

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE A
EXPRESSÃO DOS GENES *BCL-2*, *BAX* E *HER-2* NA
CARCINOGENESE MAMÁRIA.**

ISABELLE FERREIRA

Botucatu– SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE A
EXPRESSÃO DOS GENES *BCL-2*, *BAX* E *HER-2* NA
CARCINOGENESE MAMÁRIA.**

ISABELLE FERREIRA

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Noeme
Sousa Rocha

Nome do Autor: Isabelle Ferreira

Título: INFLUÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE A EXPRESSÃO DOS GENES BCL-2, BAX E HER-2 NA CARCINOGENESE MAMÁRIA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Noeme Sousa Rocha

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Julio Lopes Sequeira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa.Dra. Carla Adriene da Silva Franchi

Membro

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina – UNESP-Botucatu

Prof.Dr. Luis Fernando Barbisan

Membro

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências – UNESP-Campus de Botucatu

Profa.Dra. Renata de Azevedo Canevare

Membro

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica – UNIVAP-São José dos Campos

Data da Defesa: 24 de agosto de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais José Cláudio Ferreira e Auriete B. C. Ferreira pelo amor, carinho, compreensão e exemplo de vida. Não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradecimentos

A minha orientadora Professora Dra Noeme Sousa Rocha pela confiança em mim depositada, pelos conhecimentos transmitidos e incentivo que tornaram possível a conclusão desta tese.

A Professora Dra Daisy Maria Favero Salvadori por gentilmente abrir as portas do seu laboratório e pelos esclarecimentos na área de biologia molecular

À minha irmã, Juliana Ferreira pela colaboração com os seus conhecimentos na área de terapia fotodinâmica e por sempre me apoiar

Ao Professor Vanderlei Salvador Bagnato por mais uma vez, ter gentilmente aberto as portas do seu laboratório, me possibilitando realizar a terapia fotodinâmica

Aos pesquisadores do Laboratório de Toxicogenômica e Epidemiologia Molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, Unesp Botucatu, em especial a Glenda Silva e a Marília Porto pela essencial colaboração na realização do PCR real time

Aos pesquisadores do Cepof em especial ao Clóvis Grecco e ao José Dirceu Vollet Filho pela colaboração na realização desse trabalho.

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

Aos Professores Renne Laufer Amorim e Julio Sequeira Lopes pela atenção e apoio constantes.

Ao Professor Jose Carlos Pantoja pela acessoria estatística

Aos pós-graduandos Rodolfo Ventura, Fernanda Carmelo Figueroa, Luis Mauricio Montoya, Lidiane Narducci Monteiro, Paulo Ricardo O. Berssano, Fabrizio Grandi e Breno Salgado pela auxilio e companheirismo. Em especial a Marcia Moleta Colodel pela ajuda e incentivo constantes.

Aos pós-graduandos e residentes da Patologia e Ornitopatologia Raquel Beneton Ferioli, Carlos Eduardo Fonseca, Rafael Torres, Ana Paula Masseno, Ticiane Silva Rocha, Tais Donato, Ana Angelita S. Baptista, Guilherme Marieto Gonçalves e Elisane, Tais, Maria Claudia, Diogo, Priscila, Milena Pereira Coppola e João Zamai pela agradável convivência e troca de conhecimentos.

Aos funcionários do serviço de Patologia Veterinária Maury Raul, Claudinei Domingues, Maria Valéria Dalanezi pelo auxilio e boa convivência.

À seção de Pós-graduação nas pessoas de José Roberto de Lalla Junior e Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel pela atenção e auxilio.

Ao Prof. Camilo Bulla e sua equipe, Andreza Soriano Figueiredo, Sandra Curotto Bulla, Whitney Crow Smith, Chelsea Tiller McIntosh, Hiram Garcia Crescioni pela agradável experiência na Mississippi State University.

Durante 11 anos fiz parte do corpo docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu, fato pelo qual muito me orgulho, e ao longo dessa jornada muitas pessoas passaram pela minha vida deixando um pouco de si em mim através dos conhecimentos que me passaram, tanto acadêmicos como pessoal, infelizmente é impossível agradecer a cada uma delas, porém tenham certeza que me lembro com muito carinho de todos, meu Muito obrigada!!

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro. Processo 09/51826-0 e 11/00731-0

Aos animais

Minha gratidão e profundo respeito

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

“Nascer, morrer, renascer ainda e progredir sempre, tal é a lei.”

Alan Kardec

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Iluminação intersticial do tumor de mama	20
Figura 2	Carcinoma tubular	28
Figura 3	Neoplasia maligna de mama induzida quimicamente em ratas SD... ..	29
Figura 4	Área necrohemorrágica induzida pela TFD. H.E.100x	29
Figura 5	Área necrohemorrágica induzida pela TFD. H.E.400x	30
Figura 6	Distribuição de escores por gene estudado	33
Figura 7	Tumor de mama, imunexpressão Bax.....	33
Figura 8	Tumor de mama, imunexpressão Bcl-2.....	34
Figura 9	Tumor de mama, imunexpressão c-erbB-2	34
Figura 10	Quantificação Relativa do gene <i>BCL-2</i>	38
Figura 11	Quantificação Relativa do gene <i>BAX</i>	40
Figura 12	Quantificação Relativa do gene <i>HER-2</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Anticorpos primários, diluições e métodos de recuperação antigênica	22
Tabela 2 Classificação da intensidade de marcação de acordo com o Hercep Test	23
Tabela 3 Incidência de tumores marcados para os diferentes escores utilizando-se o anticorpo primário anti Bcl-2.	31
Tabela 4 Incidência de tumores marcados para os diferentes escores utilizando-se o anticorpo primário anti Bax.....	31
Tabela 5 Incidência de tumores marcados para os diferentes escores utilizando-se o anticorpo primário anti Her-2.....	32
Tabela 6 Valores numéricos referentes a análise de qRT-PCR para os genes BCL-2, BAX e HER-2 em 28 amostras de carcinomas mamário.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

TFD – Terapia Fotodinâmica
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FS – Fotossensibilizador
FS's – Fotossensibilizadores
STS - estaurosporina
PARP - Poli (ADP-ribose) polimerase
DNA - Ácido desoxirribunucleico
HpD – do inglês, Hematoporphyrin Derivative
ALA - ácido 5-aminolevulinico
HPPH - Pyropheophorbide-a-hexil ether
AlpcS₄ - Aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride
EtNBS - phenothiazinium chloride
FDA - *US Food Administration*
LED - do inglês, light emitting diodes
Pc 4 - ftalocianina 4
ZnPc - Zinco Ftalocianina
CEMIB-UNICAMP – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade de Campinas
FMB-UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista
DMBA – 7,12-dimetilbenz(a)antraceno
Laser – do inglês, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
HE - Hematoxilina e eosina
DAB - 3,3' diaminobenzidina
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
CT - do inglês, crossing threshold
DLI – do ingles light drug interval

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1 Terapia Fotodinâmica	4
2.2 Apoptose celular e TFD	7
2.3 Genes <i>BCL-2</i> e <i>BAX</i>	9
2.4 Gene <i>HER-2</i>	15
3. Objetivos	17
4. Material e Métodos	18
4.1 Animais	18
4.2 Diagnóstico citológico	18
4.3 TFD	19
4.4 Histopatologia	20
4.5 Imuno-histoquímica	21
4.6 qRT-PCR	24
4.7 Análise estatística	25
5. Resultados	27
5.1 Animais	27
5.2 Diagnóstico microscópico	27
5.2.1 Exame citopatológico	27
5.2.2 Histopatologia	27
5.2.3 Imuno-histoquímica	30
5.3 qRT-PCR	35
6. Discussão	43
7. Conclusões	49
8. Referências	50
Anexos	xi
Artigo científico	xii

FERREIRA, I. **Influência da Terapia Fotodinâmica sobre a expressão dos genes BCL-2, BAX E HER-2 na carcinogênese mamária.** Botucatu, 2012. 68p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica utilizada para o tratamento de neoplasia maligna que induz a morte celular por necrose ou apoptose. Estudos *in vitro* e *in vivo* são realizados para avaliar o sucesso da terapia, bem como as respostas e alterações celulares ocorridas. Esse trabalho tem por objetivos avaliar a expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* e de suas proteínas, relacionados à proliferação celular e apoptose, na eficácia da TFD, avaliar qualitativamente o grau de necrose causado pela TFD em diferentes doses e validar a técnica de PCR em tempo real com a imuno-histoquímica em tumores de mama tratados por TFD. Para tal 28 ratas da linhagem *Sprague-Dawley* (SD) receberam dose única de DMBA (80mg/kg, via gavagem) para indução do tumor de mama, quando da manifestação clínica da neoplasia foi realizado exame citológico e os animais foram divididos em 4 grupos G1: grupo controle, tumor de mama não tratado; G2 tratado com TFD utilizando-se iluminação intersticial com dose de luz de 50J/cm; G3 dose de luz de 100J/cm, G4 dose de luz de 150J/cm. Amostras dos tumores foram colhidas para realização de exame histopatológico, imuno-histoquímica e qRT-PCR. Através da imuno-histoquímica observou-se que os tumores mamários induzidos quimicamente em ratas SD superexpressam Bcl-2 e Bax e tem baixa expressão de Her-2 e que isso não se altera com os diferentes tratamentos (G2,G3 e G4) quando comparado com o grupo controle (G1). Já através do qRT-PCR observou –se que o padrão de expressão de *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* não se altera nos diferentes tratamentos (G2,G3 e G4) quando comparado ao controle (G1). Não há evidência estatística de que a TFD influencie a expressão proteica e gênica de Bcl-2, Bax e Her-2 nas condições do experimento.

FERREIRA, I. **Influence of Photodynamic Therapy on the expression of genes BCL-2, BAX and HER-2 in mammary carcinogenesis.** Botucatu, 2012. 68p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic procedure used to treat malignancy which induces cell death by necrosis or apoptosis. In vitro and in vivo are performed to evaluate the success of therapy, as well as the responses and cellular changes that occur. This study aims to evaluate the expression of genes BCL-2, BAX and HER-2 and its protein related to cell proliferation and apoptosis in the efficacy of PDT, qualitatively assess the degree of necrosis caused by PDT at different doses and validate the technique of real time PCR with immunohistochemistry in breast tumors treated by PDT. For this 28 Wistar female Sprague-Dawley (SD) received a single dose of DMBA (80mg/kg by gavage) for induction of breast tumor, when the tumor clinical cytological examination was performed and the animals were divided into 4 groups G1: control group, untreated breast tumor; G2 treated with PDT using interstitial illumination with light dose of 50J/cm; G3 dose 100J/cm light, G4 light dose of 150J/cm. Samples of tumors were harvested for histological examination, immunohistochemistry and qRT-PCR. By immunohistochemistry it was found that the chemically induced mammary tumors in female rats SD overexpress Bcl-2 and Bax and has low expression of Her-2, and it does not change in either group (G2, G3 and G4) compared with the control group (G1). Already using the qRT-PCR showed that the expression pattern of BCL-2, BAX and HER-2 is not changed in different treatments (G2, G3 and G4) compared to control (G1). There is no statistical evidence that PDT influence the expression of gene and protein of Bcl-2, Bax and Her-2 in the experimental conditions.

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica promissora, que induz apoptose em células neoplásicas *in vitro* e *in vivo*. O estresse oxidativo e a indução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) são fatores que levam a morte celular por apoptose na TFD (OLEINICK e EVANS, 1998). Entender o mecanismo que envolve a apoptose mediada pela TFD pode aumentar a sua eficácia terapêutica. Está claro que existem múltiplas vias envolvidas nesse mecanismo, porém muitos estudos são necessários para entendê-los por completo (SRIVASTAVA et al., 2001).

A eficiência da TFD em induzir apoptose, depende inicialmente da localização preferencial do fotossensibilizador (FS). A maioria dos FSs acumulam-se na mitocôndria. Estudos sugerem que o dano mitocondrial é um evento precoce na apoptose mediada pela TFD, o que poderia resultar na liberação de fatores apoptóticos como o citocromo c, que por sua vez, ativa os alvos a jusante da apoptose (SRIVASTAVA et al., 2001; CHIU et al., 2003).

Como o inibidor da proteína quinase, estaurosporina (STS), existem FSs empregados na TFD que tem a capacidade de causar dano mitocondrial induzindo a apoptose rapidamente através da ativação da via mitocondrial da apoptose. Isso inclui a liberação de citocromo c, ativação de caspases, clivagem da Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), condensação da cromatina e por fim a fragmentação do DNA (CHIU et al., 2003).

Outros estudos revelaram que o alvo inicial de muitos fotossensibilizadores é a proteína antiapoptótica Bcl-2. Esta sequestra moléculas pró-apoptóticas como Bax e Bak, inibindo a apoptose. Além disso, a Bcl-2 inibe a liberação de citocromo c da mitocôndria enquanto as proteínas Bax e BID liberam o citocromo c da mitocôndria reforçando assim a resposta apoptótica. Portanto, danos a Bcl-2 e proteínas relacionadas, podem resultar na liberação de proteínas pró-apoptóticas dando início a apoptose (SRIVASTAVA et al., 2001; KESSEL e ARROYO, 2007).

Genes envolvidos na proliferação celular também podem atuar na regulação da apoptose. A proteína p53, por exemplo, retarda a proliferação e

induz apoptose, provavelmente pela ativação do gene Bax, evidenciando que os processos de proliferação e a apoptose em sua regulação encontram-se interligados (FRETT-CONTE e SALLES, 2002).

A descoberta do papel do fator de crescimento epidermal humano 2 (*HER-2*) foi um dos marcos na pesquisa do câncer de mama nas últimas duas décadas. Foi demonstrado que em até 25% dos cânceres de mama esse gene sofre amplificação, tornando-o capaz de estimular a divisão e a proliferação celular. Em consequência, os tumores *HER2+* demonstraram crescimento mais acelerado, maior capacidade de metástases e menor relação entre os fatores prognósticos tradicionais e o tempo de sobrevida (HICKS e KULKARNI, 2008).

A proteína *HER2* é conhecida por regular a via da fosfatidilinositol -3 cinase/cinas B (*PI3K / Akt*), que desempenha um importante papel na promoção da proliferação e da inibição da morte celular e é um mediador de multirresistência. Além disso parece ter importante contribuição para a resposta antiproliferativa à TFD, em relação a necrose, apoptose e remissão do tumor (MARTINEZ-CARPIO e TRELLES, 2010).

Parece claro que as terapias antineoplásicas que atuam no ciclo celular requerem a via apoptótica intacta para destruir o tumor. Portanto, o conhecimento de alterações nessa via poderia contribuir para o entendimento das falhas na terapêutica escolhida. As terapias antineoplásicas recentes tem por base a utilização de drogas que atuam nas vias pró-apoptóticas, como a ativação das caspases e a restauração da função da proteína *p53*, ou nas vias pró-sobrevivência como regulação da família de genes *BCL-2* (ITOH et al., 2000; SENDEROWICZ, 2004).

As células cancerosas frequentemente exibem falhas nas vias da apoptose, devido, por exemplo, a expressão aumentada de oncogenes, ou a diminuição da função ou perda de genes supressores tumorais. Os sinais que estimulam a morte celular e a cascata de eventos que levam à apoptose constituem, hoje, importantes alvos na pesquisa de novas drogas antineoplásicas (BLAND et al., 2004; VITA JR et al., 2005).

As novas tendências terapêuticas do tumor de mama em mulheres têm por objetivo procedimentos cirúrgicos menos mutilantes, como a mastectomia

segmentar e a dissecação axilar com radioterapia pós-operatória. Enquanto tal terapia é menos mutilante a radioterapia profunda pode ter efeitos adversos. Portanto, modalidades novas e mais seguras para o tratamento do tumor de mama primário devem ser pesquisadas (MATHEWS et al., 2012).

Neste sentido, em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa avaliou a eficácia de TFD em tumores mamários quimicamente induzidos pelo DMBA em ratas da linhagem *Sprague-Dawley*. Os resultados mostraram que a TFD é eficaz como terapia única para reduzir a velocidade do desenvolvimento dos tumores e, como adjuvante à cirurgia, para evitar recidivas. Entretanto, embora a TFD tenha diminuído a velocidade de crescimento tumoral não houve remissão total do tumor (FERREIRA et al., 2012). Considerando que nesse estudo foi verificada a presença do fotossensibilizador no tumor no momento da iluminação, e que a luz atingiu o tecido alvo, acredita-se que por fatores endógenos os resultados não foram satisfatórios. Por esta razão ficou evidenciada a necessidade de estudos mais abrangentes, visando investigar a ação de componentes endógenos para a maior eficiência da TFD. Pretendeu-se, no presente estudo, avaliar a expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* e de suas proteínas, relacionados à proliferação celular e apoptose, na eficácia da TFD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terapia fotodinâmica

O tratamento oncológico tem como objetivo primordial a eliminação do tumor, seja por via mecânica (remoção cirúrgica), via química (quimioterapia) ou por radiação ionizante (radioterapia). Essas terapias podem ser utilizadas individualmente ou em associação e todas elas têm mostrado eficiência, principalmente quando a doença é detectada nos seus estágios iniciais. Apesar deste sucesso, ainda existem inúmeros casos em que as técnicas convencionais se mostram bastante limitadas. Além disso, para muitos casos, a única opção tem sido a cirurgia radical, o que compromete a função e a anatomia do órgão ou região residual. Assim sendo, novas pesquisas devem ser realizadas no sentido de buscar maior eficácia para os tratamentos oncológicos (BAGNATO et al., 2002).

Uma promissora opção para terapia oncológica é a terapia fotodinâmica (TFD) (KURACHI et al., 2002).

O uso da luz em medicina vem se tornando extremamente importante, ela é usada para fotocoagulação e no tratamento do câncer, por exemplo. O uso da luz para o tratamento de doenças em humanos tem uma longa história que antecede a antiguidade (DANIELL e HILL, 1991).

Um dos relatos mais antigos do uso da luz no tratamento de doenças data de 1400 d.C. Foi descrito o uso de sementes de certas plantas e a luz do sol para tratar vitiligo, leucoderma e doenças similares. Em 1903 Herman von Tappeiner descobriu que o oxigênio era necessário para se obter uma boa resposta nesses tratamentos e então criou o termo “terapia fotodinâmica” (LUCROY et al., 2000).

Esta é uma modalidade de tratamento que vem se desenvolvendo nos últimos anos. Os mecanismos da TFD que causam dano tecidual envolvem uma complexa interação entre a célula, o fotossensibilizador (FS) e a luz no comprimento de onda adequado. Para ser fotoativo, quantidades adequadas de

FS e luz devem ser depositadas simultaneamente no tecido alvo na presença de oxigênio (MARTHY et al., 1990; FREITAS e BARONZIO, 1991).

Durante a terapia fotodinâmica, o FS ligado ao tumor é ativado na presença da luz. Essa ativação leva o agente FS do estado fundamental ao estado excitado. As moléculas excitadas podem retornar ao estado fundamental emitindo energia na forma de fluorescência, por meio da liberação de fótons, ou progredir na cadeia de reações químicas transformando-se na espécie reativa chamada tripleto. As moléculas no estado tripleto podem interagir diretamente com substratos biológicos e formar radicais livres, denominada de reação tipo I, ou podem transferir sua energia diretamente para o oxigênio celular e formar o oxigênio singlete, altamente reativo e responsável pela morte celular, chamada de reação tipo II (DANIELL e HILL, 1991; HENDERSON e DOUGHERTY, 1992; MACHADO, 2000).

As propriedades de um FS ideal incluem não toxicidade sistêmica, seletividade para o tecido neoplásico, eficácia em gerar espécies reativas de oxigênio quando excitado por uma luz de comprimento de onda adequado e rápida eliminação pelo tecido normal. A maior preocupação em relação aos FSs é a prolongada fotossensibilização cutânea e ocular que ele causa. Como exemplo, os FSs derivados da hematoporfirina (HpD), como o Photofrin, Photogem e Photosan podem causar fotossensibilização cutânea por até oito semanas após a sua aplicação (MERKEL e BIEL, 2001; LUCROY, 2002).

Diferentes FSs têm sido estudados para o uso em cães e gatos com câncer, incluindo os HpD, Ácido 5-aminolevulínico (ALA), Foscan, Pyropheophorbide-a-hexil ether (HPPH), Aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride (AlpcS₄) e 5-ethylamino-9-diethylaminobenzo [a] phenothiazinium chloride (EtNBS) (LUCROY, 2002). Esses podem ser administrados por via intravenosa ou tópica (MERKEL e BIEL, 2001).

Em relação às fontes de luz, o desenvolvimento de lasers para uso em Medicina no final do século XX apresentou às pesquisas com TFD uma ferramenta capaz de fornecer grande quantidade de luz monocromática (MACHADO, 2000; LUCROY, 2002).

A propagação da luz no tecido biológico é resultado de todos os eventos que acontecem desde a incidência do feixe, sendo aproximadamente 3% da luz incidente refletida pelo tecido. O restante, penetra no tecido, sofrendo ação da absorção e do espalhamento, que dependem do comprimento de onda da luz incidente e das características intrínsecas do tecido (PRAHL et al., 1993; HOURDAKIS e PERRIS, 1995).

A TFD tem como vantagens a repetição sem resistência ao fármaco, pode ser utilizada associada a outras terapias e produz uma mutilação mais discreta ou mesmo ausente quando comparada à cirurgia, mantendo assim a estética, pois a destruição tecidual é seletiva (MERKEL e BIEL, 2001). Observa-se controle local do processo maligno, sem dano extenso as estruturas normais circundantes, sendo esse fator uma vantagem da TFD em relação à quimioterapia e a radioterapia (DANIELL e HILL, 1991). A desvantagem é a fotossensibilização quando se emprega FS de primeira geração, como os derivados da HpD (MERKEL e BIEL, 2001) e o limite de penetração da luz no tecido. Logo após a TFD pode-se observar edema, eritema e necrose secundária no local de aplicação, mas que regride com o tempo (RUSLANDER et al., 1997). As maiores causas da baixa eficiência na terapia são a dosimetria inadequada de luz e/ou a ação insatisfatória do fotossensibilizador, fatores esses que estão sendo constantemente aprimorados pela interação de profissionais de áreas afins (DANIELL e HILL, 1991).

A TFD é uma terapia aprovada pela *US Food Administration* (FDA) para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias malignas, como de esôfago e de brônquios em humanos (LIGHTDALE et al., 1995; DOUGHERTY et al., 1998). Os primeiros relatos do uso da TFD em animais com tumores espontâneos ocorreram por volta de 1980 quando cães e gatos receberam, por via intravenosa, HpD, e foram irradiados com laser. Esses estudos incluíram animais com os mais variados tipos de tumores, e a maioria deles foi considerada responsivo, mostrando o potencial clínico dessa terapia no tratamento de cânceres (LUCROY et al., 2000; LUCROY, 2002; RIBEIRO et al., 2004).

Atualmente, a TFD se tornou uma importante ferramenta para dermatologistas e oncologistas veterinários (LUCROY et al., 2000; LUCROY, 2002). Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa utilizou a técnica para o tratamento de carcinoma de células escamosas em gatos, utilizando um HpD (Photogem®) como fotossensibilizador e um dispositivo a base de LEDs (diodos emissores de luz) como fonte de luz, conseguindo um controle local das lesões em estágios iniciais e um controle da recorrência dos tumores invasivos após a cirurgia (FERREIRA et al., 2009).

2.2. Apoptose celular e TFD

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células indesejáveis ao organismo tais como as que cumpriram o ciclo de vida ou que sofreram alterações no material genético (PAROLIN e REASON, 2001; RIBEIRO et al., 2004).

Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases. Esse fenômeno biológico, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado ao curso de inúmeras doenças, como as neoplasias (KERR et al., 1972; KESSEL et al., 1997; RIBEIRO et al., 2004; GRIVICICH et al., 2007).

A apoptose ocorre na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (PAROLIN e REASON 2001; RIBEIRO et al., 2004).

Os fatores que podem desencadear a apoptose são: a ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (RIBEIRO et al., 2004).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas maneiras: pela via extrínseca, citoplasmática, ou pela via intrínseca, mitocondrial. A intrínseca envolve a liberação mitocondrial do citocromo c e fatores pró-apoptóticos como Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, EndoG, associados a ativação da caspase 9. Já a extrínseca é originada a partir de ligações de fatores químicos nos receptores de morte presentes na superfície da membrana plasmática como o “Fas”, resultando na ativação da caspase-8 e caspase-10 (KESSEL et al., 1997; PAROLIN e REASON, 2001; RIBEIRO et al., 2004).

A compreensão dos mecanismos apoptóticos permitiu o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer. Tais estratégias são embasadas na indução da morte das células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (PAROLIN e REASON 2001; RIBEIRO et al., 2004).

A apoptose pode ser induzida por TFD, dependendo da linhagem celular e do fotossensibilizador empregado (KESSEL et al., 1997).

Zaidi et al. (1993) avaliaram a indução da apoptose pela TFD após a retirada do tumor. Foi utilizado uma linhagem de fibrossarcoma induzido por radiação (RIF-1), empregando três FSs, Photofrin-II, chloroaluminum ftalocianina tetrasulfonate, ou ftalocianina 4 (Pc 4). Todos os FSs foram injetados por via intraperitoneal e após 24h os tumores foram irradiados com laser de argônio. Os tumores foram removidos em 1, 2, 4 e 10h pós-TFD e amostras foram submetidas a análise histopatológica e de microscopia eletrônica. Observou-se que os marcadores de apoptose, corpos apoptóticos e a condensação da cromatina foram evidentes no tecido tumoral, já nos tumores removidos 1h pós-TFD a extensão dessas alterações aumentou durante os últimos estágios da remoção cirúrgica do tumor. Nenhuma mudança foi observada em tumores que receberam o fotossensibilizador sozinho ou que

somente foram irradiados. Esses dados sugerem que o dano produzido pela TFD *in vivo* pode ativar endonucleases e a condensação da cromatina, e que a apoptose é um evento precoce na redução do tumor após a TFD.

Kessel et al. (1997), avaliaram a resposta fotodinâmica utilizando dois fotossensibilizadores estruturalmente semelhantes em linhagem celular de leucemia de ratos (P388). O dano causado pela luz, mediado por estanho etiopurpurin, cujos alvos são lisossomos e mitocôndria resultou em uma rápida resposta apoptótica, núcleos apoptóticos foram observados em 60 minutos após a TFD. Utilizando uma droga análoga, estanho *octaethylpurpurin amidina*, cujos alvos são lisossomos, mitocôndria e membrana celular, os núcleos apoptóticos não foram observados em até 24h após a TFD. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que o dano a membrana celular causado pela luz pode retardar ou inibir a resposta apoptótica mediada pela TFD.

Martines et al. (2007) realizaram a TFD utilizando o agente fotossensibilizador Zinco Ftalocianina (ZnPc) em linhagem celular Hep- 2 (carcinoma de traquéia humano- ATCC), sendo observado que essa linhagem celular, após tratamento fotodinâmico com ZnPc sofre morte celular por apoptose.

2.3 Genes *BCL-2* e *BAX*

O gene *BCL-2*, com 230kb de tamanho e mapeado no cromossomo 18q21, pertence a uma família de cerca de 25 genes dos mamíferos que codificam proteínas que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. Estas proteínas podem ser pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak e Bok, entre outras) ou anti-apoptóticas (Bcl-2 propriamente dito, Bcl-xL, e Bcl-w, entre outros) (de JONG et al., 1994; YANG et al., 1995; PETROS et al., 2001).

O nome Bcl-2 deriva, do inglês *B-cell lymphoma 2* (linfoma de células B 2), pelo fato de ser o segundo membro de um conjunto de proteínas inicialmente descritas em linfomas foliculares (TSUJIMOTO et al., 1985; CLEARY et al., 1986; CHAO e KORSMEYER, 1998). Este gene codifica uma proteína oncogênica de 24-26 kDa localizada dentro da membrana da

mitocôndria, retículo endoplasmático e envelope nuclear, que apresenta como função a inibição da apoptose celular. A expressão aumentada do gene *BCL-2* está relacionada ao câncer de mama, próstata, pele, cólon e pâncreas (TSUJIMOTO et al., 1985; HOCKENBERY et al., 1990; CHAO e KORSMEYER, 1998).

Hockenbery et al. (1991) observaram a expressão de Bcl-2 em vários tecidos humanos adultos e observaram que esta pode ser expressa no tecido epitelial glandular, cuja hiperplasia ou involução é regulada por fatores hormonais ou de crescimento; no tecido epitelial com diferenciação complexa, caracterizado por células-mães com longa sobrevivência, como intestino e pele; e em células pós-mitóticas com longa sobrevivência, como neurônios. O epitélio ductal mamário se enquadraria na primeira categoria.

No câncer de mama, estudos relatam o possível papel do gene *BCL-2* como fator prognóstico e preditivo, sugerindo que seu padrão de expressão pode ter correlação com a resposta terapêutica em pacientes com linfonodos axilares positivos, agindo como modulador da resposta terapêutica (GEE et al., 1994; ELLEDGE et al., 1997; ZHANG et al., 1998; JALAVA et al., 2000).

Srivastava et al. (2001) demonstraram que os membros da família Bcl-2 desempenham um importante papel na via da apoptose mediada pela TFD e no reequilíbrio entre genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da mesma família, determinando a suscetibilidade das células à apoptose mediada pela TFD. Foi avaliado o papel da Bcl-2 em células de fibrossarcoma induzido por radiação (RIF-1) e em células de carcinoma epidermóide humano submetidas a TFD. O fotossensibilizador utilizado foi uma ftalocianina (Pc 4) e como fonte de luz, uma lâmpada halógena, a avaliação foi feita por meio da citometria de fluxo e *Immunoblot*. Os autores observaram que a TFD com Pc 4 causou dano fotoquímico a Bcl-2, mas a Bcl-2 danificada pela luz não foi fosforilada nem convertida em moléculas pró-apoptóticas. O dano causado pela luz inibiu a capacidade da Bcl-2 de prevenir a apoptose, mas quando foram detectados altos níveis de Bcl-2 ou mutações funcionais nesta proteína, altas doses de luz foram necessárias para produzir dano suficiente para inativar grande quantidade de Bcl-2. A extensão do dano a Bcl-2 causado pela luz determinou

a sensibilidade das células cancerosas à apoptose e morte celular global causada pela TFD.

Xue et al. (2001) demonstraram através do *Western blot*, que a proteína anti-apoptótica Bcl-2 é altamente sensível a TFD com o fotossensibilizador Pc 4. A perda de expressão da Bcl-2 foi TFD dose dependente, ou seja, quanto maior a dose de luz empregada maior a inibição da Bcl-2. Este resultado foi observado, imediatamente após a TFD, tanto na proteína Bcl-2 endógena quanto na presente em diversas linhagens celulares. Neste estudo também foi evidenciado a perda da Bcl-2 após TFD em linhagem celular de carcinoma mamário humano (MCF-7) que não expressam caspase-3 ou que apresentaram uma protease inibidora. Entretanto a perda da Bcl-2 foi prevenida juntamente com a indução da apoptose pela L-histidina, aminoácido que apresenta a capacidade de suprimir o oxigênio singlete. A perda da FLAG-Bcl-2, um polipeptídeo de proteína (epítipo recombinante), foi observada tanto no anticorpo anti-FLAG como no anti-Bcl-2, indicando a perda de espécies nativas da proteína em vez da simples destruição do epítipo Bcl-2. Este estudo não detectou dano fotoquímico nas proteínas Bcl-xL, Bax, Bad, e pelos resultados obtidos indica que a proteína Bcl-2 pode ser considerada um alvo da TFD com o Pc 4, pois os danos causados pela TFD a esta proteína contribuíram para a eficiente indução da apoptose.

Usuda et al. (2003) relataram o uso da TFD com Pc 4 como FS e LED como fonte de luz, em linhagem de células MCF-7c3 com expressão aumentada do tipo selvagem da proteína Bcl-2. A análise por citometria de fluxo mostrou que o tipo selvagem de Bcl-2, Bcl-2D33-54 e Bcl-2D37-63 protegem as células da apoptose induzida pela TFD com Pc 4. Em contraste, a Bcl-2D210-239, que precisa do domínio transmembrana C-terminal e não pode ser danificada pela luz, não concede nenhuma proteção. Em seguida, estes autores avaliaram a sensibilidade de linhagens celulares transfectadas estavelmente com superexpressão de Bcl-2 do tipo selvagem ou uma das Bcl-2 mutantes a TFD. A expressão aumentada do tipo selvagem Bcl-2, Bcl-2D33-54 ou Bcl-2D37-63 resultou em relativa resistência das células a Pc 4-TFD. Além disso, a expressão aumentada de Bcl-2 também inibiu a ativação apoptótica

associada a mudança conformacional da proteína pró-apoptótica Bax, e doses mais elevadas de Pc 4 e luz foram necessárias para ativar a Bax em células que expressam altos níveis de Bcl-2. Muitos tumores em estádios avançados apresentam células com elevadas quantidades de Bcl-2. Os resultados desse estudo mostraram que o aumento da dose de luz durante a TFD utilizando Pc 4 pode superar a resistência conferida por qualquer Bcl-2. O protocolos da TFD que causam dano a Bcl-2 levam à ativação da Bax, indução da apoptose e a eliminação das células tumorais resistentes.

Crescenzi et al. (2004) investigaram em células de tumor de mama os efeitos da TFD combinada com baixas doses de quimioterapia. A TFD foi realizada em linhagem de células MCF-7, utilizando indocianina verde como FS e um laser de diodo na região do infravermelho em 805 nm como fonte de luz. A cisplatina foi utilizada para a quimioterapia. A dose-resposta associadas com os dois tratamentos administrados individualmente e em conjunto foram avaliados utilizando os testes de viabilidade celular por meio do teste de exclusão com tripan blue, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e ensaio de sobrevivência clonogênica. Para avaliar o *status* metabólico foram utilizados os testes de incorporação de metionina e citometria de fluxo. Os resultados demonstraram reforço mútuo da eficácia terapêutica. Foram investigadas também as alterações na proliferação celular e apoptose, avaliando por *Western blot* a expressão das proteínas Bcl-2, Bax, Bcl-XL, p21, p53, e da polimerase poli (ADP-ribose) (PARP). Foi observado que a TFD causou a destruição seletiva de Bcl-2 e aumento da expressão de Bax e também induziu apoptose em uma fração limitada de células (10-12%). Dados de citometria de fluxo mostraram que a TFD leva a morte, em sua maioria, as células que se encontram na fase G1, enquanto que a cisplatina leva a morte, em sua maioria, as células que estão na fase S do ciclo celular. Este fato pode explicar os efeitos favoráveis exercidos pelo tratamento combinado. Os resultados sugerem que baixas doses de drogas citostáticas podem ser tão ou mais eficazes que as doses atualmente usadas, se devidamente combinados com TFD.

Xue et al. (2007) demonstraram através do *Western blot* e citometria de fluxo, que a Bcl-2 não inibe a apoptose causada pela TFD com Pc 4, como avaliado pela perda de clonogenicidade, em células deficientes em apoptose (DU145 e MCF-7v), enquanto que a Bcl-2 superexpressa inibe a apoptose em células competentes (5A100 e MCF-7c3). Assim, a superexpressão de Bcl-2 inibe a apoptose, pois inibe a liberação do citocromo c, porém a apoptose é inibida somente em células com capacidade de entrar em apoptose.

Usuda et al. (2008) demonstraram utilizando *Western blot* e microscopia de fluorescência que a TFD empregando o FS Photofrin causou danos a Bcl-2, induzindo a apoptose, e demonstrou igual sensibilidade em um ensaio clonogênico entre as células MCF-7c3 e células com expressão aumentada de Bcl-2, células MCF-7c3 -GFP-Bcl-2. No entanto, a TFD utilizando o FS NPe6 não danificou a proteína Bcl-2 e levou um tempo maior para induzir a apoptose quando comparada a TFD utilizando o Photofrin (HpD-TFD). Em conclusão, os danos causados pela HpD-TFD ocorreram em diferentes alvos moleculares, e os dados indicam que o grau de dano a Bcl-2 produzido pela luz pode determinar a sensibilidade das células cancerosas à apoptose e morte celular global induzido pela TFD usando Photofrin mas não utilizando o NPe6. A aplicação dessas conclusões a TFD clínica é que a apoptose pode depender dos níveis de expressão da proteína Bcl-2 no tumor a ser tratado, e o tratamento feito sob medida com base no dano a Bcl-2 causado pela luz pode superar qualquer resistência oferecida pelos altos níveis de Bcl-2.

Ferenc et al (2010) utilizaram a combinação de genisteína e TFD com a hipericina como FS com o objetivo de alcançar um maior efeito na resposta da TFD em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, ambas identificadas nas condições do estudo como resistentes a terapia. Desde que a genisteína é conhecida por inibir a expressão de Bcl-2, supôs-se que a terapia fotodinâmica com hipericina poderia beneficiar a mútua combinação terapêutica. De fato, o tratamento combinado levou a inibição de Bcl-2 e aumento da expressão de Bax em ambas as linhagens celulares. Variações na sinalização da morte celular, favorecendo a apoptose foram efetivamente acompanhados de parada do ciclo celular na fase G2, ativação de caspase-7, a clivagem da Poli (ADP-

ribose) polimerase (PARP) e aumento do número de células com núcleo morfológicamente semelhante ao núcleo de células apoptóticas. Todos esses eventos culminaram com a inibição da proliferação. Os autores concluíram que o pré-tratamento com genisteína pode melhorar a eficácia da terapia fotodinâmica com hipericina nas linhagens de células MCF-7 e MDA-MB-231.

A proteína Bax promove a morte celular e é uma das proteínas mais estudadas da subfamília pró-apoptótica (FURTADO-VELOSO et al., 2008). As ações da Bax parecem ser neutralizadas quando heterodimerizada com a Bcl-2 e alguns outros membros supressores da apoptose da família Bcl-2. Acredita-se que a redução da expressão da proteína Bax deva aumentar a expressão da Bcl-2, e pode ser um meio de promover quimioresistência das células tumorais (BASU e HALDAR, 1998).

Também foi demonstrado que a expressão da Bax pode ser diretamente induzida pelo gene supressor tumoral *TP53* (MIYASHITA et al., 1994; SELVAKUMARAN et al., 1994) e que a radiação ionizante induz a expressão da Bax nas linhagens de células tumorais sensíveis, mas não nas resistentes (ZHAN et al., 1994). Assim, a Bax pode desempenhar um papel importante na eliminação das células tumorais por apoptose. A Bax sofre uma alteração de conformação (exposição de um epítipo detectado pelo anticorpo 6A7), bem como a translocação do citosol para mitocôndrias imediatamente ou logo após a TFD (CHIU et al., 2003).

Chiu et al. (2003) demonstraram, utilizando *Western blot* e citometria de fluxo, que a linhagem de células de carcinoma prostático humano DU – 145, é resistente a apoptose induzida pela TFD em virtude da falta de Bax. No entanto, apesar da inibição da apoptose e Bax negativo, a linhagem de células DU-145 apresentaram fotossensibilidade, assim como a linhagem de células MCF-7c3, com expressão aumentada de Bax. Desta forma, pode-se concluir que para a TFD, utilizando como FS o PC 4, a morte celular deve ocorrer antes da ativação da Bax.

2.4 Gene *HER-2* (*ERBB-2*)

O gene *Her-2* ou *erbB-2* é um oncogene bastante estudado em tumores de mama. Este gene está localizado no cromossomo 17q21 e codifica uma glicoproteína transmembrana de 185 KDa denominada p185neu/p285erbB-2, que contem um domínio extracelular de ligação e um domínio de atividade intracelular de tirosina quinase (LEITZEL et al., 1995; FICHE et al., 1999). Aproximadamente, de 20 a 25% dos tumores de mama apresentam amplificação deste oncogene, sendo que os índices aumentam para 40% quando as pacientes linfonodo positivas são incluídas (HAN et al., 1997).

A expressão aumentada da oncoproteína *Her-2* acarreta autofosforilação do receptor específico e subsequente ativação de quinases envolvidas em mecanismos de transdução de sinais, o que eventualmente afeta a transcrição de genes reguladores da progressão do ciclo celular (LEITZEL et al., 1995). Este aumento de expressão tem sido associado com o pior prognóstico e a resistência a determinadas drogas anti-tumorais em pacientes com câncer de mama (SHARMA et al., 1999; ABREU e KOIFMAN 2002).

A inibição do gene *HER-2* e/ou a degradação da proteína *Her-2* parece ser um grande efeito da TFD. A TFD leva a uma redução tempo-dependente da expressão de *HER-2* e a inibição da fosforilação da tirosina durante a regressão de tumores, também é sabido que a inibição de *HER-2* resulta em morte celular por apoptose. Durante a reação a TFD, células normais e malignas perdem sua capacidade de resposta ao *HER-2* (MARTINEZ-CARPIO e TRELLES, 2010).

Koval et al (2010) relataram o uso de hipericina na TFD (HY-TFD) em combinação com um inibidor seletivo *HER-2* (AG 825) em SKBR-3, uma linhagem celular de adenocarcinoma mamário com expressão aumentada de *HER-2*. Os resultados demonstraram que HY-TFD foi capaz de inibir *HER-2* influenciando assim na cascata de sinalização. A combinação com AG 825 resultou em aumento da apoptose e a total inibição do *HER-2*. A diminuição da regulação de HSP90, Mcl-1, Bcl-xL e a o aumento da regulação da Bax

também foi observado. Este resultado forneceu a base para posterior aplicação de HY-TFD em modelos pré-clínicos e clínicos no tratamento do câncer de mama.

Solár et al. (2011) mostraram o efeito da TFD utilizando a hipericina (HY-TFD) na expressão do *HER-2*, em linhagem de células SKBR-3 e MCF-7 com diferentes *status* de *HER-2*, utilizando PCR em tempo real e *Western Blotting*. Observou-se que a diminuição da expressão do *HER2-RNA* induzida pela TFD foi revertida pelo trolox (degradador de oxigênio singlete) o que indica que o oxigênio singlete pode desempenhar um papel importante não apenas nos efeitos citotóxicos e/ou antiproliferativos da HY-TFD, mas também na supressão da expressão do gene *HER-2*. Além disso, a prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo pré-tratamento com trolox bloqueou efetivamente a atividade antiproliferativa da hipericina. Esse estudo demonstrou que houve degradação do receptor *HER-2* mediada pela HY-TFD via atividade lisossômica, o que sugere que a baixa regulação da expressão do gene *HER2* pode também ter um impacto significativo sobre a presença do receptor *HER-2* após a HY-TFD. Estes resultados demonstram que a TFD, como terapia única ou em combinação com terapias convencionais, pode ser utilizada no tratamento do câncer de mama com expressão de *HER-2*.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* e de suas proteínas, relacionados à proliferação celular e apoptose, na eficácia da TFD.
- Avaliar qualitativamente o grau de necrose causado pela TFD em diferentes doses.
- Validar a técnica de PCR em tempo real e com a imuno-histoquímica (para os genes *BCL-2*, *BAX* E *ERBB-2*) em tumores de mama tratados por TFD, buscando compreender o efeito da TFD sobre a biologia do crescimento tumoral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa 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: 72/2009-Anexo).

4.1 Animais

Foram utilizadas 28 ratas, sendo divididas em 4 grupos com sete animais, com idade entre 35 e 55 dias, nulíparas, da linhagem *Sprague-Dawley* adquiridas do biotério de criação CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP). Os animais permaneceram no Biotério Experimental da Patologia FMB-UNESP, com período de luz, temperatura e umidade controlados, mantidos em ambiente com quatro períodos de exaustão do ar ambiente e nível máximo da amônia > 5 ppm. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

A neoplasia mamária foi induzida com 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA – Sigma –aldrich) na dose de 80 mg/kg dissolvido em óleo de soja, por gavagem.

Os animais foram submetidos diariamente à inspeção de viabilidade e, semanalmente, a exame clínico, até o desenvolvimento do tumor, quando, então, foi realizada a medição das massas tumorais com o auxílio de um paquímetro. Foi realizada a leitura dos tumores em 3 dimensões (altura (L1), largura (L2) e comprimento (L3)).

4.2 Diagnóstico citológico

O diagnóstico microscópico foi realizado por exame citológico, por capilaridade. Para tanto, foi utilizado algodão embebido em álcool iodado para antissepsia local, agulhas 13 x 4,5 e seringas descartáveis de 10 ml. O material colhido foi distendido sobre lâmina histológica, seco em temperatura ambiente, fixado com metanol e álcool 95%, corado por Giemsa e Papanicolaou. As lâminas foram analisadas à microscopia de luz em aumento de 400X. O tumor

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

4.3 TFD

Os animais foram distribuídos em 4 grupos:

- G1 – 7 animais - controle - tumor de mama não tratado;
- G2 – 7 animais - animais submetidos a TFD com dose de luz de 50 J/cm
- G3 – 7 animais - animais submetidos a TFD com dose de luz de 100 J/cm
- G4 – 7 animais submetidos a TFD com dose de luz de 150 J/cm

O fotossensibilizador utilizado foi o Photogem[®] (HpD; Rússia), um derivado de hematoporfirina. O FS foi previamente diluído em soro fisiológico 0,9%, na concentração de 200 mg/ 40 ml e, em seguida, administrado por via intraperitoneal na dose de 12 mg/kg.

A fonte de luz utilizada foi um laser de Diodo Ceralas 630 Ceramoptec[®] (Alemanha), que produz até 2 W de potência óptica no comprimento de onda de 630 nm. A intensidade utilizada foi de 200 mW/cm. O tempo de iluminação das lesões dos animais do grupo 2 foi de 250 segundos, do grupo 3, 500 segundos e do grupo 4, 750 segundos.

Para realizar a iluminação os animais foram pré-anestesiados com atropina (0,044 mg/kg via subcutânea) e, 10 minutos após, foram anestesiados com Xilazina 2% 20 mg (0,2 ml/100 g p.c; Vetbrands[®], Brasil) e Quetamina 50 mg (Vetaset; Fort Dodge, Brasil) via intramuscular.

A iluminação do tumor ocorreu após 24 horas da administração do FS sendo realizada intersticialmente por meio de uma fibra óptica difusora acoplada ao laser, como se observa na Figura 1.

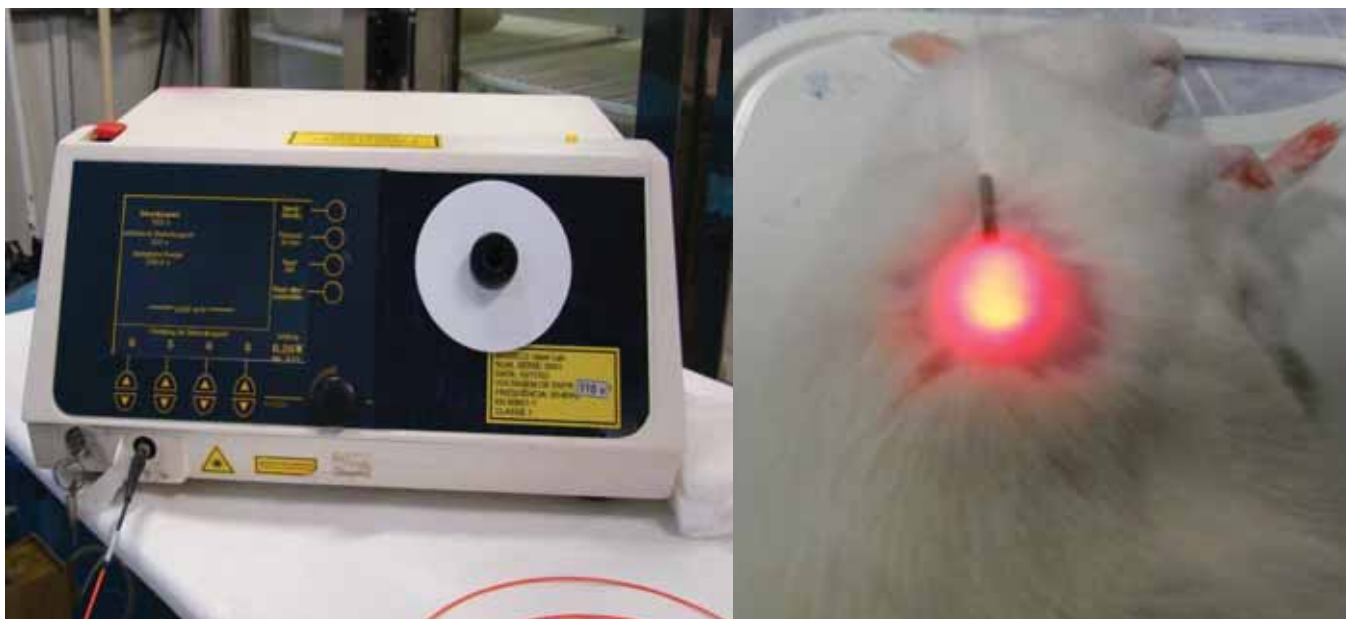


Figura 1. Tumor de mama induzido pelo DMBA em ratas SD. Iluminação do tumor com fibra difusora de 1 cm, acoplada ao laser de Diodo em 635 nm.

Após 30 horas os animais foram anestesiados profundamente com isoflurano e posteriormente submetidos á eutanásia por transecção das veias jugulares, os tumores foram colhidos e as amostras foram separadas de acordo com análise a que foram submetidas.

4.4 Histopatologia

Para a realização do exame histopatológico foi utilizado um fragmento de um tumor de cada animal, o material foi fixado com formalina tamponada a 10% e posteriormente incluídos em blocos de parafina, os cortes foram confeccionados em micrótomos rotativos com espessura de 3 μ m, e colocados em estufa para desparafinizar e posteriormente corados pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Histologicamente foram analisadas as diferenças morfológicas do tecido alterado em relação ao tecido normal e o tipo de necrose observado. Foi

realizada uma comparação entre as doses de luz utilizadas e a profundidade de necrose no tecido mamário.

4.5 Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica, secções histológicas de 3 µm de espessura foram obtidas e subsequentemente desparafinizados e reidratados. Os anticorpos primários, diluições e métodos de recuperação antigênica para cada anticorpo utilizado neste estudo estão sumarizados na Tabela 1. Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, o reagente *Peroxidase block* fornecido no kit *NovoLink Polymer Detection System* (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) foi aplicado sobre os cortes durante 10 minutos. Subsequentemente, o reagente *protein block* fornecido no mesmo kit foi aplicado durante 30 minutos sobre os cortes histológicos de modo a bloquear reações inespecíficas.

Os anticorpos primários foram incubados *overnight* nos cortes histológicos a 4° C. Após isso, o sistema de visualização baseado em polímero *NovoLink Polymer Detection System* (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) foi utilizado para detecção da reação antígeno-anticorpo.

Subsequentemente, o reagente 3,3' diaminobenzidina (DAB) foi utilizado como cromógeno para visualização da reação antígeno-anticorpo. Posteriormente, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados utilizando Permount (Fisher Scientific, EUA) para visualização em microscopia de luz. Para fins de controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por tampão salina-fosfato pH 7,4 em cada amostra. Como controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de linfonodo de rato para os anticorpos anti Bax e Bcl-2 e amostras de carcinoma mamário de rata sabidamente positivos para c-erbB2 no caso da aplicação do mesmo.

Tabela 1. Anticorpos primários, diluições e métodos de recuperação antigênica.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Clone</i>	<i>Fonte</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação antigênica</i>
Bax	Dako, EUA	Policlonal	Coelho	1:50	Banho-Maria, EDTA pH 8,0
Bcl-2 oncoprotein	Dako, EUA	124	Camundongo	1:50	Banho-Maria, EDTA pH 8,0
c-erbB2	Dako, EUA	Policlonal	Coelho	1:2000	Câmara microprocessada de pressão, citrato 10mM, pH 6,0

Para o Her-2, graduações de intensidade de coloração foram estabelecidas semiquantitativamente através de análise óptica baseado no sistema de graduação Hercep Test (Tabela 2); 0 = sem marcação membranar ou em menos do que 10% das células; 1+ = reação fraca com marcação membranar pouco perceptível em mais do que 10% das células, ou marcação parcial da membrana nas células; 2+ = reação fraca a moderada onde a marcação membranar é completa em mais do que 10% das células; 3+ - marcação membranar completa, forte, em mais do que 10% das células. Os resultados foram classificados como positivos (superexpressão) quando o tecido for classificado como 2+ ou 3+.

Tabela 2. Classificação da intensidade de marcação de Her-2 de acordo com o Hercep Test (DAKO, 2000).

ESCORE	NÍVEL DE IMUNOEXPRESSÃO	PADRÃO DE MARCAÇÃO
0	Negativo	Ausência de marcação membranar <10% das células
1+	Negativo	Não há marcação membranar completa; marcação discretamente perceptível em <10% das células
2+	Discretamente positivo	Marcação membranar completa discreta a moderada em >10% das células
3+	Acentuadamente positivo	Marcação membranar completa acentuada em >10% das células

Para Bcl-2 e Bax, a expressão foi quantificada como a porcentagem relativa da área de coloração positiva. Um valor médio de cinco campos aleatórios de maior aumento (400x) foi selecionado para a expressão de Bcl-2 e Bax. Foi utilizado o programa Image J[®] para a análise das imagens com o método K-means clustering. Esse método executa a segmentação da imagem baseada em pixels. Seleciona-se *Plugins>Segmentation>K-means clustering*. Em configuração do *K means* foi selecionado 0.00010 *cluster center tolerance* e *randomization seed* de 48. Os histogramas foram obtidos em imagens de 8-bit. O número de *cluster* variou entre 4 e 18 dependendo da necessidade de cada imagem.

Foi considerado positivo para Bcl-2 e Bax um limite de 10% de células tumorais positivas com padrão citoplasmático distinto. Os critérios para

interpretação de Bcl-2 e Bax foram: pontuação negativa (0) -0%; escore 1 entre 1-10% de células positivas; escore 2 entre 10-50% de células positivas ; escore 3 mais de 50% de células positivas seguindo o critério de CALLAGY et al. (2006) e ZAHA et al. (2012).

4.6 qRT-PCR

Amostras dos tumores foram colhidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e depois acondicionadas à temperatura de -80°C. A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Posteriormente, determinou-se a concentração e a pureza do RNA pelo espectrofotômetro (NanoVue - GE), em seguida, as amostras foram acondicionadas a temperatura de -80°C.

Para avaliar a qualidade do RNA extraído as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (agarose 1,5%, formaldeído 37% e tampão MOPS 5x) e foram utilizadas aquelas que apresentaram duas bandas (equivalentes às subunidades 28S e 18S de RNAr) e que não apresentaram contaminação com DNA genômico

O cDNA foi confeccionado a partir de 0,1 µg de RNA, para isso a reação foi realizada com enzima transcriptase reversa do *Kit High Capacity* (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 25°C por 10 min, posteriormente a 37°C por 120 min e, então, permaneceu a 4°C. As amostras foram mantidas a temperatura de -20°C.

Para a amplificação, foi utilizado o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA). Os ensaios de expressão gênica TaqMan® (Applied Biosystems™) utilizados foram para os genes-alvos *BCL-2* (ensaio Rn00566561_m1), *BAX* (Rn99999125_m1) e *ERBB-2* (Rn01480159_g1) e o gene endógeno *ACTB* foram marcados com sondas contendo um corante repórter fluorescente (FAM) na extremidade 5' e um corante quencher (MGB) na extremidade 3'.

Para verificar a eficiência dos primers, foram feitas curvas padrão. Os primers para, *ACTB*, *BCL-2*, *BAX* E *HER-2* apresentaram eficiências superiores a 90%.

A amplificação e quantificação em tempo real foram realizadas em termociclador automático (ABI Prism 7500 FAST Sequence Detection System, Applied Biosystems).

Os seguintes parâmetros de amplificação foram utilizados para todos os genes: desnaturação a 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 3 segundos, e 60°C por 30 segundos. Para garantir que não houvesse contaminação foi adicionada em cada placa um controle negativo (sem DNA complementar) em duplicata.

Os resultados foram analisados pelos métodos Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), que é método de comparação do ciclo limiar (C_t - do inglês, crossing threshold). Este método normaliza a quantidade e a qualidade do RNA. A quantificação do RNA nas amostras utilizou os valores de C_t pela fórmula $2^{(-\Delta Ct)}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Para cada amostra, o valor de ΔCt foi determinado subtraindo a média das duplicatas dos valores de C_t do gene de interesse, da média das duplicatas dos valores de C_t do gene referência (*ACTB*). Posteriormente, para determinar o $\Delta\Delta Ct$, o valor de ΔCt de cada amostra foi subtraído do valor da média de ΔCt das amostras normais. Este último valor foi adicionado a fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Considerou-se como diminuição da expressão o valor de $QR < 0,5$ e como aumento de expressão o valor de $QR > 2,00$.

O PCR em tempo real foi realizado no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP- Botucatu.

4.7 Análise estatística

Para a análise estatística da imuno-histoquímica, o teste de Qui-quadrado (PAGANO e GAUVREAU, 2000) foi usado para comparar a distribuição dos escores de marcação por proteína e grupos de estudo. O teste de Kruskal-Wallis (PAGANO e GAUVREAU, 2000) foi usado para comparar o

escore mediano de marcação entre as proteínas e grupos de estudo. O método de Bonferroni (KLEINBAUM et al., 2007) foi usado para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas. A análise estatística foi realizada com os procedimentos PROC NPAR1WAY e PROC FREQ (SAS Institute, 2009) e significância estatística foi definida como $P < 0.05$.

As análises estatísticas para os dados de qRT-PCR foram realizadas utilizando-se o *software* (GraphPad InStat version 3.00 (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, <http://www.graphpad.com>)). O teste de Mann Whitney não paramétrico foi utilizado para avaliar as diferenças de expressão dos transcritos entre os grupos. A Análise de Variância (ANOVA) para comparar as médias de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre grupos. A significância estatística foi definida como $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Animais

As diretrizes experimentais empregadas, tais como alojamento, alimentação *ad libitum*, procedimentos de diagnóstico prévio do tumor e tratamento foram bem aceitos pelos animais ao longo da fase experimental.

Foram utilizados um total de 28 animais no experimento, após cinco semanas, em média, da administração do DMBA, todos os animais (100%) desenvolveram tumor de mama. A localização preferencial do tumor foi na região cervicotorácica (61,2%), independente do tempo do aparecimento clínico da lesão. Do total de animais, 8 (2,24%) apresentaram tumores múltiplos. O tamanho dos tumores variou de 1,1 x 0,7 x 0,8cm a 2,6 x 1,3 x 1,0cm.

5.2 Diagnóstico microscópico

5.2.1 Exame citopatológico - Padrão celular para malignidade

Os tumores foram aspirados após atingirem o tamanho de 1,0 cm de largura ou comprimento. As amostras apresentaram alta celularidade, por vezes, as células encontravam-se agrupadas, demonstrando sobreposição e perda de polaridade. Além disso, foi possível observar nas células individualmente, anisocariose, anisocitose, cromatina frouxa, nucléolo evidente e amoldamento nuclear.

As características citológicas identificadas nos tumores mamários corresponderam ao diagnóstico de câncer de mama, de acordo com os critérios de malignidade identificados por Karim et al., (2008) em situação semelhante. Dessa forma, esse foi o momento estabelecido para a realização da terapia fotodinâmica.

5.2.2 Histopatologia

Aplicar uma classificação morfológica, de forma a envolver estroma e parênquima de um tumor se faz necessário para estabelecer o grau de agressividade da lesão. Nesse sentido, os tipos morfológicos neoplásicos evidenciados pelas colorações de HE obedeceram a sequência: carcinoma

tubular (16 casos), ductal (9 casos), ductal papilífero (3 casos), classificadas conforme preconizado por Russo e Russo (2000), como apresentado na Figura 2.

Na Figura 3 é possível observar alguns critérios de malignidade como: aumento da relação núcleo:citoplasma, núcleo hipercromático, nucléolo evidente, cromatina grosseira e granular, citoplasma vacuolizado, célula em anel de sinete, anisocitose e anisocariose.

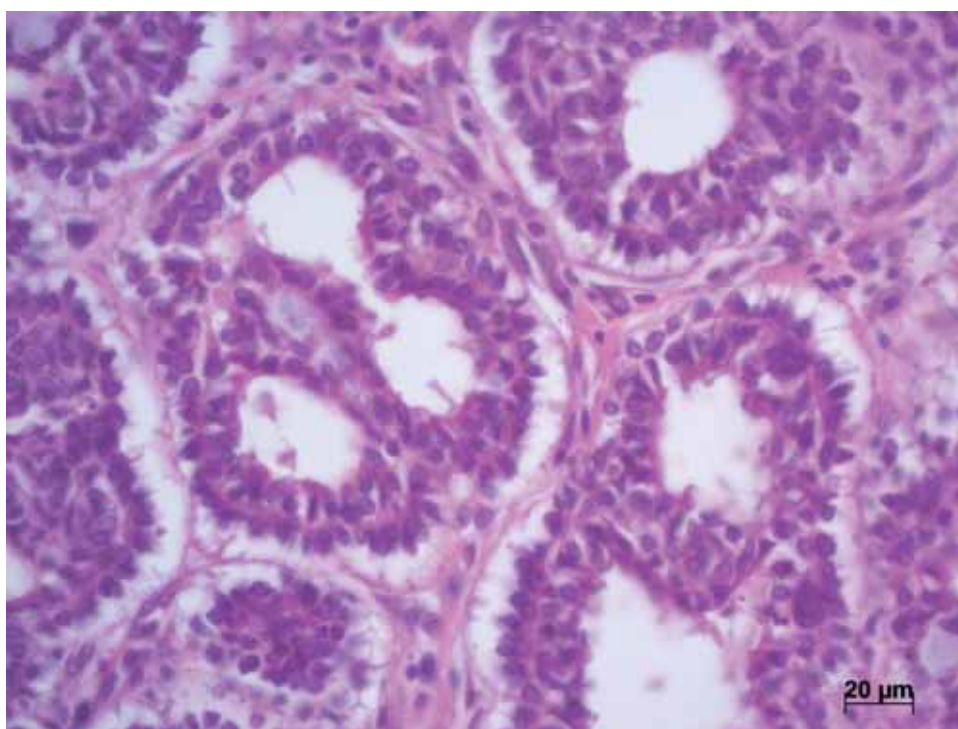


Figura 2. Tumor de mama induzido com DMBA (80 mg/kg, dose única)-carcinoma tubular. H.E. 200x

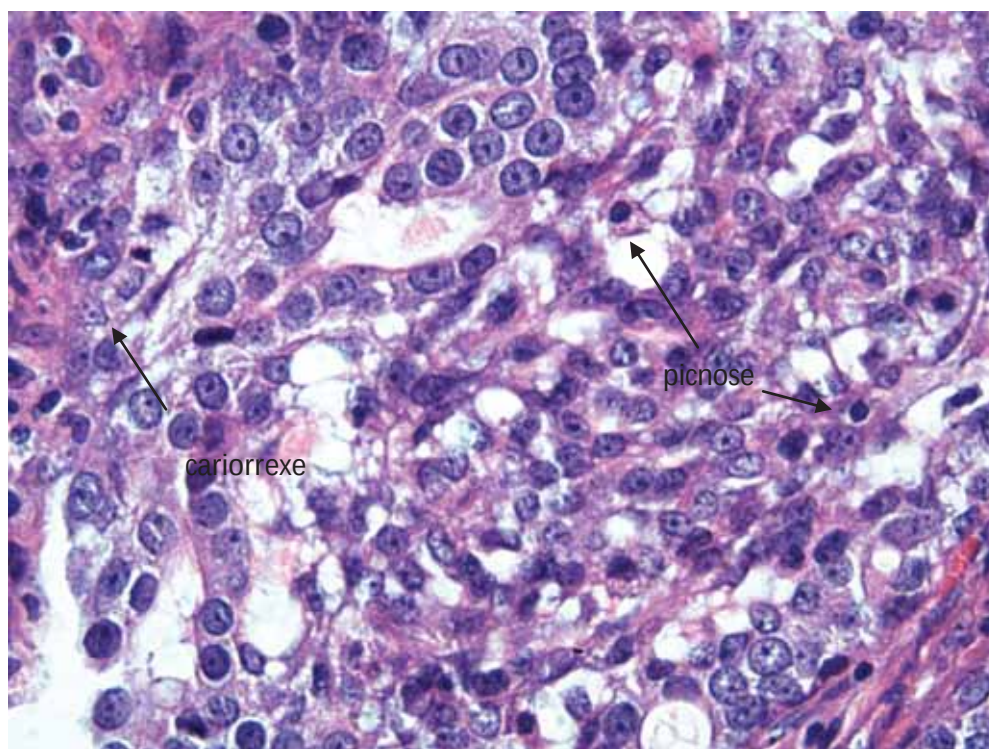


Figura 3: Neoplasia maligna de mama induzida quimicamente em ratas SD. É possível identificar células em necrose pela eosinofilia do citoplasma e alterações nucleares H.E. 500x.

O tipo de necrose observado foi a necrose hemorrágica. Na comparação entre as doses de luz e a profundidade de necrose no tecido mamário observou-se, por análise qualitativa, que quanto maior a dose de luz, maior a área de necrose e maior o dano vascular (Figura 4 e 5).

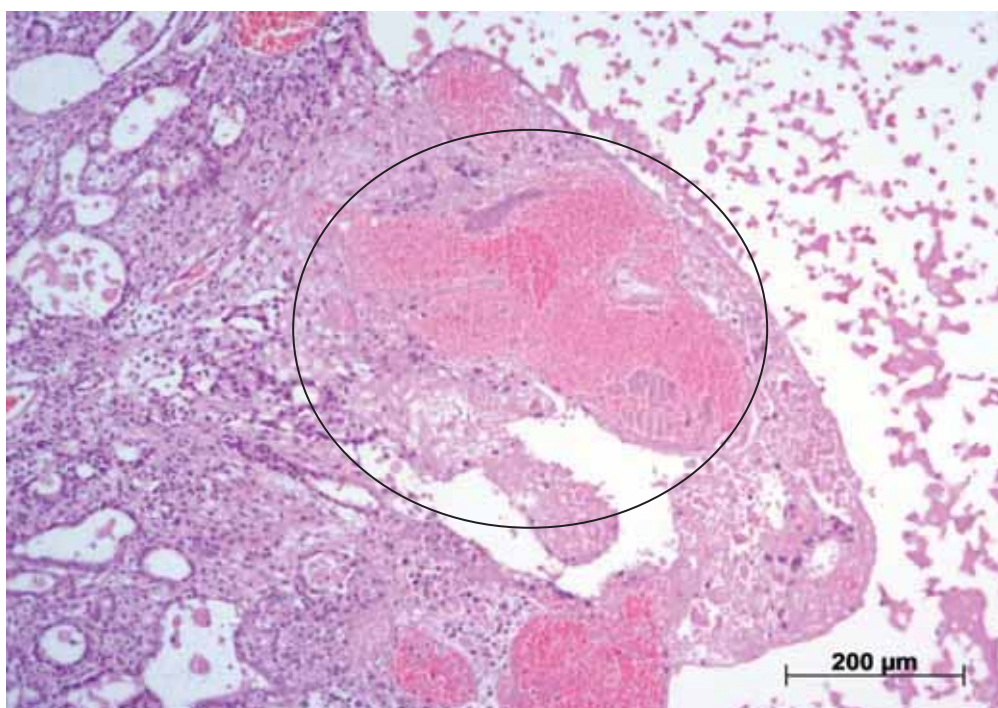


Figura 4 . Área necrohemorrágica induzida pela TFD. H.E. 100x.

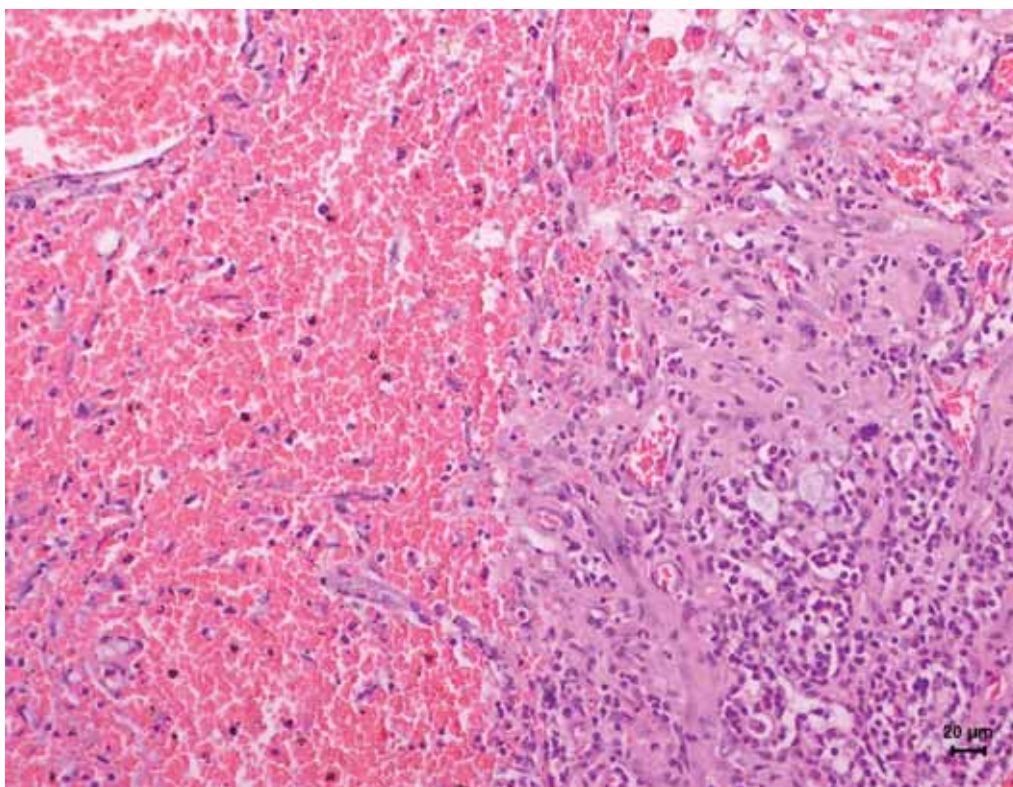


Figura 5. Área necrohemorrágica induzida pela TFD. A necrose de coagulação pode ser evidenciada pela eosinofilia e pela manutenção da arquitetura tecidual H.E. 400x.

5.2.3 Imuno-histoquímica

A imunomarcagem para Bcl-2 foi citoplasmática, e variou de porcentual de células marcadas em cada grupo. Para Bcl-2 ($n = 28$), 39 e 43% das amostras foram classificadas como escore 2 e 3, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Incidência de tumores marcados para os diferentes escores utilizando-se o anticorpo primário anti Bcl-2.

Grupo	Escore de porcentual de células marcadas			
	0	1	2	3
G1	1	1	2	3
G2	1	1	3	2
G3	0	0	3	4
G4	1	0	3	3

Para G1, G2, G3 e G4 (n=7).

A imunomarcção para Bax também foi citoplasmática, e variou de porcentual de células marcadas em cada grupo. Para a proteína Bax (n = 28), e 29 e 61% foram classificadas como escore 2 e 3, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Incidência de tumores marcados para os diferentes escores utilizando-se o anticorpo primário anti Bax.

Grupo	Escore de porcentual de células marcadas			
	0	1	2	3
G1	0	0	1	6
G2	0	1	3	3
G3	0	2	1	4
G4	0	0	3	4

Para G1, G2, G3 e G4 (n=7).

A imunomarcção para Her-2 foi citoplasmática e membranar, e variou de intensidade de marcação em cada grupo. Para a proteína Her-2 (n = 28), 14 e 4% das amostras foram classificadas como escores 2 e 3, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Incidência de tumores marcados para os diferentes escores utilizando-se o anticorpo primário anti Her-2.

Grupo	Intensidade de marcação			
	0	1+	2+	3+
G1	2	5	0	0
G2	3	1	2	1
G3	3	4	0	0
G4	1	4	2	0

Para G1, G2, G3 e G4 (n=7).

Os dados estatísticos da imuno-histoquímica mostraram que, independentemente dos grupos estudados, a distribuição de escores foi diferente entre os produtos gênicos estudados ($P < 0.001$) (Figura 6). Ou seja, os tumores mamários induzidos pelo DMBA em ratas da linhagem SD expressam Bax e Bcl-2 e não expressam ou tem baixa expressão de HER-2. Porém, a alteração do padrão de expressão dessas proteínas não é estatisticamente significativo entre os diferentes grupos ($P=0,9135$). Os padrões de marcação estão representados nas Figuras 7,8 e 9.

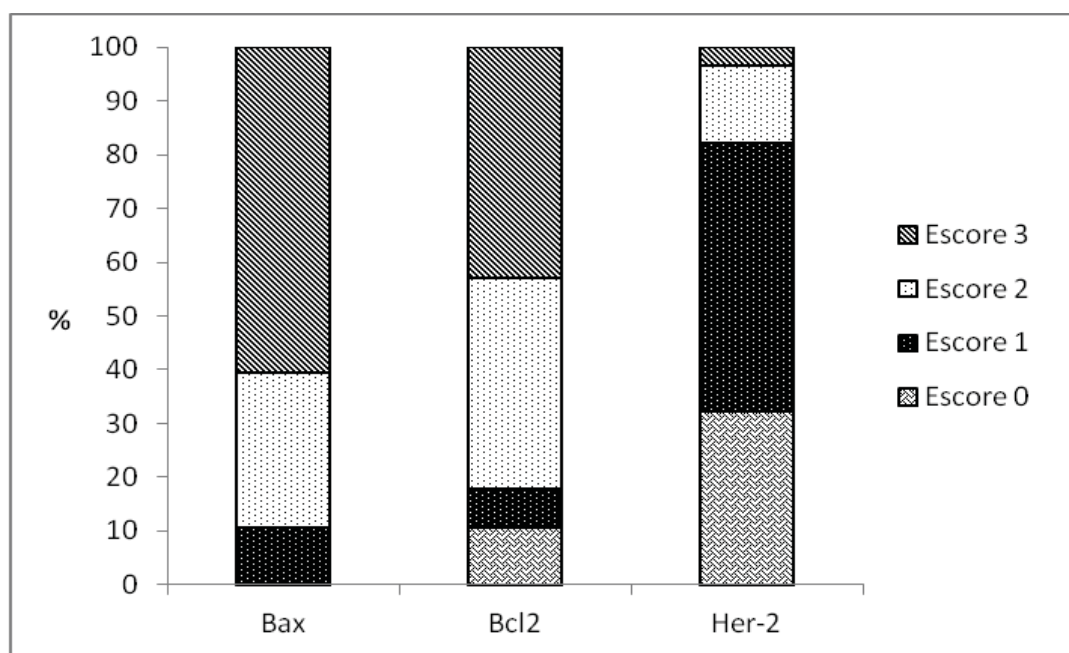


Figura 6. Distribuição de escores por gene estudado

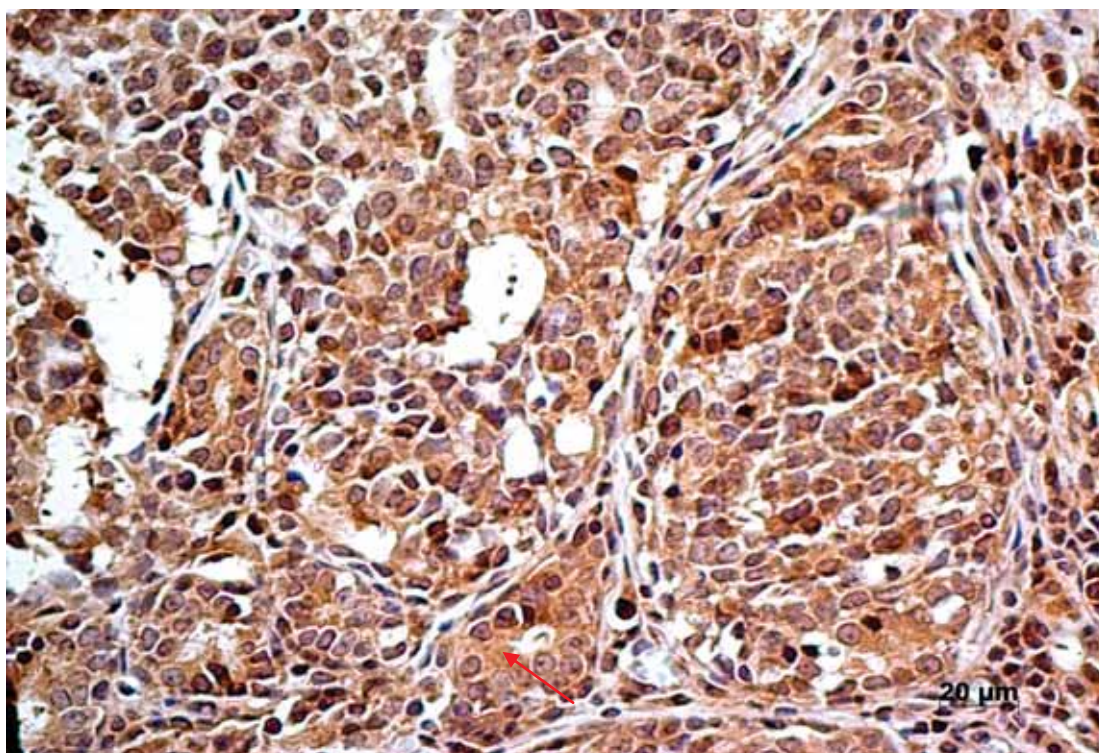


Figura 7. Imunoexpressão de Bax em carcinoma mamário induzido pelo DMBA em ratas Sprague-Dawley. Marcação citoplasmática nas células neoplásicas (escor 3) ←.400x

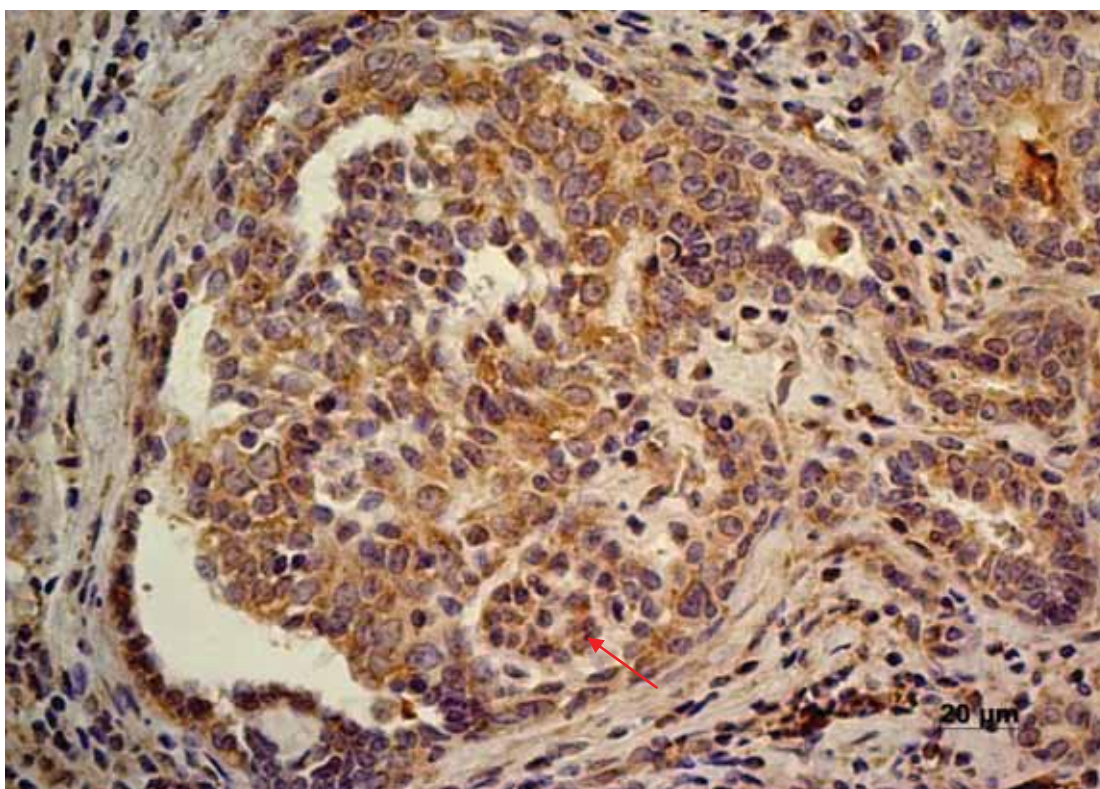


Figura 8. Imunoexpressão de Bcl-2 em carcinoma mamário induzido pelo DMBA em ratas Sprague-Dawley. Marcação citoplasmática nas células neoplásicas (score 2).  400x

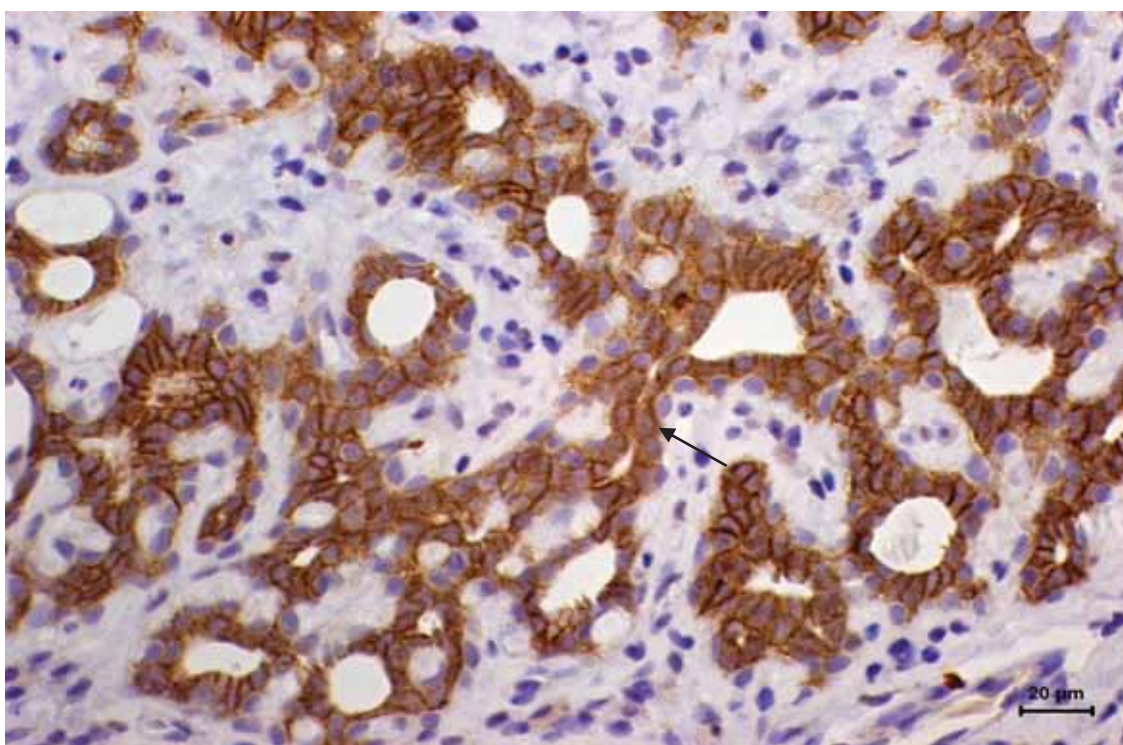


Figura 9. Imunoexpressão de c-erbB-2 em carcinoma mamário induzido pelo DMBA em ratas Sprague-Dawley. Marcação membranar e citoplasmática nas células neoplásicas (escore 3)  400x

5.3 qRT-PC

Todas as amostras avaliadas para expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* apresentaram boa integridade do RNA pelas bandas de RNA ribossômico 18S e 28S em gel de agarose.

Os valores numéricos referentes à análise pela qRT-PCR dos genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* nas amostras de carcinoma mamário estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores numéricos referentes a análise de qRT-PCR para os genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* em 28 amostras de carcinomas mamário.

Amostra	MCt BCL-2	MCt ACTB	QR BCL-2	MCt BAX	MCt ACTB	QR BAX	MCt HER-2	MCt ACTB	QR HER-2
1C	24,83	18,47	4,44	24,88	18,47	0,42	24,72	18,47	0,86
2C	25,29	16,53	0,83	24,81	16,53	0,11	24,88	16,53	0,20
3C	27,92	19,91	1,41	25,89	19,91	0,56	24,94	19,91	2,01
4C	26,98	18,05	0,74	24,75	18,05	0,33	23,92	18,05	1,12
5C	33,06	24,89	1,26	28,82	24,89	2,31	30,09	24,89	1,78
6C	35,72	26,73	0,72	30,97	26,73	1,87	33,81	26,73	0,48
7C	26,64	18,62	1,40	24,35	18,62	0,67	22,49	18,62	4,48
1/50	36,49	29,94	3,87	34,96	29,94	1,08	35,53	29,94	1,35
2/50	28,42	20,90	1,98	25,95	20,90	1,07	25,77	20,90	2,23
3/50	29,96	21,78	1,25	27,93	21,78	0,49	26,95	21,78	1,81
4/50	27,20	18,12	0,67	24,95	18,12	0,31	24,45	18,12	0,81
5/50	26,50	17,54	0,73	23,66	17,54	0,51	23,68	17,54	0,93

6/50	26,14	18,41	1,71	23,88	18,41	0,80	22,50	18,41	3,84
7/50	25,51	17,75	1,68	24,91	17,75	0,25	21,87	17,75	3,76
1/100	24,75	18,84	6,06	24,45	18,84	0,72	23,44	18,84	2,70
2/100	25,41	18,22	2,49	24,95	18,22	0,33	23,70	18,22	1,46
3/100	30,25	21,68	0,95	26,88	21,68	0,95	28,69	21,68	0,51
4/100	26,90	18,02	0,77	24,57	18,02	0,38	24,64	18,02	0,67
5/100	29,89	21,95	1,48	29,64	21,95	0,17	28,90	21,95	0,53
6/100	25,31	17,35	1,46	25,73	17,35	0,10	35,41	17,35	0,00
7/100	36,80	27,47	0,56	35,46	27,47	0,14	35,20	27,47	0,31
1/150	23,99	18,39	7,43	24,25	18,39	0,61	23,30	18,39	2,17
2/150	27,22	19,76	2,07	25,02	19,76	0,92	27,04	19,76	0,42
3/150	35,84	25,07	0,21	30,02	25,07	1,14	32,90	25,07	0,29
4/150	32,10	24,09	1,40	29,44	24,09	0,86	29,77	24,09	1,27
5/150	36,16	27,11	0,69	32,79	27,11	0,69	33,22	27,11	0,95
6/150	28,76	21,62	2,57	27,04	21,62	0,82	26,42	21,62	2,34
7/150	26,83	18,83	1,42	25,35	18,83	0,38	24,21	18,83	1,57

A análise do gene *BCL-2* revelou que 7 casos (25%) apresentaram expressão elevada (QR=2,07 a 7,43) e 1 caso (4%) apresentaram diminuição da expressão (QR=0,21). As demais amostras (20 casos) apresentaram expressão normal (QR=0,56 a 1,71). O nível de expressão para este gene variou de 0,56 a 7,43, com uma média de 1,87 +/- 1,68. Entre as 7 amostras com expressão elevada, três eram do grupo tratado com dose de luz de 150J/cm (G4). O único caso com diminuição de expressão pertencia ao mesmo grupo. Aplicado os testes de Mann Withney e ANOVA não se verificou alteração estatisticamente significativa da expressão desse gene (Figura 10).

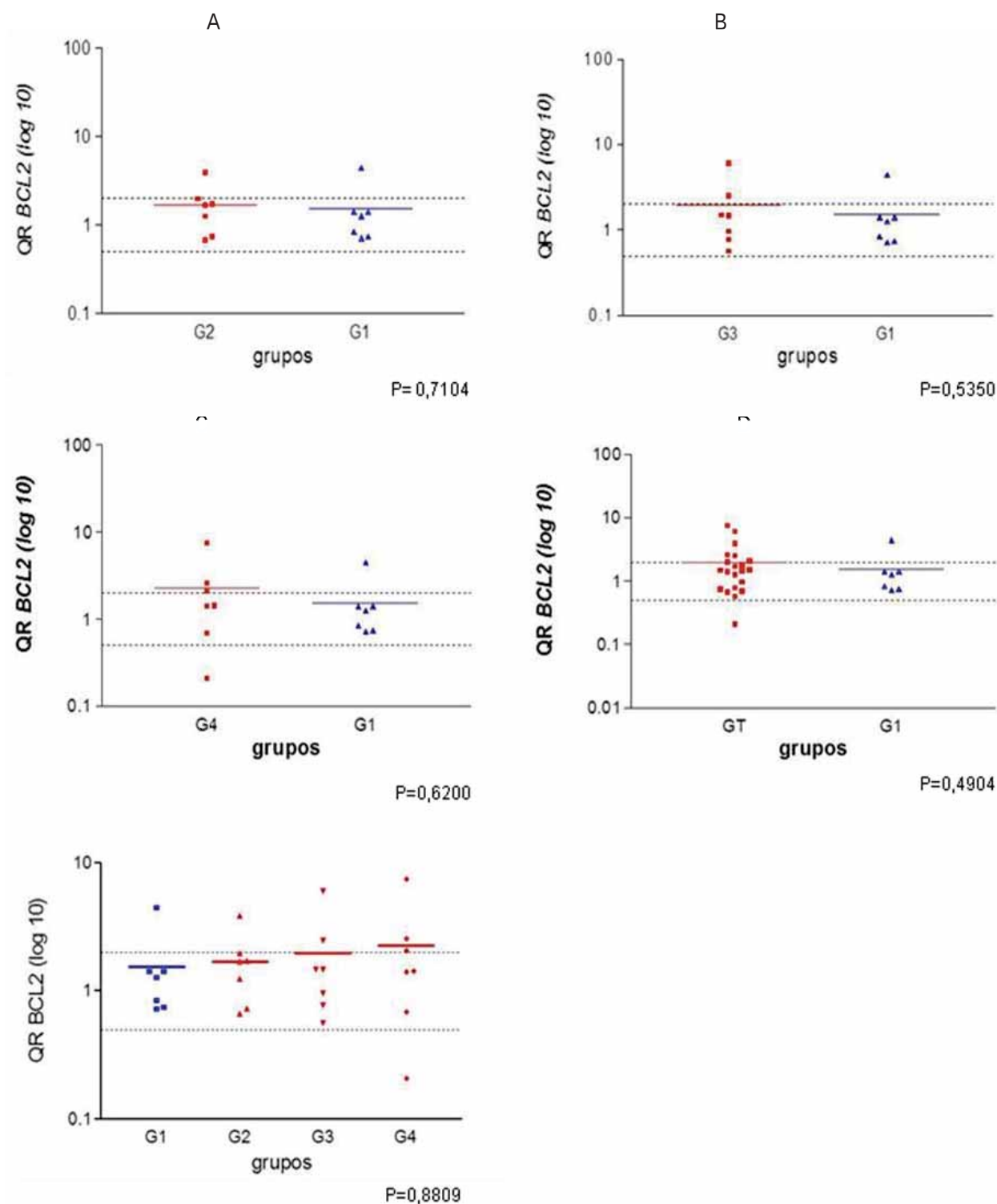


Figura 10: Comparação entre as médias dos níveis de expressão por qRT-PCR do gene *BCL-2* do grupo G2 em relação a G1(A), do grupo G3 em relação a G1 (B), do grupo G4 em relação a G1 (C) e de todos os grupos tratados em relação a G1(D). Teste de Mann Withney. Comparação das médias dos níveis de expressão por qRT-PCR do gene *BCL-2* dos grupos G2, G3, e G4 em relação a G1 ANOVA (E). QR: quantificação relativa do gene. GT: Grupos Tratados.

A análise do gene *BAX* revelou que 1 caso (4%) apresentou expressão elevada (QR=2,31) e 12 casos (43%) apresentaram diminuição da expressão (QR=0,11 a 0,49). As demais amostras (15 casos) apresentaram expressão normal (QR=0,51 a 1,87). O nível de expressão para este gene variou de 0,1 a 2,31 com uma média de 0,68 +/- 0,51. A única amostra com expressão elevada era do grupo controle (G1). Dos 12 casos com diminuição de expressão cinco pertenciam ao grupo tratado com dose de luz de 100J/cm (G3). Aplicado os testes de Mann Withney e ANOVA não se verificou alteração estatisticamente significativa da expressão desse gene (Figura 11).

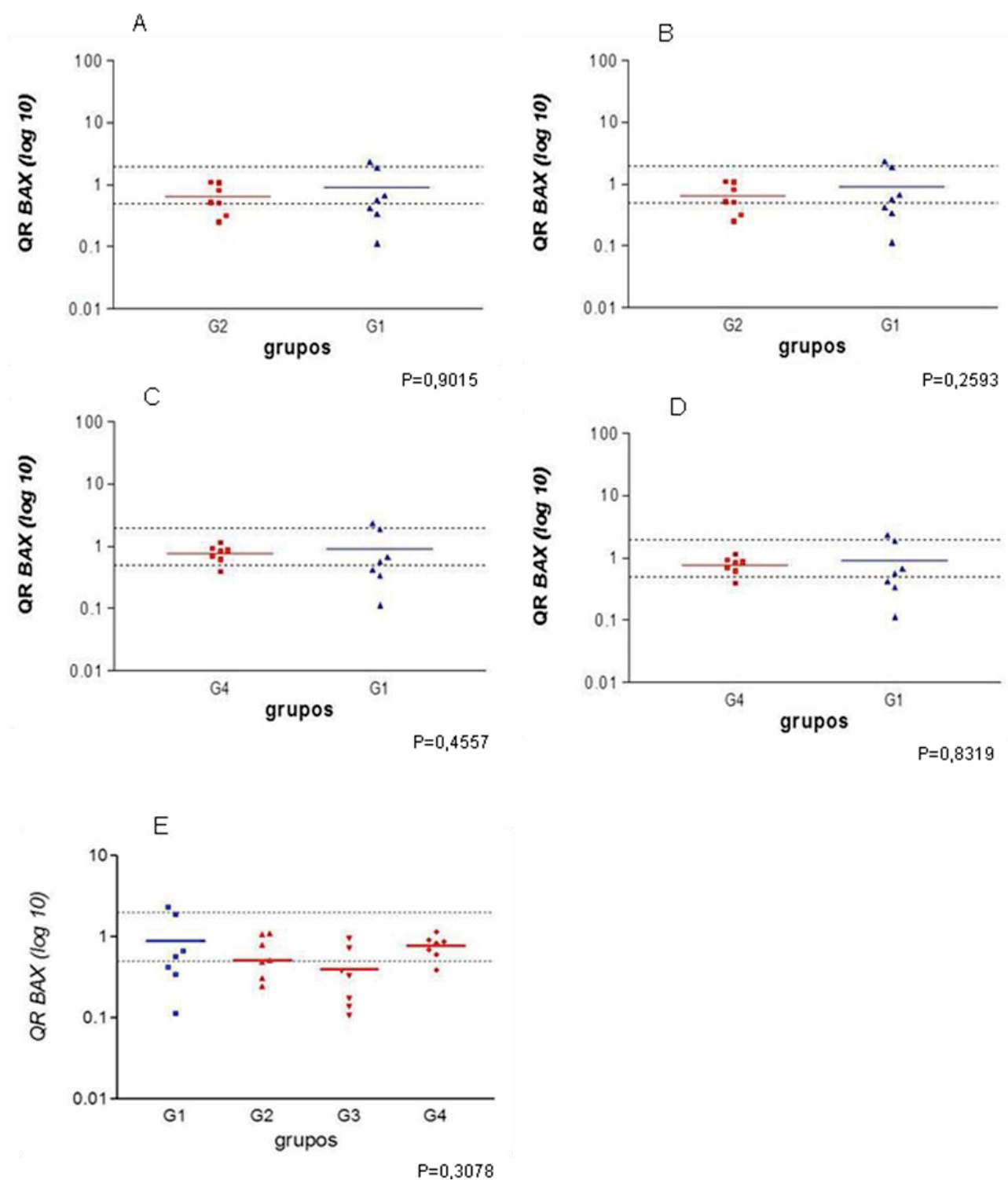


Figura 11: Comparação entre as médias dos níveis de expressão por qRT-PCR do gene *BAX* do grupo G2 em relação a G1(A), do grupo G3 em relação a G1 (B), do grupo G4 em relação a G1 (C) e de todos os grupos tratados em relação a G1(D). Teste de Mann Withney Comparação das médias dos níveis de expressão por qRT-PCR do gene *BAX* dos grupos G2, G3, e G4 em relação a G1 ANOVA (E). QR: quantificação relativa do gene. GT: Grupos Tratados.

A análise do gene *HER-2* revelou que 8 casos (29%) apresentaram expressão elevada (QR=2,01 a 4,48) e 6 casos (21%) apresentaram diminuição da expressão (QR=0,00 a 0,48). As demais amostras (14 casos) apresentaram expressão normal (QR=0,51 a 1,81). O nível de expressão para este gene variou de 0,00 a 4,48 com uma média de 1,46 +/- 1,16. Dos oito casos com expressão elevada três eram do grupo tratado com dose de luz de 100J/cm (G3). Os seis casos com diminuição de expressão estavam distribuídos igualmente entre os grupos, sendo dois casos em cada grupo. Aplicado os testes de Mann Withney e ANOVA não se verificou alteração estatisticamente significativa da expressão desse gene (Figura 12).

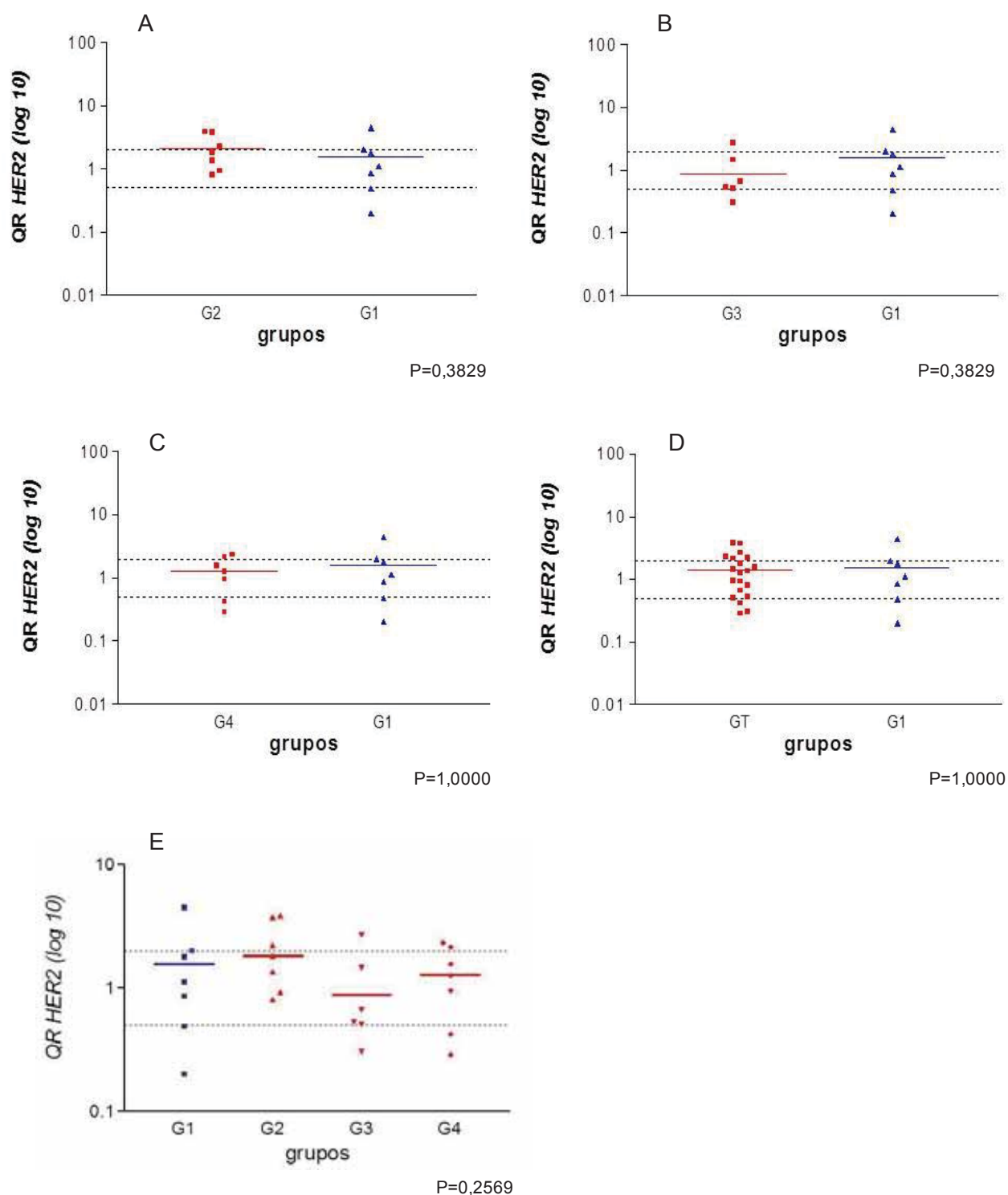


Figura 12: Comparação entre as medias dos níveis de expressão por qRT-PCR do gene *HER-2* do grupo G2 em relação a G1(A), do grupo G3 em relação a G1 (B), do grupo G4 em relação a G1 (C) e de todos os grupos tratados em relação a G1(D). Teste de Mann Withney Comparação das médias dos níveis de expressão por qRT-PCR do gene *HER-2* dos grupos G2, G3, e G4 em relação a G1 ANOVA (E). QR: quantificação relativa do gene. GT: Grupos Tratados.

6. DISCUSSÃO

Entre os vários modelos animais experimentais utilizados para analisar os diversos aspectos da carcinogênese mamária, a indução química dos tumores mamários em ratas é um dos modelos mais utilizados. Os tumores mamários induzidos quimicamente em roedores são ferramentas úteis para o estudo da patogênese do câncer e dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão do processo neoplásico (RUSSO e RUSSO, 1996).

O DMBA é uma substância genotóxica, composto de hidrocarboneto aromático policíclico, metabolizado no fígado e se acumula no tecido adiposo, como a mama possui tecido adiposo, torna-se um local de tropismo para o carcinógeno.

Utilizando o DMBA como carcinógeno químico é possível demonstrar que o agente cancerígeno atua sobre a célula da unidade ducto-lobular terminal, e que esta estrutura é a que apresenta o maior índice proliferativo na mama, sendo, portanto, a zona mais suscetível à transformação neoplásica (RUSSO et al., 1990).

Tumores mamários induzidos por dose única do DMBA variam morfológicamente de uma hiperplasia a adenomas e carcinomas (TERADA, 1995; KOCDOR et al., 2000; BARROS et al., 2004). No presente estudo neoplasias malignas foram diagnosticadas, nesse contexto, se pode aferir que o modelo foi estabelecido adequadamente.

A importância de se utilizar um modelo experimental de indução química de tumor de mama é poder estudar a variabilidade do tumor, uma vez que, para cada tipo histológico tumoral, o comportamento biológico é diferente. Os trabalhos encontrados na literatura sobre o uso da TFD em tumores mamários relatam, em sua maioria, os resultados encontrados em cultura celular, que tem como desvantagem a perda de algumas características teciduais e a dificuldade de extrapolação para o organismo vivo.

Além disso, há semelhanças anatômicas e fisiológicas do modelo utilizado neste estudo com a mulher (RUSSO et al. 1990; HEFFELFINGER,

2000). No que diz respeito às semelhanças do modelo utilizado nesse estudo, não se tem na literatura dados relacionados diretamente a cadela, porém, os trabalhos científicos afirmam que a cadela é um modelo de estudo de câncer de mama para a mulher devido a sua anatomia e fisiologia. O modelo de indução química de tumores mamários em ratas são uns dos mais utilizados para o estudo da carcinogênese mamária, porém no que se refere a utilização desse modelo no estudo de TFD a literatura é escassa.

RUSSO et al. (1990) descreveram que a localização preferencial dos tumores mamários induzidos quimicamente em ratas se situa na região cervicotorácica. Os nossos resultados corroboram com os resultados descritos por esses autores.

No presente estudo, em uma análise qualitativa das lâminas coradas por HE, observou-se que quanto maior a dose de luz utilizada na TFD, maior a área de necrose e maior o dano vascular observado. Quando o FS é administrado ao paciente em uma determinada concentração e iluminado com intensidade de luz apropriada uma série de reações é desencadeada resultando na formação de agentes oxidantes e radicais livres, induzindo a célula à morte. A quantidade de radicais livres produzida durante a terapia normalmente depende da dose de luz entregue ao tecido. Quanto maior a quantidade de radicais livres produzida maior a quantidade de células que irão morrer. No entanto, se a dose de luz entregue ao tecido for superior a um valor limite, o dano causado à célula será suficiente para induzir a morte celular, porém, se a dose estiver abaixo do valor limite, o dano promovido não será suficiente para induzir a morte celular.

Através da imuno-histoquímica observou-se que os tumores mamários induzidos quimicamente em ratas SD são positivos para Bcl-2 e Bax e negativo ou fracamente positivo para Her-2 e que isso não se altera nos diferentes tratamentos (G2, G3 e G4) quando comparado com o grupo controle (G1). Já através do qRT-PCR observou-se que o padrão de expressão de *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* não se altera nos diferentes tratamentos (G2, G3 e G4) quando comparado ao controle (G1).

De acordo com Srivastava et al. (2001) o tratamento das células RIF 1 por TFD com Pc 4 resultou em inibição de Bcl-2, o que pode dar início a via apoptótica, sensibilizando essas células a apoptose mediada pela TFD. Xue et al. (2001) demonstraram que ocorreu inibição dose-dependente de Bcl-2 induzida pela TFD em células MCF-7 utilizando-se como FS a Pc 4. Usuda et al. (2003) observaram que em células MCF-7c3 a TFD inibe a proteína Bcl-2, porém o tipo de Bcl-2 que não possui o domínio transmembrana C-terminal não é inibida pela TFD, além disso, relataram que quanto maior a dose do FS maior é a inibição da proteína. Crescenzi et al. (2004) observaram inibição da Bcl-2 induzida pela TFD, em células MCF-7 utilizando como FS a indocianina verde. Ferenc et al (2010) utilizando a combinação de genisteína e da TFD com o FS hipericina em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 observaram a inibição de Bcl-2 em ambas as linhagens celulares. No presente trabalho não foi observada inibição de Bcl-2. A análise da expressão gênica de *BCL-2* mostrou que apenas uma das 28 amostras apresentou diminuição da expressão. As alterações na expressão proteica e do gene *BCL-2* nos diferentes grupos não foram estatisticamente significativas.

Crescenzi et al. (2004) também observaram aumento da expressão de Bax, induzida pela TFD, em células MCF-7, utilizando como FS a indocianina verde. Ferenc et al (2010) utilizando a combinação de genisteína e da TFD com o FS hipericina em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231 também observaram aumento da expressão de Bax em ambas as linhagens celulares. No presente estudo, 90% das amostras, independente do grupo o qual pertenciam, apresentaram superexpressão de Bax. Na análise de expressão gênica apenas uma amostra, do grupo controle, apresentou expressão aumentada de *BAX*. As alterações na expressão proteica e do gene *BAX* nos diferentes grupos não foram estatisticamente significativas.

Koval et al (2010) relataram o uso de hipericina, como FS, na TFD em combinação com um inibidor seletivo *HER-2* (AG 825) em linhagem celular de adenocarcinoma mamário com expressão aumentada de *HER-2* (SKBR-3). Solár et al. (2001) utilizando o mesmo FS para a realização da TFD em linhagem de células SKBR-3 e MCF-7 com diferentes *status* de *HER-2*,

observaram a diminuição da expressão do *HER-2*. A inibição do gene *HER-2* e/ou a degradação da proteína Her-2 após a realização da TFD parece não ter ocorrido neste estudo, pois na análise por imuno-histoquímica 82% das amostras apresentaram marcação negativa para Her-2, independente do grupo ao qual pertenciam e na análise de expressão gênica, as amostras que apresentaram diminuição da expressão de *HER-2* estavam igualmente distribuídas entre os grupos. As alterações na expressão proteica e do gene *HER-2* nos diferentes grupos não foram estatisticamente significativas.

Como é sabido a DLI (Drug light interval- intervalo entre a administração do FS e a iluminação da lesão) interfere na resposta da TFD. Quando se utiliza um derivado de Hematoporfirina como FS, uma vez adotado um intervalo grande a ação da TFD é mais celular, entretanto se for utilizado um intervalo de tempo menor predomina a resposta vascular (LI e LUO, 2009). Desta forma sugere-se que a DLI pode estar associada a inibição ou ativação de vários genes envolvidos na morte celular.

Outro fator é o FS utilizado. Usuda et al.(2008) observaram que a TFD com Photofrin inibe a Bcl-2, induzindo apoptose, e as linhagens de células de carcinoma mamário, MCF-7c3, que superexpressa caspase-3 e MCF-7c3-GFP-Bcl-2, que superexpressa Bcl-2, demonstraram igual sensibilidade.No entanto, quando se utiliza o NPe6 como FS a Bcl-2 não é inibida e levou mais tempo para induzir apoptose em comparação com Photofrin.

O Photogem, FS utilizado no presente estudo e composto semelhante ao Photofrin, é uma mistura complexa de porfirinas monoméricas e agregadas, que quando ativado pela luz, causa dano na mitocôndria (PERLIM, et al., 1985).

Já as Ftalocianinas, são macrociclos de origem sintética cuja estrutura é formada por unidades de isoindol unidas através de pontes de nitrogênio. A Pc4, ftalocoanina utilizada como FS na maioria dos trabalhos aqui citados, ligar-se á mitocôndria, ao retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (USUDA et al, 2003).

Por sua vez, a Hipericina, FS também citado, é um pigmento fotoativo do tipo antroperilene quinina, encontrado nas plantas do gênero *Hypericum*. Ele tem como alvo principal a mitocôndria e uma de suas principais vantagens em relação aos compostos porfirínicos é a baixa tendência à agregação (DIWU e LOWN et al., 1990; HALDER et al., 2005).

Portanto, os diferentes FSs são moléculas diferentes que apresentam diferentes graus de agregação, o que pode influenciar na penetração do FS na célula. Além disso, a concentração do FS, sua afinidade por diferentes organelas e a sua distribuição, também podem influenciar os mecanismos de respostas a TFD (TEITEN et al., 2003).

Os resultados desse estudo foram obtidos após 30 horas da TFD, se a eutanásia dos animais e consequente colheita das amostras fosse realizada em um tempo maior ou menor a resposta poderia ser diferente, pois pode ocorrer ativação ou inibição tardia dos genes. Os resultados parciais obtidos em estudo desenvolvido na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP-São José dos Campos), sob coordenação da Profa. Dra. Renata de Azevedo Canevari (processo FAPESP: 2011/09523-0), até o momento demonstram que há alteração da expressão dos principais genes pertencentes a via metabólica da apoptose quando os animais com carcinoma mamário são eutanaziados com 24h e 48h após a realização da TFD, o que sugere que diferentes vias da apoptose estão envolvidas na resposta a TFD e que essas vias são, possivelmente, acionadas na dependência das alterações celulares e metabólicas que ocorrem com o decorrer do tempo após a TFD.

Chiu et al. (2003) demonstraram que a linhagem de células de carcinoma prostático humano DU – 145, é resistente a apoptose induzida pela TFD devido a falta de Bax. Nossos resultados mostram que todos os tumores mamários induzidos pelo DMBA expressaram Bax, portanto esses tumores seriam sensíveis a TFD.

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 microscópicamente, além de avaliar a expressão proteica e gênica de

BCL-2, *BAX* e *HER-2* em carcinomas mamários induzidos quimicamente. Além disso, a presença de necrose nas amostras desse trabalho pode inferir que houve ação da TFD sobre o tecido neoplásico. Portanto, a metodologia foi eficaz, o que não exclui a necessidade de avaliar a expressão de outros genes envolvidos na apoptose e proliferação celular bem como a realização de protocolos diferentes da TFD.

7. CONCLUSÕES

O tipo de necrose observada nos tumores tratados por TFD é a necrose hemorrágica, em análise qualitativa, esta é mais evidente quanto maior a dose de luz utilizada na realização da terapia.

Não há evidência estatística de que a TFD influencie a expressão das proteínas Bcl-2, Bax e Her-2 nas condições do experimento.

Não há evidência estatística de que a TFD influencie a expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *HER-2* nas condições do experimento.

8. REFERENCIAS

ABREU, E.D.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina - Revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n.1, p.13-131, 2002.

BAGNATO, V.S.; MARCASSA, L.G.; MARCASSA, J.C.; CESTARI, G.; FERREIRA, J.; KURACHI, C. *Guia prático de terapia fotodinâmica para o tratamento de tumores*. São Carlos: IFSC/USP, v.1, 2002.

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. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, v. 59, n.5, p.257-261, 2004.

BASU, A.; HALDAR, S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction*, v.4, n.12, p. 1099-1109, 1998.

BLAND, K.I.; COPELAND III, E.M. (Eds.). *The breast: comprehensive management of benign and malignant disorders* 3rd. ed. St. Louis: Elsevier, 2004, 1628p.

CALLAGY, G.M.; PHAROAH, P.D.; PINDER, S.E.; HSU, F.D.; NIELSEN, T.O.; RAGAZ, J.; ELLIS, I.O.; HUNTSMAN, D.; CALDAS, C. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clinical Cancer Research*, v.12, n.8, p. 2468–2475, 2006.

CHAO, D.T.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology*, v.16, p. 395-419, 1998.

CHIU, S.M.; XUE L.Y.; USUDA, J.; AZIZUDDIN, K.; OLEINICK, N.L. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *British Journal of Cancer*, v.89, n.8, p.1590-1597, 2003.

CLEARY, M.L.; SMITH, S.D.; SKLAR, J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*, v.47, n.1, p.19-28, 1986.

CRESCENZI, E.; VARRIALE, L.; IOVINO, M.; CHIAVIELLO, A.; VENEZIANI, B.M.; PALUMBO, G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.3, n.5, p.537-544, 2004.

DANIELL, M.D.; HILL J.S. A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, v.61, v.5, p.340-348, 1991.

DAKO Hercep Test: Anti-Her2 IHC System for Immunoenzymatic Staining (package insert). Carpinteria. Dako Corp, 2000.

de JONG, D.; PRINS F.A.; MASON, D.Y; REED, J.C.; VAN OMMEN, G.B.; KLUIN P.M. Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Research*, v.54, n.1, p.256-260, 1994.

DIWU, Z.; LOWN, J.W. Hypocrellins and their use in photosensitization. *Photochemistry and Photobiology*, v. 52, p. 609-616, 1990.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; GIULIO J.; KESSEL D.; KORBELIK M.; MOAN J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v.90, n.12, p.889-905, 1998.

ELLEDGE, R.M.; GREEN, S.; HOWES, L.; CLARK, G.M.; BERARDO, M.; ALLRED, D.C.; PUGH, R.; CIOCCA, D.; RAVDIN, P.; O'SULLIVAN, J.; RIVKIN, S.; MARTINO, S.; OSBORNE, C.K. bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, v.15, n.5, p.1916-1922, 1997.

FERENC, P.; SOLAR, P.; KLEBAN, J.; MIKES, J.; FEDOROCKO, P. Down-regulation of Bcl-2 and Akt induced by combination of photoactivated hypericin and genistein in human breast cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.98, n.1, p.25-34, 2010.

FERREIRA, I.; FERREIRA, J.; VOLLET-FILHO, J.D.; MORIYAMA, L.T.; BAGNATO, V.S.; SALVADORI, D.M.F.; ROCHA, N.S. Photodynamic therapy for the treatment of induced mammary tumor in rats. *Lasers in Medical Science*, 2012. DOI 10.1007/s10103-012-1114-3.

FERREIRA, I.; RAHAL, S.C.; ROCHA, N.S.; GOUVEIA, A.H.; CORRÊA, T.P.; CARVALHO, Y.K.; BAGNATO, V.S. Hematoporphyrin-based photodynamic therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in cats. *Veterinary Dermatology*, v.20, n.3, p.174-178, 2009.

FICHE, M.; AVET-LOISEAU, H.; HEYMANN, M.F.; MOUSSALY, F.; DIGABEL, C.; JOUBERT, M.; CLASSE, J.M.; DRAVET, F.; FUMOLEAU, P.; ROSS, J.; MAUGARD, C.M. Genetic alterations in early-onset invasive breast carcinomas: correlation of c-erbB-2 amplification detected by fluorescence in situ hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype. *International Journal of Cancer*, v.84, n.5, p. 511-515, 1999.

FREITAS, I.; BARONZIO, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. v.11, n.1, p.3-30, 1991.

FRETT-CONTE, A.C.; SALLES, A.B. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.24, n. 2, p. 85-89, 2002.

FURTADO-VELOSO, A.M.; LOPES, I.M.; LOPES-COSTA, P.V.; DOS SANTOS, L.G.; DA SILVA, B.B. Expression of Bax protein in normal tissue of premenopausal women treated with raloxifene. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.30, n.4, p.177-181, 2008.

GEE, J.M.; ROBERTSON, J.F.; ELLIS, I.O.; WILLSHER, P.; McCLELLAND, R.A.; HOYLE, H.B. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *International Journal of Cancer*. v.59, n.5, p.619-628, 1994.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v.53, n.3, p.335-343, 2007.

HALDER, M.; CHOWDHURY, P.; GORDON, M.; PETRICH, J. Hypericin and its perylene quinone analogs: probing structure, dynamics, and interactions with the environment. *Advances in Photochemistry*, 28, 2005. DOI: 10.1002/0471714127.ch1

HAN, S.; YUN, I.J.; NOH, D.; CHOE, K.; SONG, S.; CHI, J. Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. *Journal of Surgical Oncology*, v.65, n.1., p.22-27, 1997.

HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, 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. *Laboratory Investigation*. v.80, n.4, p. 485-492, 2000.

HICKS, D.G.; KULKARNI, S. HER2+ Breast Cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *American Journal of Clinical Pathology*, v.129, n. 2, p. 263-273, 2008.

HOCKENBERY, D.; NUNEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R.D.; KORSMEYER, S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, v.348, n.6299, p.334-336, 1990.

HOCKENBERY, D. M.; ZUTTER, M.; HICKEY, W.; NAHM, M.; KORSMEYER, S.J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 88, n.16, p.6961-6965, 1991.

HOURLAKIS, C.J.; PERRIS, A. A Monte Carlo estimation of tissue optical properties for use in laser dosimetry. *Physics in Medicine & Biology*. v.40, n.3, p. 351-364, 1995.

ITOH, M.; CHIBA, H.; NOUTOMI, T.; TAKADA, E.; MIZUGUCHI, J. Cleavage of Bax-alpha and Bcl-x (L) during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncology*, v.36, n.3, p.277-285, 2000.

JALAVA, P.J.; COLLAN, Y.U.; KUOPIO, T.; JUNTTI-PATINEN, L.; KRONQVIST, P. Bcl-2 immunostaining: a way to finding unresponsive postmenopausal N+ breast cancer patients. *Anticancer Research*, v.20, n. 2B, p.1213-1219, 2000.

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. *Veterinary Clinical Pathology*, v.37, n.2, p.229-236, 2008.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v.26, n.(4), p.239-257, 1972.

KESSEL, D.; ARROYO, A.S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.6, n.12, p.1290-1295, 2007.

KESSEL, D.; LUO Y.; DENG Y.C.; CHANG K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v.65, n.3, p.422-426, 1997.

KLEINBAUM, D.G.; KUPPER, L.L.; NIZAM, A.; MULLER, K.E. Applied Regression Analysis and Multivariable Methods. Duxbury Press, Belmont, California, 2007.

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. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, v.68, n.9, p.693-701, 2000.

KOVAL, J.; MIKES J.; JENDZELOVSKY, R.; KELLO, M.; SOLAR, P.; FEDOROCKO, P. Degradation of HER2 Receptor Through Hypericin-mediated Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v.86, n.1, p.200-205, 2010.

KURACHI, C.; MELO, C.A.S.; MARCASSA, L.G.; ZILIO, S.C.; BAGNATO, V.S.; CESTARI-FILHO, G.A.; JAVARONI, A.; BERTO, J.C.; PASSERI, C.; BONILHA, V.S.; SILVA, M.; FERREIRA, J.; VERÍSSIMO, F.M.; SOUZA, C.S. Implantação Clínica da Terapia Fotodinâmica no Brasil: Breve Histórico e

resultados Alcançados. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia*. v.20, p.33-41, 2002.

LEITZEL, K.; TERAMOTO, Y.; KONRAD, K. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.13, n.5, p.1129-1135, 1995.

LI, LI-BO; LUO, RONG-CHENG. Effect of drug–light interval on the mode of action of Photofrin photodynamic therapy in a mouse tumor model. *Lasers In Medical Science*, v.24, n.4, p.597-603, 2009.

LIGHTDALE, C.J.; HEIER, S.K.; MARCON, N.E.; McCOUGHAN, J.S. JR.; GERDES, H.; OVERHOLT, B.F. Photodynamic therapy with porfimer sodium versus thermal ablation therapy with Nd:YAG laser for palliation of esophageal cancer: a multicenter randomized trial. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 42, n.6, p.507-512, 1995.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-408, 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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.216, n.11, p.1745-1751, 2000.

MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova*, v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MARTHY, H.J.; MURASECCO-SUARDI, P.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A.M. Primary effects of singlet oxygen sensitizers on eggs and embryos of sea urchins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v.7, n.2-4, p.303-315, 1990.

MARTINES, N.S.; MACHADO, A.H., DA SILVA, N.S.; TEDESCO, A.C.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Avaliação de células neoplásicas

após terapia fotodinâmica. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v.36, n.1, p.59-64, 2007.

MARTINEZ-CARPIO, P.A.; TRELLES M.A. The role of epidermal growth factor receptor in photodynamic therapy: a review of the literature and proposal for future investigation. *Lasers in Medical Science*, v.25, n.6, p.767-771, 2010.

MATHEWS, M.S.; VO, V.; SHIH, E.C.; ZAMORA, G.; SUN, C.H.; MADSEN, S.J.; HIRSCHBERG, H. Photochemical internalization-mediated delivery of chemotherapeutic agents in human breast tumor cell lines. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v.31, n.1p.49-59, 2012.

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.

MIYASHITA, T.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; WANG, H.G.; LIN, H.K.; HOFFMAN, B. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, v.9, n.6, p.1799-1805. 1994.

OLEINICK, N.L.; EVANS, H.H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiation Research*, v.150, n.5, p.146-156, 1998.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. *Principles of Biostatistics*. Duxbury Press, Belmont, California. 2000.

PAROLIN, M.B.; REASON I.J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. *Arquivo de Gastroenterologia*, v.38, n.2, p.138-144, 2001.

PERLIN, D.S.; MURANT R.S.; GIBSON, S.L.; HILF, R. Effects of Photosensitization by Hematoporphyrin Derivative on Mitochondria! Adenosine Triphosphatase-mediated Proton Transport and Membrane Integrity of R3230AC Mammary Adenocarcinoma. *Cancer Research*, v.45, p.653-658, 1985.

PETROS, A.M.; MEDEK, A.; NETTESHEIM, D.G.; KIM, D.H.; YOON, H.S.; SWIFT, K.; MATAYOSHI, E.D.; OLTERSDFORF, T.; FESIK, S.W. Solution

structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.98, n.6, p.3012-3017, 2001.

PRAHL, S.A.; VAN GEMERT M.J.; WELCH, A.J. Determining the optical properties of turbid mediaby using the adding-doubling method. *Applied Optics*, v.32, n.4, p.559-568 1993.

RIBEIRO, J. N.; SILVA, A. R. D.; JORGE, R.A. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer induced by photodynamic therapy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.40, n.6, p. 383-390, 2004.

RUSLANDER, D.; KASERHOTZ, B.; SARDINAS, J.C. Cutaneous squamous cell carcinoma in cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.19, n.10, 1119-1129, 1997.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H.; ROGERS, A.E.; VAN ZWIETEN, M.J.; GUSTERSON, B.A. Tumors of the mammary gland. *IARC Scientific Publications*, v.99, p. 47-78, 1990.

RUSSO J.; RUSSO, I.H. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.39, p.7-20, 1996.

RUSSO, J.; RUSSO I.H. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.5, n.2, p.187-200, 2000.

SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2.Cary: SAS Institute Inc.

SENDEROWICZ, A.M. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Current Opinion in Cell Biology*, v.16, n.6, p.670-678, 2004.

SELVAKUMARAN, M.; LIN, H.K.; MIYASHITA, T.; WANG, H.G.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, v.9, n.6, p.1791-1798, 1994.

SHARMA, B.K.; RAY A.; KAUR, S.; GUPTA, S. Immunohistochemical co-expression of c-erbb-2/Neu oncoprotein, altered tumour suppressor (p53) protein, EGF-R and EMA in histological subtypes of infiltrating duct carcinoma

of the breast. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.37, n.3, p.223-227, 1999.

SOLAR, P.; FERENC, P.; KOVAL, J; MIKES J.; SOLAROVA, Z.; HRCKOVA, G; FULTOND, B.L.; FEDOROCKOA, P. Photoactivated Hypericin Induces Downregulation of HER2 Gene Expression. *Radiation Research*, v. 175, n.1, p.51-56, 2011.

SRIVASTAVA, M.; AHMAD, N.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.18, p.15481-15488, 2001.

TEITEN, M.H.; BEZDETNAYA, L.; MORLIÈRE, P.; SANTUS, R.; GUILLEMIN, F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are de preferential sites of Foscan localization in cultured tumor cells. *British Journal of Cancer*, v.88, n.1, p.146-152, 2003.

TERADA, S.; UCHIDE, K.; SUZUKI, N.; AKASOFU, K.; NISHIDA, E. Induction of ductal carcinomas by intaductal administration of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in Wistar rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, v.34, n.1, p.35-43, 1995 Apr.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E.; CROCE, C.M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, v.228, n.4706, p.1440-1443, 1985.

USUDA, J.; AZIZUDDIN, K.; CHIU, S; OLEINICK, N.L. Association between the photodynamic loss of Bcl-2 and the sensitivity to apoptosis caused by phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, n.1, p.1-8, 2003.

USUDA, J.; HIRATA, T.; ICHINOSE, S.; ISHIZUMI, T.; INOUE, T.; OHTANI, K.; MAEHARA, S.; YAMADA, M.; TSUTSUI, H.; OKUNAKA, T.; KATO, H.; IKEDA, N. Tailor-made approach to photodynamic therapy in the treatment of cancer based on Bcl-2 photodamage. *International Journal of Oncology*, v.33, n.4, p.689-696, 2008.

VITA JR de ,V.T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S.A. (eds.) *Cancer: principles and practice of oncology* 7th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005, CD-ROM.

XUE, L.Y.; CHIU, S.M.; JOSEPH, S.; OLEINICK, N.L. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochemistry and Photobiology*, v.83, n.5, p.1016-1023, 2007.

XUE, L.Y.; CHIU, S.M.; OLEINICK, N. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene*, v.20, n.26, p.3420-3427, 2001.

YANG, E.; ZHA, J.; JOCKEL, J.; BOISE, L.H.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, v. 80, n.2, p.285-291, 1995.

ZAHA, D.C.; LAZĂR, E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer. Romanian. *Journal of Morphology and Embryology*, v.53, n.1, p.155–160, 2012.

ZAIDI, S.I.A.; OLEINICK, N.L.; ZAIM, M.T.; MUKHTA, H. Apoptosis during Photodynamic Therapy-Induced Ablation of Rif-1 Tumors in C3h Mice - Electron-Microscopic, Histopathologic and Biochemical-Evidence. *Photochemistry and Photobiology*, v.58, n.6, p. 771-776, 1993.

ZHAN, Q.; FAN, S.; BAE, I.; GUILLOUF, C.; LIEBERMANN, D.A.; O'CONNOR, P.M.; FORNACE, A. J. Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*, v.9, n.12, p.3743-3751, 1994.

ZHANG, G.J.; KIMIJIMA, I.; TSUCHIYA, A.; ABE, R. The role of bcl-2 expression in breast carcinomas (Review). *Oncology Reports*, v.5, n.5, p.1211-1216, 1998.

You have full text access to this content

Cancer Science

© 2012 Japanese Cancer Association



Edited By: Yusuke Nakamura

Impact Factor: 3.325

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 67/194 (Oncology)

Online ISSN: 1349-7006

Author Guidelines

LATEST INFORMATION:

- OnlineOpen (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen.asp>) is available.
- New Disclosure policy and the form effective from 1 April 2011 (please see “DISCLOSURE” section)
- PPT files are no longer acceptable for review.

Average submission to first decision is 17 days.

Cancer Science is the official journal of the Japanese Cancer Association. Cancer Science publishes original articles, editorials, and letters to the editor, describing original research in the fields of basic, translational and clinical cancer research. The Journal also accepts reports and case reports. Reports are intended to present highly significant and timely findings. They are not intended simply to be short versions of original articles. Case reports should describe new findings that have a significant clinical impact on oncologists or that may alter the disease concept of a tumor. Case reports of the following contents will not be accepted for publication: description of a rare tumor or condition without new findings to be added to previous reports; combination of different tumors without new suggestive findings for oncological research; remarkable effect of already known treatments without suggestive data to explain the exceptional result. Review articles may also be published. The following subject categories are covered:

- Basic and Clinical Immunology
- Carcinogenesis
- Cell, Molecular, and Stem Cell Biology
- Clinical Research
- Drug Discovery and Delivery
- Epidemiology and Prevention

- Genetics, Genomics, and Proteomics
- Inflammation and Virology
- Pathology

EDITORIAL REVIEW AND ACCEPTANCE

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed by two anonymous reviewers, the Associate Editor, and the Editor. Final acceptance or rejection rests with the Editors, who reserve the right to refuse any material for publication. Authors may present names of potential reviewers and of reviewers whom they would prefer not to review the manuscript. The choice of reviewers remains the Editor's prerogative. A manuscript requiring revision will be returned to the author by email, along with specific suggestions for revision. Authors should follow the instructions below to submit revised manuscripts:

- The author should reply to the suggestions clearly in the “Author’s Response” section by indicating places where revisions have been made, and/or by stating reasons for disregarding other suggestions if they are thought to be unacceptable.
- Modified parts should be highlighted using underline, colored font, the highlight function or track changes.

The revised manuscript should then be resubmitted. Revised manuscripts should be returned to the Editorial Office within 2 months (minor revision) or 3 months (not acceptable in present form: major revision); otherwise they are considered to be new submissions and will be assigned a new date of receipt.

Manuscripts should be written so that they are intelligible to the professional reader who is not a specialist in the particular field. They should be written in a clear, concise, direct style. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of scientific content, the Editor and the Publisher reserve the right to modify typescripts to eliminate ambiguity and repetition and to improve communication between author and reader. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the author for revision.

Duplicate Publication and Scientific Fraud

In cases of suspected scientific misconduct (fabrication or falsification of data, double publication, or plagiarism), the journal will conduct a preliminary investigation. If scientific misconduct is found, the journal will contact the corresponding author’s institution and funding agencies. Cancer Science will not consider publication of any papers by the offending authors for a period of 1 year or longer depending on the circumstances of each case. Please also refer to the Editorial for the journal policy to plagiarism at: [Plagiarism \(http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2009.01254.x/pdf\)](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2009.01254.x/pdf).

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

All articles submitted to the Journal must comply with these instructions. Failure to do so will result in return of the manuscript and possible delay in publication. Manuscripts can be submitted [online \(http://mc.manuscriptcentral.com/cas\)](http://mc.manuscriptcentral.com/cas). For assistance, please contact the Editorial Office of Cancer Science at the address below:

Editorial Office of Cancer Science
 c/o Wiley Japan Frontier Koishikawa Bldg., 4F
 1-28-1 Koishikawa, Bunkyo-ku
 Tokyo 112-0002 Japan
 E-mail: CancerScience@wiley.com (<mailto:CancerScience@Wiley.com>)
 Tel: 81 3 3830 1266
 Fax: 81 3 5689 7278

All pages should be numbered consecutively in the top right-hand corner, beginning with the title page.

COVERING LETTER

A covering letter should be attached and the following information should be included:

- A declaration that the paper is being submitted for consideration for publication in Cancer Science. The content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.
- All authors' agreement: acknowledgment that all authors have contributed significantly, and that all authors are in agreement with the content of the manuscript. In keeping with the latest guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors, each author's contribution to the paper is to be quantified.
- Contact details at which the corresponding author can be contacted, including mailing address, telephone and fax numbers, and an email address.
- If tables or figures have been reproduced from another source, a letter from the copyright holder (usually the Publisher), stating authorization to reproduce the material, must be attached to the covering letter.
- The salient and novel findings of the paper in a concise paragraph.
- The subject category that applies to the manuscript (please choose one only): Basic and Clinical Immunology; Carcinogenesis; Cell, Molecular, and Stem Cell Biology; Clinical Research; Drug Discovery and Delivery; Epidemiology and Prevention; Genetics, Genomics, and Proteomics; Inflammation and Virology; Pathology (effective from 1 November 2009).
- If the word count of the manuscript inevitably exceeds the limit, authors must state the reason for it. Exceeding the word count limit may be allowed at the editors' discretion.
- For Case Reports, authors must state that consent for publication in print and electronically has been obtained from the patient or, if this is not possible, the next of kin.

AUTHOR MATERIAL ARCHIVE POLICY

Authors who require the return of any submitted material that is accepted for publication should inform the Editorial Office after acceptance. If no indication is given that author material should be returned, WILEY-BLACKWELL will dispose of all hardcopy and electronic material two months after publication.

DISCLOSURE

All authors should declare any financial support or relationship that may pose conflict of interest as "Disclosure Statement" between Acknowledgements and References sections. All authors will be required to complete a conflict of interest disclosure form as part of the initial manuscript submission process. The corresponding author is responsible for obtaining completed forms from all authors of the manuscript. Please visit [here](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS_COI_policy_updated_on_18Nov.pdf) (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS_COI_policy_updated_on_18Nov.pdf) to check the details of the latest disclosure guideline. The latest form can be downloaded from [here](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS_COI_form_and_example_updated_on_18nov.pdf) (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS_COI_form_and_example_updated_on_18nov.pdf).

Please be advised that for articles which are accepted after April 1, 2012, in any case that the conflict of interest related to the articles submitted are not properly disclosed, there might be possibilities of imposing a penalty.

ETHICAL CONSIDERATIONS

Authors must state that the protocol for the research project has been approved by a suitably constituted Ethics Committee of the institution within which the work was undertaken and that it conforms to the provisions of the [Declaration of Helsinki in 1995](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm) (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) (as revised in Tokyo 2004).

All investigations on human subjects must include a statement that the subject gave informed

consent. Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used). Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to national guidelines for animal usage in research.

CLINICAL TRIALS

Cancer Science requires that all clinical trials submitted for its consideration are registered in a publicly accessible database. Authors should include the name of the trial register and their clinical trial registration number at the end of their summary. If you wish the editor(s) to consider an unregistered trial, please explain briefly why the trial has not been registered.

COPYRIGHT

A signed Copyright Assignment Form (<http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS-CAF-0109.pdf>) must be provided on submission by: postal mail, fax or as a scanned file. We only accept the form with a hand-written signature. Papers accepted for publication become copyright of the Japanese Cancer Association and authors will be asked to sign a transfer of copyright form. In signing the transfer of copyright it is assumed that authors have obtained permission to use any copyrighted or previously published material. All authors must read and agree to the conditions outlined in the Copyright Assignment Form, and must sign the Form or agree that the corresponding author can sign on their behalf. Articles cannot be published until a signed Copyright Assignment Form has been received. Authors can download the form here (<http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS-CAF-0109.pdf>).

STYLE OF THE MANUSCRIPT

Manuscripts should follow the style of the Vancouver agreement detailed in the International Committee of Medical Journal Editors' revised 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication' (<http://www.icmje.org/>). Spelling. The Journal uses US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the Merriam-Webster's Collegiate Dictionary.

Units. All measurements must be given in SI or SI-derived units. Please go to the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.

Abbreviations. Abbreviations used should be consistent with recommended international nomenclature. If there are few abbreviations used initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only. If there are many non-standard abbreviations, a list of the abbreviations should be prepared. Click here (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/cas_abbreviations.pdf) for a list of Standard Abbreviations that can be used without definition.

Nomenclature. Names of chemical compounds should conform to the International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature and biochemical terms to those of the International Union of Biochemistry (IUB). Chemical substances should be referred to by the generic name only. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name, and the name and location of the manufacturer, in parentheses. Names of enzymes should conform to the nomenclature recommended by IUB, the name to be followed by the enzyme number (EC) in parentheses.

Genetic nomenclature. Standard genetic nomenclature should be used. For further information, including relevant websites, authors should refer to the genetic nomenclature guide in Trends in Genetics (Elsevier Science, 1998).

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345.'

Links are as follows:

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)

PARTS OF THE MANUSCRIPT

Manuscripts parts should be presented in the following order: (i) title page, (ii) summary, abbreviations, and clinical trial register and their clinical registration number at the end of summary, (iii) text (including Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), (iv) acknowledgments (if any), (v) disclosure statement (if any), (vi) references, (vii) appendices (if any), (viii) figure legends, (ix) a list of Supporting Information (if any; with codec used if they are videos), (x) tables (each table complete with title and footnotes) and (xi) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

Word count:

Papers should not exceed the number of words set for each article type. For Original Article, the title page, summary, figure legends are included in the word count. For the other article types, the title page, summary, references, figure legends are included in the word count.

- Original article: up to 4000 words (excluding references), including a summary of no more than 250 words. The number of tables and figures is not limited.
- Review article: 4000-5000 words (including up to 80 references), including a summary of no more than 250 words and 4–6 tables or figures in total.
- Report: up to 2000 words (including up to 25 references), and up to 4 tables or figures in total, including a summary of no more than 250 words. Results and Discussion sections (which may be combined) and Acknowledgements. It must contain highly significant and timely findings.
- Case report: up to 2000 words (including up to 25 references), and up to 3 tables or figures in total. Summary should be up to 100 words. In the covering letter and in the text of the manuscript, authors must state that consent for publication in print has been obtained from the patient or, if this is not possible, the next of kin.
- Letter to the Editor: up to 1000 words (including 10 references), and up to 3 figures or tables in total.

File Format

- Main document: Word.
- Tables: Word or Excel (tables of image data and grouping of text boxes should be avoided.)
- Graphic figures: JPG/TIF/EPS (PDF is acceptable only for submission for ease of transmission during the review process.)

Upon acceptance of the article, high-resolution figures (at least 300 d.p.i.) saved as .jpg or .tif files should be provided. Digital images supplied only as low-resolution files cannot be used.

- Line figures: EPS/ Word/Excel.
- Videos: QuickTime/ MPEG/AVI.

Please note that we cannot accept PowerPoint files. These files must be converted to one of the following file types: TIF/EPS/JPG (use maximum quality). Converting PowerPoint files frequently results in unexpected changes to the figures (e.g. missing or shifted text; shifted image elements). We recommend you not to create figures by PowerPoint. If you do try to convert from PowerPoint to one of these file types, be very careful to compare the final version to your original.

Title page

The title page should contain: (i) the title of the paper, (ii) the full names of the authors, (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out, (iv) the full postal and email address, plus facsimile and telephone numbers, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent. The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote, (v) the precise word count of the manuscript (excluding references for Original Articles; including references for Review Articles, Reports, Case Reports, and Letters to the Editor), (vi) number of tables/figures, (vii) quantity of supporting information.

The title should be short (preferably less than 120 letters), informative and contain the major key words. Do not use unnecessary words such as 'Study of' or 'Results on', or abbreviations in the title.

Summary

All articles must have a summary that states in 250 words or fewer the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. Data such as the number of test subjects and controls, strains of animals or viruses, drug dosages and routes of administration, tumor yields and latent periods, length of observation period, and magnitude of activity should be included. The summary should not contain abbreviations or references.

Text

Authors should use the following subheadings to divide the sections of their manuscript: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion.

Introduction. The introduction should mention the purpose of the investigation, its relation to other work in the field, and the reasons for undertaking the research. Brief reference to the most relevant papers is sufficient.

Materials and Methods. Description of methods should be brief, but with sufficient detail to enable others to reproduce the experiments. When published procedures are used, the appropriate references should be cited. Only new and significant modifications of previously published procedures require complete description. Names of products and manufacturers with their locations (city and state/country) should be given and sources of animals and tumors should always be indicated.

Results. The results should be described concisely. Tables and figures should be used only if they are indispensable for the comprehension of data.

Discussion. The results should be interpreted and related to existing knowledge in the field. Information already given in the introduction or results should not be repeated.

Acknowledgments

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Personal thanks and thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Disclosure

All authors should declare any financial support or relationship that may pose conflict of interest as "Disclosure Statement" between Acknowledgements and References sections. Examples of the disclosure statement will be found [here](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS_COI_policy_updated_on_18Nov.pdf) (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CAS_COI_policy_updated_on_18Nov.pdf).

References

The Vancouver system of referencing should be used (examples are given below). In the text, references should be cited using superscript Arabic numerals in the order in which they appear. If cited in tables or figure legends, number according to the first identification of the table or figure in the text.

In the reference list, cite the names of all authors when there are six or fewer; when seven or more, list the first three followed by et al. Do not use *ibid.* or *op cit.* Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Smith A, 2000, unpublished data). All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list. When a reference is accepted but still in press, authors must submit it to reviewers if requested. If authors refuse to submit, the manuscript might be rejected because reviewers cannot review the context of the articles in press.

Names of journals should be abbreviated in the style used in Index Medicus. Authors are responsible for the accuracy of the references.

Journal article

1 Chenevix-Trench G, Spurdle AB, Gatei M et al. Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 205-15.

Journal articles published ahead of issue (print or online)

An online article that has not yet been published in an issue (therefore has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue.

2 Okumura H, Ishii H, Pichiorri F et al. Fragile gene product, Fhit, in oxidative and replicative stress responses. *Cancer Sci* 2009 doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01168.x

Benz PJ, Soll J, Bölter B. Protein transport in organelles: The composition, function and regulation of the Tic complex in chloroplast protein import. *FEBS Journal*, 2009. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06874.x

Book

3 Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and Leadership Skills for Nurses*, 2nd edn. Albany, NY: Delmar Publishers, 1996.

Chapter in a Book

4 Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 2nd edn. New York: Raven Press, 1995; 465–78.

Published on the World Wide Web

5 Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (Serial online) 1995 Jan–Mar; 1(1): (24 screens). [Cited 5 Jun 1996.] Available from URL:

<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/index.htm> (<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/index.htm>)

If the title of a paper is in English, French or German, it should be written in the original language. The present policy of Cancer Science is to reduce to a minimum citation of works which are not widely available to the international scientific community. However, if the title of an essential citation is in another language, such as Japanese or Russian, it should be translated into English, and the original language should be indicated in parentheses.

Appendices

These should be placed at the end of the paper, numbered in Roman numerals and referred to in the text. If written by a person other than the author of the main text, the writer's name should be included below the title.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Number tables consecutively in the text in Arabic numerals. Type tables on a separate sheet with the legend above. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings. Tables should be submitted in Microsoft Word or Excel. Image files and groupings of text boxes should be avoided.

Figures

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Figures should be sized to fit within the column (88 mm), intermediate (114 mm) or the full text width (180 mm). Materials of inappropriate size will be reduced by the Editorial Office. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration. Figures should be supplied as separate files, with the figure number incorporated in the file name.

- Photographic and scanned images should be supplied meeting all three of the following criteria: (i) TIF or JPG file, (ii) 300 d.p.i. in resolution (or greater); (iii) 86 mm in image width (or greater). For submission, figures saved as .eps or .pdf files will be accepted, for ease of transmission during the review process. Upon acceptance of the article, high-resolution figures (at

least 300 d.p.i.) saved as .jpg, .eps or .tif files should be provided.

- Line figures should be supplied as EPS, Excel or Word files. Please provide the original version of these figures, that is, the file from the program they were drawn in.
- For figures that contain both line and photographic elements, please supply the line elements in the program in which they were drawn and the photographic elements in a separate file according to the instructions above.
- For more information regarding digital figures, please refer to our Electronic Artwork Information for Authors page (<http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>).

Figure legends.

Type figure legends on a separate sheet. Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Supporting Information

This is additional, peer-reviewed material that is hosted online via a link on Wiley Online Library but is not printed in the Journal. It must be submitted with the initial submission.

- Supporting information must be cited at appropriate points in the main text of the manuscript.
- Supporting figures, tables and text must be numbered Fig. S1, Fig. S2, etc., Table S1, Table S2, etc. and Doc. S1, Doc S2, etc, respectively.
- Titles and legends of supporting figures and tables need to be included in the respective figure and table file (s).
- The availability of supporting information needs to be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting information' and providing titles of figures, tables and text.
- Each figure and table file should not be larger than 5MB, although video files may be larger. Prior to submission, please check the guidelines for the format at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp>.
- An author's website cannot be used as supporting information.
- Supporting information will appear as supplied by the author. They will not be checked or typeset in any way.

MANUSCRIPTS

Authors are required to provide electronic copies of their manuscripts to be submitted online. The following instructions should be adhered to:

- Lines should be double-spaced.
- Do not use the carriage return (Enter) at the end of lines within a paragraph.
- Turn the hyphenation option off; include only those hyphens that are essential to the meaning.
- Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.
- Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for β (Greek beta).
- Use a tab, not spaces, to separate data points in tables. If you use a table editor function, ensure that each data point is contained within a unique cell (i.e. do not use carriage returns within cells).

WILEY-BLACKWELL AUTHOR SERVICES

Author Services enables authors to track their article, once it has been accepted, through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production so they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor>) for more details on online production tracking and for a wealth of resources, including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

PROOFS

It is essential that submitting authors supply an email address to which proofs can be emailed. Notification of the URL from where to download a Portable Document Format (PDF) typeset

proof will be sent to the submitting author via email as a final check of the layout, tables and figures. (Note that the corresponding author will only receive the PDF typeset proof if he is the submitting author.) Alterations (other than the essential correction of errors) and addition/deletion of co-authors are unacceptable at PDF stage. Further instructions will be sent with the proof. The submitting author will be given a 48 hour turn-around time to return proof corrections. Submitting authors who will not be available to check their proofs should appoint someone to proofread their article. If the proof is not returned by the appointed date, it may be signed off on by the Editor or held over to the next issue.

OFFPRINTS

A minimum of 50 offprints will be provided upon request, at the author's expense. These paper offprints may be ordered online. Please visit <http://offprint.cosprinters.com/> (<http://offprint.cosprinters.com/>), fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields. If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com (<mailto:offprint@cosprinters.com>)

PUBLICATION FEES

Color figures are not charged for publication. Authors are required to pay a page charge of US\$50/¥6,000 per typeset page. Authors of solicited articles are not required to pay page charges.

ACCEPTED ARTICLES LITE

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles Lite are published online a few days after final acceptance, appear in abstract format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. A completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article Lite.

ONLINE OPEN

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms (http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms). Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp (https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

EARLY VIEW

Cancer Science is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print

publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at <http://www.doi.org/faq.html> (<http://www.doi.org/faq.html>)

WILEY-BLACKWELL JOURNAL ONLINE

Visit the Cancer Science home page at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/cas> (<http://wileyonlinelibrary.com/journal/cas>) for more information. For submission guidelines and digital graphics standards visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>). Cancer Science is also available online at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/cas> (<http://wileyonlinelibrary.com/journal/cas>)

WILEY'S OPEN ACCESS JOURNAL, Cancer Medicine

This journal works together with Wiley's Open Access Journal, Cancer Medicine, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors will be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of Cancer Medicine. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor of Cancer Medicine will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. Accepted papers can be published rapidly, typically within 15 days of acceptance. Cancer Medicine is a Wiley Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to www.cancermedicinejournal.com/ (<http://www.cancermedicinejournal.com/>)

Influence of photodynamic therapy on BCL-2, BAX and HER-2 in breast carcinogenesis.

Isabelle Ferreira*¹, Juliana Ferreira², Clovis Grecco³, Vanderlei S Bagnato³, Glenda Silva, Daisy Maria Favero Salvadori⁴, Noeme S Rocha¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Veterinária.

² Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, SP.

³ Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Física de São Carlos, Departamento de Física e Ciência dos Materiais, Laboratório de Biofotônica.

⁴Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Departamento Patologia.

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: iferreira_16@hotmail.com

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic modality, which induces apoptosis in neoplastic cells in vitro and in vivo. The induction of oxidative stress and formation of reactive oxygen species (ROS) are factors that lead to cell death by apoptosis in PDT ⁽¹⁾. To understand the mechanism which involves apoptosis mediated by PDT can enhance its therapeutic effectiveness. It is clear that there are multiple pathways involved in this mechanism, but many studies are needed to understand them completely ⁽²⁾.

Studies have shown that many of the initial target photosensitizers is the protein anti-apoptotic Bcl-2. This sequester molecules pro-apoptotic as Bax and Bak, inhibiting apoptosis. Moreover, the Bcl-2 inhibits the release of cytochrome c from mitochondria as proteins Bax and BID cytochrome c release from mitochondria thereby enhancing the apoptotic response. Therefore, damage in Bcl-2 and related proteins, may result in release of pro-apoptotic proteins initiating apoptosis ^(2,3).

The discovery of the role of the HER2 gene was one of the milestones in breast cancer research over the past two decades. HER2 + tumors show faster growth, higher capacity and smaller metastases relationship between traditional prognostic factors and survival time [4]. In addition it seems to be an important contribution to the proliferative response to PDT, in terms of necrosis, apoptosis and tumor destruction ⁽⁵⁾.

The antineoplastic therapies that act on the cell cycle require the apoptotic pathway intact to destroy the tumor. Therefore, knowledge of changes in this pathway could contribute to the understanding of failures in the treatment chosen ^(6,7).

Cancer cells often exhibit gaps in the process of apoptosis, due, for example, increased expression of oncogenes, or the loss or decreased function of tumor suppressor genes. The signals that stimulate cell death and the cascade of events leading to apoptosis are today important targets in the search for new anticancer drugs.

Our research group evaluated the efficacy of PDT in chemically induced mammary tumors in rats by DMBA in Sprague-Dawley strain. The results showed that the PDT as single therapy is effective to slow the development of tumors and, as an adjunct to surgery, to avoid recurrence. However, although the PDT decreased the rate of tumor growth was not complete remission of the tumor ⁽⁸⁾. We believe that because the endogenous factors the results were not satisfactory. For this reason the authors

emphasize the need for more comprehensive study, in order to investigate the action of endogenous components in the success of PDT.

The intention is now to evaluate the role of certain genes associated with cell proliferation and apoptosis in the efficacy of PDT, correlating the expression profile of genes BCL-2, BAX and erbB-2 in tumors treated with PDT with different light doses and compared to untreated tumors, and sensitivity of qRT-PCR and immunohistochemistry for this genes in breast tumors treated with PDT, searching markers effective and rapid diagnostic.

2. Materials and Methods

This research is in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science-UNESP-Botucatu (protocol: 72/2009).

2.1 Animals

We used 28 rats aged between 35 and 55 days, virgin Sprague-Dawley strain. The animals remained in the ideal conditions of temperature humidity and light. Feed and water were provided ad libitum.

The breast cancer was induced by 7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA - Sigma-Aldrich) at a dose of 80 mg / kg dissolved in soybean oil by gavage.

The animals were submitted daily to the inspection of viability, and weekly to the clinical evaluation until tumor development, when it was performed the measurement of tumor masses with the assistance of a caliper. Tumors were read in three dimensions (height (L1) of a width (L2) and length (L3)).

2.2 Cytology Diagnostic

The microscopic diagnosis was made by cytological examination by capillarity. The histological slides were stained with Giemsa and Papanicolaou. The slides were examined under an optical microscope at 400X magnification. The cytologic criteria was used by Karim et al ⁽⁹⁾ adapted.

2.3 PDT

The animals were divided into four groups with 7 animals in each group:

- G1 - control - untreated breast tumor;
- G2 - animals submitted to PDT with light dose of 50 J/cm
- G3 - animals submitted to PDT with light dose of 100 J/cm
- G4 - submitted to PDT with light dose of 150 J/cm

The photosensitizer utilized was Photogem ® (HpD, Russia), a hematoporphyrin derivative. The PS was diluted in 0.9% saline solution at a concentration of 200 mg / 40 ml and then administered intraperitoneally at a dose of 12 mg / kg.

The light source used is a laser diode Ceralas Ceramoptec 630 ®, Germany, produces up to 2 W optical power at a wavelength of 630 nm. The amount used was 200 mW / cm.

To perform the lighting the animals were anesthetized with atropine (0.044 mg / kg subcutaneously), and after 10 minutes, was administered 20 mg xylazine 2% (0.2 ml/100 g bw; Vetbrands ®, Brazil) and ketamine 50 mg (Vetaset, Fort Dodge, Brazil) intramuscularly.

The illumination of the tumor occurred after 24 hours of administration PS, interstitially being held by a fiber optic diffuser coupled to the laser, as shown in Figure 1.

Histopathology

To perform the histopathological material was fixed with 10% buffered formalin and subsequently embedded in paraffin, sections were made using a rotating microtomy with a thickness of 3 mM, and placed in an incubator to desparafinizar and stained by hematoxylin staining and eosin (HE).

Histologically analyzed the morphological differences of the tissue changes in relation to normal tissue and type of necrosis observed. A comparison between the light doses used and the depth of necrosis in the breast tissue.

Histologically were analyzed the morphological differences of the tissue changes in relation to normal tissue and type of necrosis observed. A comparison was done between the light doses used and the depth of necrosis in the breast tissue.

2.4 Immunohistochemistry

To perform immunohistochemistry, histological sections of 3 mm thick were obtained and subsequently deparaffinized and rehydrated. The primary antibodies, diluted and recovery methods for each antigen antibody used in this study are summarized in Table 1. To block endogenous peroxidase activity, peroxidase block reagent supplied in the kit Novolink Polymer Detection System (Novocastra Laboratories, Newcastle, England) was used. Subsequently, the reagent protein block provided on the same kit was used to nonspecific reactions.

Primary antibodies were incubated overnight in histological sections at 4 °C. After this, the display system Novolink Polymer Detection System (Novocastra Laboratories, Newcastle, England) was used to detect antigen-antibody reaction. Subsequently, the reagent 3,3 'diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen to

visualize the antigen-antibody reaction. Subsequently, the sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated and mounted using Permount (Fisher Scientific, USA) for viewing under light microscopy. For purposes of negative control primary antibodies were replaced with phosphate buffered saline pH 7.4 in each sample. As a positive control, we used histological sections of mouse lymph node for anti Bax and Bcl-2 and samples of rat mammary carcinoma known to be positive for c-erbB2 in the case of application.

For HER-2 degrees of intensity of staining were semi-quantitatively established by optical analysis based on grading system Hercep Test; 0 = no mark membrane or less than 10% of the cells 1 + = weak reaction with barely perceptible membrane labeling more than 10% of the cells, the membrane part or marking the cells, 2 + = moderate to weak reaction membrane where the marking is complete in more than 10% of the cells 3 + - dialing complete membrane, strong, more than 10% of the cells. The results were classified as positive (overexpression) when the fabric is rated as 2 + or 3 +.

Bcl-2 and Bax expression was quantified as the relative percentage of the area of positive staining. An average of five random fields of higher magnification (400x) was selected for the expression of Bcl-2 and Bax. We used the program Image J ® for image analysis with the K-means clustering method.

Was considered positive for Bcl-2 and Bax a limit of 10% of tumor cells with positive distinct cytoplasmic pattern. The criteria for the interpretation of Bcl-2 and Bax were negative score (0) -0%, a score of 1-10% positive cells; score 2 10-50% positive cells; score 3 more than 50% positive cells following the criterion of Callagy et al., 2006 ⁽¹⁰⁾ Zaha et al ⁽¹¹⁾.

2.5 qRT-PCR

Samples of tumors were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and then conditioned at -80 °C. Extraction of total RNA of samples was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer. Subsequently, it was determined concentration and purity of the RNA by spectrophotometer (NanoVue - EG), then the samples were conditioned at -80 °C.

The cDNA was confectioned from 0.1 g of RNA, for this the reaction was performed with reverse transcriptase enzyme provided in High Capacity Kit (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) according to the manufacturer's protocol. The reaction was incubated at 25 °C for 10 min, then at 37°C for 120 min and then remained at 4 °C. The samples were stored at – 20 °C.

The gene expression assays TaqMan ® (Applied Biosystems TM) were used to target genes *BCL-2* (test Rn00566561_m1), *BAX* (Rn99999125_m1) and *erbB-2* (Rn01480159_g1) and the endogenous gene β -actin probes were labeled with one containing fluorescent reporter dye (FAM) in the 5' end and a quencher dye (MGB) the 3' end.

To verify the efficiency of primers were performed standard curves. The primers, β -actin, Bcl-2, Bax and Her-2 showed efficiencies above 90%.

Gene amplification and quantification were carried out in real time in automatic thermocycler (ABI Prism 7500 Sequence Detection System FAST, Applied Biosystems), the amplification was performed using the TaqMan ® system (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA).

The following parameters were used for amplification of all genes: denaturation at 95 ° C for 20 seconds followed by 40 cycles at 95 ° C for 3 seconds and 60 ° C for 30

seconds. To ensure there was no contamination was added to each plate a negative control (no DNA complement) in duplicate.

The relative quantification was carried out using the method of comparison of the crossing threshold (CT). For each sample we performed a relative quantification (RQ) compared to the control sample ⁽¹²⁾.

2.6 Statistical analysis

The results were compared using the test of analysis of variance (ANOVA) to detect statistical differences between experimental groups and the Student t test to evaluate the difference between the averages of the groups, statistical significance was defined as $P < 0.05$. Statistical analysis was performed with the aid of SAS software, v.9.2.

3. Results and Discussion

Of the 28 animals used in the experiment, five weeks after DMBA administration, 28 (100%) developed breast cancer. The preferential localization of the tumor was in the cervicothoracic region (61.2%), regardless of time of clinical onset of the injury. Of all animals, 8 (2.24%) had multiple tumors. Tumor size ranged from 1.1 x 0.7 x 0.8 cm to 2.6 x 1.3 x 1.0. Among the various experimental animal models used to analyze the various aspects of mammary carcinogenesis, the chemical induction of mammary tumors in rats is one of the most widely used models. The chemically induced mammary tumors in rodents are useful tools for the study of cancer pathogenesis and molecular mechanisms involved in the initiation and progression of neoplastic process ⁽¹³⁾.

DMBA is a genotoxic substance, polycyclic aromatic hydrocarbon compound, metabolized in the liver and accumulate in adipose tissue such as breast has adipose tissue, it is a local tropism for the carcinogen.

Using the DMBA as chemical carcinogen is possible to demonstrate that the carcinogen acts on the cell of the terminal end bud unit (TEB), and that this structure is the one that has the highest proliferative index in the breast, therefore, the area most susceptible to neoplastic transformation ⁽¹⁴⁾.

All developed tumors diagnosed by cytological examination were malignant. In reading these slides was possible to identify the malignancy criteria described by Karim et al. ⁽⁹⁾ such as high cellularity, anisokaryosis, anisocytosis, loose chromatin, prominent nucleoli.

The morphological types neoplastic evidenced by HE staining followed the sequence: tubular carcinoma (16 cases), ductal (nine cases), papillary ductal (3 cases), the tumors were classified as recommended by Russo et al. ⁽¹⁵⁾.

Mammary tumors induced by a single dose of DMBA vary morphologically from hyperplasia to adenomas and carcinomas ^(16, 17, 18). In the present study were diagnosed malignant neoplasias, in this context can ascertain that the model was established properly.

The importance of using an experimental model of chemically induced breast tumor is able to study the variability of the tumor, once for each tumor type, to biological behavior is different. The studies in the literature on the use of PDT in mammary tumors reported, mostly the results in cell culture, which has the disadvantage of losing some tissue characteristics and the difficulty of extrapolation to the living organism.

Moreover, there are anatomical and physiological similarities of the model used in this study with the woman ^(14,19). With regard to the similarities of the model used in

this study, there is no data in the literature directly related to bitch, but scientific studies say the bitch is a model study of breast cancer for women due to their anatomy and physiology. The model of chemical induced mammary tumors in female rats are one of the most used for the study of mammary carcinogenesis, but as regards the use of this model in the study of PDT literature is sparse.

The type of necrosis observed was hemorrhagic necrosis. Comparing the dose of light and the depth of the breast tissue necrosis was observed, qualitatively, the highest dose of light is increased necrosis area and the higher the vascular injury.

By immunohistochemistry, among the samples tested for Bax (n = 28), 61 and 29% were classified as score 3 and 2, respectively. For Bcl-2 (n = 28), 43 and 39% were classified as score 3 and 2, respectively. Furthermore, only 4 and 14% of the samples on HER2 scores were classified as 3 and 2. Statistical data of immunohistochemistry showed that, regardless groups studied, the distribution of scores was different between the genes studied ($P < 0.001$) as shown in Figure 1, but the distribution of scores was not statistically different between groups. That is, the DMBA-induced mammary tumors in female rats of SD strain express Bax and Bcl-2 and do not express or have low expression of HER-2. However, changing the pattern of expression of these proteins is not statistically significant between the different groups.

We evaluated the gene expression profile of BCL-2, BAX and HER-2 in chemically induced mammary tumors in SD rats without treatment (G1), underwent PDT with light dose of 50 J / cm (G2) undergoing PDT with light dose of 100J/cm (G3) and subjected to PDT with light dose of 150J/cm (G4).

The results for the BCL-2 gene are shown in Figure 2. For all treatments there was no change in the pattern of expression of Bcl-2 as compared to G1.

The results for BAX gene are shown in Figure 3. For all treatments there was no change of BAX expression pattern relative to G1.

The results for the HER-2 gene are shown in Figure 4. For all treatments there was no change of HER-2 expression pattern relative to G1.

Chiu et al. ⁽²⁰⁾ demonstrated that the cell lines of human prostate cancer (DU – 145), is resistant to apoptosis induced by PDT due to lack of Bax. All DMBA-induced mammary tumors expressed Bax, so these tumors would be sensitive to PDT.

According to Srivastava et al. ⁽²⁾ the treatment of cells with PDT for a RIF Pc 4 resulted in down-regulation of Bcl-2, which can initiate the apoptotic pathway to sensitize the cells to apoptosis mediated by PDT, these cells were also unchanged levels of Bax. In this study the Bax levels also showed the same, but was not observed down-regulation of Bcl-2. The damage caused to Bcl-2 by PDT was also described by Xue et al. ⁽²¹⁾.

The inhibition and / or degradation of the HER-2 gene after the completion of PDT, as demonstrated by Koval et al. ⁽²²⁾ and reported by Martinez-Carpio et al. ⁽⁵⁾ seems to have occurred in this study because there was no change in the pattern of expression of this gene after the completion of PDT, regardless of the light dose used.

As is known the DLI (Drug-light interval) interferes with the response of PDT. When using a hematoporphyrin derivative as FS, once adopted a large interval, the action of PDT is more in the cell, however if an interval of less prevalent vascular response ⁽²³⁾. Thus suggested that the PDT may be associated with inhibition or activation of several genes involved in cell death.

Another factor is the PS used. The Photogem, FS used in this study, is a complex mixture of monomeric and aggregated porphyrins, when activated by light, causes damage to the mitochondria ⁽²⁴⁾.

The Phthalocyanines are macrocycles of synthetic origin whose structure is composed of units isoindol together by bridges of nitrogen. The PC4, FS used in most studies cited, will connect to the mitocôndria, endoplasmic reticulum and the Golgi complex ⁽²⁵⁾.

The Hypericin, FS also mentioned, is a photoactive pigment type antroperilene quinine, found in plants of the genus *Hypericum*. He has as main target the mitochondria and one of its main advantages over porphyrin compounds is the low tendency to aggregate ^(26, 27).

Therefore, they are different molecules representing different degrees of aggregation, which can influence the penetration of the FS cell. Furthermore, the concentration of SP, its affinity for different organelles and their distribution, can also influence response mechanisms PDT ⁽²⁸⁾.

The PCR-qRT appeared to be more sensitive than immunohistochemistry to detect expression of Bcl-2 and HER2 in these experimental conditions, therefore in one of the 28 tumors (3.6%) the Bcl-2 protein was not located and 9 of 28 (32%) tumors Her-2 protein was not located, but in qRT-PCR all the tumors expressing Bcl-2 and HER-2.

Acknowledgements

The authors are greatly indebted to FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) for Financial Support, CePOF-IFSCUSP (Optics and Photonics Research Center – Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo) for scientific material support (Laser and photosensitizer), José Dirceu Vollet Filho, Marília Porto for scientific support.

4. References

1. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res* 1998; **150** (5): 146-56.
2. Srivastava M, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *J Biol Chem* 2001; **276** (18): 15481-88.
3. Kessel D, Arroyo AS. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. *Photoch Photobio Sci* 2007; **6** (12): 1290-95.
4. Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ Breast Cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *Am J Clin Pathol* 2008; **129** (2): 263-73.
5. Martinez-Carpio PA, Trelles MA. The role of epidermal growth factor receptor in photodynamic therapy: a review of the literature and proposal for future investigation. *Lasers Med Sci* 2010; **25** (6): 767-71.
6. Itoh M, Chiba H, Noutomi T, Takada E, Mizuguchi J. Cleavage of Bax-alpha and Bcl-x (L) during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol* 2000; **36** (3): 277-85.
7. Senderowicz AM. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16** (6): 670-78.
8. Ferreira I, Ferreira J, Vollet-Filho JD, Moriyama LT, Bagnato VS, Salvadori DMF, Rocha NS. Photodynamic therapy for the treatment of induced mammary tumor in rats. *Lasers Med Sci* 2012. DOI 10.1007/s10103-012-1114-3
9. Karim BO, Ali SZ, Landolfi JA, Mann JF, Liu G, Christian A, Dicello JF, Rosenthal DL, Huso DL. Cytomorphologic differentiation of benign and malignant mammary

- tumors in fine needle aspirate specimens from irradiated female Sprague-Dawley rats. *Vet Clin Pathol* 2008; **37** (2): 229-36.
10. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, Ellis IO, Huntsman D, Caldas C. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res* 2006; **12** (8): 2468–75.
 11. Zaha DC, Lazăr E. Molecular characterization of apoptosis by the immunohistochemical evaluation of Bcl-2 in breast cancer Romanian. *J Morphol Embryol* 2012; **53** (1): 155–60.
 12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-08.
 13. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Tr* 1996; **39**: 7-20.
 14. Russo J, Russo IH, Rogers AE, Van Zwieten MJ, Gusterson, BA. Tumors of the mammary gland. *IARC Scientific Publications* 1990; **99**: 47-78.
 15. Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol* 2000; **5** (2): 187-200.
 16. Terada S, Uchide K, Suzuki N, Akasofu K., Nishida E. Induction of ductal carcinomas by intaductal administration of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene in Wistar rats. *Breast Cancer Res Tr* 1995; **34** (1): 35-43.
 17. Kocdor H, Cehreli R, Kocdor MA, 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 Env Heal A* 2000; **68** (9): 693-701.

18. Barros ACS, Muranaka EN, Mori JL, Pelizon HT, Iriya K, Giocondo G, Pinotti JA. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. *Rev Hosp Clín* 2004; **59** (5): 257-261.
19. Heffelfinger SC, Gear RB, Taylor K, Miller MA, Schneider J, Ladow K, Warshawsky D. DMBA-induced mammary pathologies are angiogenic in vivo and in vitro. *Lab Invest*. 2000; **80** (4): 485-92.
20. Chiu SM, Xue LY, Usuda J, Azizuddin K., Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Brit J Cancer* 2003; **89** (8): 1590-97.
21. Xue LY, Chiu SM, Oleinick N. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogen* 2001; **20** (26): 3420-27.
22. Koval J, Mikes J, Jendzelovsky R, Kello M, Solar P, Fedorocko P. Degradation of HER2 Receptor Through Hypericin-mediated Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* 2010; **86** (1): 200-05.
23. Li L-B, Luo R-C. Effect of drug–light interval on the mode of action of Photofrin photodynamic therapy in a mouse tumor model. *Lasers Med Sci* 2009; **24** (4): 597-603.
24. Perlin DS, Murant RS, Gibson SL, Hilf R. Effects of Photosensitization by Hematoporphyrin Derivative on Mitochondria Adenosine Triphosphatase-mediated Proton Transport and Membrane Integrity of R3230AC Mammary Adenocarcinoma. *Cancer Res* 1985; **45**: 653-58.
25. Usuda J, Azizuddin K, Chiu S, Oleinick NL. Association between the photodynamic loss of Bcl-2 and the sensitivity to apoptosis caused by phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2003; **78** (1): 1-8.

26. Diwu Z, Lown JW. Hypocrellins and their use in photosensitization. *Photochem Photobiol* 1990; **52**: 609-16.
27. Halder M, Chowdhury P, Gordon M, Petrich J. Hypericin and its perylene quinone analogs: probing structure, dynamics, and interactions with the environment. *Adv Photochem* 2005; **28**. DOI: 10.1002/0471714127.ch1
28. Teiten, M.H. Bezdetnaya, L.; Morlière, P.; Santus, R.; Guillemin, F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are de preferential sites of Foscan localization in cultured tumor cells. *Brit J Cancer* 2003; **88** (1): 146-52.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – Distribution of scores for target gene

Figure 2 – Comparison between mean levels of expression by qRT-PCR *BCL-2* gene from group G2 with respect to G1 (A), the group G3 in relation to G1 (B), the group G1 to G4 in relation (C) and in all treated groups with respect to G1 (D). Mann Whitney. Comparison of mean expression levels by qRT-PCR gene *BCL-2* of G2, G3, G4 and G1 ANOVA with respect to (E). QR: the relative quantification of the gene. GT: Groups Treaties.

Figure 3 – Comparison between mean levels of expression by qRT-PCR gene *BAX* group G2 with respect to G1 (A), the group G3 in relation to G1 (B), the group G1 to G4 in relation (C) and all treated groups compared to G1 (D). Mann Whitney. comparison of mean expression levels by qRT-PCR of the gene *BAX* G2, G3, G4 and G1 ANOVA with respect to (E). QR: the relative quantification of the gene. GT: Groups Treaties.

Figure 4 - Comparison between mean levels of expression by qRT-PCR *HER-2* gene from group G2 with respect to G1 (A), the group G3 in relation to G1 (B), the group G1 to G4 in relation (C) and in all treated groups with respect to G1 (D). Mann Whitney comparison of mean expression levels by qRT-PCR of the *HER-2* gene G2, G3, G4 and G1 ANOVA with respect to (E). QR: the relative quantification of the gene. GT: Groups Treaties.

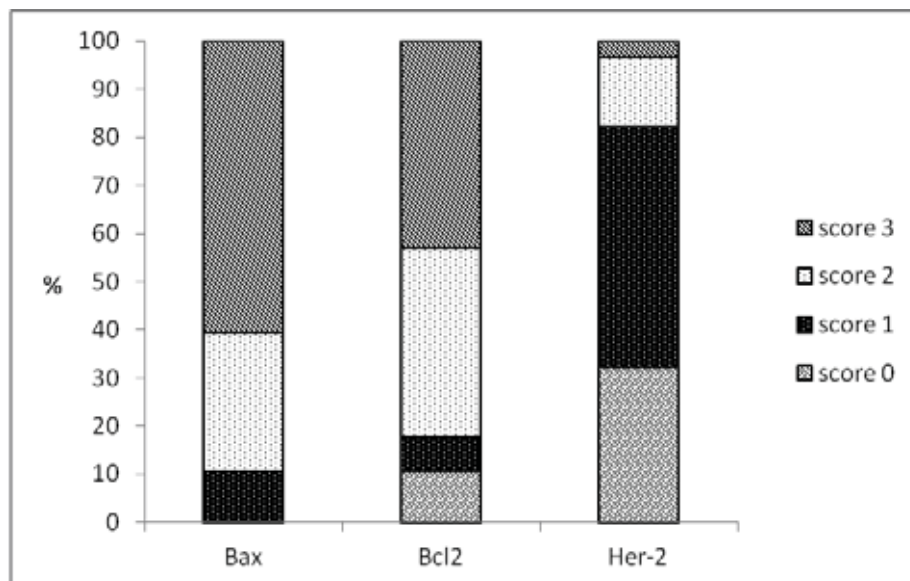


Figure 1

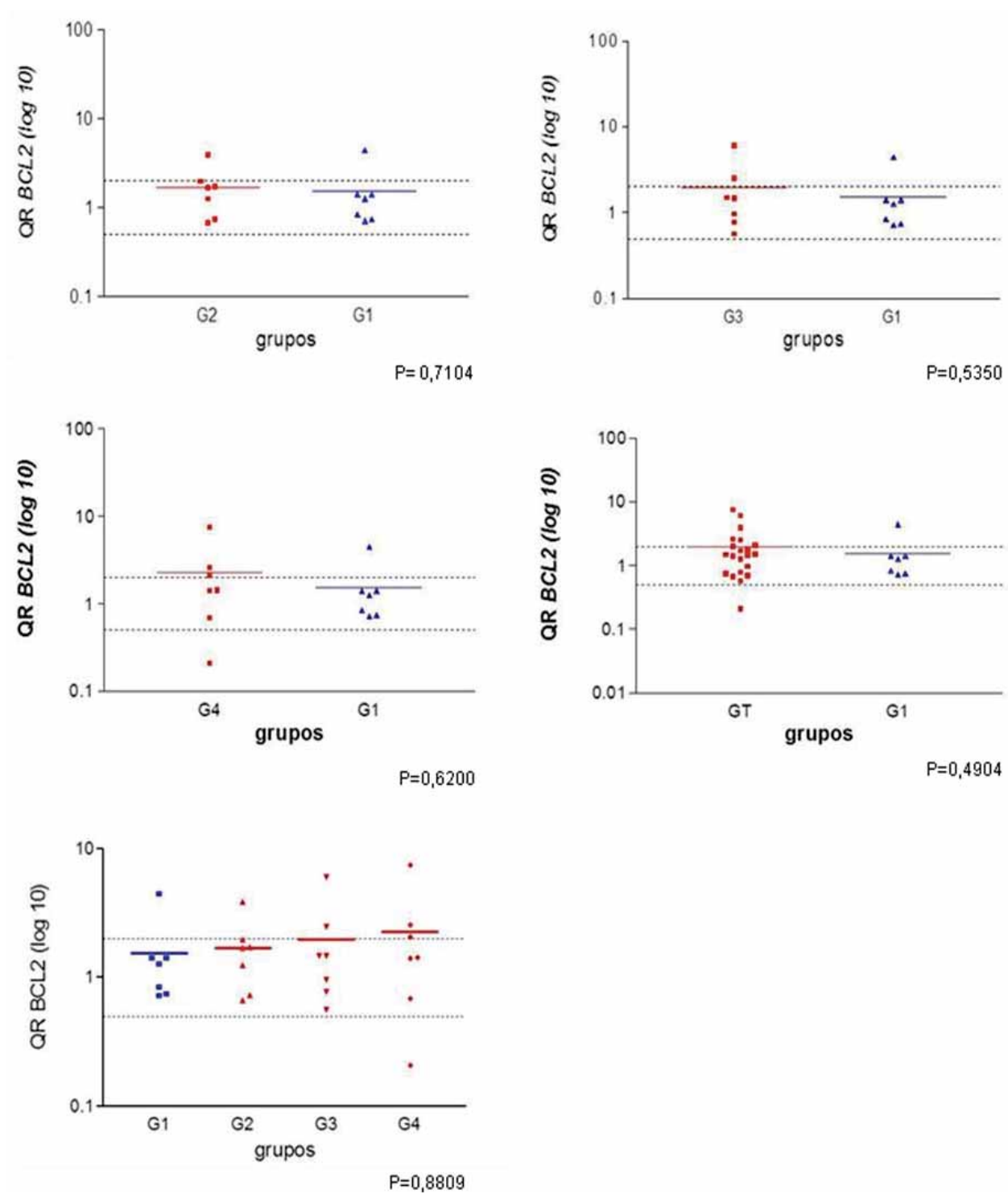


Figure 2

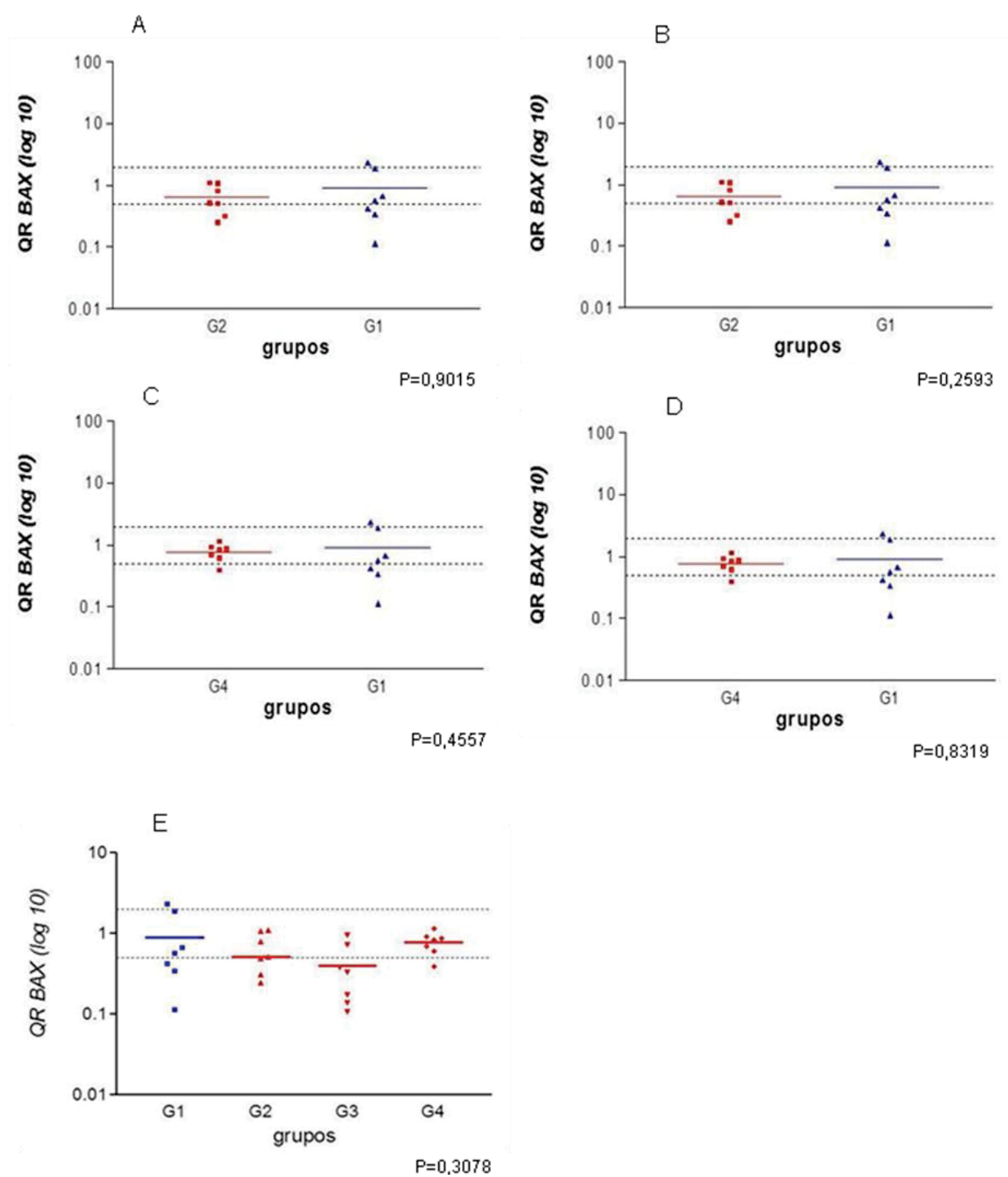


Figure 3

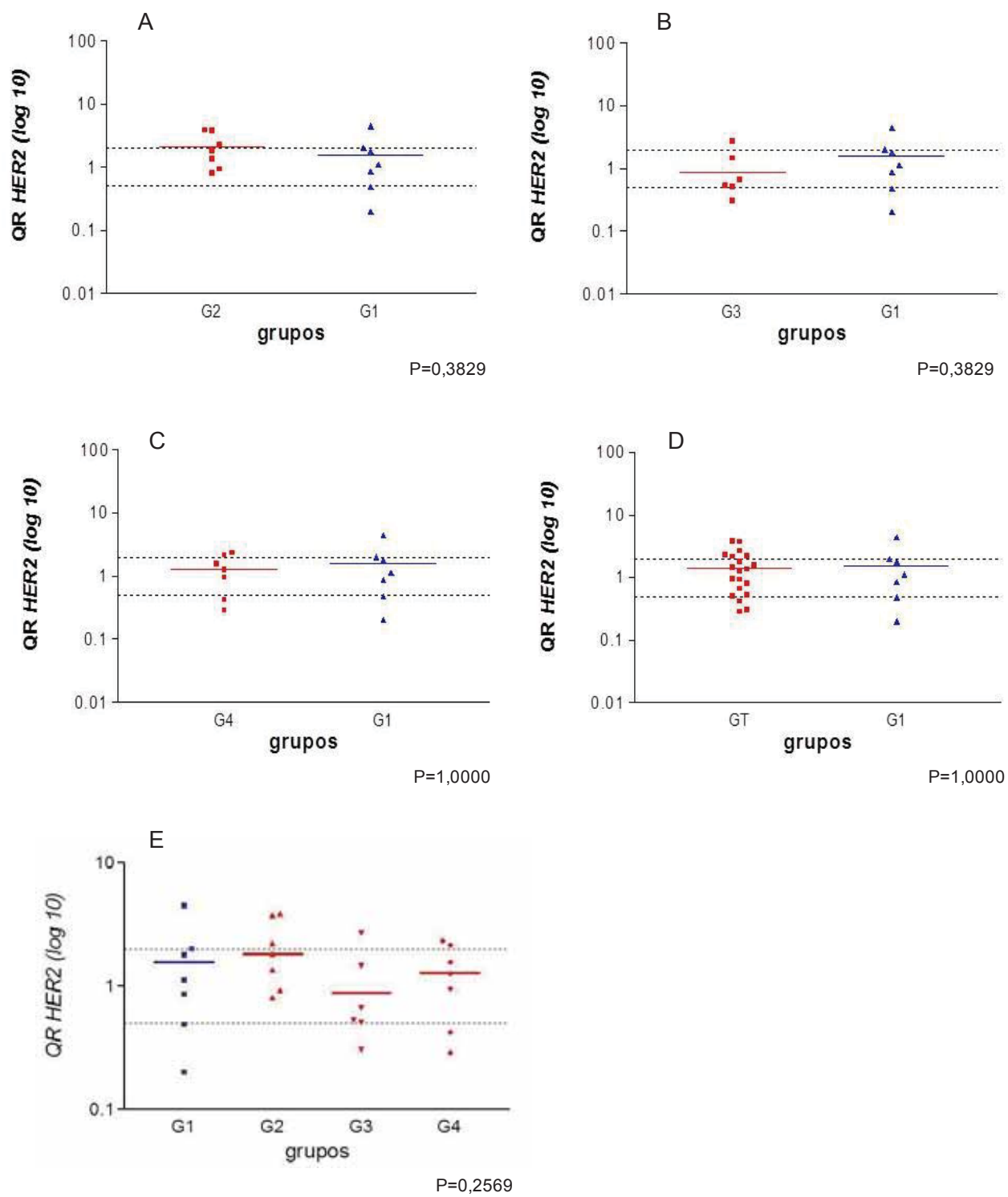


Figure 4