



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV

**TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CARCINOMA
MAMÁRIO DE CADELA CULTIVADO *IN VITRO***

MARTHA DE SOUZA TEIXEIRA DA ROCHA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2010**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CARCINOMA MAMÁRIO DE CADELA
CULTIVADO *IN VITRO***

MARTHA DE SOUZA TEIXEIRA DA ROCHA

ORIENTADOR: PAULA DINIZ GALERA

CO-ORIENTADOR: RICARDO BENTES DE AZEVEDO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 020/2010

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2010**

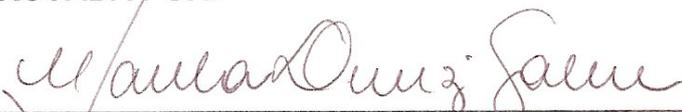
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CARCINOMA MAMÁRIO DE CADELA
CULTIVADO *IN VITRO*

MARTHA DE SOUZA TEIXEIRA DA ROCHA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

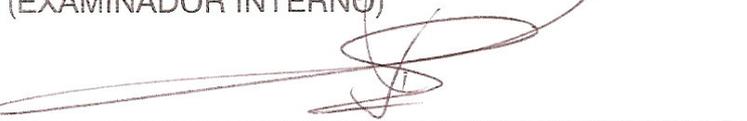
APROVADA POR:



PAULA DINIZ GALERA, MVD, PhD (Universidade de Brasília - UnB)
(ORIENTADOR)



MÔNICA PEREIRA GARCIA, MVD, PhD (Universidade de Brasília - UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)



CARLOS ROBERTO DALECK, MVD, PhD (Universidade Estadual Paulista – UNESP)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 18 de MARÇO de 2010.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ROCHA, M.S.T.. **Terapia fotodinâmica sobre carcinoma mamário de cadela cultivado *in vitro***. Brasília:Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 85 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA 020/2010

Rocha, Martha de Souza Teixeira da

Terapia fotodinâmica sobre carcinoma mamário de cadela cultivado *in vitro* / Martha de Souza Teixeira da Rocha orientação de Paula Diniz Galera, co-orientação de Ricardo Bentes de Azevedo – Brasília, 2010. 85p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2010.

1.terapia fotodinâmica, 2.carcinoma mamário, 3.cadela, 4. alumino-cloro ftalocianina lipossomal.

I. Rocha, M.S.T.. II. Terapia fotodinâmica sobre carcinoma mamário de cadela cultivado *in vitro*

CDD ou CDU
Agris / FAO

DEDICATÓRIA

A Deus, meu rochedo, minha salvação e minha fortaleza (Salmo 61.3)

Aos meus amados pais Geraldo Rosalvo e Maria Virgínia e às minhas irmãs Mariana e Maria Izabel pelo amor, amizade, paciência e confiança. Sem o apoio incondicional de vocês, certamente não chegaria até aqui.

Amo vocês

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos Profs. Drs. Carolina Madeira Lucci e Ricardo Bentes de Azevedo, agradeço pela oportunidade dada, sem a qual nada disso seria possível. Obrigada por ajudar não somente a mim como também, a todos que lhes procuram na busca pelo conhecimento. Obrigada por acreditarem em seus orientados, co-orientados e discentes, pelos valiosos ensinamentos e valores morais adquiridos e pelo companheirismo principalmente nas horas em que nem eu acreditava mais em mim. Minha admiração e respeito pelos mestres, profissionais, líderes e seres humanos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dra. Paula Diniz Galera, pela orientação concedida, pela confiança, pelos vários anos de convivência e oportunidades. Você é um exemplo para mim.

Ao Prof.Dr. Carlos Roberto Daleck e Prof Dra. Mônica Pereira Garcia pelo aceite do convite para compor a minha banca examinadora. Fico honrada com a presença, correções e considerações dos docentes para a melhoria do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco e equipe pela disponibilidade de envio e formulação do agente fotossensibilizador.

Ao Prof. Sebastião Willian da Silva pela generosidade de realizar as avaliações do LED e paciência em ensinar a uma médica veterinária importantes conceitos da Física.

Aos Profs. Msc, Christine Souza Martins, Prof. Dr. Richard da Rocha Figueiras e Prof. Dr. Daniel Gerardi pelos ensinamentos e ajuda nas horas mais difíceis. Mais que grandes mestres, vocês foram grandes amigos. A admiração e o respeito serão eternos.

Ao Prof Dr Márcio Botelho de Castro, pela ajuda sincera e desinteressada nas análises adicionais ao meu projeto. Sei que posso contar a qualquer hora seja com o docente ou com o amigo. Conhecer essa pessoa tão íntegra e de bom coração foi um dos grandes presentes que ganhei no mestrado.

Ao Prof. Ricardo Titze pela disponibilidade do laboratório do MMB.

A todos, sem exceção, funcionários, médicos veterinários e residentes do Hospital Veterinário da UnB, pelo apoio, paciência, solidariedade, e compreensão nos momentos de ausência. Obrigada especialmente a Equipe da Clínica Cirúrgica e aos

funcionários Alex, Cris, Hugo, Joacir, Monique, Nazaré e Wilson pela ajuda nos horários mais imprevisíveis.

A equipe do laboratório de Morfologia e Morfogênese da UnB, em especial a Zélia e aos pesquisadores Camila, Carol, Cláudio, Grazielli, Jaqueline, João, Jú, Larissa, Leandro, Luis, Maitê, Natália, Patricia, Victoria, por me receberem de braços abertos e pelas inúmeras ajudas no decorrer de meu mestrado. A cada dia admiro mais a capacidade científica de cada um de vocês, contem sempre comigo.

A Universidade de Brasília por ter me acolhido desde a graduação. Minha história profissional sempre estará vinculada a esta instituição tão querida.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES, Finatec, pelo auxílio financeiro.

A Pós Graduação Saúde Animal - FAV, e especial ao coordenador Prof. Dr Vítor Salvador Picão e aos funcionários Kelly Cristina e Deuzidete pelo empenho de vocês sempre quando me foi necessário.

A toda equipe da Microbiologia Veterinária, Patologia Veterinária e Patologia Clínica, pela boa vontade em todos os momentos.

As médicas-veterinárias: Anahí, Cris, Karla, Marta, Mirna e Vanessa. Não há palavras para agradecer tanto esforço, tanta amizade e desprendimento. Nesta trajetória muitas vezes árdua, vocês foram sensacionais.

Ao Laboratório de Reprodução Animal e as mestrandas Luciana e Renata, amigas adquiridas no laboratório para toda vida. Agradeço pelo companheirismo, seja nas horas de alegria quando as coisas davam certo ou nas horas de tristezas decorrentes dos obstáculos enfrentados. Vocês foram fundamentais para meu equilíbrio.

As Médicas veterinárias, Alexandra, Bruna, Catarina, Etiele e Samara pela valiosa ajuda nos atendimentos e atenção aos meus pacientes tão especiais da oncologia. Sem a ajuda de vocês, jamais conseguiria tocar meus projetos.

Ao amigo e médico veterinário Mário Falcão, pelos anos de amizade. A cada dia lhe admiro mais como ser humano e profissional. Estarei sempre presente quando precisar.

A Maria Fernanda, “filha”, médica veterinária e minha amiga, pelas palavras corretas nas horas mais incertas e pelas várias ajudas no decorrer deste trabalho. Obrigada por me ouvir, e por sempre estar disposta a me ajudar.

A Ana Bárbara, médica veterinária pelo carinho, amizade, cooperação e força no Hvetinho. Obrigada pelo ombro amigo.

A minha melhor amiga, minha irmã Luíza Quintão pela presença constante mesmo estando fisicamente distante e pela amizade verdadeira. Obrigada por sempre estar ao meu lado nos momentos mais importantes, seja torcendo pelo meu sucesso, pela minha felicidade, seja me protegendo, me consolando ou me aconselhando. Sua amizade é essencial em minha vida. Como sinto sua falta, mas agora falta bem pouquinho... Volta logo!!!

Aos meus “filhos”: Brisa, Cocada, Nina e Nikos, pelo amor incondicional. Desculpem pela falta de tempo principalmente nesta reta final.

Aos meus queridos pacientes e seus respectivos proprietários. Todo esforço, dedicação, estudos é por amor e dedicação a vocês. Obrigada pela confiança em meu trabalho e pela paciência nos momentos em que não pude estar presente. Saudades eternas a Sacha, Layka, Pagu, Kay, Fufu e Bárbara Carolina.

Ao amigo e médico veterinário Levi Fiúza, você faz parte de tudo isso... Saudade eterna...

“A vida é valor absoluto. Não existe vida menor ou maior, inferior ou superior. Engana-se quem mata ou subjuga um animal por julgá-lo inferior. Diante da consciência que abriga a essência da vida, o crime é o mesmo.”

(Olympia Salete)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	Xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I	01
Introdução	01
Referencial Teórico	03
Objetivos	15
Referências	16
CAPÍTULO II	27
Introdução	27
Material e Métodos	29
Resultados	44
Discussão	54
Conclusões	59
Referências	60
CAPÍTULO III	67
Considerações Finais	67
ANEXO	68

LISTA DE QUADROS

		Página
QUADRO 1	Classificação Histológica dos Neoplasmas Mamários em Cadelas segundo a Organização Mundial de Saúde (MISDORP <i>et al.</i> , 1999).	04
QUADRO 2	Descrição da constituição de cada grupo experimental. As demarcações em “X” referem-se à aplicação do item em questão	48

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Ilustração gráfica dos mecanismos fotoquímicos presentes na TFD. Observa-se transferência de energia e a produção de radicais livres em diferentes tipos de reações, após a excitação do fármaco FS devido à irradiação com LED	11
FIGURA 2	Imagem fotográfica do aparelho LED protótipo utilizado nesta dissertação, em funcionamento durante TFD. Note a amostra protegida da luz ambiente	33
FIGURA 3	Imagem computadorizada da faixa obtida através da cromatografia de camada delgada (CCD) para identificação da faixa de comprimento de onda do LED. Observa-se em 580nm percepção do espectro (luz), em 660nm obtém-se seu maior valor e em 700nm termina seu espectro	33
FIGURA 4	Representação esquemática elucidando as etapas envolvidas da colheita da amostra até o estabelecimento das culturas primárias. A) cadeia mamária unilateral removida cirurgicamente do paciente contendo massas tumorais em glândula mamária abdominal cranial e inguinal; B) excisão do fragmento tumoral para colheita da amostra; C) diérese do material; D e E) imediatos ciclos de lavagens da amostra e envio para o laboratório através do meio de transporte; F) fracionamento da amostra coletada e G) cultivo produzido a partir dos fragmentos do tumor.	36
FIGURA 5	Representação do preparo das placas de 24 poços para realização do experimento com TFD. A) garrafa de cultivo contendo células aderidas na superfície e confluentes; B) após adição da solução de tripsina-EDTA e consequente destacamento das células aderidas ao fundo do frasco de cultura; C) e D) ressuspensão do meio contendo células soltas e envio para centrífuga a 750xg durante 05 minutos para formação do <i>pellet</i> . E) descarte do sobrenadante e ressuspensão do <i>pellete</i> em 1mL de meio e F) transferência de 1×10^5 células em cada poço para após 24 horas de estufa realização do experimento.	38
FIGURA 6	Representação esquemática dos grupos experimentais e análises realizadas.	40
FIGURA 7	Viabilidade média (\pm DP) das células após 24 horas do experimento, avaliadas pelo ensaio com corante Azul Tripán. ^(ab) Barras com diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).	46
FIGURA 8	Viabilidade média (\pm DP) das células após 24 horas do experimento através do método de avaliação MTT. ^(abc) Barras com diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).	47
FIGURA 9	Fotomicrografias de fluorescência de células cultivadas de carcinoma mamário de cadela em diferentes grupos experimentais coradas com	

	alaranjado de acridina e brometo de etídeo, mostrando células viáveis (A), em apoptose tardia (B), apoptose (C), e necrose (D).	48
FIGURA 10	Porcentagem média (\pm DP) de células vivas, com apoptose e necrose após 24 horas do experimento através do método de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídeo. ^(a,b) Barras com diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). ^(**) Diferença estatisticamente significativa de células mortas por necrose entre TFD e os demais grupos ($P < 0,05$).	49
FIGURA 11	Fotomicrografias de células do grupo controle em cultivo. Em (A) observa-se no aumento de 100X, nível de confluência de aproximadamente 80%, células justapostas, (B – D) aumento de 200x e 400X, células de diferentes formatos, núcleo, citoplasma evidentes. Notar escassez ou ausência de células arredondadas e imersas no sobrenadante.	51
FIGURA 12	Fotomicrografias de células em cultivo tratadas com terapia fotodinâmica. (A) observa-se no aumento de 100X, ausência de confluência, células arredondadas flutuantes no meio de cultivo, (B) aumento de 400X além das características observadas em (A), há também poucas células aderidas no fundo da placa, próximas aos aglomerados celulares de formato arredondado. (C) aumento de 400X verificam-se células poligonais com vacúolos citoplasmáticos (seta) e em (D) aumento de 600X, observa-se com melhor precisão as alterações analisadas em (C).	52
FIGURA 13	Fotomicrografias de células cultivadas em lamínulas com coloração panótico rápido, grupo controle. (A) aumento de 25X, projeção espacial da monocamada de células, (B) aumento de 100X, células com arranjo uniforme, e projeções citoplasmáticas conferindo-lhes aspecto de estrela. (C) aumento de 200X e (D) aumento de 400X, observa-se citoplasma abundante, núcleo preservado e bem delimitado, presença de inúmeros grânulos citoplasmáticos.	54
FIGURA 14	Fotomicrografias de células cultivadas em lamínulas com coloração panótico rápido, grupo TFD. (A – C) - aumento de 400X, células em processo degenerativo, perda da morfologia padrão, (D) aumento de 100X, fundo da placa com ausência de monocamada e intensa quantidade de debris celulares	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ALA	Ácido Alfa-Linoléico
AICIFt	Alumínio-Cloro-Ftalocianina
AIPCS₄	Alumínio-Ftalocianina Tetrasulfonada
ANOVA	Análise de Variância
B16F10	<i>Murine Melanoma Cells</i>
CCD	Cromatografia de Câmara Delgada
CHO-KI	<i>Growth in Chinese Hamster Ovary Cells.</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
±DP	Desvio Padrão Médio
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EROS	Espécie Reativa de Oxigênio.
FAV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
FS	Fotossensibilizador
HEp - 2	<i>Human Epidermoid Cancer Cells</i>
IB	Instituto de Ciências Biológicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LED	Laser Emissor de Diodo
MCF-7c3	<i>Human Breast Cancer Cell Line</i>
MTT	(brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio)
NHIK	<i>Human Cervix Carcinoma</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSCC	<i>Oral Squamous Cells Carcinoma</i>
PBS	Solução de Tampão Fosfato
PVPI	Polivinilpirrolidona
TFD	Terapia Fotodinâmica
TNM	Tumor/NóduloLinfonodo/Metástase
UnB	Universidade de Brasília
ZnPc	Zinco-ftalocianina

RESUMO

O câncer de mama representa o neoplasma maligno mais comum nas cadelas e o tratamento atualmente consiste na sua excisão, associado ou não à quimioterapia adjuvante que pode ser eficaz ou não. Conseqüentemente é crescente a busca por alternativas terapêuticas que cessem ou retardem o crescimento tumoral. Uma terapia promissora, difundida para o tratamento de alguns tipos de é a terapia fotodinâmica que se baseia na combinação de um fármaco fotossensibilizante que quando ativado provoca morte celular. O objetivo do trabalho foi avaliar a aplicação e citotoxicidade da Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal (TFD-AICIFt) em um sistema de tratamento experimental *in vitro* de amostras tumorais extraídas de carcinoma mamário de cadela submetida ao tratamento cirúrgico tradicional. Para isso foram formados 04 grupos experimentais: grupo controle, LED, fármaco fotossensibilizador AICIFt 2,5 μ M e TFD. O grupo O controle (1) foi aquele em que as células não foram submetidas a nenhum tratamento; O grupo LED (2) recebeu iluminação com a fonte de luz LED na intensidade 10 J/cm² e comprimento de onda 660nm. O grupo AICIFt (3) apenas administração do fármaco AICIFt e grupo TFD (4), que consistiu na terapia fotodinâmica. Foram analisados viabilidade celular, citotoxicidade, via de morte celular e possíveis alterações morfológicas através dos ensaios ciitotóxicos; azul tripan, dupla coloração de alaranjado de acridina e brometo de etídio, MTT e avaliações morfológicas que evidenciaram efetividade da TFD nas condições experimentais deste trabalho.

1.terapia fotodinâmica, 2.carcinoma mamário, 3.cadela, 4. alumino-cloro ftalocianina lipossomal

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignant neoplasm in dogs and treatment currently consists of surgical excision, with or without adjuvant chemotherapy. However, the search for alternative therapies to stop completely or to slow down tumor growth is increasing. Photodynamic therapy (PDT) is based on the combination of a photosensitizing agent that once activated causes cell death. The objective of this study was to evaluate PDT mediated by Aluminum-Chlorine-Phtalocyanine (AICIPc) in an experimental *in vitro* treatment system of tumor samples taken from mammary carcinoma of dogs subjected to surgical excision . The primary cell culture was divided into four experimental groups: control, LED, photosensitizer AICIPc 2.5 μ M and PDT. The control group (1) represented the cells which had not undergone any treatment, the LED group (2) was exposed to a LED light source of 10 J/cm² intensity and wavelength of 660nm. The AICIPc group (3) was treated with only the photosensitizer agent and the PDT group (4), was the one that undergone the photodynamic therapy. Cell viability, cytotoxicity and cell death pathways were evaluated through the cytotoxicity assays: trypan blue, double staining of acridine orange and ethidium bromide and MTT. Cultures were also subjected to morphological evaluation by optic microscopy. It can be observed from the results that the amount of cell death was significantly higher ($P < 0.05$) in the PDT group when compared to the other groups by all tests, and the cell death was due to necrosis. It can be concluded that the PDT is an effective treatment in cell culture of canine mammary carcinoma.

1 photodynamic therapy, 2. mammary carcinoma, 3. dog, 4. aluminium-chlorine-phtalocyanine

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O câncer é hoje um dos principais problemas de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos apontam as neoplasias malignas como terceira maior causa de morte do mundo, sendo a segunda entre as doenças. Estes dados promoveram uma espécie de corrida mundial para a “cura” do câncer. Grande parte dos atuais conhecimentos em biologia celular foi desenvolvida a partir de projetos com interesse em terapêutica para os tumores malignos (INCA, 2008).

O câncer é uma terminologia mundialmente conhecida para uma série de doenças que possuem em comum a hiperproliferação de populações celulares específicas, com potencial de invasão de tecidos próximos e/ou distantes. Em termos patológicos, o câncer é classificado como uma neoplasia maligna, ou seja, é o desenvolvimento de novos clones celulares com atividade proliferativa superior às das células vizinhas e com caráter de invasão e destruição tecidual adjacente acentuada (KNOWLES & SELBY, 2005).

Conforme também observado na medicina, a oncologia é hoje uma das especialidades que mais evoluiu dentro da medicina veterinária de animais de companhia (WHITROW, 2006). Dentro da oncologia, os tumores mamários são, sem dúvida, os mais estudados (BRODEY, *et al.*, 1983), pois representam os tumores malignos mais comuns em cadelas e correspondem a 25-50% dentre todas as neoplasias (JONES *et al.*, 2000). Nos cães observa-se uma incidência

aproximadamente três vezes maior que a do câncer de mama nas mulheres (RUTTERMAN *et al.*, 2001). O diagnóstico precoce favorece o tratamento, que atualmente baseia-se na sua excisão, associado ou não à quimioterapia adjuvante (MOULTON 1990; CEBALLOS *et al.*, 1993; SILVA, 2000, OGILVIE & MOORE, 2001). Uma alternativa para tratamento de diferentes tipos de câncer é a Terapia Fotodinâmica (TFD), que pode ser substituta ou adjunta para a cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. A grande vantagem da utilização da TFD é a sua alta seletividade na eliminação dos tecidos neoplásicos (DANIELL & HILL, 1991; RUSLANDER *et al.*, 1997; MERKEL & BIEL, 2001), tornando-se opção mais recente e promissora de tratamento clínico contra o câncer (DANIELL & HILL, 1991; RUSLANDER *et al.*, 1997; MERKEL & BIEL, 2001). O presente estudo pretende avançar na avaliação do uso da TFD em um sistema de tratamento experimental *in vitro* de amostras tumorais extraídas de carcinoma mamário de cadela submetida ao tratamento cirúrgico tradicional.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Câncer de Mama

A evolução da Medicina Veterinária tem contribuído para a maior longevidade dos animais. Nutrição balanceada, prevenção a doenças, diagnósticos precisos e tratamentos adequados permitem uma sobrevivência maior e uma melhor qualidade de vida. Conseqüentemente, doenças que geralmente acometem animais idosos tornam-se mais freqüentes. É o caso, por exemplo, dos neoplasmas (OGILVIE & MOORE, 2001; LANA *et al.*, 2007; MONDIANO & BREEN, 2007).

O aprofundamento dos estudos tem demonstrado que dentre as neoplasias que acometem as cadelas, as neoplasias da glândula mamária merecem destaque, sobretudo por sua alta incidência e pela semelhança, em diversos aspectos, aos tumores de mama em mulheres constituindo assim, modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia tumoral, carcinogênese (MOTTOLLESE *et al.*, 1994; ZUCCARI *et al.*, 2001),

É relevante citar que dada a apresentação histopatológica e comportamento biológico similar ao da espécie humana, o câncer de mama em cadelas torna-se um molde experimental para avaliação de agentes terapêuticos (GILBERTSON *et al.*, 1983; NERURKAR, 1989; PELETEIRO, 1994; CAVALCANTI & CASSALI, 2006; TERZIAN *et al.*, 2007).

Os neoplasmas de mama representam 25 a 50% das neoplasias que acometem as cadelas, e quando se leva em consideração os cães em geral, as neoplasias mamárias são menos freqüentes apenas que os tumores de pele (RUTTEMAN, 1995, JONES *et al.*, 2000; LANA *et al.*, 2007). As raças apontadas como de maior ocorrência de tumor mamário são Cocker Spaniel, Poodle, Labrador e Dachshund, apesar de estudos relatarem o fato de não haver predisposição racial (LANA *et al.*, 2007).

As neoplasias mamárias são de grande interesse de patologistas, devido a sua complexidade, dificuldade de classificação como, também, o exame histopatológico ser o método eletivo para identificar as características

correlacionadas ao tratamento e ao prognóstico clínico do paciente (LIMA & MARTINS, 1992; MOTA & OLIVEIRA, 1999; MISDORP, 2002). Somando-se a outros fatores, o tratamento cirúrgico é o de eleição, pois, em princípio, todos os tumores deverão ser submetidos a exames histológicos. Mesmo nódulos pequenos, com aparência de benignidade, podem revelar focos de células malignas, e as biópsias excisionais são essenciais para o diagnóstico (MISDORP, 2002). A classificação dos neoplasmas mamários em cadelas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS - Misdorp *et al.*, 1999), está disposta no Quadro 1.

Quadro 01 – Classificação Histológica dos Neoplasmas Mamários em Cadelas segundo a Organização Mundial de Saúde (MISDORP *et al.*, 1999).

I - Neoplasmas Malignos	II - Neoplasmas Benignos
Carcinoma não-infiltrativo (<i>in situ</i>) Carcinoma Complexo Carcinoma Simples Carcinoma túbulo-papífero Carcinoma sólido Carcinoma anaplásico Tipos específicos de carcinoma Carcinoma de células fusiformes Carcinoma de células escamosas Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lipídeos Carcinossarcomas Sarcomas Fibrossarcoma Osteossarcoma Outros tipos de sarcomas Carcinoma em tumores benignos/ Sarcoma em tumores benignos	Adenoma Adenoma Simples Adenoma Complexo Adenoma Basalóide Fibroadenoma Baixa celularidade Alta celularidade Tumor misto benigno Papiloma Ductal

Fonte: Adaptado de Rutterman & Withrow, 2007.

A transformação neoplásica é multifatorial (MORRIS & DOBSON, 2001). O desenvolvimento de neoplasia mamária na cadela é dependente, em grande parte, de hormônios, como o estrógeno, a progesterona e o hormônio do crescimento que influenciam a carcinogênese (MORRISON, 1998; FONSECA *et al.*, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2001). MacEWEN *et al.* (1982) e Sartin (1992) identificaram receptores de estrógenos em 40 a 60% dos casos de câncer de mama em cães. O estrógeno estimula o aumento da atividade mitótica do epitélio mamário, o que eleva o risco de

aparecimento do tumor. Porém, por si só ele não desencadeia o surgimento do mesmo, mas associado a outros fatores e em fases distintas da formação do tumor, pode ter papel determinante, seja na multiplicação ou na transformação genômica das células (MOULTON, 1990; PELETEIRO, 1994).

A incidência de tumor de mama é de 0,5% com a castração antes do primeiro cio, 8% após o primeiro ciclo estral e 26% após dois ou mais ciclos, até os dois primeiros anos (O'KEEFE, 1997; MORRISON, 1998). No entanto, cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia após os dois anos e meio de idade ou concomitante à mastectomia, não são beneficiadas pelos efeitos profiláticos deste procedimento (PELETEIRO, 1994; YAMAGAMI *et al.*, 1996; MORRISON, 1998; FONSECA & DALECK, 2000; RUTTEMAN *et al.*, 2001; GALERA *et al.*, 2002).

É importante salientar as características clínicas e o comportamento biológico de cada neoplasia, pois elas estarão associadas com o prognóstico desfavorável. Características como modo e taxa de crescimento, volume total do tumor e envolvimento dos linfonodos regionais e distantes são fundamentais para determinar prognóstico e possível tratamento. Conseqüentemente, a abordagem clínica primária é essencial para o correto estadiamento da enfermidade, que no caso de neoplasmas mamários em cadelas deve ser voltado para avaliar a fase de evolução tumoral, bem como as possibilidades de progressão do tumor.

O modo de crescimento de uma neoplasia é freqüentemente o indicador da sua invasividade relativa. Lesões expansivas, bem circunscritas são mais facilmente excisadas; tumores infiltrativos com ou sem ulceração ou de tecidos abaixo da glândula mamária são mais agressivos, apresentando elevada taxa de recidiva no pós-operatório (LERZIAN, *et al.*, 2007; NELSON & COUTO, 2006). É fundamental, também, análise dos linfonodos regionais já que tumores com alto potencial metastático possuem prognóstico desfavorável (DALECK *et al.*, 1998; GALERA *et al.*, 2002; MORRIS & DOBSON, 2001; QUEIROGA & LOPES, 2002; ZUCARRI *et al.*, 2005).

Clinicamente os tumores mamários podem ser únicos ou múltiplos. Cerca de 65 a 70% deles acomete as glândulas inguinais e as abdominais caudais, provavelmente em decorrência do maior volume de tecido mamário (RUTTEMAN *et al.*, 2001).

Distintos procedimentos cirúrgicos são empregados na conduta terapêutica. A mastectomia regional baseia-se na drenagem venosa e linfática do tecido mamário. Há conexão entre as glândulas torácicas craniais e caudais, e entre as abdominais caudais e as inguinais. As glândulas torácicas craniais e caudais e a abdominal cranial, e eventualmente a abdominal caudal, drenam para o linfonodo axilar. O linfonodo inguinal superficial drena as glândulas abdominais craniais e caudais e as inguinais (ALLEN *et al.*, 1986; MISDORP, 2002; CARVALHO, 2006). Considerando-se as características anatômicas, é recomendada a extração destas glândulas em bloco, incluindo o linfonodo adjacente (RUTTEMAN *et al.*, 2001; MISDORP, 2002;).

A excisão cirúrgica completa do tumor, com margem de segurança, é o tratamento de eleição, conferindo maior sobrevida às cadelas com câncer de mama (BIRCHARD, 1995 apud DE NARDI, 2007), à exceção dos tumores inoperáveis, a exemplo dos carcinomas inflamatórios e as metástases para órgãos distantes (MISDORP, 2002). A escolha da técnica cirúrgica mais adequada é determinada pelo tamanho, localização e consistência tumorais, grau de infiltração e número de tumores, achados radiográficos de tórax, e comprometimento ou não dos linfonodos regionais (MISDORP, 2002). A localização do tumor, considerando-se a drenagem linfática das glândulas mamárias, determina a opção da técnica cirúrgica a ser adotada (McCAW, 1996; MARTINS & FERREIRA, 2003).

Outros tratamentos podem ser associados ao procedimento operatório tais como quimioterapia e radioterapia. A aplicação dos tratamentos varia de acordo com o estágio de desenvolvimento e localização do tumor (McCAW, 1996; QUEIROGA & LOPES, 2002; FOSSUM *et al.*, 2005).

A radioterapia é um tratamento não-invasivo indicado principalmente para pacientes submetidas à cirurgia visando evitar a recorrência do tumor. Tal terapia utiliza raios X ou gama com alta energia que é direcionada para o local do tumor/cirurgia. A energia empregada deve ser suficiente para causar danos que garantam a eliminação de todas as células tumorais. No entanto, essa radiação também incide em células normais (BUCCI *et al.*, 2005). Os principais efeitos colaterais são ressecamento da mucosa oral, hiperemia na área tratada e fadiga após o tratamento (NIH, 2005). Esta técnica não é difundida na medicina veterinária e seus benefícios ainda não foram definidos, de forma que implica em maiores

estudos a cerca de sua eficácia (LANA *et al.*, 2007), sendo portanto, alvo experimental até dado momento (ZUCCARI *et al.*, 2001; WHITROW, 2007)

A utilização de protocolos de quimioterapia adjuvante tem aumentado nos últimos anos, proporcionando aumento na qualidade de vida dos animais, porém, os carcinomas são tumores com baixo grau de quimiosensibilidade (MORRIS & DOBSON, 2001; RUTTEMAN *et al.*, 2001). A quimioterapia consiste no uso de fármacos citotóxicos aplicados através das vias endovenosa, oral ou intratumoral e que atingem preferencialmente células com elevadas taxas de mitose, ou seja, as células cancerígenas. No entanto, outras células normais do organismo com elevadas taxas de mitose também podem ser afetadas (FONSECA & DALECK, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2001; WEINBERG, 2006). Os efeitos colaterais desse tratamento variam de acordo com o tipo de fármaco utilizado. Estes efeitos compreendem a morte de células sangüíneas, alopecia, alterações gastrintestinais (náuseas, vômito e diarréia) e perda de apetite (FONSECA & DALECK, 2000; NIH, 2005). Os fármacos mais empregados no tratamento para câncer de mama em cadelas são a doxorrubicina, a ciclofosfamida e o 5-Fluorouracil (FRIMBERGER & COTTER, 1995; DALECK *et al.*, 1998; DAGLI, 2002; NOVOSSAD, 2003; LANORE & DELPRAT, 2004). As falhas nos protocolos quimioterápicos são devidas a resistência celular aos fármacos, provocada pela presença da proteína transmembrana glicoproteína-P, produzida pelo gene MDR1 (RODRIGUEZ *et al.*, 1997; DE NARDI *et al.*, 2007).

2. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) consiste na administração por via tópica ou sistêmica de fármacos fotossensibilizantes (FS), que se acumulam preferencialmente nos tecidos neoplásicos e através da incorporação celular da substância fotossensibilizadora que é ativada por determinada fonte de luz, adequado comprimento de onda e oxigênio molecular, acarretando citotoxicidade e morte celular (DANIELL & HILL, 1991; RUSLANDER *et al.*, 1997; MACHADO, 2000b; MERKEL & BIEL, 2001; SIMPLISIO, 2002).

Ensaio clínicos consideram que a TFD pode se tornar uma opção de tratamento para o câncer (TEDESCO *et al.*, 2003; TEDESCO *et al.*, 2004, CHEUNG

et al., 2005; PARISSE & BUZAID, 2006; LONGO *et al.*, 2009). A grande vantagem da utilização da TFD é a sua alta seletividade na eliminação dos tecidos neoplásicos (DANIELL & HILL, 1991; RUSLANDER *et al.*, 1997; MERKEL & BIEL, 2001), podendo ser associada a terapias tradicionais com produção mínima de mutilação e complicações, se comparada ao tratamento cirúrgico tradicional (DANIELL & HILL, 1991). Tais características resultam da seletividade da destruição tecidual da terapia em decorrência do controle do local tratado, e sem dano extenso às estruturas normais circunjacentes (DANIELL & HILL, 1991).

Os primeiros passos da avaliação do efeito da aplicação da TFD na medicina veterinária foram realizados na década de 80 para o carcinoma de células escamosas com as porfirinas, derivados da hematoporfirina, fármaco fotossensibilizador de primeira geração (MERKEL & BIEL, 2001). Os principais efeitos colaterais observados era fotossensibilização tardia e eritema local.

Em seguida, Peaston *et al.*, 1993, utilizaram a TFD em 18 gatos com carcinoma de células escamosas, com fotossensibilizador, tetrasulfonato fitalocianina de alumínio. Neste estudo, houve êxito do tratamento em mais de 80% dos pacientes, e os efeitos colaterais restringiram-se à formação de edema e eritema local. Os mesmos achados foram descritos por LEACH & PEASTON (1994), após utilização da TFD com mesmo fotossensibilizador, em estudo com 45 gatos que apresentavam carcinoma de células escamosas.

Nos últimos anos, outros agentes seletivos de ação fotodinâmica com efeitos colaterais reduzidos foram desenvolvidos, tais como o ácido alfa-linoléico (ALA) para tratamento de carcinoma de células escamosas em gatos (STELL *et al.*, 2001; LUCROY *et al.*, 2003), os agentes lipossomais e as nanopartículas (ANIOLA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BARBOSA, 2008).

Tapajós *et al.* (2008) demonstraram que o fotossensibilizador Alumínio-Cloro-Ftalocianina apresentou excelentes resultados na aplicação da TFD em modelos de cultura de células derivadas de Carcinoma Epidermoide Bucal Humano. Posteriormente, semelhante protocolo de aplicação da TFD foi avaliado em diferentes modelos experimentais para o câncer de boca em camundongos (LONGO *et al.*, 2009). Neste estudo, não foram observados efeitos adversos aos animais tratados de forma sistêmica com o fármaco fotossensibilizador (LONGO *et al.*, 2009).

2.1. Mecanismos da fotossensibilização

O mecanismo de ação da TFD é uma reação fotoquímica promovida pela irradiação dos FS com fontes de luz em comprimentos de onda adequados, ou seja, específicos (RUSLANDER *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2006). A absorção de fótons pelo fármaco promove a sua transformação em uma molécula extremamente instável que reagirá com o oxigênio presente no meio tecidual formando uma cascata de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente geração dos efeitos citotóxicos da terapia sobre as células alvo (LUKSIENE, 2003; PERUSSI, 2007).

Durante a terapia fotodinâmica, na presença de oxigênio encontrado nas células o fotossensibilizador que se encontra ligado ao tumor é ativado pela luz e passa do estado fundamental ao estado excitado, denominado estado singlete. As moléculas excitadas podem retornar ao seu estado fundamental emitindo energia na forma de calor ou fluorescência, por meio da liberação de fótons, ou progredir na cadeia de reações químicas, passar a outro estado de excitação menos instável denominado de estado triplete. Neste estado, eles podem interagir diretamente com substratos biológicos ou moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à formação de íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, gerando uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs), denominada reação do tipo I (DANIELL & HILL, 1991; HENDERSON & DOUGHERTY, 1992; LUKISIENE, 2003, PERUSSI, 2007)..

As moléculas em estado triplete podem, também, 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 & HILL, 1991; HENDERSON & DOUGHERTY, 1992; MACHADO, 2000b, LUKISIENE, 2003, PERUSSI, 2007). Tais reações são rapidamente descritas na figura 01.

Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (SKIVKA *et al.*, 2004; PERUSSI, 2007; BUCK, 2009). O oxigênio singlete reage com quase todos os componentes celulares uma vez que os compostos orgânicos insaturados são, de forma geral, suscetíveis à ação do oxigênio reativo. Como a primeira barreira para esta molécula é a membrana celular que contém lipídeos insaturados, estes podem ser danificados e tornar a célula inviável. Os

hidroperóxidos resultantes podem levar à formação de EROS através de reações catalíticas (CARRE *et al.*, 1999; CASTANO *et al.*, 2006). Uma vez que a reatividade das EROS com moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para terapia fotodinâmica (DOLMANS *et al.*, 2003). Assim, a multiplicidade de alvos dificulta o desenvolvimento de resistência celular sendo essa, juntamente com a citotoxicidade, uma das vantagens da fotossensibilização (DOLMANS *et al.*, 2003; FEROLLA, 2007; PERUSSI, 2007; BUCK, 2009).

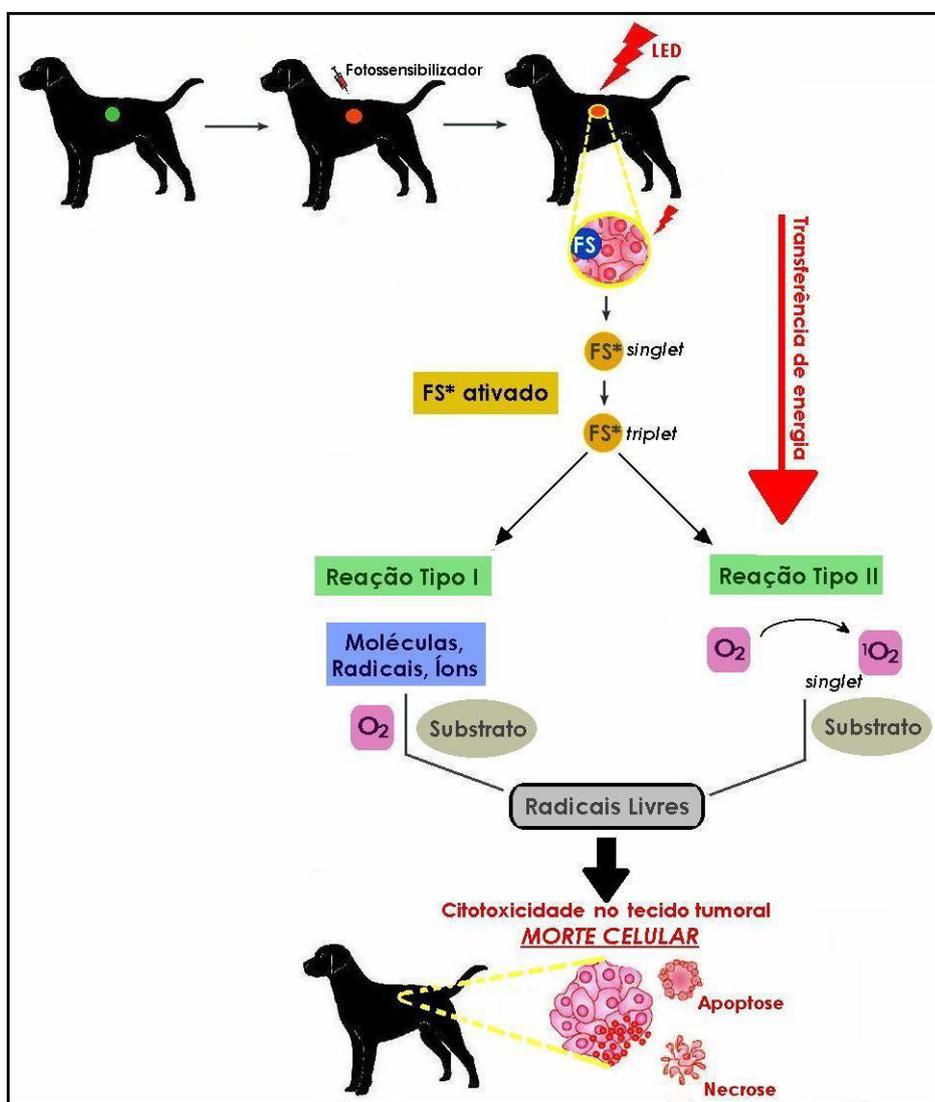


Figura 01 – Ilustração gráfica dos mecanismos fotoquímicos presentes na TFD. Observa-se transferência de energia e a produção de radicais livres em diferentes tipos de reações, após a excitação do fármaco FS devido à irradiação com LED. .

As EROs são radicais livres com alta energia que podem reagir com várias biomoléculas, acarretando modificações químicas que impedem seu funcionamento normal. A geração de uma cascata de espécies reativas após a aplicação da TFD é um fator fundamental para a citotoxicidade causada pela terapia devido a sua alta capacidade de interações com diferentes biomoléculas (DOLMANS *et al.*, 2003; CASTANO *et al.*, 2005; LONGO *et al.*, 2009).

2.2. Fatores envolvidos na fotossensibilização

A maioria dos fotossensibilizadores é retida tanto nos tecidos normais como nos neoplásicos (HENDERSON & DOUGHERTY, 1992; SKIVKA *et al.*, 2004). O agente fotossensível, segundo MACHADO (2000b), tende a se concentrar no tecido lesionado, mas o mecanismo não está totalmente esclarecido. Sharman *et al.*, 1999, Dolman's *et al.*, 2003, descrevem que apesar desta retenção não ser claramente elucidada, alguns fatores são incriminados como responsáveis. A permeabilidade da membrana das células neoplásicas encontra-se alterada, as fibras colágenas que interagem no tumor são imaturas e semelhantes às observadas em tecidos embrionários e em processo de cicatrização recente. Essas fibras imaturas apresentam grande capacidade de ligação às porfirinas, agente fotossensibilizador, constituindo um local para retenção e acúmulo do fármaco. Outros fatores como a rede linfática pouco desenvolvida, a presença de macrófagos e o menor pH intracelular também favorecem maior concentração do fármaco nas células tumorais (MOAN & PENG, 2003; NOWIS *et al.*, 2005).

Outro importante componente na TFD é a fonte de luz (HENDERSON & DOUGHERTY, 1992). As fontes de radiação são, em geral, laser ou laser emissor de diodo, (MACHADO, 2000a; CARVALHO, 2008). As principais vantagens do laser como fonte de luz são a estabilidade, coerência e previsibilidade (PARIZE & BUZAID, 2006); entretanto, este possui um custo elevado (MACHADO, 2000a). Conseqüentemente, a disponibilidade do laser emissor de diodo (LED) tornou o valor das fontes de luz mais acessíveis, visto ser um quarto do valor econômico do laser

(DOUGHERTY, *et al.*, 1998; MANG, 2004). O LED, apesar de apresentar potência inferior ao laser, possui comprimento de onda e características químico-físicas necessárias para a adequada aplicabilidade da TFD (MACHADO *et al.*, 2000a; MANG, 2004. CARVALHO, 2008).

Logo, a eficácia da TFD depende da natureza química do fotossensibilizador, da adequada concentração nos tecidos e da localização celular no momento da irradiação, seja através do laser ou LED, de radiação luminosa compatível com as características bioquímicas do fotossensibilizador permitindo que este seja excitado. Outros fatores que interferem são o tempo entre a administração do FS, das características anatômicas do neoplasma ou no caso experimental, da linhagem celular tumoral utilizada e da disponibilidade de oxigênio molecular da célula tumoral durante todo o processo (WÖHRLE *et al.*, 1998; MACHADO, 2000b; PERUSSI, 2007)

2.3. Fotossensibilizadores

Conforme elucidado anteriormente, os FSs são os elementos principais na execução da TFD. Estas estruturas realizam a transferência de energia luminosa para gerar reações que culminam com a formação de uma série de espécies químicas altamente reativas, que por sua vez promovem a destruição das células-alvo. Diversos FSs têm sido desenvolvidos e testados clinicamente para serem utilizados na TFD. Inicialmente, a literatura classificou os grupos de FSs em gerações de fármacos de acordo com o período cronológico de desenvolvimento (DOUGHERTY, *et al.*, 1998). Contrários a classificação cronológica, Allison *et al.*, (2004) classificaram os FSs de acordo com suas semelhanças bioquímicas, classificando-os em famílias de fotossensibilizadores.

A escolha de um FS para a utilização na TFD envolve uma complexa análise de características até que se possa determinar qual a melhor opção para a execução da TFD. Dentre os pontos a serem analisados, há as propriedades específicas como as características fotofísicas, a estruturação química, a toxicidade, a ação mutagênica e a carcinogenicidade dos fármacos (HENDERSON &

DOUGHERTY, 1992). Devem ser avaliadas ainda a seletividade do fármaco pelas células alvo; possíveis efeitos adversos decorrentes de exposição à luz branca, toxicidade no escuro, via de administração, custos, solubilidade e água ou solvente inócuo, capacidade e tempo de eliminação dos fármacos, comprimento de onda para ativação e efetividade clínica (ALLISON et al., 2004; CASTANO et al., 2005). A análise de todos estes fatores muitas vezes se torna complexa, mas é apropriado ter um fator de efetividade calculado subjetivamente para justificar a escolha de um FS entre as várias opções terapêuticas (CASTANO et al., 2006).

MACHADO (2000b) citou que a primeira geração de agentes fotossensibilizadores baseia-se em mistura de derivados porfirínicos. Os fármacos da segunda geração, como as ftalocianinas e as clorinas, podem ser excitados com radiação de comprimento de ondas maiores, quando o tecido biológico tem menor absorção e a profundidade de penetração da luz é maior, e apresentam um período de eliminação mais curto. O fotossensibilizador pode ser aplicado por via intravenosa ou tópica (MERKEL & BIEL, 2001).

Os fotossensibilizadores mais utilizados são os de primeira geração, tal como o Photofrin (MERKEL & BIEL, 2001). Este foi desenvolvido em fins da década de 80, sendo o primeiro agente fotossensibilizador a ser autorizado por órgãos governamentais (MACHADO, 2000b). A medicação é ativada com um comprimento de onda de 630nm (MERKEL & BIEL, 2001). Entre seus efeitos colaterais está a indução de prolongada fotossensibilidade dérmica e ocular (MACHADO, 2000b).

Entre as famílias de FSs, as ftalocianinas têm despertado grande interesse da comunidade científica. Estudos clínicos e pré-clínicos envolvendo ftalocianinas têm apresentado resultados promissores para aplicação na TFD. Como grandes vantagens, as ftalocianinas são ativadas por luz em comprimentos de onda elevados (650-750 nm), o que confere maior poder de penetração, além de apresentarem baixa toxicidade quando empregada na TFD (ALLISON et al., 2004).

Outra importante característica desta classe de FS é serem hidrofóbicos. Devido a esta característica química, estes fármacos necessitam ser incorporados a sistemas de liberação de fármacos específicos para que possam circular através do plasma sanguíneo. Um dos sistemas de liberação descritos para o transporte de fármacos lipossolúveis são os lipossomas. Essas estruturas são pequenas vesículas formadas por paredes fosfolipídicas contendo um compartimento aquoso no seu

interior. Desta forma, esse sistema pode carrear tanto estruturas lipofílicas (na parede) quando hidrofílicas (interior) (SIBATA *et al.*, 2004). Além da capacidade de fluir livremente pelo plasma sanguíneo, a associação de ftalocianinas com lipossomas apresenta outras vantagens, como sua maior captação pelas células tumorais. A estrutura do lipossomo pode ser modificada pela adição de algumas substâncias como colesterol. A presença deste lipídio na parede do lipossoma tende a aumentar a captação dos fármacos pelos tecidos tumorais. Esse aumento se refere ao fato de existir um aumento de receptores de membrana com afinidade para colesterol. Esta afinidade química permite que haja uma maior captação de FS pelas células neoplásicas (DOUGHERTY, *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; LONGO *et al.*, 2009). Estudos experimentais (TAPAJÓS *et al.*, 2008) demonstraram a alta efetividade da Alumínio-Cloro-Ftalocianina na destruição de células em cultura derivadas de Carcinoma Epidermóide Bucal Humano. Nesse mesmo estudo, foi descrita a baixa citotoxicidade do FS quando administrado às células de cultivo na ausência da iluminação com laser. Corroborando com tais achados, Longo *et al.*, (2009) avaliaram a eficiência da TFD mediada por Alumínio-Cloro-Ftalocianina. em formulação lipossomal sobre a mesma linhagem celular, como em modelos experimentais *in vivo*, camundongos imunocompetentes (*Swiss*) e imunocomprometidos (*nude-Balb/c*).com o mesmo neoplasma.

2.4. Morte Celular

A terapia fotodinâmica pode produzir apoptose ou necrose, ou uma combinação dos dois mecanismos (OLEINICK *et al.*, 2002). Apoptose é uma forma regulada de morte celular que pode ocorrer em eventos fisiológicos ou patológicos que é dependente da expressão intrínseca celular, no qual uma cascata da caspases é induzida (WISING, *et al.*, 2005). Morfologicamente, os elementos cruciais do processo são condensação da cromatina, encolhimento celular e produção de corpos apoptóticos os quais são engolfados por células circunvizinhas e então fagocitados (NOWIS, *et al.*, 2005; OLEINICK *et al.*, 2002).A morte celular caracterizada por necrose, em geral, está relacionada à presença de um agente agressor de alta intensidade. Nessas situações, os mecanismos básicos de defesa e

escape celulares da morte são ineficientes devido à grande intensidade do estímulo agressor como o promovido pela formação de radicais livres após a aplicação da TFD (OLEINICK *et al.*, 2002; RICH *et al.*, 2000). Uma das características marcantes da necrose são as alterações funcionais em diferentes regiões subcelulares, com especial atenção às membranas biológicas que provocam a liberação dos conteúdos celulares e conseqüente perda de viabilidade. Associada à destruição das membranas celulares, ocorre a liberação de fosfolipídios de membrana e, conseqüentemente, a geração de intenso processo inflamatório decorrente dos produtos gerados na via da lipooxigenase (RICH *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar o efeito *in vitro* da Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação liposomal (TFD-AICIFt) sobre culturas primárias derivadas de carcinoma mamário de cadelas.

Objetivos Específicos

- Obter culturas primárias de carcinoma mamário de cadela;
- Verificar a citotoxicidade provocada AICIFt no escuro e LED, nas condições utilizadas no trabalho.
- Analisar citotoxicidade, as vias de morte celular e as possíveis alterações morfológicas causadas pelo tratamento com a TFD-AICIFt.

REFERÊNCIAS

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X, H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.

ALLEN, S. W.; PRASSE, K. W.; MAHAFFEY, E. A. Cytologic Differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 23, n.6, p. 649-655. 1986.

ANIOLA, J.; SELMAN, S.H.; LILGE, L. Spatial distribution of liposome encapsulated tin etiopurpurin dichloride (SnET₂) in the canine prostate: implications for computer simulation of photodynamic therapy. **Internal Journal Molecular Medicine**. v.11, p 287 – 290, 2003.

BARBOSA, L.S. **Estudo dos processos de magnetohipertermia e terapia fotodinâmica mediados por magnetolipossomas fotossensibilizados em camundongos**. Tese de doutorado – Universidade de Brasília, p.170, 2008.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 61-89, 1983

BUCCI, M. K.; BEVAN, A.; ROACH, M., 3RD. Advances in radiation therapy: conventional to 3D, to IMRT, to 4D, and beyond. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 117-134, 2005.

BUCK, S.T.G. **Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica**. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, 93p., 2009.

CARRÉ, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.; GRANET, R.; KRAUSZ, P.; GUILLOTON, M.; Photodynamic therapy applications. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 7, p. 48-57, 1999.

CARVALHO, T. B. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72)**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Viçosa, 235p. 2006.

CARVALHO, E.S. **Terapia fotodinâmica utilizando o cloridrato de aminolevulinato de metila no modelo de câncer bucal em murino induzido por células de Walker 26**. Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília, 92p, 2008.

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

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

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n.61, p. 56-64, 2006.

CEBALLOS, P.I.; BARNHILL, R.L. Spontaneous regression of cutaneous tumors. In: **Schachner LA, Advances in Dermatology**. 8v. St. Louis: Mosby-Year Book, 229-61, 1993.

CHEUN, B.; POGUE, B. W.; ZHOU, X.; O'HARA, J. A. HOOPS, P. J.; HASSAN, T. Effect of Tumor Host Microenvironment on Photodynamic Therapy in a Rat Prostate Tumor Model. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 720-727, 2005.

DAGLI, M. L. Z., **Agentes Antineoplásicos** in: Spinosa & Górnica & Bernardi **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária** terceira edição, editora Guanabara Koogan, cap.53, p.581 – 595, 2002.

DALECK, C. R.; FRANCECHIN, P.R.; ALESSI, A.C.; SANTANA, A.E.; MARTINS, M.I.M. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor de mama em canino. **Ciência Rural**. v.28, n.1, p. 95 – 100, 1998.

DANIELL, M.D.; HILL, J.S. A history of photodynamic therapy. **Aust N Z J Surg**, v.61, p.340-348, 1991.

DE NARDI, A. B.; DALECK, C.R.; AMORIM, R.L.; RODASKI, S.; CALDERON, C. ; NETO TORRES, R.; MALAVER, A. U. Imunoexpressão de la ciclooxigenase-2 en las neoplasias mamarias en perras. **Selecciones Veterinarias**, v. 15, p. 9-13, 2007.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Review Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy: Review. **Journal National. Cancer Institute**. v.90, p. 889-902, 1998.

FEROLLA, A.C.J. **Estudo da pele humana fotoenvelhecida após tratamento com terapia fotodinâmica associada ao ácido-5-delta-aminolevulínico tópico: avaliação imunohistoquímica, do colágeno e do tecido elástico**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 294p. 2007.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 731-735. 2000.

FOSSUM, T. W., HEDLUND, C.S.; HULSE, D.A.; JOHNSON, A.L.; WILLARD, M.D.; CARROLL, G.L. Cirurgia do sistema reprodutivo feminino. In: _____. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Rocca, 2ª ed., p.631-637, 2005.

FRIMBERGER & COTTER Principles of Chemotherapy In: Hanh e Ricahrdson **Cancer Chemotherapy** cap.3, p. 47 – 60, 1995.

GALERA, P. D.; FREITAS, S. H.; OLIVEIRA, J. E. B.; GODOI, S. Estudo retrospectivo da ocorrência de tumores de mama em cadelas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 6, p. 252-254, 2002.

GILBERTSON, S. R. *et al.* Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 127–142, 1983.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

JONES, T.H.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Sistema genital. In:_____. **Patologia Veterinária**. 6ed. São Paulo: Manole, p.1213-1222, 2000.

KNOWLES, M.; SELBY, P. **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. Oxford-Bioscience, 2005.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, Saunders Elsevier, 4ª ed., p. 619-628, 2007.

LANORE; DELPRAT **Quimioterapia anticancerígena** Editora Roca, 2004.

LEACH, M.W.; PEASTON, A.E. Adverse drug reactions attributable to aluminum phthalocyanine tetrasulphonate administration in domestic cats. **Veterinary Pathology**, v.31, n.2, p.283- 287, 1994.

LIMA, G. R.; MARTINS, N. V. **Onco Ginecologia**. São Paulo: Atheneu, p.17-23. 1992.

LONGO, J.P.F.; LOZZI, S.P.; SIMIONI A.R.; MORAIS, P.C., TEDESCO, A.C. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v.94, n.2, p. 143 – 146, 2009.

LUCROY, M.D.; RIDGWAY, T.D.; PEAVY, G.M.; KRASIEVA, T.B.; HIGBEE, R.G.; CAMPBELL, G.A.; BLAIK, M.A. Preclinical evaluation of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for canine transitional cell carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.1, n. 2, p. 76 – 85, 2003.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanisms of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v. 39, n. 12, p. 1137-1149, 2003.

MacEWEN, E. G.; PATNAIK, A. K.; HARVEY, H. J.; PANKO, W. B. Estrogen receptors in canine mammary tumors. **Cancer Research**, v. 42, n. 6, p. 2255-2259, 1982.

MACHADO, A.H.A.; RODRIGUES K.D.C., MORAES K.C.M; SOARES C.P.; SILVA, N.S. Terapia fotodinâmica com LED e diferentes fotossensibilizantes. **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, 2000a.

MACHADO, A.E.H. Terapêutica fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p.237-243, 2000b.

MANG T. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n 1, p. 43-48, 2004

MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Prognostic markers as an aid to the clinical-surgical conduct in a female dog presenting multiple mammary nodes **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 31, n.3, p.189 - 191, 2003.

MCCAW, D.L. Moléstias da glândula mamária. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. 2ed. São Paulo: Manole,. p.216-219, 1996

MERKEL, L.K.; BIEL, M.A.C. Photodynamic therapy. In: WITHROW, S.J.; MacEWAN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, Chap.8, p.86-91, 2001.

MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J. (Ed). **Tumors in domestic dogs**. Iowa: Iowa State Press, pp. 575-606, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-59, 1999.

MOAN, J.; Q. PENG An outline of the history of PDT in Thierry Patrice. **Photodynamic Therapy**. 2003

MONDIANO & BREEN The Etiology of Cancer *in*: Withrow & MacEwen's **Small Animal Oncology** 4ª edição – cap 01, p. 03-17, 2007.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Mammary gland. In: _____. **Small Animal Oncology**, Blackwell Science, p. 184-191., 2001.

MORRISON W.B.. Canine and feline mammary tumors. In: Morrison W.B. (Ed). **Cancer in dogs and cats – medical and surgical management**. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 591-598, 1998.

MOTA, E. F. F.; OLIVEIRA, S. R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 30, n. 1, p. 29-47, 1999.

MOTTOLLESE, M; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCIARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, G. N.; Spontaneous canine mammary tumors – a model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 2, p. 182-186, 1994.

MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Berkeley : University of California, p.672, 1990.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Neoplasia mamária. In: _____. **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier's, p. 847-848., 2006.

NERURKAR, V. R.; CHITALE, A. R.; JALNAPURKAR, B. V ; NAIK, S. N.; LALITHA V. S. Comparative pathology of canine mammary tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 101, n. 4, p. 389–397, 1989

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). What do you need to know about breast cancer. **NIH Publication**, n. 05-1556, 2005.

NOVOSAD C. A., Principal of Treatment for Mammary Gland Tumors In: **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p.107–109; 2003.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T; LEGAT, M.; ISSAT, T. AND GOŁĄB, JAKUB. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**. v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

O'KEEFE D.A.. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole, pp. 2344-2354, 1997.

OGILVIE, G.K ; MOORE, A.S.; Skin tumors. In: OGILVIE,G.K.; MOORE, A.S. **Feline oncology – A Comprehensive Guide to Compassionate Care**. USA: Veterinary Learning Systems, Chap.50, p.398-428,. 2001.

OLEINICK NL, MORRIS RL, BELICHENKO I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemistry and Photobiology Science**. v.1. p. 1 – 21,. 2002.

OLIVEIRA, D.M.; LACAVAL, Z.G.M.; LIMA, E.C.D.; MORAIS, P.C.; TEDESCO, A.C. Zinc phthalocyanine magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for câncer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.6, p. 2432-2431, 2006.

PARIZE, J.O.; BUZAID, A.C. Terapia fotodinâmica. Uma opção no tratamento de carcinomas superficiais de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira Cirurgia Cabeça e Pescoço**. V.35, p.121 – 125, 2006

PEASTON, A.E.; LEACH MW; HIGGINS RJ. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. **Journal American Vet Med Assoc**, v.202, n.8, p.1261-1265, 1993.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. LXXXIX, n. 509, p. 10-29, 1994..

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**. v. 30, n.4, p. 988 – 994, 2007.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – Novas perspectivas. In: **Congresso de Ciências Veterinárias**, Oeiras, p. 183-190, 2002.

RODRIGUEZ, A. S.; GÓMEZ, M. J. R.; MORENO, J. A. M.; MORILLO, M. M. Multidrug resistance (MDR) in oncology. **Anales de Medicina Interna**, v. 14, p. 145-153, 1997.

RUSLANDER, D. KASER-HOTZ, B.; SARDINAS, J.C. Cutaneous squamous cell carcinoma in cats. **Compend Contin Educ Pract Vet**, v.19, n.10, p.1119- 1129, 1997.

RUTTEMAN. G.R. Mammary tumors in the dog. In:_____ **Kirk's Current Veterinary Therapy**. Philadelphia: Saunders, p. 518-522, 1995.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3ed. Philadelphia: Saunders, p.455-467. 2001.

SARTIN, E. A. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p. 2196-2200, 1992.

SHARMAN. W.M., ALLEN C. M., LIER V. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today** .v.4, n.11, p: 507-517, 1999.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **European Journal Pharmacy Science**, v.23, n. 2, 131-138, 2004.

SILVA, M.R. Carcinogênese no Câncer da Pele. **Revista Dermatologia Atual**. V.6, n.02, p. 13-17, 2000.

SIMPLISIO . F. Terapia fotodinâmica – Aspectos farmacológicos, aplicações e abnços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova** v.25 (05) p. 801-807, 2002.

SKIVKA, L.M.; GOROBETS, O.B.; KUTSENOK, V.V.; LOZINSKY, M.O.; BORISEVICH, A.N.; FEDORCHUK, A.G.; KHOLIN, V.V.; GAMALEYA, N.F.5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy of Lewis lung carcinoma: a role of tumor infiltration with different cells of immune system. **Experimental Oncology**. V.26, n.4, p. 312 – 315, 2004.

STELL, A.J.; DOBSON, J.M.; Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. **Journal Small Animal Practice**. n.42, p. 164, 2001.

TAPAJÓS, E. C. C.; LONGO, J. P.; SIMIONI, A. R.; LACAVAL, Z. G. M.; SANTOS, M. F. M. A.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In vitro photodynamic therapy on human oral Keratinocytes cells using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncology**, v. 44, n. 11, p. 1073 – 1079, 2008.

TEDESCO A.C.; ROTTA, J.C.G.; LUNARDI C.N.; Synthesis, Photophysical and Photochemical aspect of phthalocyanines for photodynamic therapy. **Current Organic Chemistry**. V.7, p.187-196, 2003.

TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. M; LACAVAL, Z. G. M.; AZEVEDO, R.B.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C., Investigation of the binding constant and stoichiometry of biocompatible cobalt ferrite-based magnetic fluids to serum albumin. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 272, p.2404, 2004

TERZIAN, A.C.B.; ZUCCARI, D.A.P.C.; PEREIRA, R.S.; PAVAM, M.V.; RUIZ, C.M.; SUEIRO, F.A.R.; COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores. prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 96-102, 2007.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, K.; SUGIYAMA, M. Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 37, p.462- 464, 1996.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 850 p. 2006.

WHITROW, S.J. **Witrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed, Philadelphia: Saunders, 1325p., 2007.

WISING C, AZEM J, ZETTERBERG M, SVENSSON LA, AHLMAN K, LAGERGARD T. Induction of apoptosis/ necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. **Toxicology**, v.45, p.767-776, 2005.

WÖHRLE, D. HIRTH, A.; BOGDAHN-RAI, T.; SCHNURPFEIL, G; SHOPOVA M. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. **Russian Chemical Bulletin**, v. 47, n. 5, 1998

ZUCCARI, D.A.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**., ano VI, n.32, p.50-54, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C.; TERZIAN, A. C. B. ; PEREIRA, R. S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C. M.; SUEIRO, F. A. R.; ANDRADE, J. C. A.; CORDEIRO, J. A. Avaliação imunohistoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. **ARS Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 344-350, 2005.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CARCINOMA MAMÁRIO DE CADELA CULTIVADA *IN VITRO*.

INTRODUÇÃO

Os tratamentos para o câncer atualmente disponíveis, apesar de apresentarem bons efeitos terapêuticos, possuem inúmeros efeitos colaterais adversos. O desenvolvimento de novas terapias que possam ser utilizadas como forma de tratamento principal ou como terapia adjuvante é fundamental para o estabelecimento de protocolos terapêuticos mais efetivos contra as diferentes modalidades de câncer.

A avaliação de eficiência de um protocolo terapêutico para o tratamento do câncer é extremamente complexa e envolve diversas etapas de avaliação até que se comprove a sua efetividade clínica. Ensaios clínicos demonstram que a TFD é um tratamento interessante para o câncer. Suas principais características são de seletividade obtida pelo acúmulo preferencial do fotossensibilizador na célula tumoral e a habilidade de reter a ativação deste fármaco através da restrição de iluminação àquela região específica (MACHADO, 2000; MERKEL & BIEL, 2001);.

Portanto, comparativamente aos métodos atuais de tratamento, a TFD possui a vantagem de ser mais efetiva e seletiva na destruição das células tumorais, preservando a integridade das células adjacentes normais. Além disso, trata-se de uma modalidade de tratamento minimamente invasiva, podendo ser aplicada repetidamente no mesmo local e usada no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo aqueles que são resistentes às outras terapias. É importante observar que a utilização da quimioterapia, radioterapia ou cirurgia não impedem a aplicação da TFD, podendo ser usadas antes ou após o paciente ser submetido a TFD (FEROLLA, 2007; PASCHOAL, 2009).

Os primeiros passos da avaliação do efeito da aplicação da TFD mediada pela AICIFt-liposomal foram conduzidos com êxito em sistemas de cultura celular e em modelos tumorais experimentais em camundongos (TAPAJÓS *et al.*, 2008; LONGO *et al.*, 2009). O presente estudo pretende avançar na avaliação deste protocolo terapêutico em um sistema de tratamento experimental *in vitro* de amostras tumorais extraídas de carcinoma mamário de cadela submetida ao tratamento cirúrgico tradicional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho, sob o número de processo UNBDOC nº 36972/2008, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB).

1. MATERIAIS

As soluções estoque dos meios, corantes e reagentes foram preparadas em PBS, ph=7,4 e mantidas a temperatura ambiente, ou quando necessário refrigerado a 4°C e ao abrigo da luz. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22µm imediatamente antes do uso e armazenadas em frascos de vidro autoclavados ou aliquotados em micro tubos do tipo *eppendorfs*.

1.1. Procedência das Amostras Neoplásicas

O estudo foi conduzido no Hospital Veterinário de Pequenos Animais, no Laboratório de Morfologia e Morfogênese do Instituto de Ciências Biológicas (IB) e no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FAV), todos pertencente à Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal.

A amostra utilizada foi extraída de um paciente da espécie canina, raça pitbull, nove anos de idade, com nódulo de aproximadamente 2,5cm de diâmetro na glândula mamária inguinal esquerda posteriormente diagnosticado com carcinoma complexo de mama moderadamente diferenciado invasor, através de análise histopatológica, proveniente do Serviço de Clínica Cirúrgica, setor de oncologia, do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB. O atendimento, a avaliação clínica e pré-operatória do animal, assim como fornecimento de informações e recomendações necessárias ao proprietário, foi realizados conforme rotina hospitalar. O procedimento cirúrgico adotado foi mastectomia radical unilateral esquerda, de acordo com o estabelecido na literatura (RUTTEMAN et al., 2001; MISDORP, 2002). O proprietário estava ciente, através de autorização escrita, que continha descritos os mecanismos e procedimentos utilizados como também, os riscos inerentes envolvidos em quaisquer procedimentos cirúrgicos e anestésicos.

Vale ressaltar que o animal foi submetido ao procedimento cirúrgico usual e para o cultivo celular foram utilizadas amostras do material comumente excisado no procedimento cirúrgico tradicional. A biópsia que geralmente é enviada para análise histopatológica foi fragmentada e encaminhada para o cultivo celular. O animal foi acompanhado diariamente até a retirada da sutura e depois semanalmente para acompanhamento do quadro clínico e evolução quimioterápica conforme conduta do médico veterinário responsável.

1.2. Fotossensibilizador

1.2.1. Formulação lipossomal de Alumínio-Cloro-ftalocianina (AlClft)

Utilizou-se nos tratamentos deste estudo, amostra de ftalocianinas lipossomais, na concentração de 5 μM , estocada no escuro, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco – USP/ Ribeirão Preto. As demais concentrações de estudo, 2,5 μM , foram retiradas desta mesma amostra e diluídas de acordo com a concentração almejada com Solução Tampão Fosfato Salina (PBS) (LB[®] Laborclin Ltda., Brasil) estéril em capela com fluxo laminar contínuo horizontal.

1.3. Fonte de Luz

Empregou-se protótipo Laser Emissor de Diodo (LED), (Figura 02), comprimento de onda de 660 nm, com potência de 75 - 78 mW a distância determinada de quatro centímetros entre a lente do LED e o objeto experimental. Tais valores foram determinados através da avaliação física gentilmente realizada pelo Prof. Dr. Sebastião Willian da Silva – Instituto de Física /UnB. O comprimento de onda foi calculado através da Cromatografia de Camada Delgada (CCD - Figura 03) e espectrofotometria para aferição do espectro. O LED utilizado é formado por uma banda espectral inserida no espectro vermelho.

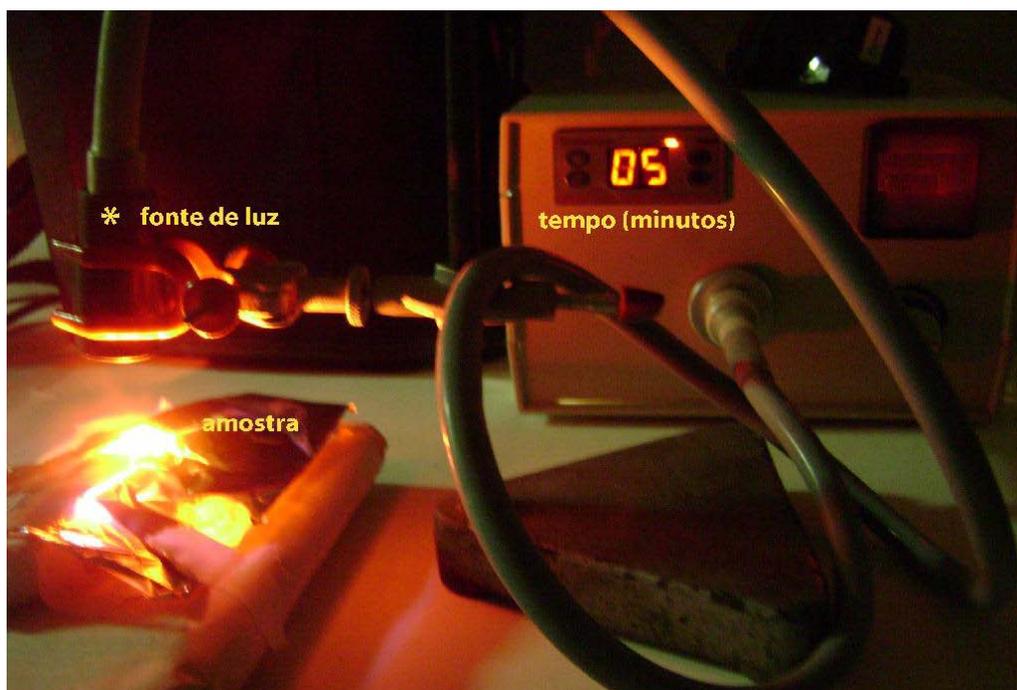


Figura 02 – Imagem fotográfica do aparelho protótipo LED em funcionamento durante TFD. Note a esquerda, amostra envolvida em papel alumínio para ficar protegida da luz ambiente.

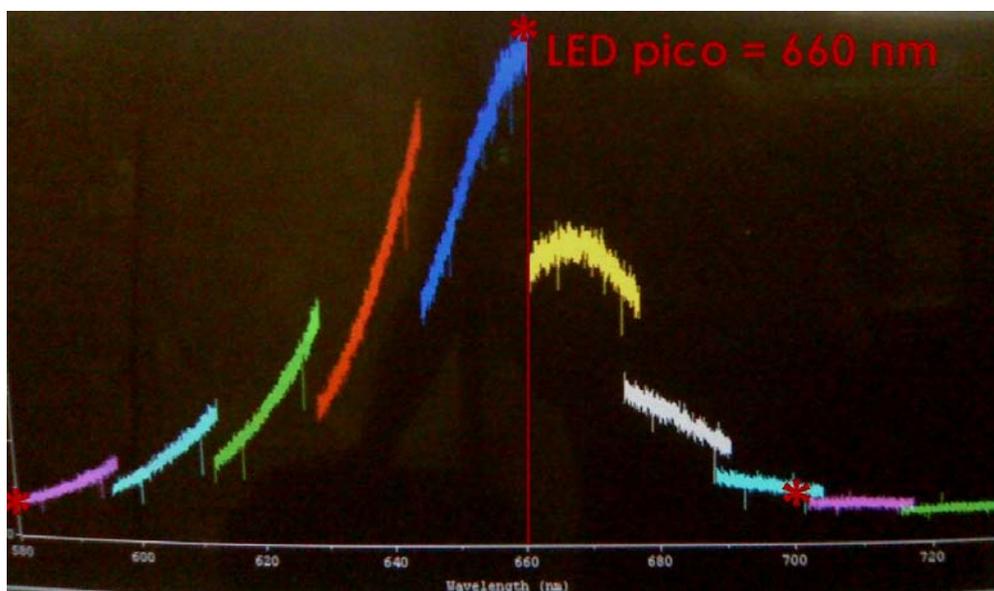


Figura 03 – Imagem computadorizada da faixa obtida através da cromatografia de camada delgada (CCD) para identificação da faixa de comprimento de onda do LED. Observa-se em 580nm percepção do espectro (luz), em 660nm obtém-se seu maior valor e em 700nm termina seu espectro.

A potência do LED foi medida em um colimador ligado a uma fonte de quantificação de concentração fotônica (intensidade medida em watts) e fonte de energia de 220 volts.

A dosimetria estipulada para o experimento foi obtida através da fórmula:

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Potência (watt)} \times \text{Tempo (segundos)}}{\text{Área irradiada (cm}^2\text{)}}$$

*Dose: energia necessária para excitação dos fótons dada por J/cm²

*Potência: intensidade da fonte de luz a uma determinada distância, medida em watts.

*Tempo: período em segundos de exposição a fonte de luz necessário para a excitação dos fótons.

*Área: espaço da amostra a ser irradiada pela fonte de luz medida pela área da circunferência do fundo da placa.

1.4. Concentração do fotossensibilizador e dosimetria

Inicialmente realizou-se um estudo preliminar da aplicação da TFD *in vitro* mediada pela AICIFt-liposomal em diferentes períodos de tratamento para averiguar o tempo mínimo necessário de exposição ao LED como também, a concentração de AICIFt.

Após análise destes resultados (dados não mostrados), a concentração escolhida de AICIFt-liposomal foi de 2,5µM e fonte de luz, LED, com: comprimento de onda 660nm., potência entre 75 -78 mW, densidade de energia de 10J/cm².

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção das Amostras

Uma vez removido cirurgicamente, os tumores foram imediatamente seccionados em fragmentos de aproximadamente dois centímetros de diâmetro com

auxílio de lâmina de bisturi nº 10, cabo de bisturi nº 03 e pinça anatômica. Em seguida, foi novamente excisado em duas partes iguais de um centímetro cada. A primeira amostra foi armazenada em frasco coletor de amostras biológicas de capacidade 50mL contendo formol a 10% e encaminhada para avaliação histopatológica juntamente com o restante da biópsia excisional do paciente. No outro fragmento foram realizados ciclos de lavagem, através da imersão da amostra em um tubo falcon 50mL com Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI) tópico - LM[®] Farma, Brasil, seguidos de quatro lavagens com solução fisiológica NaCl 0,9%, - Equiplax[®] Brasil, todos estéreis para finalmente armazenagem em tubo falcon contendo meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - GIBCO[™], EUA, e antibiótico penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) - Sigma – Adrich[®], EUA, o qual serviu de meio de transporte do material até o laboratório.

A manipulação em todas as etapas deste procedimento foi feita de forma estéril, e os materiais utilizados foram previamente esterilizados.

2.2. Cultivo Celular

Fragmentos dos tecidos tumorais excisados durante o tratamento cirúrgico tradicional foram encaminhados para o estabelecimento de culturas celulares primárias. Após o estabelecimento das culturas primárias derivadas do neoplasma, foi realizada a aplicação da TFD mediada pela AICIFt-liposomal *in vitro* e demais grupos experimentais.

Todos os procedimentos que serão posteriormente descritos foram realizados em capela de fluxo laminar horizontal - CFLH-12, VECO[®], Brasil, com material estéril. Cabe ressaltar que, sempre antes da utilização da câmara de fluxo laminar, era realizada limpeza mecânica com álcool a 70% e em seguida, repouso de 30 a 40 minutos sob luz ultravioleta.

2.2.1. Estabelecimento de culturas primárias

As culturas de células de tecidos tumorais foram estabelecidas conforme o seguinte protocolo: uma vez removido o tecido tumoral de maneira asséptica, conforme descrito no item 2.1, a amostra foi transportada para o laboratório em 5mL de meio de transporte. Em seguida, o material foi seccionado em pequenos fragmentos com aproximadamente 0,5mm de diâmetro (separação mecânica do material biológico), sob placa de Petri de vidro com auxílio de pinça anatômica e lâmina de bisturi número 20 acoplado em cabo de bisturi nº 04. Em seguida, o material foi transferido para placa de 6 poços e garrafa pequena de cultivo contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino - GIBCO®, Brasil, penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As placas e as garrafas foram colocadas em estufa TE – 399Tecnal®, Brasil, e mantidas a 37,5°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ em ar (Figura 04).

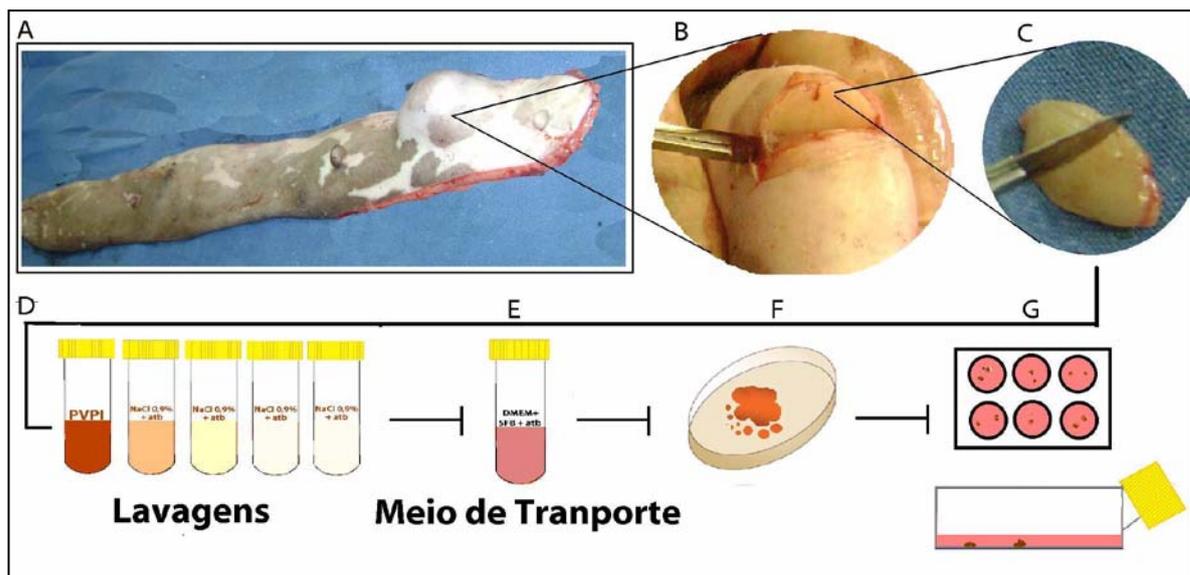


Figura 04 – Representação esquemática elucidando as etapas envolvidas da colheita da amostra até o estabelecimento das culturas primárias. A) cadeia mamária unilateral removida cirurgicamente do paciente contendo massas tumorais em glândula mamária abdominal cranial e inguinal; B) excisão do fragmento tumoral para colheita da amostra; C) diérese do material; D e E) imediatos ciclos de lavagens da amostra e envio para o laboratório através do meio de transporte; F) fracionamento da amostra coletada e G) cultivo produzido a partir dos fragmentos do tumor.

Para estabelecimento de subculturas, partindo-se inicialmente da placa de seis poços e uma garrafa de 25cm² para cultura de células, após atingir 75% de

confluência, as células foram soltas do fundo do frasco por tratamento com solução de tripsina-EDTA - GIBCO® - Canadá, contendo 2,5 g/L de tripsina (1:250) e 0,38 g/L de EDTA, por três minutos, a 37° C. Em seguida adicionou-se igual volume de meio de cultivo com soro fetal bovino para inativação da tripsina, e o volume total contendo a suspensão de células foi transferido para um tubo de centrífuga, centrifugado a 750 x g por 5 minutos, para formar um precipitado de células (*pellet*). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em novo meio de cultivo. Este volume total foi distribuído em placas e garrafas de cultura, as quais eram acondicionadas na estufa conforme descrito anteriormente.

2.2.3. Manutenção do Cultivo Celular

Os frascos de cultura foram avaliados a cada 48 horas em microscópio invertido com contraste de fase onde na ocasião era realizada a troca de metade do volume do meio das placas e das garrafas, ou caso atingissem confluência, a repicagem.

2.3. Delineamento Experimental

Em todos os experimentos aqui realizados, a aplicação do LED e do fármaco AICIFt-liposomal, seja isolado ou na TFD, foram realizadas em ambiente escuro, sem luminosidade.

2.3.1. Preparação do Cultivo para os experimentos *in vitro*

Partindo-se inicialmente de uma garrafa para cultura de células contendo uma monocamada de células confluentes, outras garrafas foram preparadas similar ao referido no estabelecimento de sub-culturas. No entanto, após a centrifugação e descarte do sobrenadante, o *pellet* formado era ressuspensado em 01 mL de meio de cultura suplementado. Após, as células eram contadas em câmara de Neubauer

e plaqueadas para placas de cultura de 24 poços. Todas as passagens celulares foram realizadas 24 horas antes dos procedimentos experimentais, para que houvesse a estabilização e adesão celular ao fundo das placas de cultura. Para as placas de 24 poços foram transferidas 10^5 células por poço (Figura 05).

O método de cultivo acima descrito foi igual para todos os ensaios realizados. No entanto, para as placas de 24 poços disponibilizadas para as análises de morfologia na microscopia de luz, foi adicionada uma lamínula de vidro circular, estéril, no fundo de cada poço das placas anterior ao plaqueamento de células, possibilitando o crescimento celular em sua superfície.

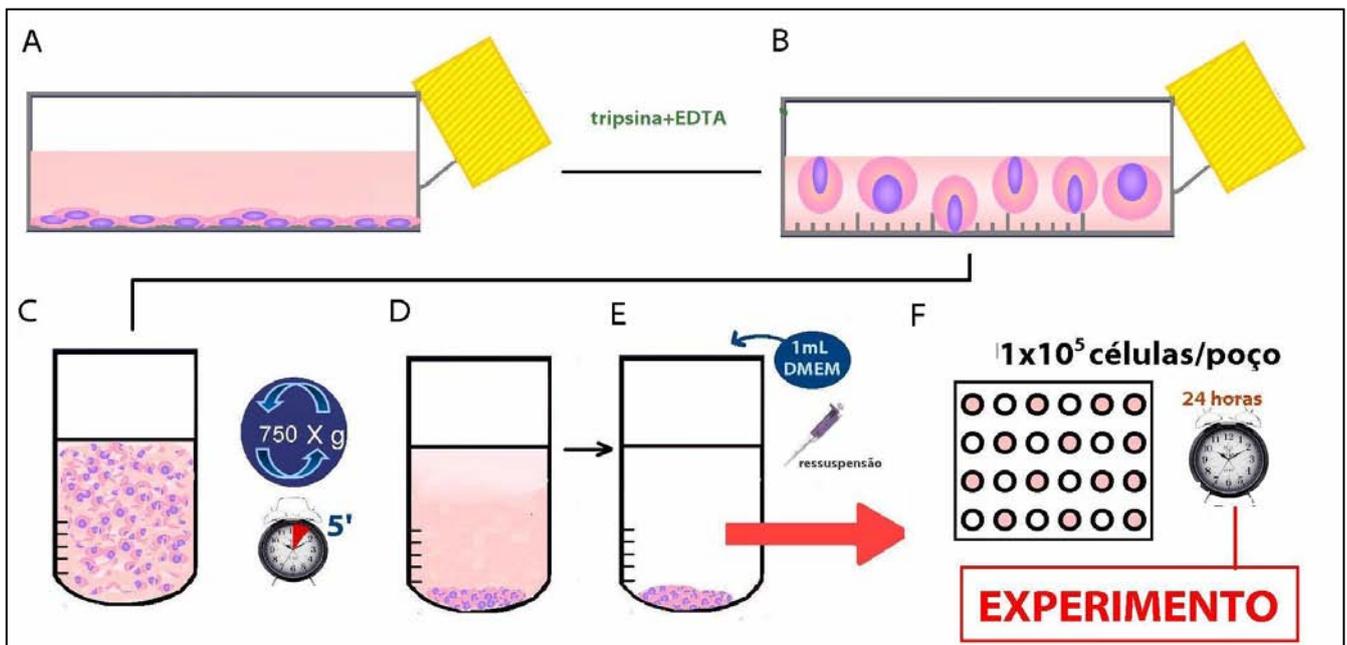


Figura 05 – Representação do preparo das placas de 24 poços para realização do experimento com TFD. A) garrafa de cultivo contendo células aderidas na superfície e confluentes; B) após adição da solução de tripsina-EDTA e consequente destacamento das células aderidas ao fundo do frasco de cultura; C) e D) ressuspensão do meio contendo células soltas e envio para centrífuga a $750 \times g$ durante 05 minutos para formação do *pellet*. E) descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellete* em 1 mL de meio e F) transferência de 1×10^5 células em cada poço para após 24 horas de estufa realização do experimento.

2.3.2. Grupos Experimentais

Foram delineados quatro grupos experimentais: (1) controle; (2) LED; (3) AICIFt-liposomal 2,5 μ M; (4) TFD (Quadro 03)

O controle (1) foi aquele em que as células não foram submetidas a nenhum tratamento e permaneceram em estufa de cultivo com solução de PBS estéril durante todo o procedimento.

O grupo tratado somente com LED (2) permaneceu somente com solução PBS estéril semelhante ao grupo controle, porém recebeu iluminação com LED na mesma intensidade e comprimento de onda que o grupo da TFD. Objetivo deste grupo foi avaliar se a fonte de luz apresentava toxicidade celular se utilizada isoladamente. O grupo tratado com AICIFt (3) possuiu metodologia semelhante ao grupo tratado com TFD (4), porém sem iluminação com LED, apenas administração do fármaco durante 30 minutos e em seguida descarte e manutenção com o PBS. A finalidade deste grupo foi avaliar a citotoxicidade do fármaco sem fotoativação. Enfim, o objetivo almejado na criação destes dois grupos foi certificar inocuidade dos fatores FS e fonte de luz, aumento assim confiabilidade da TFD.

E finalmente, grupo TFD (4), que consistiu no tratamento das culturas celulares com solução liposomal de AICIFt em uma concentração de 2,5 μ M. Após 30 minutos de exposição em estufa de cultivo celular, a solução fotossensibilizadora foi descartada e uma solução de PBS estéril foi aplicada nos poços para que fosse procedida a aplicação de LED com energia total de 10 J/cm²

Quadro 02 – Descrição da constituição de cada grupo experimental. As demarcações em “X” referem-se à aplicação do item em questão.

GRUPOS	AICIFt	LED
	2,5 μ M	10J/cm ²
1 (Controle)	-	-
2 (LED)	-	X
3 (AICIFt)	X	-
4 (TFD)	X	X

Após 24 horas da execução destes procedimentos, as placas de cultura foram processadas para as diferentes análises. Todas as análises foram conduzidas em quadruplicatas, ou seja, realização de quatro poços de tratamento para cada grupo experimental em cada análise proposta.

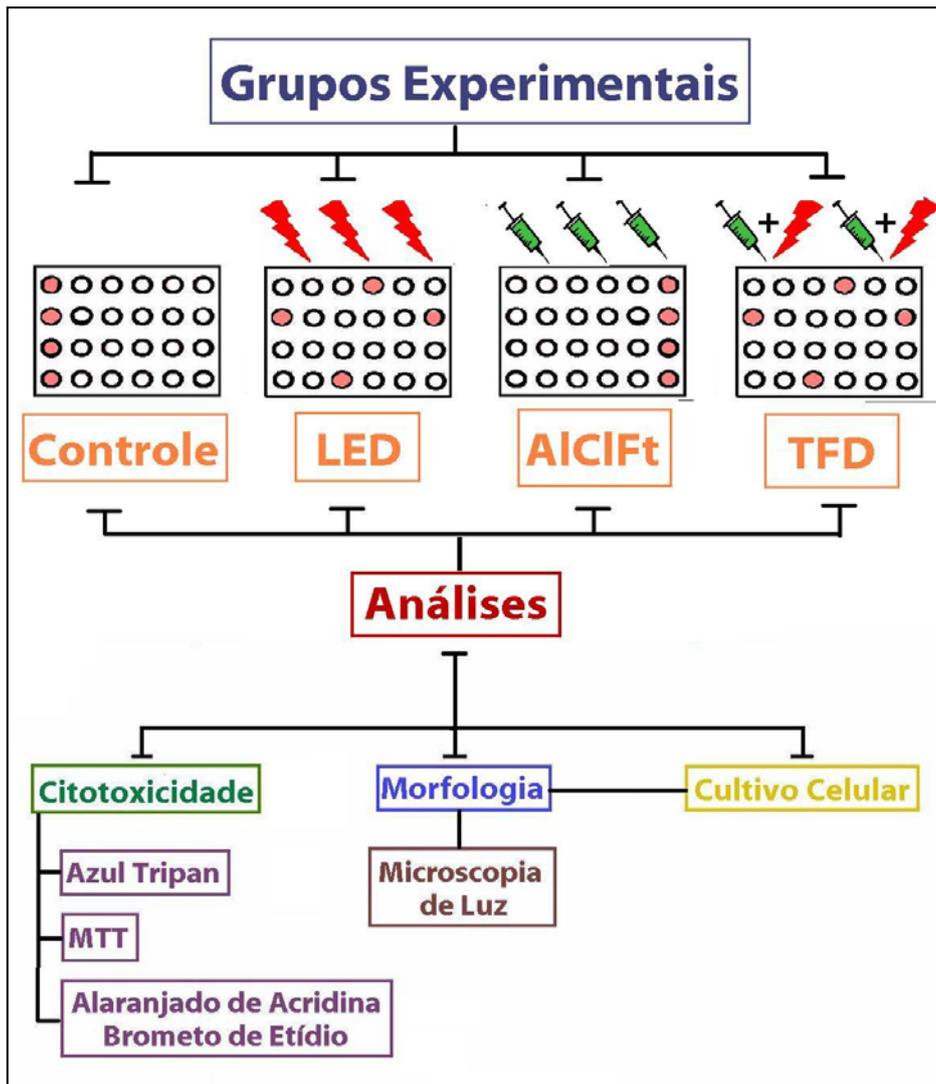


Figura 06 – Representação esquemática dos grupos experimentais e análises realizadas.

2.4. Ensaio Cytotóxicos

2.4.1. Análise da Viabilidade Celular pelo método de Exclusão por Azul Tripan

Esse teste de viabilidade tem como princípio a avaliação do grau de comprometimento estrutural da membrana plasmática através da detecção de células com perda de integridade de membrana citoplasmática sendo, assim, consideradas inviáveis. Tal fato pode ser evidenciado em razão do corante ser uma macromolécula, não absorvido pela membrana plasmática de células viáveis (STROBER, 2003). Contudo, quando a membrana plasmática sofre alterações estruturais e se torna permeável ao corante, as células são coradas em azul.

Para tal, decorridas 24 horas do protocolo experimental (tratamentos), foi retirado o meio DMEM suplementado de cada poço e adicionados 300µl de tripsina-EDTA e mantido em estufa de cultivo durante dois minutos. Após a incubação, foi adicionado igual volume de DMEM com 10% de soro fetal bovino e o volume total foi ressuscitado e transferido para tubos de microcentrifugação do tipo eppendorfs, devidamente numerados e identificados com o nome do grupo experimental. Em seguida o material foi centrifugado a 750xg durante cinco minutos e o sobrenadante formado, descartado. Do *pellet* obtido fez-se ressuspensão com um mililitro de meio de cultivo DMEM e de cada uma das amostras, retirou-se 100µL da suspensão de células de cada poço, aos quais foram adicionados 100µL do corante azul tripan (0,4%) - Sigma - Aldrich[®], EUA. Após homogeneização da mistura, 25µL foram transferidos ao hematocítômetro - C.A.Hausser & Son, EUA e o número de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas em azul) foi determinado. A contagem celular realizada com auxílio do microscópio óptico modelo MO BX 41- Olympus, EUA, foi feita no período máximo de cinco minutos para evitar a evaporação do líquido e a morte celular por exposição prolongada ao corante. Para a determinação do número de células na câmara de Neubauer foi utilizada a fórmula a seguir.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células por mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células nos 4 quadrantes}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Um número absoluto de células por mililitros foi obtido neste ensaio. A média da contagem de 4 poços em cada grupo 24 horas após os diferentes tratamentos levou ao resultado obtido desta etapa do experimento.

2.4.2. Viabilidade Celular pelo método de MTT

Esse ensaio de citotoxicidade consiste em um teste colorimétrico que quantifica a redução do sal tetrazolium MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) em um composto conhecido como formazan (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5- diphenylformazan), pela ação de desidrogenases mitocondriais e mediada pela enzima intracelular succinato-desidrogenase. O resultado do teste é dependente, portanto, da população celular viável, capaz de metabolizar o formazan (DENIZOT et al 1986 apud MACHADO et al., 2008). Ou seja, a presença de desidrogenases mitocondriais ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais do corante roxo de formazan formados pela redução do MTT são quantificados por técnicas de espectrofotometria.

Para a realização dessa análise, decorridas 24 horas após o período de incubação, o meio de cultivo foi substituído por outro adicionado de solução estoque de MTT (5 mg/mL) na proporção 50µL / 450 µL de meio de cultura. Tal solução foi armazenada protegida da luz e em temperatura de 4°C. Em seguida, incubaram-se as placas na estufa de cultivo de maneira rotineira, mas ao abrigo da luz. Após três horas de incubação com o meio de cultura adicionado com o corante MTT, esse meio foi removido e adicionados 300 µL de solução dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma - Aldrich®; EUA, em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Após 10 minutos de repouso, os cristais de formazan foram dissolvidos e a leitura e quantificação das quadruplicatas foram feitas com o aparelho espectrofotômetro digital (Bio-Rad Model 3550 – UV microplate reader) em comprimento de onda 595 nm. O gráfico foi plotado no Programa *Origin* versão 6.0 e a interpretação dos resultados foi obtida através da análise das absorvâncias. Absorvância menor que a lida no grupo controle não tratado é indicativo de morte celular.

2.4.3. Viabilidade celular e distinção entre as vias de morte celular por meio do ensaio de coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio

Este ensaio consiste em um teste de viabilidade celular que utiliza uma dupla coloração fluorescente. Os corantes então utilizados têm a capacidade de se intercalarem com ácidos nucleicos, sendo que o brometo de etídio exposto a radiação ultravioleta emite fluorescência em vermelho ou vermelho-alaranjado quando se intercala ao DNA (SILVA *et al.*, 2001) e o alaranjado de acridina emite fluorescência em verde quando se intercala a esse ácido nucleico (LIU *et al.*, 2008). Esses dois corantes também possuem a capacidade de penetrar a membrana plasmática de forma diferenciada. Enquanto o alaranjado de acridina consegue penetrar as células com membrana íntegra, o brometo de etídio só penetra as células com perda de integridade de membrana. Ou seja, quando a célula encontra-se viável, será corada de verde uniformemente, com citoplasma de tamanho normal e núcleo preservado se destacando com verde mais claro. No caso de apoptose inicial, mas com preservação de sua membrana plasmática, haverá entrada somente do corante alaranjado de acridina e as células serão coradas em verde, no entanto, o núcleo estará com formatos irregulares e possíveis condensações e fragmentação da cromatina. Na apoptose tardia, como as células já perderam parcialmente a integridade da membrana, parte do brometo de etídio sobressairá sobre o alaranjado de acridina, corando o núcleo de cor laranja. Além disso, a célula poderá apresentar formação de corpos apoptóticos, característica de apoptose, em coloração verde. Será ainda possível observar o formato celular padrão (HEWITT & NEBE-VON-CARON, 2001). Na necrose, como não há mais integridade de membrana, haverá predomínio do corante brometo de etídio e a identificação de células ocorrerá na emissão uniforme de fluorescência vermelha ou alaranjada intensa com células intumescidas e ausência de arranjo celular normal (SILVA *et al.*, 2001).

Para a execução do ensaio de viabilidade com a dupla coloração alaranjada de acridina e brometo de etídio - VETEC[®] Química Fina, Brasil, 24 horas após os tratamentos descritos no item 3.3.4., as células aderidas ao frasco foram tripsinizadas com a solução tripsina-EDTA, coletadas, centrifugadas a 750 x g

durante cinco minutos e ressuspensas em 100µL de meio de cultura. De cada amostra, foram retirados 20 µL, aos quais foram adicionados 2 µL de uma mistura recém preparada da dupla coloração em uma proporção de 1:1, a partir da concentração de 100µg/ml de cada corante. O material corado foi então colocado sobre lâminas de microscopia de vidro e imediatamente após montagem com lamínula de vidro (24 mm x 24 mm), a morfologia celular foi observada e analisada em microscópio de fluorescência invertido Axiophot, Zeiss.²⁶

De cada grupo experimental, foram contadas e avaliadas cerca de 200 a 100 células, quando possível, em cada uma das quadruplicatas.

2.4.4. Análise Estatística

As percentagens adquiridas entre células viáveis e não-viáveis, bem como a percentagem de células apresentando as diferentes vias de morte celular, foram comparadas entre os tratamentos. Os dados foram transformados e submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey (StartView[®] para Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

2.5. Avaliação do cultivo celular através do microscópio invertido

Decorridas 24 horas dos ensaios experimentais, as placas de 24 poços foram retiradas da estufa de cultivo e cuidadosamente levadas para o microscópio contraste de fase – TS 1000 Nikon Eclipse – EUA, para avaliação da aderência das células à placa de cultivo pós-tratamento, morfologia celular se acaso as células se encontram com formas poligonais e aderidas no fundo do recipiente, ou se encontram arredondas não aderidas, móveis e dispersas no meio de cultivo, o que constitui inviabilidade celular e por fim, multiplicação celular através do preenchimento de espaços vazios na placa, formando monocamada celular e o nível de confluência celular. Essas características foram também analisadas subjetivamente e comparadas entre os grupos experimentais.

Após análise, foi acoplada câmera fotográfica digital DCM35 – Microstatone Infotech para obtenção de imagens.

2.6. Avaliação morfológica das células dos grupos experimentais

Para a análise da morfologia celular, lamínulas de microscopia circulares estéreis 25 mm de diâmetro foram posicionadas no fundo de placas de cultura com 24 poços. Com isso, células do cultivo primário proliferaram nas lamínulas, aderindo-se a essa superfície. Decorridas 24 horas do tratamento, foi retirado o meio de cultivo existente e lavado demasiadamente com PBS. Foram realizadas no total três lavagens para certificação da retirada completa do meio de cultivo anteriormente existente. Em seguida, as células foram fixadas e coradas com panótico - LB[®] Laborclin, Brasil, de forma convencional e imediatamente analisadas no microscópio óptico - MO BX 41 Olympus, EUA, nos aumentos de 100X, 200X e 400X procurando-se principalmente avaliar comparativamente os padrões morfológicos e arranjo celular dos diferentes grupos. Na mesma ocasião, as micrografias foram realizadas em microscópio de luz, sendo as imagens capturadas no programa Axio Vison 40v 4.6.1.0. Copyring © 2002-2004.

O intuito da avaliação morfológica foi observar através da microscopia de luz, alterações estruturais ocorridas nas células.

RESULTADOS

3. Resultados experimentais *in vitro* da Aplicação da TFD no cultivo primário de carcinoma mamário de cadela.

3.1. Resultados do método de exclusão do Azul Tripán

A avaliação da efetividade da aplicação da TFD nos cultivos primários foi realizada por meio de diferentes experimentos, envolvendo aspectos qualitativos e quantitativos relacionados com a viabilidade celular. A figura 7 apresenta os resultados dos ensaios com o corante Azul Tripán. Observa-se que o grupo TFD apresentou uma porcentagem de viabilidade celular significativamente menor do que todos os demais grupos ($P < 0,05$) e não houve diferença significativa entre os outros tratamentos e controle. Ou seja, após a TFD o cultivo celular apresentou apenas 12% de células vivas, o grupo controle, LED e AICftalo apresentaram respectivamente 94%, 90% e 95% de células vivas..

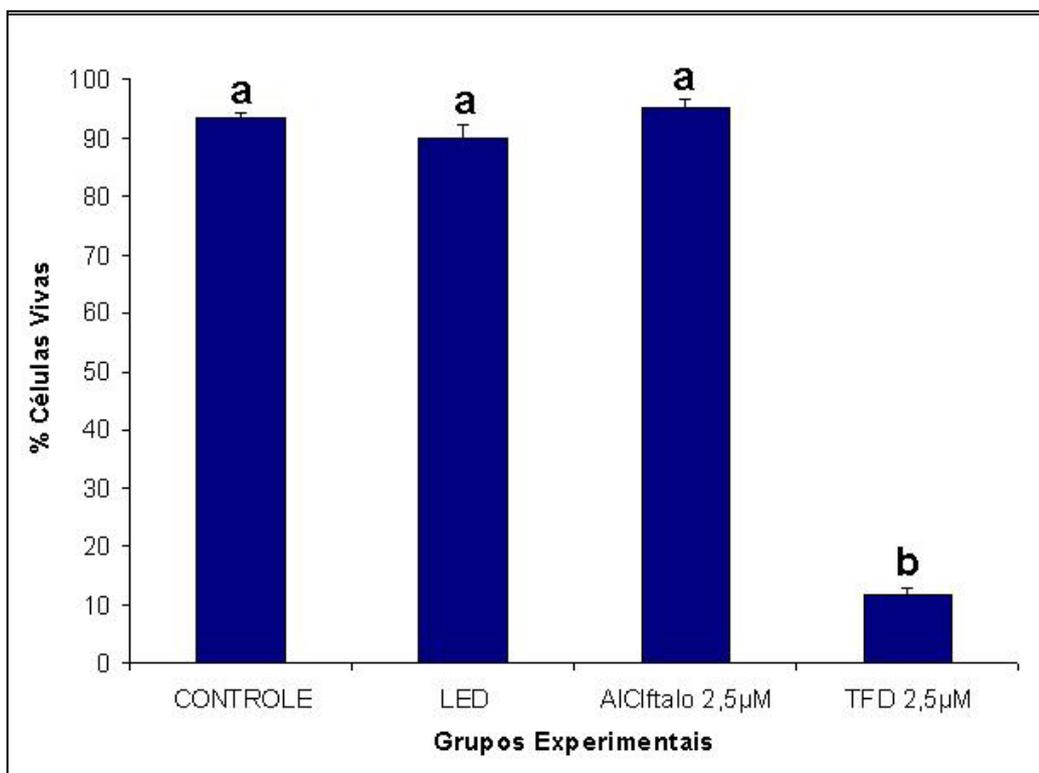


Figura 7. Viabilidade média (\pm DP) das células após 24 horas do experimento, avaliadas pelo ensaio com corante Azul Tripán. ^(ab) Barras com diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.2. Resultados do método de avaliação de viabilidade celular pelo MTT

Os resultados decorridos deste método de avaliação de citotoxicidade encontram-se dispostas na figura 8. Por meio do ensaio pelo MTT observa-se que o controle tem significativamente mais células viáveis (100%) que os outros tratamentos ($P < 0,05$), e a TFD tem significativamente menos células viáveis que todos os outros tratamentos ($P < 0,05$). O uso do LED e da medicação sozinhos não diferiram entre si, apresentando 83% e 84% respectivamente de viabilidade celular. Nota-se que há grande eficiência na redução da viabilidade das células cultivadas após a aplicação da TFD sendo demonstrada pela morte celular de mais de 93% do total de células no ensaio de MTT.

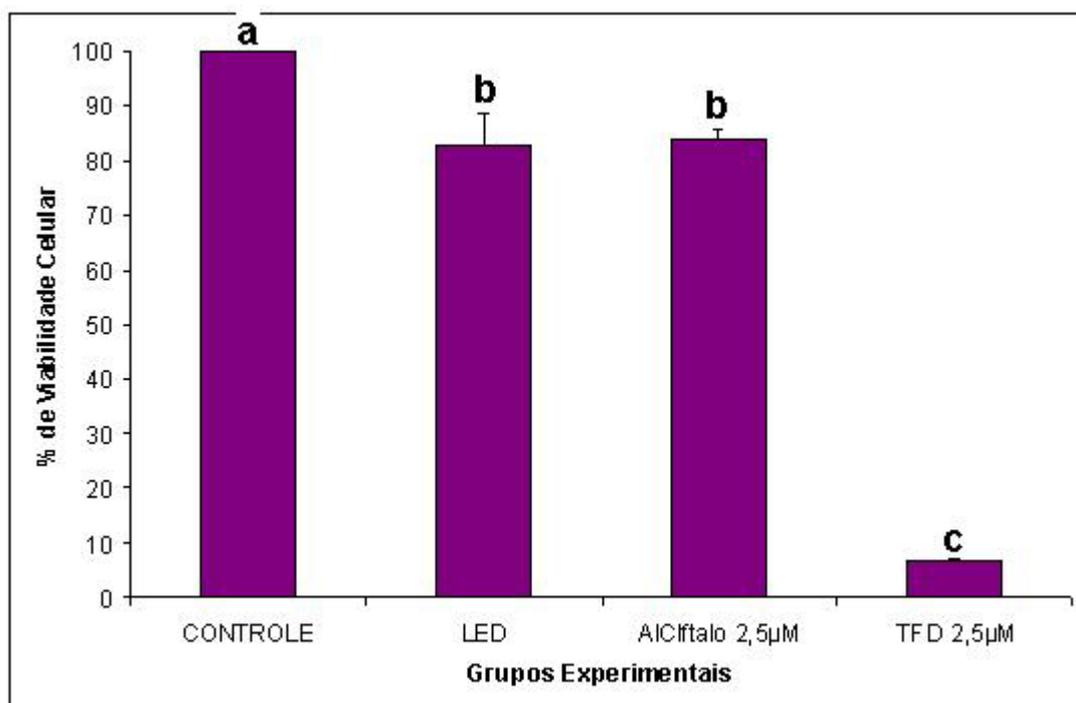


Figura 8. Viabilidade média (\pm DP) das células após 24 horas do experimento através do método de avaliação MTT. ^(abc) Barras com diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.3. Resultados do ensaio de citotoxicidade pela coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio

A análise morfológica de citotoxicidade das células cultivadas após a aplicação da TFD com o ensaio de coloração Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio permitiu a distinção entre as células vivas, necróticas e apoptóticas como descrito na metodologia, em cada um dos grupos experimentais.

As células cultivadas consideradas viáveis tratadas ou não, se apresentavam com coloração verde, com forma regular esférica ou oval e sem projeções citoplasmáticas aberrantes (Figura 9A). As consideradas apoptóticas apresentavam alterações como condensação, fragmentação de núcleo e da cromatina e liberação de corpos apoptóticos, podendo se mostrar de coloração verde ou laranja (Figura 9B e C). As células necróticas eram visualizadas como células intumescidas, se apresentando com coloração avermelhada, dada a total perda de integridade de membrana (Figura 9D).

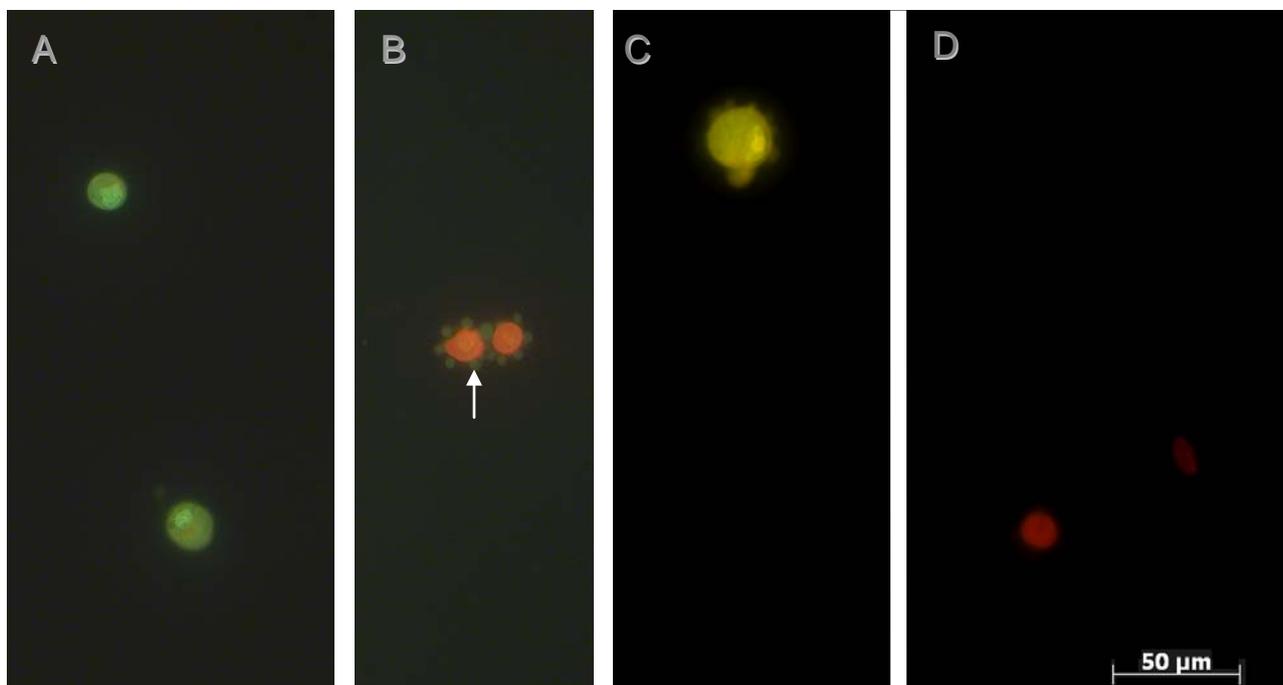


Figura 09. Fotomicrografias de fluorescência de células cultivadas de carcinoma mamário de cadela em diferentes grupos experimentais coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídeo, mostrando células viáveis (A), em apoptose com presença de corpos apoptóticos (seta) (B), apoptose, (C), e necrose (D).

Os resultados obtidos pela coloração com Alaranjado de Acridina e Brometo de Etídio permitiu quantificar células necróticas e apoptóticas em cada um dos grupos experimentais e os resultados podem ser visualizados na figura 10. Como se pode observar, o grupo da TFD apresentou menos células viáveis (13%) diferindo significativamente de todos os demais grupos ($P < 0,05$), e não houve diferença entre os outros tratamentos, resultado semelhante ao observado com a coloração azul tripan. Avaliando-se as vias de morte celular, nota-se que para a percentagem de células em necrose a TFD apresentou um maior número de células necróticas (87%) que os demais tratamentos ($P < 0,05$); no entanto, não houve diferença entre os outros tratamentos. Já para via de morte celular por apoptose, os resultados obtidos foram reduzidos e não diferiram entre si. Nota-se, então, que a TFD causou morte celular significativa, quando comparada aos outros grupos de tratamento, e que a mesma decorreu de necrose celular.

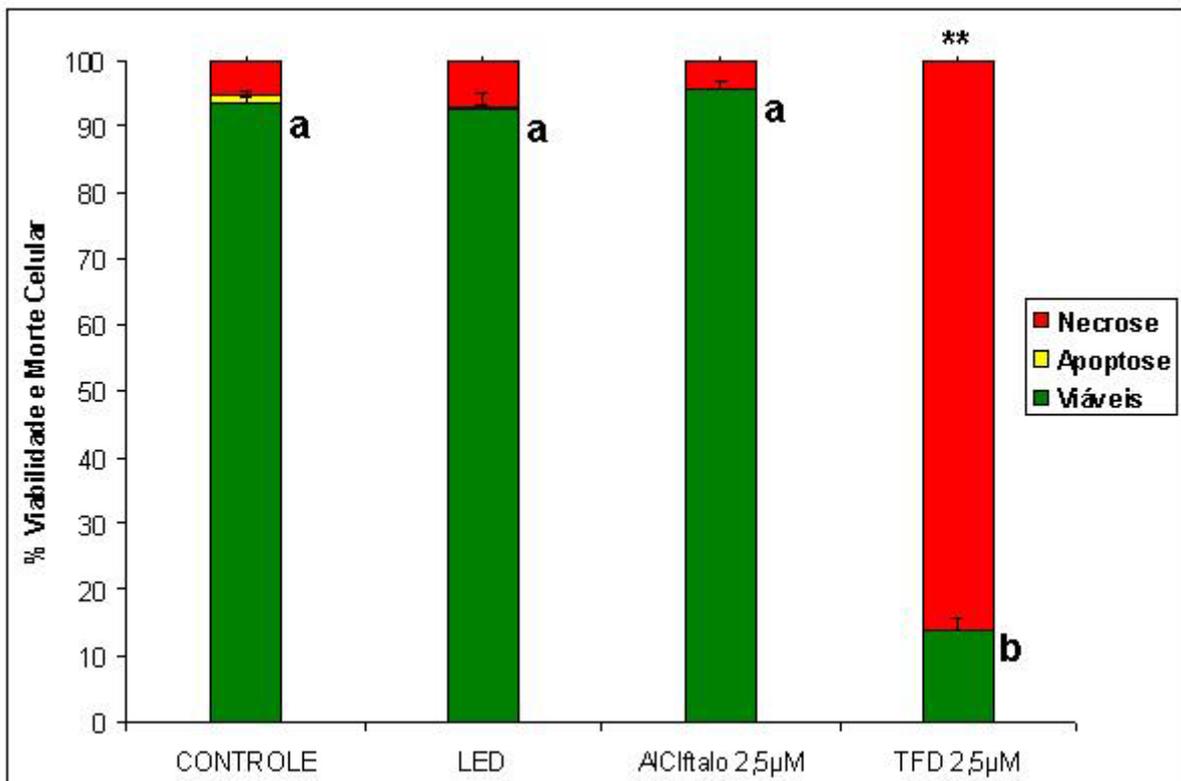


Figura 10. Porcentagem média (\pm DP) de células vivas, com apoptose e necrose após 24 horas do experimento através do método de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio. ^(a,b) Barras com diferentes letras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). ^(**) Diferença estatisticamente significativa de células mortas por necrose entre TFD e os demais grupos ($P < 0,05$).

3.4. Análise do cultivo celular após tratamentos experimentais, através do microscópio invertido com contraste de fase

As placas contendo os cultivos celulares foram analisadas decorridas 24 horas do experimento sob microscopia de contraste de fase nos aumentos de 100X, 400X e 600X. O grupo controle foi o modelo de comparação entre os diversos tratamentos.

As imagens observadas no grupo controle (Figura 11) demonstraram confluência e aderência celular (Figura 11A, B e C), células com formatos poligonais variando de formas mais alongadas (Figura 11C) a formas mais quadrangulares (Figura 11D) a depender do nível de confluência da placa, ou seja, da concentração celular aderida no fundo da placa. Observaram-se poucas células arredondadas ou imersas no sobrenadante do meio de cultivo. As imagens obtidas nos grupos LED e nos grupos com o fármaco fotossensibilizador isolado foram similares aos observados no grupo controle.

Nas imagens obtidas no grupo da TFD (Figuras 12) observou-se escasso número de células aderidas ao fundo da placa, perda do arranjo celular e ausência de confluência. Ainda, elevado número de células arredondadas e imersas no meio de cultivo (Figura 12A e B), evidenciadas como pontos radioluscentes. Era possível observar também células aderidas, entretanto, com grande número de vacúolos citoplasmáticos (Figura 12C e D), inferindo processo de degeneração e morte celular.

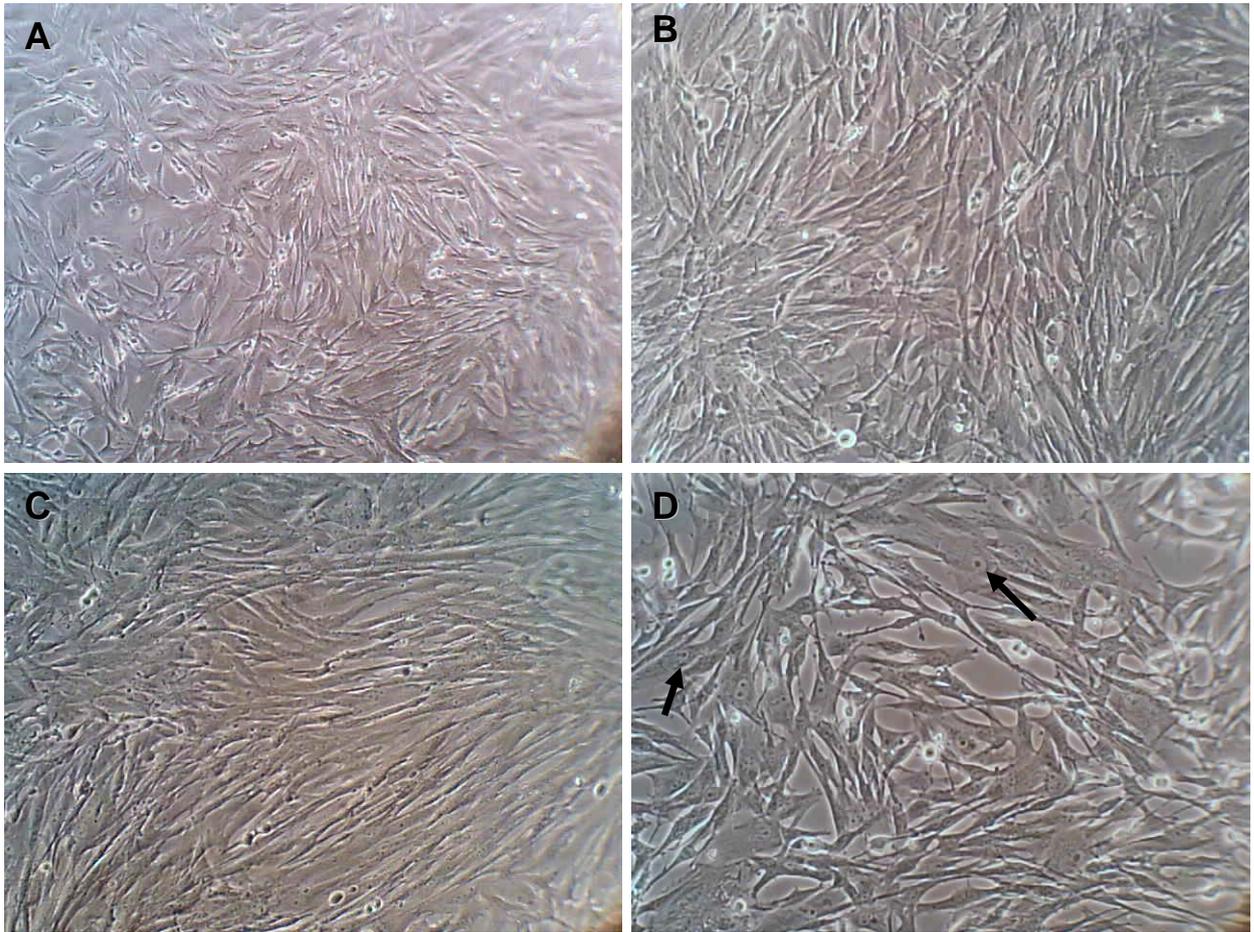


Figura 11. Fotomicrografias de células do grupo controle em cultivo. Em (A) observa-se no aumento de 100X, nível de confluência de aproximadamente 80%, (B) aumento de 400X, observa-se monocamada com células justapostas com arranjo uniforme, (C) aumento de 400X, verifica-se em outro campo visual as mesmas características analisadas em (B); (D) aumento de 400X, células de diferentes formatos, núcleo (seta) e citoplasma evidentes. Notar escassez ou ausência de células arredondadas e imersas no sobrenadante.

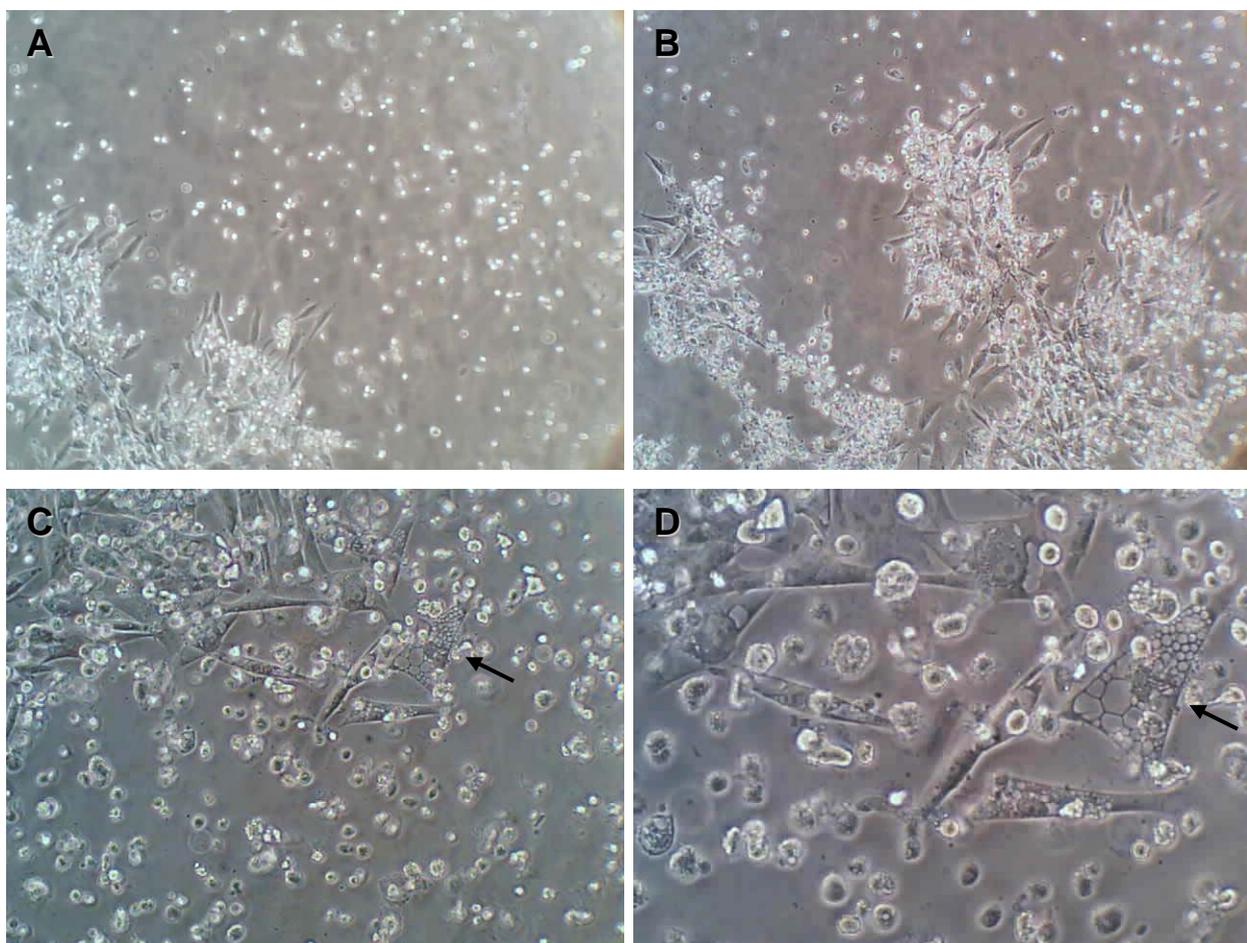


Figura 12. Fotomicrografias de células em cultivo tratadas com terapia fotodinâmica. (A) observa-se no aumento de 100X, ausência de confluência, células arredondadas flutuantes no meio de cultivo, (B) aumento de 400X além das características observadas em (A), há também poucas células aderidas no fundo da placa, próximas aos aglomerados celulares de formato arredondado. (C) aumento de 400X verificam-se células poligonais com vacúolos citoplasmáticos (seta) e em (D) aumento de 600X, observa-se com melhor precisão as alterações analisadas em (C).

3.5. Análise da morfologia celular após tratamentos experimentais, por meio de microscopia de luz

As alterações analisadas da morfologia celular em todos os grupos experimentais foram comparadas ao observado no grupo controle. A microscopia de luz das culturas celulares submetidas aos tratamentos com o LED e à AICIFt isoladamente apresentaram morfologia semelhante àquela observada no grupo controle (Figura 13). Nesses grupos evidenciaram-se células com projeções citoplasmáticas que lhe conferiram aspecto de “estrela” (Figura 13A), as quais ligavam uma célula à outra (Figura 13B), e grande quantidade de células com formas poligonais (Figura 13C e D). Verificou-se integridade de membrana, citoplasma abundante, presença de grânulos e núcleo, e cromatina bem evidente (Figura 13D).

Já a análise à microscopia de luz do grupo submetido à TFD demonstra hipocelularidade e intensas alterações morfológicas das células cultivadas, como perda do conteúdo citoplasmático, condensação nuclear, fragmentação de núcleo e ruptura de membrana plasmática (Figuras 14A, B e C). Em determinados campos de visualização a presença intensa de debris celulares dificultou uma análise mais precisa (Figura 14D).

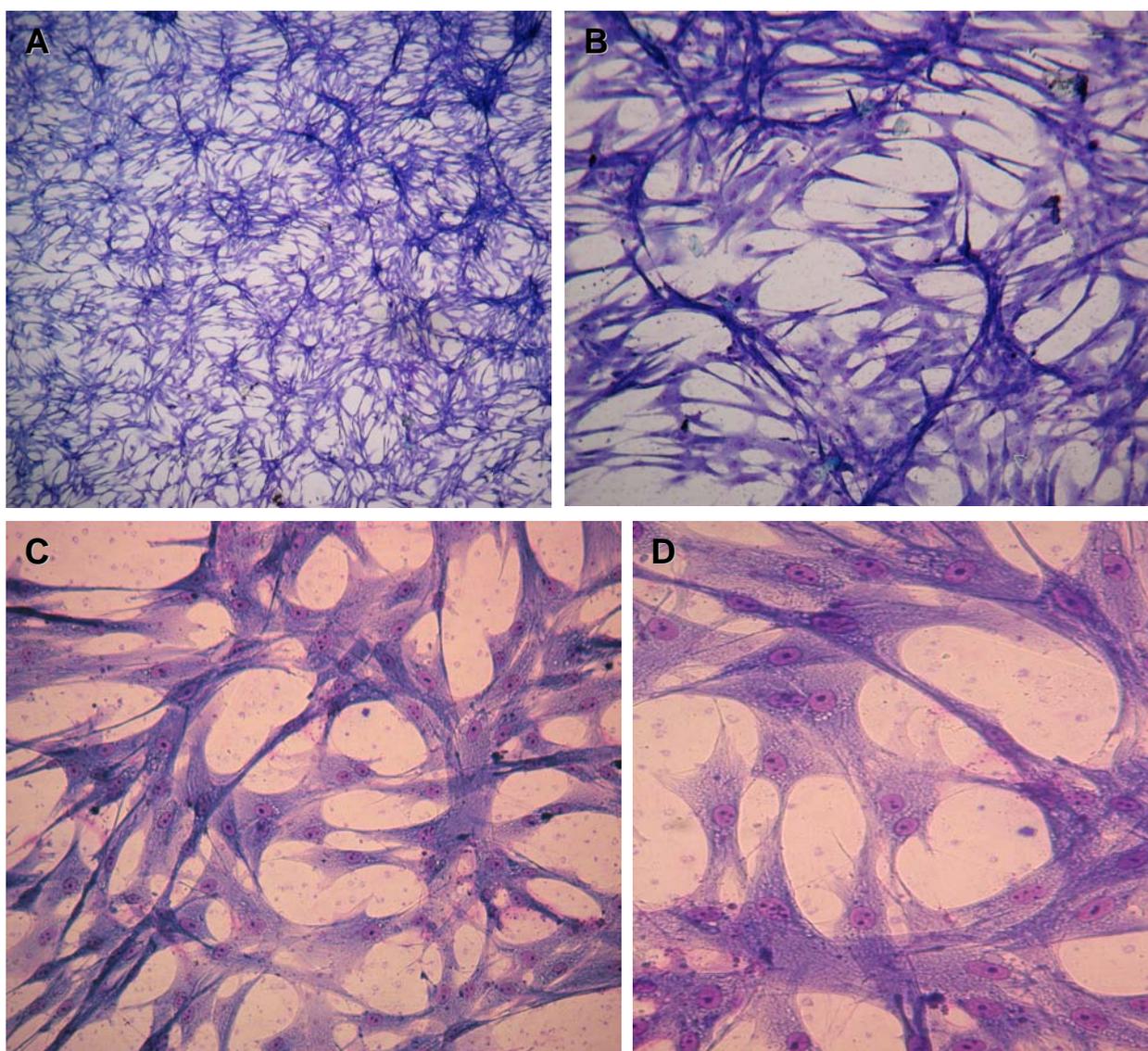


Figura 13. Fotomicrografias de células cultivadas em lamínulas com coloração panótico rápido, grupo controle. (A) aumento de 25X, projeção espacial da monocamada de células, (B) aumento de 100X, células com arranjo uniforme, e projeções citoplasmáticas conferindo-lhes aspecto de estrela. (C) aumento de 200X e (D) aumento de 400X, observa-se citoplasma abundante, núcleo preservado e bem delimitado, presença de inúmeros grânulos citoplasmáticos.

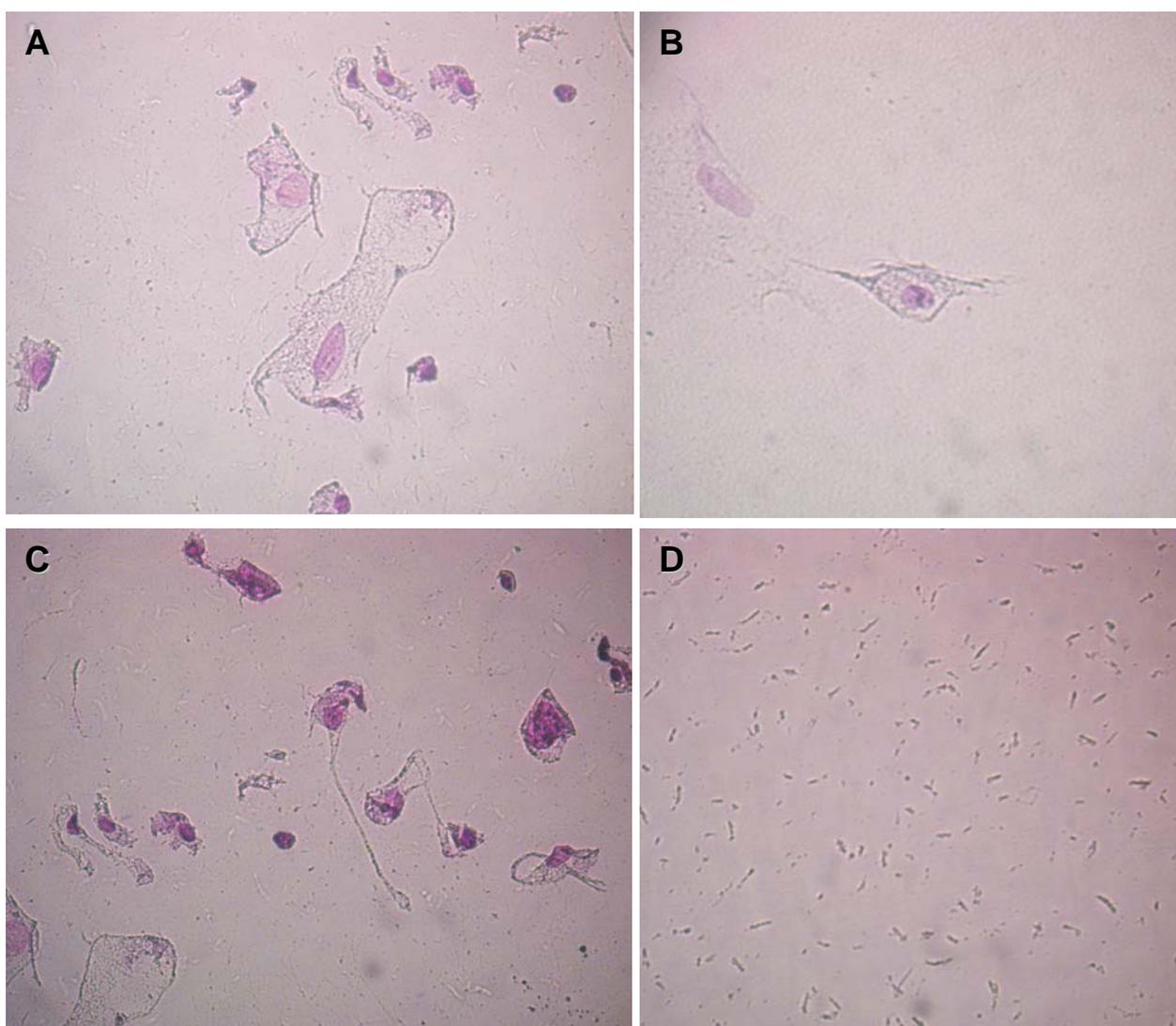


Figura 14. Fotomicrografias de células cultivadas em lamínulas com coloração panótico rápido, grupo TFD. (A – C) - aumento de 400X, células em processo degenerativo, perda da morfologia padrão. Em D, aumento de 100X, fundo da placa com ausência de monocamada e intensa quantidade de debris celulares.

DISCUSSÃO

O câncer de mama representa o neoplasma maligno mais comum nas cadelas e corresponde a 25-50% dentre todas as neoplasias (JONES et al., 2000; GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). A condução deste experimento, embasado na linha de pesquisa de cultivo primário de células cancerígenas e terapia fotodinâmica *in vitro* justifica-se pela elevada incidência de neoplasias mamárias malignas em cadelas (GORMAN & DOBSON, 1995; KITCHELL, 1995; OGILVIE & MOORE, 1995; MORRISON, 1998; ZUCCARI, 2005) como, também, na necessidade e segurança ética de se realizar primeiramente uma terapia não convencional em modelos apropriados *in vitro* que mimetizem a realidade *in vivo* (MACHADO, 2000; MERKEL & BIEL, 2001).

Ao se tratar de neoplasmas mamários, o tratamento atualmente consiste na sua excisão, que ocorre de formas distintas de acordo com o grau de envolvimento glandular, podendo estar associado ou não à quimioterapia adjuvante (MOULTON 1990, CEBALLOS *et al*, 1993; SILVA, 2000, OGILVIE & MOORE, 2001). A escolha do tratamento é dependente não somente do estadiamento do tumor, mas do grau de disponibilidade e aceitação do proprietário com relação ao período pós-operatório, aos custos financeiros, às mudanças estéticas e aos possíveis efeitos colaterais das sessões quimioterápicas (OGILVIE & MOORE, 2001). Vale ressaltar que dependendo do grau de acometimento do câncer, e presença de possíveis metástases, muitas vezes o tratamento cirúrgico não é recomendado, cabendo ao médico veterinário determinar alternativas paliativas para controle da dor e melhoria na qualidade de vida e bem estar do paciente oncológico.

Elucidadas tais dificuldades de cura e, muitas vezes, da finalização dos tratamentos convencionais para o câncer de mama, suscita-se a busca por alternativas terapêuticas que cessem ou retardem o crescimento tumoral, o que torna o modelo experimental aqui proposto uma ferramenta útil para a busca de tais alternativas. Sabe-se que as terapias antineoplásicas são de suma importância no aumento da expectativa de vida do paciente, mas, se mal planejadas, podem comprometer sua sobrevivência (BARBOSA, 2008).

Uma alternativa promissora, difundida para o tratamento de alguns neoplasmas cutâneos, como carcinoma de células escamosas (MERKEL & BIEL,

2001), câncer de próstata em cachorros (LUCROY *et al.*, 2003), ou no caso de ocorrência em humanos, do carcinoma bucal (MACHADO, 2000; TAPAJÓS, 2008), é a TFD.

Estudos sobre o uso de ftalocianina em Terapia Fotodinâmica de câncer de animais de companhia são reduzidos na literatura (ROBERTS *et al.*, 1991; PEASTON *et al.* 1993; LEACH & PEASTON, 1994; STELL & DOBSON, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BORGATTI-JEFFREYS *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos de TFD em câncer de mama em cadelas com AICIFt lipossomal não foram encontrados, até dado momento, nas bases de dados internacionais consultadas, dificultando comparações de metodologias e resultados. No entanto, Tapajós e colaboradores (2008) demonstraram que o fotossensibilizador AICFt-lipossomal apresentou excelentes resultados na aplicação da TFD em modelos de cultura de células derivadas de carcinoma epidermoide bucal humano. Longo *et al.*, (2009) observaram diferentes graus de eficiência deste protocolo terapêutico no tratamento de modelos experimentais em camundongos, com mínimo efeito colateral. E na eminência de se obter um agente fotossensibilizador próximo ao considerado ideal (OLIVEIRA *et al.*, 2006), tais achados, acima descritos, suscitaram a pesquisa com o fármaco fotossensibilizador AICIFt lipossomal.

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade com cultivo celular primário de carcinoma mamário de cadela demonstraram claramente a eficácia da TFD mediada pela AICIFt em formulação lipossomal na destruição destas células tumorais em sistemas de cultura celular. Tapajós *et al.*, (2008) obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que o fotossensibilizador AICIF-lipossomal apresentou excelentes resultados na aplicação da TFD em modelos de cultura de células derivadas de Carcinoma Epidermoide Bucal Humano. Neste estudo, foi demonstrado que 24 horas após a aplicação da terapia, aproximadamente 90% das células apresentaram perda da viabilidade celular. Verificou-se, ainda, que o tratamento com o fármaco fotossensibilizador de forma isolada não apresentava efeitos citotóxicos e genotóxicos às células em cultura. Posteriormente, o protocolo de aplicação da TFD mediada pelo fotossensibilizador AICIFt-lipossomal foi avaliado em diferentes modelos experimentais para o câncer de boca em camundongos (LONGO *et al.*, 2009). Também foram observados diferentes graus de eficiência deste protocolo terapêutico no tratamento dos modelos experimentais em camundongos. Assim

como nos modelos *in vitro*, nos estudos *in vivo* não foram observados efeitos adversos nos animais tratados de forma sistêmica com o fármaco fotossensibilizador (LONGO *et al.*, 2009).

Em termos gerais, o sucesso da Terapia Fotodinâmica depende dentre outros fatores, da fonte de luz, do tipo de agente fotossensibilizador, da sua concentração e localização intracelular. A morte celular, causada pelo agente citotóxico oxigênio singlete, pode ser promovida tanto por necrose quanto por apoptose, reações inflamatórias e estimulação de reações imunes do paciente (DOLMANS *et al.*, 2003).

De maneira sucinta, a apoptose é uma forma regulada de morte celular fisiológica, dependente da autodestruição intrínseca celular (WISING *et al.*, 2005). A necrose se caracteriza pelo conjunto de alterações morfológicas que se seguem à morte celular, num tecido ou órgão vivo, resultante de ação degradativa por parte de enzimas sobre uma célula letalmente agredida (JONES *et al.*, 2000).

Os achados morfológicos observados com o uso de Terapia Fotodinâmica com AICIFt lipossomal em cultura primária de carcinoma mamário são sugestivos de um mecanismo de morte celular por necrose. Tais resultados assemelham-se aos descritos por Longo *et al.*, (2009), os quais, utilizando o mesmo protocolo experimental com células de linhagem de carcinoma epidermóide bucal humano, OSSC, demonstraram a ocorrência de necrose celular com alterações morfológicas muito semelhantes às apresentadas no presente estudo. Além da morte celular induzida por necrose, verificou-se que o perfil de viabilidade celular dos grupos tratados apenas com luz ou com o fármaco fotossensibilizador AICIFt, isoladamente, foram semelhantes àqueles descritos por outros autores (TAPAJÓS *et al.*, 2008; LONGO *et al.*, 2009), demonstrando a reprodutibilidade dos resultados em diferentes linhagens celulares.

As alterações morfológicas observadas no presente trabalho também foram descritas por Darvish *et al.* (2006) para linhagem celular de carcinoma de laringe humano (B16F10) submetidas a TFD com Ácido 5-Aminolevulínico (ALA), Mijan *et al.* (2006) para o tratamento de linhagens distintas de carcinoma bucal por TFD com alumínio-ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS₄) e Martins *et al.*, (2007) para tratamento *in vitro* de linhagens celulares de carcinoma de laringe humana (HEp-2) através da utilização da TDF com o fármaco AIPcS₄.

Diversos estudos têm demonstrado que a aplicação da TFD promove a morte celular das células tumorais tanto por mecanismos de necrose (DARVISH *et al.* 2000 MIJAN *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007; TAPAJÓS *et al.*, 2008; LONGO *et al.*, 2009) quanto por apoptose (MARTINES *et al.*, 2007; PAZOS & NADER, 2007; PASCHOAL, 2009) e a caracterização destas mortes celulares pode ser obtida a partir de análises morfológicas e bioquímicas. Baseados na estimulação ou não do sistema imunológico, há trabalhos que discutem as vantagens e desvantagens da ocorrência da morte celular tumoral preferencialmente por necrose ou por apoptose (LAVIE *et al.*, 1999; CASTANO *et al.*, 2006). A necrose estimularia melhor a resposta imune que os eventos apoptóticos. E esse estímulo imunológico poderia gerar eventos inflamatórios clinicamente desfavoráveis. No entanto, estes mesmos eventos, estimulariam o desenvolvimento de respostas imunes específicas contra os tumores tratados promovendo através do estímulo imune, o controle da progressão tumoral (CASTANO *et al.*, 2006).

Correlacionando os resultados obtidos nos diferentes ensaios citotóxicos, observou-se interligação entre eles, atribuindo coerência aos achados. Na avaliação pela coloração azul tripan, que possui a finalidade de observar integridade de membrana e conseqüentemente inviabilidade celular, os resultados sugerem viabilidade celular no grupo controle e nos grupos onde foram adotados somente aplicação do LED ou do fármaco, contrariamente ao observado no grupo tratado com TFD. O mesmo pode ser observado nos testes de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio, sendo que neste último a morte celular por necrose foi evidente. O ensaio com alaranjado de acridina é relatado como um teste acurado (RENVOISÉ *et al.*, 1998), permitindo distinção das células em processo de necrose ou apoptose, e de células viáveis. Associando-se os resultados dos testes de dupla coloração à análise morfológica através da microscopia de luz, pode-se atribuir eficácia e seletividade à TFD.

Por outro lado, os resultados do teste MTT, cujo composto tem afinidade mitocondrial (DENIZOT *et al.* 1986 apud MACHADO *et al.*, 2008), mostraram grande perda de viabilidade celular ocasionada pela TFD, e também evidenciaram diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com LED ou com o fármaco, isoladamente. No entanto, a perda celular constatada nestes dois grupos foi mínima (cerca de 15% das células), se comparada ao grupo TFD (cerca de 93%).

Face ao exposto acima, uma hipótese sugerida para tais resultados pode ser fundamentada sobre a atividade celular ou sobre o sítio de ação de cada teste. Os ensaios com azul tripan, dupla coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio possuem como principal característica avaliar citotoxicidade através de integridade de membrana plasmática. Por outro lado, o teste MTT avalia atividade mitocondrial (MAGAUD *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos no teste MTT ensejam algumas considerações. A redução da atividade mitocondrial pode ser decorrente, inclusive, do momento em que a avaliação foi conduzida; ou seja, a sua atividade estar reduzida nos grupos LED e fármaco, isoladamente. Rodal *et al.*, (1998) observaram presença de ZnPc em mitocôndrias de células NHIK 3025 e Usuda *et al.*(2002) descreveram que as ftalocianinas interagem preferencialmente na membrana mitocondrial, no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi de linhagens celulares de câncer de mama humano MCF-7c3. As ftalocianinas podem interagir com as enzimas mitocondriais (FERREIRA *et al.*, 2004), mas somente acarretarão a morte celular mediante altas concentrações ou através de sua ativação pela TFD (RODAL *et al.*, 1998; USUDA *et al.*2002, USUDA, *et al.*, 2003), fato este comprovado em nosso experimento.

Alguns estudos discutem a ação da fonte de luz sobre a atividade celular. Yu *et al.*, (1997) trabalhando com fotomodulação com diferentes lasers de baixa-intensidade em células hepáticas de ratos, bem como Karu (1999) e Carnevalli (2003) com cultura de fibroblastos (CHO-K1), observaram que a fonte de luz em baixa potência (2 a 4 J/cm²) pode acarretar em bioestimulação das células cultivadas. Verificaram, em ambos os trabalhos, aumento na síntese de ATP destas linhagens. Por outro lado, concluíram que a energia da fonte de luz, em doses elevadas, pode causar destruição celular. Estudos adicionais devem ser incentivados.

Embora tenha sido observada pequena discrepância entre os grupos LED e fármaco, isoladamente, nos testes de MTT, comparativamente ao grupo controle, acredita-se que a soma dos demais resultados atribuam baixa ou ausência de toxicidade celular a estas duas variáveis. Houve preservação da arquitetura celular e proliferação celular durante o cultivo pós-experimento.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com os tratamentos realizados com Terapia Fotodinâmica mediada pelo Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre culturas primárias derivadas de carcinoma mamário de cadela, nos permite concluir pela efetividade da mesma, por mecanismo de necrose celular, nas condições experimentais deste trabalho.

É possível o estabelecimento, manutenção e proliferação de cultura celular a partir de células de carcinomas mamários de cadelas.

O laser emissor de diodo e a Alumínio – Cloro - Ftalocianina em formulação lipossomal, ambos de forma isolada, não causam citotoxicidade no modelo experimental proposto.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, L.S. **Estudo dos processos de magnetohipertermia e terapia fotodinâmica mediados por magnetolipossomas fotossensibilizados em camundongos**. Tese de doutorado – Universidade de Brasília, 170p., 2008.
- BORGATTI-JEFFREYS, A.; HOOSER, S.B.; MILLER, M.A. Preclinical evaluation of zinc phthalocyanine tetrasulfonate-based PDT. **Proceedings of SPIE**. San Jose, Califórnia, 2005.
- CARNEVALLI, C. M. M.; SOARES, C. P.; ZANGARO, R. A.; PINHEIRO, A. L. B.; SILVA, N. S. Laser Light Prevents Apoptosis on CHO K-1 Cell Line. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery** . , v.21, p.193 - 196, 2003.
- CASTANO, A.P., MROZ, P., HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Cancer Reviews**, v.6, p. 535-545, 2006.
- CEBALLOS, P.I.; BARNHILL, R.L. Spontaneous regression of cutaneous tumors. In: **Schachner LA, Advances in Dermatology**. 8v. St. Louis: Mosby-Year Book, 229-61, 1993.
- DARVISH, D.; SAFRAI, M.; MAIK, Z.; WEISS, A. Morphological characterization of photodynamic therapy. **The 41st Annual Scientific Meeting of Israel Society of Microscopy**, 2006. Disponível <http://ism.technion.ac.il/Docs/2006/Darvish-Poster.pdf> - Acesso em dezembro de 2009.
- DOLMANS, D. E., FUKUMURA, D. & JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**. v.3, p. 380–387, 2003.
- FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA, G.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.; PACHECO M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria,

endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS4. **Lasers in Medical Science.** v.18, p. 207 – 212, 2004.

FEROLLA, A.C.J. **Estudo da pele humana fotoenvelhecida após tratamento com terapia fotodinâmica associada ao ácido-5-delta-aminolevulínico tópico: avaliação imunohistoquímica, do colágeno e do tecido elástico.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 294p. 2007.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals.** 4.ed. Ames: Iowa State, p.44-117, 2002.

GORMAN, N. T.; DOBSON, J. M. The skin and associated tissues. In: WHITE, R. A. S. **Manual of Small Animal Oncology.** Shurdington: British Small Animal Veterinary Association, p. 187-200, 1995.

HEWITT, C. J.; NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, v. 44, p.179-187. 2001.

JONES, T.H.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Sistema genital. In:_____. **Patologia Veterinária.** 6ed. São Paulo: Manole, p.1213-1222, 2000.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal Photochemistry. Photobiology.** v. 49, n.1, p. 1 – 17, 1999.

KITCHELL, B. E. Mammary tumors. **Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice.** Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 1098-1103, 1995.

LAVIE, G.; KAPLINSKY, C.; TOREN, A.; AIZMAN, I.; MERUELO, D.; MAZUR, Y.; MANDEL, M. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthrone and hypericin in leukaemic cells: possible

relevance to photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**. v. 79, n.3/4, p.423 – 432, 1999.

LEACH, M.W.; PEASTON, A.E. Adverse drug reactions attributable to aluminum phthalocyanine tetrasulphonate administration in domestic cats. **Veterinary Pathology**, v.31, n.2, p.283- 287, 1994.

LIU, L.; KUMAR, S. K.; SEDGHIZADEH, P. P.; JAYAKAR, A. N.; SHULER, C. F. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial and ethnic populations in California. **Journal Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, 2008.

LONGO, J.P.F.; LOZZI, S.P.; SIMIONI A.R.; MORAIS, P.C., TEDESCO, A.C. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v.94, n.2, p. 143 – 146, 2009.

LUCROY, M.D.; BOWLES M.H.; HIGBEE, R.G. Photodynamic therapy for prostatic carcinoma in dog. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 17, p 235., 2003.

MACHADO, A.E.H. Terapêutica fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MACHADO, A.H.A.; RODRIGUES K.D.C., MORAES K.C.M; SOARES C.P.; SILVA,.N.S. Terapia fotodinâmica com LED e diferentes fotossensibilizantes. **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, 2008.

MAGAUD, J.P.; SARGENT, I.; MASON, D.Y. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromo deoxyrridine uptake. **Immunology Methods**. v.106, p.95 – 100, 1998.

- MARTINES, N. S; MACHADO, A.H.A; SILVA, N.S.; TEDESCO, A.C; ZÂNGARO, R.A; PACHECO-SOARES, C. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. **ACM Arquivo Catarinense Médico**. v.36, n.1, 2007.
- MARTINS, B.P.; MACHADO, A.H.A.; COSTA, M.M.; NICOLAU, R.A.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.; SOARES, C.P. Análise do citoesqueleto de células Hep-2 após tfd com luz não coerente. - **VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**. Disponível www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/.../INICG00028_01C.pdf
- MERKEL, L.K.; BIEL, M.A.C. Photodynamic therapy. In: WITHROW, S.J.; MacEWAN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. Chap.8, p.86-91.
- MIJAN, M.C.; LONGO, J.P.F.; TAPAJÓS, E.C.C.; SIMIONI, A.R.; TEDESCO, A.C.; LEAL, S.C.; AZEVEDO, R.B. Morfologia de células KB e OSCC após aplicação de terapia fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina. **Brazilian Oral Research**. 2006.
- MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J. (Ed). **Tumors in domestic dogs**. Iowa: Iowa State Press, pp. 575-606, 2002.
- MORRISSON W.B.. Canine and feline mammary tumors. In: Morriison W.B. (Ed). **Cancer in dogs and cats – medical and surgical management**. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 591-598, 1998.
- MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Berkeley : University of California, p.672, 1990.
- OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Mammary neoplasm. In: _____. **Managing the Veterinary Cancer Patient: A Practice Manual**. Treton: Veterinary Learning Systems Company, p. 430-434, 1995.

- OGILVIE, G.K ; MOORE, A.S.; Skin tumors. In: OGILVIE,G.K.; MOORE, A.S. **Feline oncology – A Comprehensive Guide to Compassionate Care**. USA: Veterinary Learning Systems, v. 50, p.398-428. 2001.
- OLIVEIRA, D.M.; LACAVAL, Z.G.M.; LIMA, E.C.D.; MORAIS, P.C.; TEDESCO, A.C. Zinc phthalocyanine magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for câncer treatment. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v.6, p. 2432-2431, 2006.
- PASCHOAL, M.A.B. **Avaliação *in vitro* dos efeitos da terapia fotodinâmica sobre microrganismo cariogênicos presentes na saliva de crianças**. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, 142p, 2009.
- PAZOS, M.D.; NADER, H.B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1025-1035, 2007.
- PEASTON, A.E.; LEACH MW; HIGGINS RJ. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. **J Am Vet Med Assoc**, v.202, n.8, p.1261-1265, 1993.
- RENVOISÉ, C.; BIOLA, M.; BREARD, J. Apoptosis: Identification of dying cells. **Cell Biology and Toxicology**. v.14, p.111 – 120, 1998.
- ROBERTS, W.G.; KLEIN, M.K.; LOOMIS M. Photodynamic therapy of spontaneous cancers in felines, canines and snakes with chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine. **Journal Natural Cancer Institute**. v.83, n.18, 1991.
- RODAL G.H.; RODAL SK, MOAN J, BERG K. Liposome-bound Zn (II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization. **Journal Photochemistry Photobiology**. v. 45, n.2/3, p.150 – 159, 1998.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3ed. Philadelphia: Saunders, p.455-467. 2001.

SILVA, M.R. Carcinogênese no Câncer da Pele. **Revista Dermatologia Atual**. V.6, n.02, p. 13-17, 2000.

SILVA, T.L., REIS, A., HEWITT, C., ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo – funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, p. 32-40, 2001.

STELL, A.J.; DOBSON, J.M.; Photodynamic therapy of feline superficial squamous cell carcinoma using topical 5-aminolaevulinic acid. **Journal Small Animal Practice**. n.42, p. 164, 2001.

STROBER W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In: Coligan JE, **Current protocols in immunology**. New York: Wiley & Sons; 2003.

TAPAJÓS, E. C. C.; LONGO, J. P.; SIMIONI, A. R.; LACAVAL, Z. G. M.; SANTOS, M. F. M. A.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In vitro photodynamic therapy on human oral Keratinocytes cells using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncology**, v. 44, n. 11, p. 1073 – 1079, 2008.

USUDA. J.; CHIU, S.M.; AZIZUDDIN, K.; XUE, L.Y.; LAM, M.; NIEMINEN, A.L.; OLEINICK, N.L. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax. **Photochemistry and Photobiology**. v. 76, p. 217 – 223, 2002.

USUDA. J.; AZIZUDDIN, K.; CHIU, S.M.; 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.

- YU, W.; NAIM, J. O.; MCGOWAN, M.; KIPPOLITO, K.; LANZAFAME, R. J. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, n. 6, p. 866-871, 1997.
- WISING, C.; AZEM, J.; ZETTERBERG, M.; SVENSSON, L.A.; AHLMAN, K.; LAGERGARD, T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. **Toxicon**. v.45: p. 767-776, 2005
- ZUCCARI, D. A. P. C.; TERZIAN, A. C. B. ; PEREIRA, R. S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C. M.; SUEIRO, F. A. R.; ANDRADE, J. C. A.; CORDEIRO, J. A. Avaliação imunohistoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. **ARS Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 344-350, 2005.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perante a confiabilidade do experimento e dos resultados obtidos, instigam-se novos projetos experimentais com modelos *in vivo*, dada a elevada ocorrência do câncer de mama em cadelas e sua subsequente importância seja ela clínica para o médico veterinário, ou como modelo experimental para a mesma afecção em humanos, pois é crescente a busca por terapias antineoplásicas que proporcionem a cura ou melhores resultados e com reduzidos efeitos colaterais perante os tratamentos convencionais hoje já realizados contra o câncer.

ANEXOS

1.1. Materiais de Consumo

1.1.1. Soluções, Reagentes e Corantes

<u>Material</u>	<u>Fabricante/Origem</u>
Água Destilada	Filtro QUIMIS [®] , Brasil
Água Deionizada Milli-Q	Millipore Corporation [®] , EUA
Alaranjado de Acridina	VETEC [®] Química Fina, Brasil
Álcool hidratado 99,3°	Zulu Ltda [®] , Brasil
Azul Tripán 0,4%	Sigma - Aldrich [®] , EUA
Brometo de Etídio	VETEC [®] Química Fina, Brasil
Dimetilsulfóxido (DMSO) minimum 99,5% GC	Sigma - Aldrich [®] ; EUA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO [™] , EUA
Formol a 10%	Sigma – Adrich [®] , EUA
Kit Panótico Rápido	LB [®] Laborclin, Brasil
Penicilina/Estreptomicina 1% v/v (100µg/mL)	Sigma – Adrich [®] , EUA
Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI 10% de Iodo Ativo)	LM [®] Farma, Brasil
Soro Fetal Bovino (Foetal Bovine Serum)	GIBCO [®] , Brasil
Solução Fisiológica NaCl 0,9% 500mL	Equiplex [®] Brasil
Solução Tampão Fosfato Salina (PBS) pH = 7,2	LB [®] Laborclin Ltda., Brasil
Tripsina-EDTA (0,125% tripsina e 0.02% EDTA)	GIBCO [®] - Canadá

1.1.2. Instrumentos e Equipamentos.

<u>Material</u>	<u>Fabricante/Origem</u>
Agitador Magnético com Aquecimento	Nova Técnica [®] , Brasil
Autoclave Vertical AV Plus	Phoenix Germany - Alemanha
Balança de Precisão	Shimadzu AUW220D, Europa
Béquer graduado (50mL; 500mL) vidro	J.Prolab [®] , Brasil
Cabo de bisturi n° 03 e 04	Edlo [®] , Brasil
Câmara de fluxo laminar horizontal CFLH-12	VECO [®] , Brasil
Centrífuga	Centrobio [®] , Brasil

Digital Camera for Microscopy DCM35	Microstatone Infotech, EUA
Erlenmeyer graduado (1000mL) vidro	J.Prolab [®] , Brasil
Espectrofotômetro Digital	Microplate Reader, EUA
Bio-Rad Model 3550 – UV	
Estufa Incubadora CO ₂ para Cultivo TE – 399	Tecnal [®] , Brasil
Frasco alemão 500mL e 1000mL	BOECO [®] , Alemanha
Coletor universal de amostra biológica 50mL	J.Prolab. [®] , Brasil
Garrafas de Cultivo Poliestireno	BOECO [®] , Alemanha
25cm ² (60mL) e 75cm ² (270mL)	
Hematocitômetro (Câmara de Neubauer)	C.A.Hausser & Son, EUA
Lâminas de bisturi nº 10 e 20	MedBlade EUA
Lâminas para Microscópio de vidro	Exacta, Brasil
Lamínulas de vidro circulares 25mm diâmetro	VWR Scientific [®] , EUA
Lamínulas de vidro (24 mm x 24 mm)	VWR Scientific [®] , EUA
Membrana para filtro de 0,22µm	Millex GV – Millipore [®] EUA
Micropipetas de 1 - 20 µm; 50 - 200 µm; 200 a 1000 µm	Pipetman Gilson [®] , França
Microscópio Optico Axiophot	Zeiss Alemanha
Microscópio Optico MO BX 41	Olympus, EUA
Microscópio de fluorescência invertido Axiophot	Zeiss.26 - Alemanha
Microscópio invertido - TS1000	Nikon Eclipse - EUA
Microtubos para centrífuga do tipo <i>ependorfs</i>	Axygen EUA
graduados (2,0 e 1,5mL)	
Parafilm Pechiny Plastic Packaging	Menasha WI, EUA
PHmetro SC-09	QUIMIS [®] , Brasil
Pinça anatômica	Edlo [®] - Brasil
Placas de cultivo poliestireno 6, 24 e 96 poços tampa	TPP [®] , EUA
Placas de Petri de vidro 90X15 mm lisa	J.Prolab [®] , Brasil
Ponteiras descartáveis para micropipetas	Axygen EUA
Refrigerador e congelador Dynamic Coolin 36	Bosch EUA
Seringas plásticas 20 mL, 20G 1" 0,7x25	Plascalp [®] , Brasil
Sistema de Filtração de Soluções de vidro	BOECO [®] , Alemanha
Tubos Falcon 15 e 50 mL	TPP [®] , EUA