 J/cm² for 30 minutes. The mammary tumors in animals obtained from group 1 (control) and group 2 (submitted to PDT) were measured over 8 weeks using a caliper. Data analysis used Origin software, version 7.5. To study the distribution of light *in vivo*, 2 Sprague-Dawley (SD) rats without mammary tumors were used. As a light source, a device based on red LEDs was used, and the parameters of irradiation were the same used for the treatment of tumors. At the beginning of the experiment, Group 2 animals had an average of clinical staging of 1.1 cm. The control group showed clinical staging of 0.9 cm. Therefore, the tumors of Group 2 animals showed an increased clinical staging when compared to the control group. The animals of the treated group underwent a

single session of PDT and, after 8 weeks, lower clinical staging (2.2 cm) was observed for this group compared to the control group (3.5 cm). Animals in group 1 had an average growth of the tumor diameter of approximately 0.4 cm / week. Comparatively, the PDT group observed a growth of less than 0.15 cm / week, which suggests a significant delay in tumor growth. To flesh out that since measures were made by comparing the intensity of light delivered to the surface in the subcutaneous tissue and adipose tissue adjacent to mammary gland of SD rats and actually decreased the intensity of light that reaches the adipose tissue. Thus, there is only partial irradiation of the tumors, with a reduction in their development but not their elimination. Results thus show that PDT used in the experimental model of mammary tumor as a single therapy was effective in reducing tumor development.

1. INTRODUCTION

Mammary tumor is the most common cancer in women worldwide (1). From the epidemiological profile, apparently, the mammary tumor is the result of interaction of genetic factors, reproductive behavior, hormonal factors, diet, exposure to radiation and chemicals¹. Despite of advances in diagnosis, in Brazil this tumor is diagnosed in advanced stage of the disease, when treatment is less effective. The conventional protocols for the treatment of cancer are surgery, chemotherapy and radiotherapy, used alone or associated. Except by surgery, the mechanism of action of those therapies on cells is destruction, which is not selective. As destruction is observed both for neoplastic and normal cells, therapies side effects are undesirable. In addition to new therapeutic options have been studied for the treatment of tumors, including mammary tumors.

There are some common steps in the development of breast cancer among species: woman, dog and rat^{2,3}. However, there are limitations in understanding these steps. When ethically used, experimental models are a valuable alternative to investigate these common points. Mammary tumors induced by administration of the chemical carcinogen 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) – DMBA is a polycyclic hydrocarbon that requires metabolic activation^{4,5} – to young virgin rats is one of the most used experimental systems.

Sprague Dawley (SD) rats are among the most sensitive to carcinogen-induced mammary cancers^{6,7}. An early study identifying the mammary window of susceptibility showed that the peri-pubescent period of about 45-50 days of age was consistently found to be the time of optimal sensitivity for initiation with the model DMBA^{8,9}. This is a well-known model for the production of tumors that are morphologically heterogeneous and hormone-dependent.

Photodynamic Therapy (PDT) is a considerable promising technique as treatment modality for the clinical management of a variety of cancers. The clinical treatment regimen consists in the induction the cytotoxicity of proliferative cells through interaction of a photosensitizing agent (PS), light of proper wavelength and molecular oxygen^{10,11}. Ideally, PS accumulates mainly in neoplastic cells and is activated in the presence of light. This activation transfers the photosensitizing agent molecules to excited state molecules.¹¹ One of the manners by which excited molecules return to the ground state is by transferring the absorbed energy directly to cellular oxygen, generating highly reactive singlet oxygen, which is responsible for cell death – known as type II reaction^{11,12}. Both vascular and direct cell damages contribute to the destruction of the tumor^{13,14,15}. Alternatively, excited molecules can transfer energy to intermediate molecules, which then react with oxygen to produce free radicals – type I reaction. In addition, the role of an inflammatory process and of the immune system has been studied with regards to PDT.^{14, 15}

Considering the possibilities for PDT in clinics for mammary tumors, this study aimed to obtain information about the efficacy of PDT on DMBA-induced mammary tumor in Sprague-Dawley rats.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

The groups were formed by 10 young virgin Sprague-Dawley female rats. The animals were bred in vivarium of the Medicine School of UNESP – Botucatu. The animals were maintained in accordance to the guidelines of the committee on care and use of laboratory animals of the National Research Council (CNPq) and the commission for Ethic in Research of the School of Veterinary Medicine and Animal

Science – UNESP-Botucatu (Protocol:85/2006), under ideal conditions of temperature, humidity, and light, and they were fed with appropriate rat food in pellets and filtered water.

2.2. Photosensitizer

Photogem[®] (Photogem, Moscow, Russia), a hematoporphyrin derivative complex, was used as photosensitizer. A stock solution of the photosensitizer (PS) of 5 mg mL⁻¹ in 20 mM phosphate buffered solution with 0.9% NaCl, pH 7.4 (PBS) was stored in the dark at 4°C.

2.3. Light Source

The region of the electromagnetic spectrum emission for the PDT light source was chosen taking into account the absorption bands of the PS and the penetration of light in biological tissues.

For PDT application, a light-emitting diode (LED) device composed of an array of red LEDs was used. This device was developed at the São Carlos Physics Institute of the University of São Paulo (IFSC-USP), with emitting wavelength at 635 nm, total emitting power of 1 W and fluence rate of 185 mW/cm².

2.4. Experimental design

Mammary tumors were induced by a single dose of 50 mg/kg of DMBA diluted in soy oil given by gavage (Figure 1). All animals (between 180g and 230g; average weight 205 g) received the chemical carcinogen at the age of 50 days. After induction, the animals underwent daily feasibility inspection, and weekly physical examination, until the tumor development.

When neoplasia was identified by clinical TNM and cytological exam, the animals were divided into two groups (G1 and G2) and studied for 50 days. Group G1 was clinically monitored only. Group G2 underwent photodynamic therapy using Photogem[®] as photosensitizer (4 mg/kg, IV).

Tumors were irradiated 24 hours after PS application. Irradiation was performed using the LED device, with fluence rate 185 mW/cm², fluence 300 J/cm², and treatment time 30 minutes. The mammary tumors obtained for the group 1 (control) and group 2 (PDT) animals were measured over 8 weeks using a caliper.

To study the distribution of light *in vivo*, two Sprague-Dawley rats without mammary tumors were used. As a light source, the LED device described in section 2.3 was used, with the same irradiation parameters used for the treatment of tumors.

The light intensity both on the surface as inside the tissue were collected with the help of an isotropic optical fiber (IP, Medlight SA, Switzerland). This fiber has a spherical tip of 0.85 mm in diameter, allowing the collection of scattered light in biological tissues. The fiber was coupled to a spectrophotometer and the acquisition of data was performed by a computer. Data processing was performed using the software OriginPro, version 7.5.

The investigation sites were skin surface, subcutaneous tissue and fat tissue adjacent to breast. So that in an animal (animal number 1) investigated the breast is located in the chest and the other animal (animal number 2) the breast is located in the inguinal region. Thus, we can assess the distribution and penetration of light in the target tissue.

At the end of the experiment, the animals were killed and then submitted to complete necropsy to verify metastases by clinical TNM. The lesions were analyzed by the routine HE method.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Single and multiple doses of DMBA have been used to induce mammary carcinogenesis in rats². Using a 50 mg/kg dose made possible to develop of mammary tumor in 10 (100%) animals used in the experiment after 6 weeks of administration of DMBA. There was no interference in water consumption and diet, and the gain of weight was normal. Diagnoses were confirmed by cytological exam.

At the beginning of the experiment the animals in Group 2 had an average of clinical staging of 1.1 cm. For control group, average clinical staging was 0.9 cm. Hence, previous to the treatment, Group 2 animals showed a higher clinical staging when compared to the control group.

The animals of the treated group were subjected to a single session of PDT. After 8 weeks, the average clinical staging was lower (2.2 cm) compared to the control group (3.5 cm) (**Figure 1**).

Animals in group 1 had an average growth of the tumor diameter of approximately 0.4 cm/week, while PDT group observed a growth of less than 0.15 cm/week, which suggests a significant delay in tumor growth.

The main action of PDT is the cell death. Thus, the investigation of photoreaction caused by light in a photosensitized tissue depends mainly on the appropriate amount of light that reaches the target tissue, the concentration of PS in tissue and the formation of singlet oxygen. As many studies have shown, light penetration is a dominant factor on PDT dosimetry studies¹⁶.

Photodynamic therapy was effective in the treatment of the mammary tumors. However, it is possible that, during irradiation, light reaching the tumor tissue might have been limited due to the adipose tissue adjacent to the mammary glands. Since fat

usually is a highly scatters light, decreasing the effective amount of light delivered to the region to be treated.

It should be emphasized that since measurements were made by comparing the light intensity that is delivered to the surface in the subcutaneous tissue and adipose tissue adjacent to mammary gland of Sprague-Dawley rats and actually decreased the intensity of light that reaches the adipose tissue (**Figure 2**). Thus, there is only partial lighting of the tumor with a reduction in their development, but not their elimination.

Due to the light scattering and the action of the systemic photosensitizer that was used, a greater damage in healthy tissue seems to be dealt when compared to the tumor. Thus, the reduction in the tumor growth rate was probably due mainly to the damage promoted at the adjacent tissue, and not directly to the tumor tissue.

In this case, the photodynamic effect was indirect, and the destroyed tumor cells were mostly those with higher metabolic rate and, hence, with higher multiplicative rates. Thus, tumor growth occurred through the proliferation of cells with lower multiplicative rate, resulting in a much slower growth. That explains the decrease in tumor growth rate for the treated group.

At the end of 12 weeks the animals were killed and the remaining tumors were collected for histological examination. Tumors were classified by the Russo et al. (1990)². Tumors were found to be 45% of solid and cribriform ductal carcinoma, 30% of papillary ductal carcinoma, 10% papillary carcinoma, 10% tubular carcinoma, and 5% of comedo.

However, it was not possible to verify the tumor tissue architecture after PDT due to extensive necrosis of the coagulation and hemorrhagic areas, to apoptosis, and

to infiltration of neoplastic cells in adipose tissue (**Figure 3**). These findings agree with Casas *et al.* (1999)¹⁷ and Collombo *et al.* (2005)¹⁸ results.

The mechanism of action of PDT is to induce cell death through the formation of reactive oxygen species, among them the hydroxyl radical, the superoxide anion and foremost the singlet oxygen. These species cause an oxidative stress for oxidation of lipids and proteins of membranes and organelles and, consequently, induce cellular hypoxia. Thus, the result of tissue injury is the induction of cell death by necrosis of coagulation and/or apoptosis. The apoptotic cell death is energy-regulated and energy-dependent, resulting in rupture of nuclear DNA, condensation, and cellular phagocytosis, in contrast to necrotic cell death, which does not require ATP and where there may be an increase in cell volume and even leakage of cytosolic material¹⁹.

4. CONCLUSION

In this study, photodynamic therapy was used in the experimental model of mammary tumor as a single therapy. Based on the obtained results, the complete elimination of the lesions for the procedures and irradiation conditions used was not observed. However, results showed that it was effective in reducing the development of the tumor. Therefore, PDT could be used as an alternative treatment in the control of mammary tumor growth. It could also be used, in principle, as a parallel treatment for the complete elimination of the lesion, even though other studies should be carried on to verify its response together with other techniques for mammary tumors.

5. REFERENCES

- [1] A. J. Sasco, Horm Res. **60**, 50 (2003).
- [2] J Russo, B.A. Gusterson, A.E. Rogers, I.H. Russo, S.R. Wellings and M.J. Van Zwieten, Lab. Invest. **62**, 244 (1990).
- [3] R.D. Cardiff and S.R. Wellings, J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia. **4**, 105 (1999).
- [4] J. Russo and I. H. Russo, Breast Cancer Res Treat. **39**, 7 (1996).
- [5] P. C. Mann, G. A. Boorman, L. O. Lollini, M. Martin and D.G. Goodman, Toxicol. Pathol. (1996).
- [6] J. Isaacs, Cancer Res. **46**, 3958 (1986).
- [7] I. H. Russo and J. Russo, Environm. Health Perspec. **104**, 938 (1996).
- [8] C. Huggins, L. Grand and F. Brillantes, Nature, **189**, 204 (1961).
- [9] I. H. Russo and J. Russo, J Natl Cancer Inst. **61**, 1439 (1978).
- [10] M. D. Lucroy, B. F. Edwards and B. R. Madewell, J. American Vet. Med. Assoc. **216**, 1745 (2000).
- [11] M. D. Daniell and J. S. Hill, Aust. and New Zeal. J. Surg. **61**, 340 (1991).
- [12] A. E. H. Machado, Quím. Nova. **23**, 237 (2000).
- [13] B.W. Henderson and T. J. Dougherty, Photochem. and Photobiol. **55**, 145 (1992).
- [14] T. J. Dougherty, J. Clin. Laser Med. & Surg. **20**, 3 (2002).
- [15] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H. Schellens and F.A. Stewart, Oncol. **11**, 1034 (2006).
- [16] J. Ferreira, C. Kurachi, C. A. S. Melo, L.T. Moriyama, S. Zucoloto, V.S. Bagnato, Laser Physics. **14**, 209 (2004).
- [17] A. Casas, H. Fukuda, R. Meiss and A.M. Batlle, Cancer Lett., **141**, 29 (1999).

- [18] L. L. Colombo, S. I. Vanzulli, A. Villanueva, M. Cañete, A. Juarranz and J. C. Stockert, *Int J Oncol.* **27**, 1053 (2005).
- [19] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A.R. Currie, *Br J Cancer.* **26**, 239 (1972).
- [20] M. W. Berns, A. Dahlman, F. M. Johnson, R. Burns, D. Sperling, A. Guiltinan, A. Siemens, R. Walter, W. Wright, M. Hammer-Wilson and A. Wile, *Cancer Res.* **42**, 2325 (1982).
- [21] F. Ricchelli, P. Barbato, M. Milani, S. Gobbo, C. Salet, and G. Moreno, *Biochem. J.* **338**, 221 (1999).
- [22] G. Moreno and C. Salet, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* **47**, 383 (1985).
- [23] W. N. Leung, X. Sun, N. K. Mak, and C. M. Yow, *Photochem Photobiol.* **75**, 406 (2002).
- [24] S. M. Ali and M. Olivo, *Int J Oncol.* **21**, 531 (2002).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 - Clinical staging the group PDT compared to the control

Figure 2 Intensity of light delivered to different areas.

Figure 3 - Mammary tumor after PDT: extensive necrosis of coagulation (surrounded area) and hemorrhage areas (arrow), HE 20x.

