INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação pré-clínica da fotobiomodulação combinada à
radioterapia no tratamento de câncer de mama**

CAMILA RAMOS SILVA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2020**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação pré-clínica da fotobiomodulação combinada à
radioterapia no tratamento de câncer de mama**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

CAMILA RAMOS SILVA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2020**

Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Energia Nuclear

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

SILVA, C. R. . *Avaliação pré-clínica da fotobiomodulação combinada à radioterapia no tratamento de câncer de mama*. 2020. 140 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Camila Ramos
Avaliação pré-clínica da fotobiomodulação combinada à
radioterapia no tratamento de câncer de mama / Camila Ramos
Silva ; orientadora Martha Simões Ribeiro. -- São Paulo,
2020.
140 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e
Nucleares, São Paulo, 2020.

1. câncer de mama 4T1. 2. fototerapia. 3. análises
hematológicas. 4. aspectos clínicos. 5. sobrevida. I. Ribeiro,
Martha Simões, orient. II. Título.

*DEDICO AOS MEUS PAIS E A TODOS
AQUELES QUE FAZEM E ACREDITAM
NA CIÊNCIA.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro, por desde o início me orientar, acreditar em mim e me auxiliar na continua formação acadêmica. Martha, muito obrigada pelo conhecimento, amizade, momentos no escritório, networking durante esses anos e espero ansiosamente que eu possa ser uma colaboradora e também dizer aos meus alunos: “ Eu já sou doutora, você que está em busca do seu título”, “ Na minha época não era assim...”, “Por que ninguém me escuta, @*%& ??”. E tantas outras frases que não cabe nesse momento de agradecimento. Obrigada, MARTHA AAA, por todos os ensinamentos e acredito que um dia eu chegarei a ter modos, afinal: *Winter is here* !!!

Ao prof. Dr. Marcelo Larami Santoro, do laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantã pela disponibilidade em seu laboratório bem como as orientações e discussões. À Valdirene Maria Barbosa, pelo auxílio, disponibilidade na leitura dos hemogramas e as palavras motivadoras durante as sextas-feiras pela manhã.

Ao prof. Dr. Emerson Bernades e a Dra. Sofia Nascimento do Centro de Radiofarmácia, pelas discussões, sugestões, uso dos equipamentos e insumos.

Ao prof. Dr. Roger Chammas e a Mara de Souza Junqueira do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pela disponibilidade das células.

Ao senhor Marco Antônio Andrade do Centro de Lasers e Aplicações, pelo auxílio no desenvolvimento do dispositivo para blindagem.

À Msc Célia Napolitano do Centro de Tecnologia das Radiações pelo seu conhecimento e auxílio em toda a dosimetria no desenvolvimento do dispositivo para blindagem.

À engenheira Elizabeth Somessari do Centro de Tecnologia das Radiações por toda ajuda, disponibilidade e empenho durante as irradiações. Beth, palavras não são suficientes para agradecer toda a assistência. Que a sua motivação e compromisso sejam exemplo para os demais profissionais. Meu sincero, Obrigada!

Ao Biotério do IPEN pela concessão dos animais, auxílio e orientação no manuseio dos mesmos.

Aos professores, profissionais e colegas do Centro de Lasers e Aplicações, por todo conhecimento, apoio e incentivo, especialmente aos trabalhos desenvolvidos pelo OSA- SPIE STUDENT CHAPTER.

Aos meus colegas do Laboratório de Terapia Óptica: Carol, Saulo, Mayara, Maressa, Caetano, Fernanda, Ismael, Alessandra, Silvinha, China, Ilka, Renatinho e em especial, a senhorita Dra. Yoshimura, T.M, pelas discussões científicas e da vida.

Aos meus estimados pais, Petrucio e Teresinha, por me ensinarem os valores da vida e que com toda simplicidade me proporcionaram o melhor que podiam. Obrigada, meus velhos queridos!

Às minhas irmãs e amigas por escolha: Anny e conseqüentemente meu cunhado Bruno, Alice e Ana Clara. Adoro vocês e desejo o melhor sempre!

Aos meus tios Tonho, Rita e as nossas “estrelinhas” que fizeram muita história em nossas vidas.

Aos amigos da Física, Do Campesina, Da Escola e da Vida que não ousou citar nomes, pois tenho receio de esquecê-los.

E em especial a todos os colegas da ciência, pois nos últimos tempos estamos sendo massacrados e o continuo corte de verbas tem sucateado cada vez mais o nosso trabalho, nos obrigando a trabalhar somente com o amor. Em tempos de pandemia estão nos vendo e percebendo que uma nação sem ciência e educação nada se é.

Ao IPEN e a USP pela infraestrutura, à Comissão Nacional de Energia Nuclear, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia- Fotônica (CNPq: 465763/2014-6) pelo auxílio financeiro.

“SE VI MAIS LONGE FOI POR ESTAR
DE PÉ SOBRE OMBROS DE GIGANTE”.

SIR ISSAC NEWTON

RESUMO

SILVA, C.R. ***Avaliação pré-clínica da fotobiomodulação combinada à radioterapia no tratamento de câncer de mama***. 2020. 140 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A terapia por fotobiomodulação (PBM) tem sido estudada como radiomodificador em células tumorais, contudo, há poucos trabalhos *in vivo* que reportam a sua associação com a radioterapia (RT) no tratamento do câncer. Neste estudo, nosso objetivo foi verificar os efeitos da PBM em diferentes regimes associada à RT no tratamento de camundongos com câncer de mama. Camundongos BALB/c fêmeas receberam um inóculo com células de câncer de mama 4T1 e após 14 dias, quando o volume tumoral foi de aproximadamente 0,1 cm³, foram divididos em 8 grupos experimentais (n=5 animais/grupo) e os protocolos de tratamento foram iniciados. A dose de radiação ionizante entregue na RT local foi de 60 Gy divididas em 4 sessões consecutivas (15 Gy/sessão), utilizando uma fonte panorâmica de cobalto 60. Para a PBM, um laser de emissão vermelha (660 nm, 500 mW/cm²) com fluência de 150 J/cm² foi utilizado nos regimes: exposição única (24 h antes do início ou depois do término do protocolo radioterápico (PBM+RT e RT+PBM, respectivamente), concomitante (imediatamente antes ou depois de cada sessão de RT, PBM/RT e RT/PBM, respectivamente) e concomitante fracionado (RT/PBM_F) com a fluência de 37,5 J/cm² por sessão. O volume tumoral, análises hematológicas e aspectos clínicos foram monitorados durante 4 semanas. Os nossos resultados apresentaram redução significativa no volume tumoral em relação ao grupo controle (RT) a partir da semana 3 após o tratamento para os grupos com a PBM concomitante antes, depois e fracionada. De acordo com os nossos resultados, a PBM poderia ser usada como adjuvante no tratamento do câncer de mama.

Palavras-chaves: câncer de mama 4T1, fototerapia, análises hematológicas, aspectos clínicos e sobrevida.

ABSTRACT

SILVA, C.R. ***Preclinical evaluation of the photobiomodulation combined to radiotherapy in the treatment of breast cancer***. 2020. 140 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Photobiomodulation (PBM) has been studied to radiomodify the cellular response to ionizing radiation; however, there are few studies *in vivo* in the literature that report its association with radiotherapy (RT) in the treatment of cancer. Therefore, the objective of this study is to verify the effects of PBM in different regimes associated with RT in the treatment of mice with breast cancer. Female BALB / c mice received 4T1 breast cancer cells into mammary fat pad and following 14 days, when the tumor volume reached 0.1 cm³, the animals were divided into 8 experimental groups (n = 5 animals / group) and the protocols of treatment have started. The local RT was performed with dose of 60 Gy divided into 4 consecutive sessions (15 Gy / session), using a panoramic cobalt 60 source. For PBM, a red emission laser (660 nm, 500 mW /cm²) with fluency of 150 J / cm² was used in the two different regimens: single exposure (24 h before the start or after the last RT session), concomitant (immediately before or after each RT session) and fractionated concomitantly with the fluency of 37.5 J / cm² per session. The tumor volume, blood count cells and clinical aspects were monitored during 4 weeks. Our results showed a significant reduction in the tumor volume in relation to the control group (RT) from the week 3 after treatment for groups with concomitant PBM before (PBM/RT), after (RT/PBM) and fractionated (RT/PBM_F). Taken together our results indicate that PBM could be used as an adjunct in the treatment of breast cancer.

Keywords: breast cancer 4T1, phototherapy, hematological analysis, clinical examination and survival.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2- OBJETIVOS	23
2.1. Geral	23
2.2. Específicos	23
3. REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1. Câncer	24
3.1.2.Estatísticas	27
3.1.3.Câncer de mama	28
3.1.4.Câncer de mama murino 4T1	30
3.1.5.Câncer de mama e perfil hematológico	30
3.2. Radioterapia	33
3.2.1. Radioterapia no câncer de mama	34
3.2.2.Radioterapia em modelos de câncer de mama murino	35
3.3. Fotobiomodulação	37
3.3.1. PBM associada à RT	39
APRESENTAÇÃO DA TESE	42
CAPÍTULO I- ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	43
1- MATERIAIS E MÉTODOS	43
1.1. Modelo tumoral	43
1.1.2. Células de câncer de mama 4T1	43
1.1.3. Indução e evolução tumoral	43
1.2. Desenvolvimento de um dispositivo para blindagem e radioterapia	44
1.2.2. Dosimetria	44
1.2.3. Irradiação	45
1.2.4. Radioterapia- piloto	46
1.3. Fotobiomodulação no modelo tumoral	47
1.4. Análise estatística	47

2- RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
2.1. Volume Tumoral	48
2.1.2. Massa	50
1.2. Dispositivo para blindagem e radioterapia	52
1.2.1. Dimensões	52
1.2.2. Dosimetria	52
2.2.3. Radioterapia- piloto	53
2.3. Fotobiomodulação no modelo tumoral	55
2.3.1. Volume tumoral	55
1.3.2. Sobrevida	56
CAPÍTULO II- FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA À RADIOTERAPIA	58
1. MATERIAIS E MÉTODOS	58
1.1. Animais e tumor de mama	58
1.2. Radioterapia	58
1.3. Fotobiomodulação	59
1.4. Análises Hematológicas	60
1.4.2. Contagem diferencial- Esfregaço sanguíneo	61
1.5. Acompanhamento clínico	61
1.6. Eutanásia e Necropsia	62
1.7. Análise Estatística	63
2- RESULTADOS	64
2.1. Volume Tumoral	64
2.1.2- Área sob a curva	66
2.2. Massa	68
2.2.2. Massa Relativa	70
2.3. Análises Hematológicas	72
2.3.1. Eritrócitos	72

2.3.2. Hemoglobina	76
2.3.3. Hematócrito	79
2.3.4 Plaquetas (PLQ).....	82
2.3.5. Volume e Tamanho Plaquetários	84
2.3.6. Leucócitos	86
2.3.7. Contagem diferencial	89
2.3.8. Relação Neutrófilo/Linfócito (NLR)	95
2.4. Aspectos Clínicos.....	97
2.4.2 Sobrevida	101
2.5. Necropsia e Metástases.....	103
2.5.2. Contagem Macroscópica de Metástases	106
2.5.3. Pulmões	107
1- DISCUSSÃO.....	112
2- CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS	138
Comitê de Ética.....	138
Curva de crescimento das linhagens 4T1 e 4T1-LUC.....	139

Lista de Figuras

Figura 1- Características do câncer- "Hallmarks of cancer ".....	26
Figura 2- Mecanismo celular após a PBM. O esquema apresenta a absorção da luz no comprimento de onda vermelho ou infravermelho próximo pelos cromóforos ou fotorreceptores localizados na mitocôndria. Durante o processo, a produção de ATP aumenta e espécies reativas de oxigênio são geradas para desencadear o efeito biológico.....	38
Figura 3- Espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico. A região em destaque refere-se ao intervalo com os valores utilizados nas aplicações biológicas à qual seria a região do vermelho e infravermelho. Nota-se que quanto menor o coeficiente de absorção maior a profundidade de transmissão.....	38
Figura 4- Profundidade de penetração dos fótons na pele de acordo com o comprimento de onda.	39
Figura 5- Dosímetros termoluminescentes ao longo do tubo cônico. A região em vermelho (dosímetro 1) refere-se à localização da mama do animal. A distância entre os dosímetros 1 e 10 (posterior a mama) é aproximadamente 3 cm. Os dosímetros 13 e 14 representam a região da cabeça do animal e o dosímetro 15 a região da cauda do animal. A distância entre os dosímetros é aproximadamente 1 mm.	45
Figura 6-Dispositivo posicionado no irradiador e a representação da região da mama do animal. Um bloco de chumbo foi posicionado para fixar o dispositivo na distância exata. A distância entre a região da mama e a fonte equivale à 10 cm.	46
Figura 7- Volume Tumoral (n=5 animais) durante o período pós-inoculação do concentrado de células. Foram identificadas diferenças estatisticamente significantes a partir do período de 21 após a inoculação em relação ao período inicial de 7 dias.....	48
Figura 8- Massa corpórea dos animais (n=5) dos grupos:Tumor e Controle antes da inoculação celular dia 0 e no período pós- inoculação do concentrado de células.	51
Figura 9- Dispositivo para blindagem a base de chumbo para radioterapia de mama em camundongos BALB/c. A espessura do dispositivo corresponde a 7 cm.....	52
Figura 10- Volume tumoral normalizado em relação ao dia 0 (início do protocolo radioterápico) para os grupos Tumor, RT ₁₀ , RT ₁₅ e RT ₈ (n= 3 animais) durante as	

sessões de radioterapia e após o encerramento do protocolo. O sinal * significa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Tumor.....	54
Figura 11- Volume tumoral durante 28 dias após a PBM para os grupos com energias de 1,2 J e 6,0 J (n= 3 animais). Letras diferentes representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Tumor em cada período experimental.....	55
Figura 12- Porcentagem de sobrevida dos animais após a PBM (n= 3). As curvas entre os grupos possuem diferença estatisticamente significativa com $p= 0,003$..	57
Figura 13- Fotobiomodulação nos animais usando a ponteira laser em contato direto com o tumor na inclinação de 90° em relação ao centro da superfície do tumor.....	60
Figura 14- Volume Tumoral dos grupos com PBM pré- RT (n=5 animais/grupo). O período destacado refere-se ao período de RT. Os pontos anterior e posterior ao destaque representam um dia antes e depois do tratamento (indicados pela seta), respectivamente. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúscula. O traço a cada dois pontos consecutivos indica o período experimental, por exemplo :semana 2. O intervalo no volume tumoral está entre 1 a 2 cm ³	64
Figura 15- Volume Tumoral dos grupos com PBM pós- RT (n=5 animais/grupo). O período destacado refere-se ao período de RT. Os pontos anterior e posterior ao destaque representam um dia antes e depois do tratamento (indicados pela seta), respectivamente. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúscula. O traço a cada dois pontos consecutivos indica o período experimental, por exemplo: semana 2. O intervalo no volume tumoral está entre 1 a 2 cm ³	65
Figura 16- Valores da área sob a curva dos grupos experimentais com PBM antes da RT a partir do segundo momento da semana 3. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúsculo.	66
Figura 17- Valores da área sob a curva dos grupos experimentais com PBM após a RT a partir do segundo momento da semana 3. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúsculo.	67

Figura 18- Massa corpórea antes do tratamento, 1 dia após o término do processo radioterápico e durante o acompanhamento experimental para todos os grupos experiemtais com PBM antes da RT e controle negativo. O intervalo na escala do eixo y está entre 7 a 21 g.	68
Figura 19- Massa corpórea antes do tratamento, 1 dia após o término do processo radioterápico e durante o acompanhamento experimental para todos os grupos experiemtais com PBM pós-RT e controle negativo. O intervalo na escala do eixo y está entre 7 a 21 g.	69
Figura 20- Massa relativa para todos os grupos experimentais com PBM antes da RT antes do início do protocolo (0,1 cm ³) e no término do período experimental para os grupos com PBM antes da RT.	70
Figura 21- Massa relativa para todos os grupos experimentais com PBM após a RT antes do início do protocolo (0,1 cm ³) e no término do período experimental.....	71
Figura 22- Contagem total eritrócitos para os grupos com PBM pré-RT antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM antes da RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	72
Figura 23- Contagem total de eritrócitos para os grupos com a PBM pós-RT antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	73
Figura 24- Quantificação do Volume Corpuscular Médio (A) e Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com a PBM pré- RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.....	74
Figura 25- Quantificação do Volume Corpuscular Médio (A) e Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	75
Figura 26- Quantificação de Hemoglobina antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os	

grupos com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	76
Figura 27- Quantificação de Hemoglobina antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	77
Figura 28- Quantidades de Hemoglobina Corpuscular Média (A) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	78
Figura 29- Quantidades de Hemoglobina Corpuscular Média (A) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	79
Figura 30 Porcentagem de hematócrito antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	80
Figura 31-Porcentagem de hematócrito antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós- RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	81
Figura 32- Expressão dos níveis de plaquetas antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	82
Figura 33- Expressão dos níveis de plaquetas antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	83
Figura 34- Quantificação de VPM (A) e PDW (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento	

experimental para os grupos com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	84
Figura 35- Quantificação de VPM (A) e PDW (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós- RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.	85
Figura 36- Contagem de leucócitos antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pré-RT e controle negativo. A pausa na escala na quantidade de leucócitos está entre o intervalo de 25 a 100 leucócitos ($\times 10^9/L$).....	86
Figura 37- Contagem de leucócitos antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós-RT e controle negativo. A pausa na escala na quantidade de leucócitos está entre o intervalo de 25 a 100 leucócitos ($\times 10^9/L$).....	88
Figura 38- Contagem absoluta (n= 3 lâminas/grupo) de linfócitos (A), monócitos (B), células precursoras de neutrófilos (C) e neutrófilos (D), antes do início do protocolo experimental (semana 0), 7 dias após o término do protocolo (semana 2) e no último período experimental analisado (semana 4) para os grupos com PBM pré-RT e controle negativo.....	89
Figura 39- Fotomiografia das lâminas provenientes do esfregaço sanguíneo dos grupos: Sadio e Tumor antes do início do protocolo experimental (semana 0). A seta aponta para um agregado plaquetário.	90
Figura 40- Fotomiografias de esfregaço do sangue para todos os grupos experimentais com PBM pré-RT na semana 2. A seta indica plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas.	91
Figura 41-Fotomiografias de esfregaço do sangue para todos os grupos experimentais com PBM pré-RT na semana 4. A seta indica plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas,	92
Figura 42- Contagem absoluta (n= 3 lâminas/grupo) de linfócitos (A), monócitos (B), células precursoras de neutrófilos (C) e neutrófilos (D), antes do início do protocolo experimental (semana 0), 7 dias após o término do protocolo (semana 2) e no último período experimental analisado (semana 4) para os grupos com PBM pós-RT e controle negativo.....	93

Figura 43- Fotomiografia de esfregaço de sangue para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT na semana 2. A seta aponta para um agregado de plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas.....	94
Figura 44- Fotomiografia de esfregaço de sangue para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT na semana 4. A seta indica plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas.	95
Figura 45- Relação Neutrófilo/ Linfócito (NLR) para os grupos experimentais com PBM pré-RT e controle negativo (n=3/grupo) nas semanas 2 e 4. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo maiúsculo.	96
Figura 46- Relação Neutrófilo/ Linfócito (NLR) para os grupos experimentais com PBM pós-RT e controle negativo (n=3/grupo) nas semanas 2 e 4. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo maiúsculo.	97
Figura 47- Ilustração de alguns sinais clínicos apresentados pelos animais durante o período experimental analisado. Em (A) piloereção, (B) curvatura e em (C) hipocinesia.	98
Figura 48- Pontuação obtida pelos grupos com PBM antes da RT nas 4 semanas experimentais após a exposição à RT e PBM. A somatória seria com n=5 animais por grupo.....	99
Figura 49- Pontuação obtida pelos grupos experimentais com PBM após a RT nas 4 semanas experimentais após a exposição à RT e PBM. A somatória seria com n=5 animais por grupo.	100
Figura 50- Curva de sobrevida para todos os grupos experimentais com PBM antes da RT durante todo o período experimental a partir do primeiro dia do início do protocolo radioterápico para o n=5 animais/grupo.	102
Figura 51- Curva de sobrevida para todos os grupos experimentais com PBM após a RT durante todo o período experimental a partir do primeiro dia do início do protocolo radioterápico para o n=5 animais/grupo	103
Figura 52- Imagens do tumor, pulmão (centro) e baço (direita) para os animais dos grupos experimentais com PBM antes da RT na semana 5 e para o grupo Tumor também quando o volume tumoral atingiu 0,1 cm ³ . A seta indica a localização de nódulos.	104

Figura 53- Imagens do tumor, pulmão (centro) e baço (direita) para os animais dos grupos experimentais com PBM após a RT na semana 5 e para o grupo Tumor também quando o volume tumoral atingiu 0,1 cm ³ . A seta indica a localização de nódulos.	105
Figura 54- Contagem macroscópica da quantidade de nódulos presentes no pulmão dos animais de acordo com o grupo experimental no regime PBM pré-RT.	106
Figura 55-- Contagem macroscópica da quantidade de nódulos presentes no pulmão dos animais de acordo com o grupo experimental no regime PBM pós-RT.	107
Figura 56- Massa dos pulmões para todos os grupos experimentais com PBM pré-RT na semana 5 e aproximadamente 14 dias após a inoculação quando o tumor atingiu o volume de 0,1 cm ³ para os grupos Tumor e Sadio.	108
Figura 57- Massa dos pulmões para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT na semana 5 e aproximadamente 14 dias após a inoculação quando o tumor atingiu o volume de 0,1 cm ³ para os grupos Tumor e Sadio.	109

Lista de Tabelas

Tabela 1- Estadiamento Tumor, Linfonodos e Metástases (TNM) de acordo com a AJCC.....	30
Tabela 2- Grupos e parâmetros de irradiação na PBM.....	47
Tabela 3- Valores de dose absorvida pelos dosímetros termoluminescentes.....	53
Tabela 4- Descrição dos regimes de exposição conforme o grupo experimental (antes ou após a RT) e os parâmetros da luz utilizados na PBM.....	59
Tabela 5- Total de animais utilizados durante todo o período experimental para compor a análise dos resultados com n= 5 animais/grupo.	60
Tabela 6- Sinais Clínicos observados e suas respectivas pontuações.	62
Tabela 10- Comportamento dos dados experimentais do grupo RT em relação ao grupo Tumor. Os sinais: ↑, ↓ e =, significam maior, menor e igual, respectivamente em relação ao grupo Tumor.	110
Tabela 11- Comportamento dos dados experimentais expostos à PBM em relação ao grupo RT. Os sinais: ↑, ↓ e =, significam maior, menor e igual, respectivamente em relação ao grupo RT.	111

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2018, aproximadamente 2 milhões de casos surgiram e 626 mil mortes foram confirmadas¹. No Brasil, de acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, no triênio 2020-2022 são esperados 66 mil novos casos, sendo considerado a primeira causa de óbito por câncer entre as mulheres². A incidência é relativamente baixa em mulheres abaixo de 35 anos de idade e cresce progressivamente com a idade, principalmente após os 50 anos. Não existe uma causa única para o surgimento do câncer de mama, diversos fatores estão relacionados, tais como, a idade, fatores endócrinos, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos^{1,2}.

Atualmente, os subtipos moleculares do câncer de mama são classificados em: Luminal A, Luminal B, HER-2 (do inglês: *Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2*) e Triplo Negativo (do inglês: *Triple Negative Breast Cancer*). A identificação do subtipo molecular é de grande importância para o planejamento terapêutico, uma vez que a expressão de determinado hormônio e/ou proteína indica a sensibilidade ou resistência do tumor à terapia³.

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) representa aproximadamente 20 % dos subtipos moleculares do câncer de mama. A sua incidência é mais comum em mulheres jovens, negras e hispânicas e pode estar associado à mutação do gene BCRA. O seu alto poder de divisão e proliferação celular resulta em um câncer extremamente agressivo, altamente metastático, com baixa sobrevida, e resistente aos tratamentos convencionais, uma vez que não é receptor de estrógeno, progesterona e HER-2^{4; 5; 6}.

Os tratamentos disponíveis atualmente para o câncer de mama são a cirurgia, quimioterapia, radioterapia (RT) e hormonioterapia. A conduta terapêutica é baseada na etiologia do câncer e combinadas de acordo com o estadiamento do tumor; raramente a paciente é submetida à apenas uma modalidade de tratamento^{7; 8}.

A RT é amplamente empregada no tratamento do câncer de mama, contudo, ela é invasiva, gera diversos efeitos colaterais e em muitos casos, acaba

se tornando paliativa, pois a resistência das células ao tratamento e a alta taxa de recorrência dos tumores expõem as pacientes a um longo período de tratamento com altas doses de radiação ionizante (RI). As altas doses de RI podem agravar os efeitos colaterais, interferindo muitas vezes na continuidade do tratamento, aumentando a incidência de óbitos e influenciando diretamente na qualidade de vida física e social da paciente^{9; 10}.

A terapia por fotobiomodulação (PBM) tem ganhado grande destaque mundial devido aos seus efeitos terapêuticos em uma variedade de condições. O tratamento consiste em utilizar uma fonte de luz com comprimento de onda e parâmetros adequados para ocorrer a maior penetração possível dos fótons em via transcutânea^{11; 12}. Nas áreas das ciências da saúde, o comprimento de onda na região do vermelho e infravermelho têm sido frequentemente utilizados^{13; 14; 15}.

O uso da PBM em células de origem tumoral ainda é controverso, pois não há elucidação dos seus efeitos até o presente momento^{16; 17}. No entanto, recentemente nosso grupo desenvolveu um estudo para verificar a influência da PBM, em diferentes fluências, em camundongos portadores de câncer de mama. Independente da fluência utilizada, camundongos irradiados apresentaram maior sobrevida que o grupo controle sem tratamento¹⁸.

Embora os mecanismos da PBM não estejam completamente elucidados, diversos estudos mostram que a PBM poderia ser utilizada para mitigação dos efeitos colaterais do tratamento do câncer.^{19; 20; 21; 22; 23; 24; 25}. No Brasil, recentemente a Secretaria de Atenção à Saúde aprovou o uso da PBM como tratamento suporte para a mucosite oral em pacientes oncológicos expostos à RT de cabeça e pescoço (Portaria nº516, 17/06/2015, Diário Oficial da União).

A literatura também reporta a PBM como um radiomodificador. Alguns estudos utilizam a PBM antes ou após a exposição à RI com o objetivo de sensibilização e/ou proteção celular^{22; 26}. Entretanto, há escassez de trabalhos pré-clínicos que reportem a PBM associada à RT no tratamento do câncer. Assim, o objetivo deste estudo consiste em verificar o efeito radiomodificador da PBM em diferentes regimes associada à RT no tratamento do câncer de mama triplo negativo em modelo animal.

2- OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o efeito radiomodificador da fotobiomodulação ($\lambda = 660 \text{ nm}$) em diferentes regimes associada à radioterapia no tratamento do câncer de mama triplo negativo em modelo animal.

2.2. Específicos

- Desenvolver um modelo de tumor de mama em camundongos;
- Desenvolver um dispositivo para blindagem da extensão corporal dos animais durante a radioterapia;
- Desenvolver um protocolo de radioterapia para câncer de mama utilizando uma fonte de cobalto 60;
- Estabelecer o valor da energia entregue durante as sessões de fotobiomodulação;
- Avaliar o efeito radiomodificador da PBM associada à RT em diferentes regimes no volume tumoral, hemograma, aspectos clínicos e no desenvolvimento de metástases;
- Comparar os diferentes regimes da PBM associada à RT.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Câncer

A palavra câncer, de origem latina *cancer*, possui o significado de “caranguejo”. Possivelmente ela foi empregada em analogia ao seu modo de crescimento invasivo, que pode ser comparado às pernas do crustáceo que, ao se fixarem, torna dificultosa a remoção²⁷.

Câncer é um termo genérico utilizado para descrever um conjunto de mais de 200 doenças que possuem em comum o crescimento celular descontrolado com potencial invasivo e sua origem se dá por condições multifatoriais, tais como, ambientais, hormonais e hereditárias²⁸. Embora a incidência de novos casos tenha aumentado mundialmente nos últimos anos, a doença tenha sido descrita por egípcios, persas e indianos trinta séculos antes de Cristo (a.C)²⁹.

Os estudos da escola grega, datados do século IV a.C., caracterizaram o câncer como um tumor duro, que, muitas vezes, reaparecia depois de extirpado, ou que se alastrava para diversas partes do corpo levando ao óbito. A origem do câncer, para os praticantes de medicina no pós-Cristo era definido como um desequilíbrio dos fluidos que compunham o organismo. De fato, Cláudio Galeno (130-200), acreditava que o câncer poderia ser tratado com purgativos para diminuir esse desequilíbrio e impedir a propagação da doença^{29; 30}.

Somente no século XVIII, o câncer passou a ser visto como uma doença de caráter local. Para essa mudança, mostrou-se fundamental o desenvolvimento da anatomia patológica e dos conhecimentos sobre células. Nesse contexto, o anatomista italiano Giovanni Battista Morgagni (1682- 1771) e o médico francês Marie François Xavier Bichat (1771-1802) foram de grande importância^{31; 32}.

Morgagni enfatizou a localização corpórea das doenças, que passavam a se caracterizar como uma entidade específica localizada em determinado órgão do corpo³¹. Já Bichat elaborou um tratado revolucionário, mostrando que os órgãos são formados por diferentes tecidos, tornando-se assim facilitada a compreensão de que o câncer pode surgir em diversas localizações tissulares³³.

Ainda no século XVIII, René Théophile Laennec (1781-1826), um patologista francês, contribuiu grandemente no diagnóstico do câncer, pois ele foi o primeiro a diferenciar tuberculose pulmonar de câncer de pulmão, como também a mencionar o termo câncer coloide³⁴. A formulação conceitual e a atribuição ao

termo metástase foi introduzida inicialmente em 1829 por Joseph Recamier (1744-1852), observando o surgimento de um tumor no cérebro de uma paciente inicialmente com câncer de mama. Recamier ainda cogitou que o câncer poderia ser algo hereditário que seria herdado de família para família perpetuando gerações³⁵.

No século XIX, o desenvolvimento da teoria celular, a partir dos trabalhos de Virchow (1821-1902), finalmente possibilitou a vinculação do câncer às células no seu processo de divisão^{36; 37}. Em meados do século XIX, o anatomista Waldeyer-Hartz (1836-1921) mostrou que as células cancerígenas se desenvolvem a partir de células não tumorais, e que o processo de metástase, proposto inicialmente por Recamier, era resultado do transporte das células cancerígenas pela corrente sanguínea ou linfática. Waldeyer-Hartz também enfatizou que as células invasivas podem induzir uma extensa proliferação de tecido conjuntivo gerando o estroma celular que aparenta um aspecto firme e cicatricial. No entanto, os tecidos do cérebro e medular produzem seu próprio estroma, portanto não se enquadram na definição citada por Waldeyer-Hartz. Essa argumentação respondeu a questionamentos de aproximadamente 2000 anos de enigma no estudo do câncer^{38; 39}.

Atualmente, sabe-se que a célula cancerígena é definida por ela e sua descendência reproduzirem-se desordenadamente, invadindo e colonizando regiões normalmente destinadas a outras células, desobedecendo aos limites normais da divisão celular, tornando assim o câncer particularmente perigoso⁴⁰.

Os cânceres geralmente se desenvolvem por um processo no qual uma população inicial de células levemente anormais, descendente de uma célula ancestral com uma única mutação, evolui em sucessivos ciclos de mutação e de seleção natural. Em cada estágio, a célula adquire mais uma mutação gerando assim possivelmente um tumor, no processo de evolução clonal de células mutantes⁴¹.

O processo de tumorigênese é composto por múltiplas etapas, as quais podem ocorrer tanto na transformação de proto-oncogenes (responsáveis por controlar os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular) em oncogenes, que são responsáveis pela malignidade das células, como também em mutações que levam à perda da função e/ou inativação dos genes supressores

tumorais relacionados com o controle do crescimento celular desregulado e ativação de vias de reparo do DNA⁴².

A literatura tem descrito características fundamentais (*Hallmarks of cancer*) para permitir a sobrevivência, proliferação e disseminação das células tumorais no processo de tumorigênese, como o desenvolvimento de instabilidade genômica nas células tumorais, que inclui mutações aleatórias, rearranjo cromossômico e as raras alterações genéticas. Outra característica a ser destacada seria o estado inflamatório em lesões pré-malignas que permite a célula crescer em um ambiente hostil com inflamação. Essas características fundamentais são manifestadas via diferentes mecanismos e em variados tempos durante o processo de tumorigênese diferentemente para cada tipo de tumor^{43; 44}.

Atualmente, um corpo sólido de pesquisas tem acrescentado mais duas características no desenvolvimento do câncer. Essas características emergentes são a habilidade de escapar do sistema de vigilância imunológica e a reprogramação do metabolismo celular⁴⁵ (Figura 1).

Figura 1- Características do câncer- "*Hallmarks of cancer*".

Fonte: Adaptado de Negrini et.al⁴³.

A instabilidade genômica foi inicialmente separada das características do câncer por não representar uma capacidade biológica funcional da célula tumoral, mas sim por direcionar o surgimento destas. Contudo, atualmente foi incluída novamente como uma característica determinística do câncer, pois a mesma está presente em todos os estágios da doença, desde as lesões pré-tumorais até nos casos em estágio avançado. Nos casos de cânceres hereditários, a instabilidade genômica é provavelmente o evento inicial que estabelece as outras características do tumor. Nos casos de cânceres esporádicos e não hereditários, a desregulação dos genes envolvidos nas vias de crescimento celular podem ser o evento inicial, gerando danos ao DNA que conduzem a instabilidade genômica e a evasão dos mecanismos de morte celular^{45; 46}.

3.1.2. Estatísticas

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial. De acordo com a Estatística Global do Câncer (*Global Cancer Statistics- Globocan*) ocorreram aproximadamente 18 milhões de novos casos de câncer em 20 regiões do mundo e aproximadamente 9 milhões de mortes ocasionadas por essa doença¹. Segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization-WHO*), são esperados 21 milhões de novos casos em 2030 e em 2015, o câncer foi a primeira ou a segunda causa de morte antes dos 70 anos em 91 e a terceira ou quarta causa em 22 países.⁴⁷

O câncer com maior incidência mundial é o câncer de pulmão (aproximadamente 2 milhões de casos anuais) ⁴⁷. Entretanto, ao separar os gêneros, o câncer de próstata apresenta uma incidência de aproximadamente 1 milhão de novos casos com 6,7 % de mortalidade para os homens. Já para as mulheres, há uma incidência de aproximadamente 2 milhões de casos anuais para o câncer de mama com 15 % de óbitos^{1, 47}.

As explicações para as elevadas taxas de incidências ainda não são claras, contudo, há uma hipótese de associação entre o índice de desenvolvimento humano e a porcentagem de incidências e mortalidades. Desse modo, as estatísticas relatam que 48 % dos casos de câncer estão na Ásia, 23 % na Europa, 21 % nas Américas, 5,8 % na África e apenas 1,4 % na Oceania^{1, 47}.

No Brasil, segundo as estatísticas para o triênio 2020-2022 do Instituto Nacional do Câncer – José de Alencar Gomes da Silva (INCA), 625 mil novos casos

são previstos por ano, sendo os cânceres de próstata e mama feminina os mais incidentes, ambos com previsão de 66 mil casos².

A região do Brasil com maior incidência de casos de câncer de próstata e mama é a Sudeste, representando aproximadamente 5 % dos totais de casos de câncer previstos no triênio. A região com menor porcentagem seria a Norte com 0,45 % e 0,38 % para os cânceres de próstata e mama, respectivamente. Considerando que as regiões supracitadas são as regiões do país com maior e menor concentração de habitantes e desenvolvimento econômico, a proporção remete a uma correlação entre tais fatores².

3.1.3. Câncer de mama

O câncer de mama é considerado o câncer de maior incidência para o sexo feminino mundialmente, 2 milhões de casos surgiram e 626 mil mortes foram confirmadas, sendo a quinta maior causa de morte por doença e a primeira por câncer entre as mulheres¹. No Brasil, é considerado a primeira causa de óbitos por câncer entre as mulheres. A incidência é relativamente baixa em mulheres abaixo de 35 anos de idade e cresce progressivamente com a idade, principalmente após os 50 anos. Não existe uma causa única para o surgimento do câncer de mama, diversos fatores estão relacionados, tais como, a idade, fatores endócrinos, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos^{1; 2}.

Aproximadamente entre 5 % a 10 % dos casos de câncer de mama são hereditários e dentre esses, 25 % possuem associação com a mutação de genes específicos. Os genes mais estudados e disseminados na literatura são: *BRCA1* e *BRCA2*⁴⁸. Mulheres com mutação em algum desses genes apresentam risco de desenvolvimento de câncer de mama entre 45 % a 75 %. A intensidade da doença associada a mutação de tal gene pode ser maior, pois a literatura descreve que tal associação pode apresentar uma doença mais severa com alto grau de invasividade e um subtipo molecular diferente^{49; 50}.

Atualmente, os subtipos moleculares do câncer de mama são classificados de acordo com a expressão de determinado hormônio e/ou proteína e podemos classifica-los em: Luminal A, Luminal B, HER-2 e Triplo Negativo. A identificação do subtipo molecular do câncer de mama é de extrema importância para o delineamento do tratamento a ser adotado^{50; 51}.

Os tipos Luminal A e B são receptores de estrógeno e progesterona e são os mais incidentes na população. O que os difere é o tempo de progressão da doença, pois o tipo A geralmente evolui mais lentamente em comparação ao Luminal B. Ambos apresentam bons resultados à hormonioterapia associada com outra modalidade terapêutica⁵⁰.

O câncer HER-2 possui expressão positiva de tal proteína na membrana celular, apresenta crescimento acelerado e não apresenta bons resultados ao tratamento com quimioterapia isoladamente, necessitando da associação de medicamentos que inibem a sua expressão.⁵¹

O câncer de mama triplo negativo não expressa os hormônios estrógeno e progesterona, como também a proteína HER- 2. A sua incidência é mais comum em mulheres jovens, negras e hispânicas, pode ser associado à mutação do gene BRCA1 e representa aproximadamente 20 % dos subtipos moleculares do câncer de mama. O seu alto poder de divisão e proliferação celular resulta em um câncer extremamente agressivo, altamente metastático com baixa sobrevida e excepcionalmente resistente aos tratamentos convencionais.^{4; 5}

Com o intuito de padronizar os achados referente ao câncer, em 1977 a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicou critérios a serem adotados para o estadiamento TNM do câncer de mama. A sigla TNM, do inglês refere-se à T (tumor), N (linfonodo) e M (metástases). A classificação dos itens consiste em enquadrar o tumor primário em algum grau histológico de invasão celular e estágio da evolução da doença em relação ao tamanho do tumor, invasão de linfonodos e metástases⁵².

Em 2018, a AJCC reformulou os critérios de estadiamento TNM, considerando os receptores de hormônio estrógeno (RE), progesterona (RP) e proteína HER2. Desse modo, o tumor primário pode ser classificado entre os estágios I a IV (tabela 1t)⁵³. .

Tabela 1- Estadiamento Tumor, Linfonodos e Metástases (TNM) de acordo com a AJCC.

Estágio	HER2	RE	RP	T	N	M
I	Positivo	Positivo	Positivo	Até 2 cm de diâmetro	Ausências nos linfonodos ou no máximo linfonodo sentinela	Ausente
II	Positivo	Negativo	Negativo	Até 3 cm de diâmetro	Até 3 linfonodos axilares e/ou mamários internos	Ausente
II	Negativo	Negativo	Negativo			
III	Negativo	Negativo	Negativo	Até 4 cm de diâmetro	3 ou mais linfonodos axilares e/ou mamários internos	Ausente
III	Positivo	Positivo	Negativo			
III	Positivo	Negativo	Negativo			
IV	Negativo	Negativo	Negativo	Qualquer tamanho e invadir o tórax ou a pele	Linfonodos claviculares com área maior que 2 mm	Presente

Fonte: Adaptado de Hortobagyi e colaboradores⁵³.

3.1.4. Câncer de mama murino 4T1

A linhagem celular de câncer de mama murino 4T1 (ATCC® CRL-2539), possui características tumorigênicas semelhantes a um câncer de mama humano triplo negativo, estágio IV^{54; 55}. Essa linhagem foi isolada inicialmente por Fred Miller e colaboradores através do crescimento espontâneo de um tumor na glândula mamaria de um camundongo BALB/c e possui como sítios de metástases os linfonodos, fígado, baço, rins, cérebro, ossos e principalmente os pulmões^{56; 57}.

A literatura é rica no uso da linhagem celular 4T1 em ensaios *in vitro* quanto em modelo animal devido ao fácil manuseio e as características semelhantes ao câncer de mama humano triplo negativo^{58; 59}. Alguns achados na literatura discorrem sobre o seu comportamento bifásico e resistência à tioguanina^{60; 61}.

3.1.5. Câncer de mama e perfil hematológico

O estadiamento do câncer pode apresentar alterações diretas nos valores hematológicos do paciente. Os valores da série branca e os seus

constituintes podem ser relacionados ao desenvolvimento do tumor bem como a resposta imune do paciente frente ao combate da doença. Dependendo da etilologia do câncer, o nível plaquetário pode sinalizar metástases e progressão tumoral. E a série vermelha juntamente com os demais parâmetros traduz o aspecto clínico geral do paciente bem como a evolução e progressão da doença frente ao tratamento^{62; 63; 64}.

Em relação ao câncer de mama, alguns estudos retrospectivos descrevem o perfil hematológico das portadoras de câncer de mama. De fato, Akinsegum e colaboradores, descrevem o perfil hematológico de pacientes com câncer de mama em relação a pacientes saudáveis. Os achados do grupo descrevem que os níveis de leucócitos, neutrófilos e plaquetas (PLQ) aumentam proporcionalmente com o estadiamento do tumor enquanto os linfócitos possuem comportamento inversamente proporcional. Já para os eritrócitos há uma redução nos valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e aumento na amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW) durante o desenvolvimento do tumor antes de qualquer tratamento⁶⁵.

Yiediz Okuturbar e colegas tentam relacionar o perfil hematológico de portadoras de câncer de mama com a malignidade do tumor comparado com o perfil de pacientes saudáveis. Os valores encontrados pelo grupo também descrevem redução nos níveis de hemoglobina, hematócrito e PLQ em portadoras de câncer de mama. No entanto, não há diferença estatisticamente significativa nos níveis de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, volume plaquetário médio (VPM) e o índice de anisocitose plaquetária (PDW) em pacientes com câncer de mama com metástases e sem metástases. A relação neutrófilo/linfócito é maior em pacientes com câncer de mama quando comparados a pacientes saudáveis, uma vez que já se era esperado, pois a literatura descreve esse comportamento, indicando que quanto maior a relação maior seria o estadiamento do tumor. O grupo ainda conclui que os níveis de neutrófilos poderiam ser usados como um preditor independente para identificar o estadiamento do câncer de mama⁶⁶.

Charalampos e colaboradores propõem que os valores de RDW poderiam ser um novo biomarcador do câncer de mama, pois os seus valores foram maiores quando comparado a pacientes com fibroadenomas. O grupo ainda

investiga diferenças entre os tipos de câncer de mama, relatando que os níveis de RDW para pacientes com expressão positiva de HER-2 é maior do que em pacientes com expressão negativa e não houve diferença nos níveis de RDW quando comparados entre os tipos receptores ou não de estrógeno e progesterona. Entretanto, um comportamento inversamente proporcional foi observado, quanto maior o estadiamento do tumor menores são os valores de RDW⁶⁷.

Huang Zenan e colaboradores, realizaram um estudo com 601 pacientes tentando relacionar os níveis de leucócitos e seus constituintes com os subtipos de câncer de mama em mulheres antes e após o tratamento. A classificação etária foi até 60 anos ou superior a 60 anos de idade. Os resultados encontrados pelo grupo de modo geral, descrevem que os neutrófilos podem ser um importante indicador da progressão tumoral, independente da faixa etária. Já para cada subtipo, a relação linfócito/monócito foi um prognóstico independente para os subtipos Luminal A e HER-2⁺, a relação plaqueta/linfócito foi para o subtipo Luminal B e por fim, a relação neutrófilo/linfócito e leucócitos foram para o subtipo TNBC para determinação da progressão tumoral e resposta frente ao tratamento⁶⁸.

O câncer de mama quando associado à RT pode agravar o quadro anêmico das pacientes devido as regiões expostas à RT bem como os efeitos da RI nas células hematopoiéticas. Hans Geinitz e colegas, descrevem que os níveis de leucócitos, linfócitos e PLQ declinam continuamente durante o processo radioterápico e pode perpetuar por até 2 meses após o término do tratamento. Os neutrófilos, monócitos e hemoglobina podem também diminuir durante a RT, no entanto, com menor expressividade que os anteriormente citados e mesmo após 2 meses os níveis podem continuar a decair⁶⁹.

Wang e colaboradores realizaram um estudo com camundongos BALB/c fêmeas com tumor de mama 4T1. Os dados hematológicos mostraram que o desenvolvimento do tumor gerou anemia nos animais, pois os níveis de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, HCM, CHCM e VCM diminuíram significativamente em relação ao grupo controle. Já os leucócitos aumentaram 31 vezes em relação ao controle indicando evolução tumoral bem como avaliação de metástases. Por fim, foram observados aumento significativo nos níveis de PLQ, PDW e VPM. O grupo acredita que esse aumento significativo está relacionado com a formação de trombos que auxiliam na disseminação e prevalência do câncer⁷⁰.

3.2. Radioterapia

A RT, atualmente é uma das terapias bases para o tratamento do câncer. Estima-se que aproximadamente 50 % dos pacientes com câncer utilizem em algum momento essa modalidade⁷¹. O uso medicinal da RT possui como finalidade a erradicação das células tumorais, atenuar a sua reprodução ou como tratamento paliativo para casos avançados da doença⁷².

A associação com mais de uma modalidade terapêutica, tais como intervenção cirúrgica, quimioterapia ou hormonioterapia é bem estabelecida na medicina e o regime terapêutico depende do estadiamento do tumor e sua etiologia⁷.

A RT consiste em utilizar RI, que podem ser por exemplo, raios gama (γ) ou raios X com alta energia, que ao interagirem com as moléculas causam desequilíbrio eletrostático, ejetando íons negativos e ocasionando sucessivos danos à estrutura molecular que podem ser reparados ou não⁷³. O emprego da RT no tratamento do câncer tem sido descrito desde o século XX, quando um estudante de medicina, Emil Grubbe montou sua própria máquina de raios-X e usou-a em uma mulher com câncer de mama recorrente⁷⁴.

A interação da RI com o alvo, mais especificamente o DNA, pode ser por via direta ou indireta. Na ionização direta, os elétrons livres reagem diretamente com as moléculas orgânicas, alterando totalmente sua configuração e função. Na ionização indireta, os elétrons livres reagem com as moléculas de água, promovendo a radiólise e produzindo as espécies reativas de oxigênio (do inglês ROS, *Reactive Oxygen Species*), principalmente o radical hidroxila. Dois terços dos danos ao DNA são causados por via indireta, desse modo, para obtenção efetiva dos resultados é importante que o tumor possua menores regiões em hipóxia^{75; 76}.

A RT pode ser realizada inserindo a fonte radioativa diretamente no alvo, denominada de braquiterapia ou fixando-a à uma distância pré-estabelecida do alvo, reportada como teleterapia. Em ambas as modalidades, o planejamento das doses bem como a precisa localização de sua deposição é essencial para a preservação das áreas sadias adjacentes⁷⁷.

Atualmente, com o objetivo de atenuar a deposição de dose em regiões indesejadas, avanços tecnológicos estão sendo realizados. De fato, podemos destacar a RT conformacional tridimensional, RT de intensidade modulada, RT

guiada por imagem e terapia de arco volumétrico modulado. Todas as técnicas utilizam construção de imagens do alvo, seja por tomografia, ressonância magnética ou tomografia por emissão de pósitrons para fornecer melhor precisão na incidência dos feixes ionizantes^{78; 79}.

O uso de aceleradores lineares tem se intensificado mundialmente na RT desde o século passado, entretanto, ainda há as fontes de cobalto-60 (Co^{60}) fornecendo a cobaltoterapia⁸⁰. A mesma consiste em um utilizar o radioisótopo Co^{60} , com decaimento em emissões beta de Ni^{60} (níquel) com meia vida de 5,2714 anos e emissão de raios γ com energias de 1,117 MeV e 1,33 MeV⁸¹.

Embora a cobaltoterapia esteja sendo gradativamente substituída pelos aceleradores lineares, o seu uso se faz muito presente em países pobres ou em desenvolvimento devido ao baixo custo de manutenção, meia vida relativamente alta, bons resultados em uma variedade de tumores, além do fornecimento de raios γ de alta energia e penetrabilidade sem efeitos significativos superficialmente. Desse modo, discussões estão sendo reabertas para analisar o quão efetivo é a substituição e o custo-benefício^{71,72}.

3.2.1. Radioterapia no câncer de mama

A RT é um dos principais tratamentos do câncer de mama em todos os estágios. Estudos sugerem que aproximadamente 80 % das mulheres diagnosticadas realizaram RT antes ou após a remoção do tumor primário. O uso da RT geralmente não ocorre de forma isolada. Dependendo do estadiamento do tumor, a associação com a hormonioterapia ou quimioterapia é bem estabelecida^{7; 82}.

A definição da dose a ser utilizada durante o tratamento requer um minucioso estudo, pois é preciso considerar o estadiamento do tumor, metástases, bem como o comprometimento dos órgãos nas proximidades. Em geral, o intervalo de dose utilizado é descrito entre 40 a 70 Gy, fracionados em diversas sessões, que podem perdurar em aproximadamente 8 semanas com doses diárias máximas em torno de 2,5 Gy^{8; 83; 84}.

Efeitos colaterais, tais como, radiodermites, eritemas, fadiga e dores nas mamas são comumente relatados durante ou após o tratamento. No entanto, dependendo da intensidade, a paciente acaba interrompendo a continuidade das

sessões, pois encontra-se com intensa debilidade física e emocional comprometendo a eficácia dos resultados^{9; 10}.

Nos últimos anos, pesquisadores têm introduzido o hipofracionamento de doses no processo radioterápico, inclusive no que concerne o tratamento do câncer de mama. O hipofracionamento seria a diminuição do período de tratamento elevando as doses diárias, objetivando a atenuação dos efeitos colaterais e, conseqüentemente, a falta de continuidade no mesmo. A hipótese que embasa o hipofracionamento seria que, além da atenuação dos efeitos colaterais, o desenvolvimento do tumor quanto as reincidivas respondem igualmente ou melhor quando comparado ao regime hiperfracionado^{85; 86}.

3.2.2. Radioterapia em modelos de câncer de mama murino

Modelos murinos para desenvolvimento tumoral e RT são descritos na literatura para progresso e aprimoramento das pesquisas científicas. Entretanto, protocolos, bem como equipamentos dedicados às necessidades relacionadas ao manuseio animal, ainda são escassas^{87; 88; 89}.

Os protocolos radioterápicos descritos na literatura em suma objetivam mimetizar as condições clínicas, variando a dose total na RT, o regime e o tipo de radiação. De fato, Pilonis e colaboradores induziram tumor de mama em camundongos BALB/c com a linhagem celular 4T1 e após 2 semanas quando o volume tumoral era de aproximadamente 65 mm³ submeteram os animais ao processo radioterápico. A fonte utilizada foi de Co⁶⁰ em duas sessões com intervalo de um dia com dose de 12 Gy cada⁹⁰.

Poucos relatos na literatura descrevem o uso de equipamentos capazes de realizar RT devidamente customizados à experimentação animal. Na grande maioria, os equipamentos são de uso geral e adaptações são realizadas com o intuito de efetuar o procedimento com maior segurança e alvo específico. Assim, o desenvolvimento de dispositivos à base de chumbo para blindagem são executados de acordo com a necessidade experimental. Kaplon e colaboradores adaptaram um dispositivo para realizar RT no flanco de camundongos BALB/c com tumor xenográfico de leucemia. O grupo elaborou as dimensões ideais para inserir o animal e validaram o mesmo para os padrões de dose e irradiação utilizados⁹¹.

Neste trabalho, nós desenvolvemos um dispositivo para blindagem de acordo com as dimensões necessárias para um camundongo e a área de interesse.

De fato, o nosso dispositivo foi capaz de atenuar a RI e permitir a RT na região da mama com câncer dos camundongos⁹².

3.3. Fotobiomodulação

A terapia por fotobiomodulação (PBM, do inglês *Photobiomodulation*) tem ganhado grande destaque mundial nas áreas da saúde devido aos seus efeitos terapêuticos em uma variedade de condições^{93; 94; 95}. O tratamento consiste em utilizar uma fonte de luz, seja laser ou diodo emissor de luz (Led) com comprimento de onda e parâmetros adequados para ocorrer maior penetração possível dos fótons¹¹.

A introdução da PBM para fins medicinais foi descrita inicialmente por Endre Mester e colaboradores no final da década de 60, quando adaptaram um laser de rubi, com densidade de energia de 1 J/cm² e verificaram crescimento mais acentuado dos pelos em regiões previamente tricotomizadas de ratos. Os estudos do grupo perduraram durante a década de 70 com o uso da luz na estimulação da reparação tecidual^{96; 97; 98}.

Os efeitos positivos da PBM vêm sendo reportados para a aceleração do processo de reparação tecidual, modulação do processo inflamatório com redução de edema, redução da pressão arterial e melhora de função renal, como também em redução de dor em quadros algícos agudos e crônicos^{99; 100; 101; 102; 103}.

Embora a PBM possua uma descrição bastante sólida na literatura, a compreensão dos seus mecanismos de ação ainda não fora completamente elucidada. Em nível celular, evidências sugerem que seus efeitos são resultantes da absorção dos fótons pela enzima *citocromo C oxidase* na cadeia respiratória¹⁰⁴, que possui seu espectro de absorção dentro do intervalo dos comprimentos de onda visível e infravermelho, com picos em comprimentos de onda usados na PBM. Uma vez que essa enzima é estimulada pela radiação luminosa, pode ocorrer aumento da síntese de ATP na cadeia respiratória, modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e indução de fatores de transcrição (figura 2). Esses fatores de transcrição promovem a síntese de proteínas que desencadeia outros efeitos como o aumento da proliferação e migração celular, modulação nos níveis de citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e aumento da oxigenação tecidual^{105; 106; 107; 108}.

Figura 2- Mecanismo celular após a PBM. O esquema apresenta a absorção da luz no comprimento de onda vermelho ou infravermelho próximo pelos cromóforos ou fotorreceptores localizados na mitocôndria. Durante o processo, a produção de ATP aumenta e espécies reativas de oxigênio são geradas para desencadear o efeito biológico.

Fonte: Adaptado de Hoon Chung e colaboradores em *The Nuts and Bolts of low-level laser (light) therapy*¹⁰⁷

O comprimento de onda é um parâmetro importante para a PBM. Atualmente nas áreas da saúde são utilizados os comprimentos de onda de emissão vermelha e infravermelha, que coincidem com o espectro de ação da PBM em via transcutânea, sendo também conhecido como janela óptica^{11; 12}. Essa região do espectro eletromagnético corresponde à faixa de maior penetração dos fótons no tecido, ilustrado nas figuras 3 e 4.

Figura 3- Espectro de absorção dos cromóforos mais importantes do tecido biológico. A região em destaque refere-se ao intervalo com os valores utilizados nas aplicações biológicas à qual seria a região do vermelho e infravermelho. Nota-se que quanto menor o coeficiente de absorção maior a profundidade de transmissão.

Fonte: Retirado de Garcez e colaboradores¹²

Figura 4- Profundidade de penetração dos fótons na pele de acordo com o comprimento de onda.

Fonte: Retirado de da Silva e colaboradores¹¹.

Além do comprimento de onda adequado, outros parâmetros, como, potência de saída, fluência, taxa de fluência e tempo de exposição são de extrema importância para obtenção dos melhores resultados. Há relatos da curva de dose-resposta bifásica, onde ora se pode obter resultados estimulatórios, ora resultados inibitórios^{109; 110}. A literatura também reporta que para ação efetiva da PBM, a célula deve estar em déficit¹¹¹.

Nas últimas décadas, há um crescente interesse em compreender os mecanismos da PBM em células tumorais e, conseqüentemente, promover o uso em pacientes oncológicos, uma vez que não há elucidação sobre seus efeitos em neoplasias^{18; 112; 113}. Atualmente a PBM ainda não é indicada como parte da conduta terapêutica para pacientes oncológicos, contudo, na literatura há investigações relatando sua associação à RI, que serviram de motivação para o presente trabalho^{114; 115}.

3.3.1. PBM associada à RT

Nos últimos anos, a PBM tem sido estudada como radiomodificador, isto é, para proteger ou sensibilizar a resposta celular frente à RI. Alguns estudos utilizam a PBM antes ou após à RI com o objetivo de proteção celular ou mitigação dos efeitos.^{19; 20}. Outros abordam a PBM com capacidade de sensibilizar as células

à RI e ainda há relatos na literatura do uso da luz para atenuar os efeitos colaterais provenientes da RT^{24; 116}. Trabalhos clínicos na literatura abordam a PBM no tratamento da radiodermite em pacientes com câncer de mama expostas à RT^{24; 25}. No Brasil, recentemente a Secretaria de Atenção à Saúde aprovou o uso da PBM como tratamento suporte para a mucosite oral em pacientes oncológicos expostos à RT de cabeça e pescoço (Portaria nº516, 17/06/2015, Diário Oficial da União)

KARU e colaboradores utilizaram um laser de baixa intensidade com densidade de energia de 100 J/m² em células He-La antes da exposição à radiação ionizante com doses variando entre 0,2 a 10 Gy, objetivando verificar efeito radioprotetor, variando o tempo de exposição entre as radiações de 5 min, 60 min ou 180 min. Os resultados mostraram que a fração de sobrevivência das células expostas à fototerapia antes da exposição à RI aumentou em relação às células não irradiadas, havendo uma dependência com o intervalo de tempo entre as duas radiações. O grupo acredita que os mecanismos de ação de ambas radiações são diferentes e haveria mudança na resposta adaptativa das células frente ao tratamento¹⁹.

DJAVID e colegas utilizaram fibroblastos murinos NIH 3T3 e células tumorais HeLa expostas ao comprimento de onda de 685 nm e 830 nm com diferentes densidades de energia 1 h antes da exposição às doses de RI de 2 Gy, 4 Gy e 6 Gy objetivando radiosensibilizar essas células. O grupo observou que a exposição à PBM influenciou na fração de sobrevivência após a RI com o comprimento de onda 685 nm, pois em ambas as linhagens a fração diminuiu em relação ao controle não irradiado previamente. Entretanto, quando as células foram submetidas ao comprimento de onda 830 nm observou-se um efeito radioprotetivo nas células NIH 3T3. O grupo acredita que o efeito radiomodificador da PBM está relacionado ao comprimento de onda e a densidade de energia. O possível mecanismo de interação entre a RI e a PBM seria que as ROS gerado pela PBM ultrapassaria o sistema antioxidante, causando instabilidade no balanço *redox*, ativando o *redox sensitive*, sinalizando fatores como o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$)²¹.

O nosso grupo realizou PBM com energias de 1,2 J, 3,6 J e 6 J em células de câncer de mama e em fibroblastos após a exposição às doses de 2,5 Gy e 10 Gy de RI. Os achados indicaram que a luz, independente da energia utilizada, bem como a dose de RI não influenciou a proliferação das células de câncer de

mama, conduzindo-as para a senescência. Já para os fibroblastos foi observado aumento na proliferação celular. Um possível mecanismo de ação seria que a mitocôndria da célula tumoral possui comportamentos distintos em comparação à célula não tumoral e a luz efetivamente age de forma diferenciada.¹¹⁴.

Trabalhos que usam modelo murino para verificar a interação da RI com a PBM são escassos na literatura, contudo, podemos destacar alguns achados, tais como de Acauan e colaboradores que verificaram os efeitos da PBM em glândulas parótidas de camundongos Swiss. O grupo realizou uma única sessão de RT com dose de 10 Gy na região supracitada e PBM imediatamente antes da RT e 24 h após RT com energias de 2 J e 4 J. Nenhuma diferença foi identificada quanto o efeito radiomoficador da PBM, pois a detecção de caspase 3 (indicativo de apoptose) não apresentou diferença independente da energia entregue, relatando que não houve efeito protetor e nem sensibilizador. Entretanto, o grupo com 4 J apresentou maior preservação das estruturas morfológicas da glândula parótida assim como maior vascularização no tecido da glândula¹¹⁷.

Eframova e colegas verificaram o efeito radioprotetor da PBM com laser no comprimento de onda de 940 nm em camundongos submetidos a dose letal de corpo inteiro de radiação gama (8,7 Gy). As fluências utilizadas foram de 3, 12 ou 18 J/cm², 30 minutos antes da RI. O grupo observou ação da PBM na sobrevivência dos animais bem como nos níveis de leucócitos durante o período experimental. O grupo sugere que a PBM influenciou na produção de células troncos e progenitoras para obtenção dos níveis supracitados²⁰.

Voskanyan e colaboradores realizaram um estudo para identificar um possível intervalo de tempo à qual seria possível diminuir os danos da RI com a PBM. Camundongos CD1 foram expostos à RI com doses de 5 Gy ou 7 Gy de corpo inteiro e após 2 h ou 24 h a PBM foi realizada com $\lambda = 650$ nm (1 mJ/cm²) no dorso dos animais. As doses de RI foram utilizadas com o objetivo de causar síndrome aguda da radiação. O grupo verificou que tanto a PBM após 2 h ou 24 h promoveu efeitos positivos na sobrevivência dos animais em relação ao grupo apenas com radiação gama. No entanto, os valores são mais efetivos quando o intervalo de tempo entre as duas radiações foi de 2 h, sendo esse, portanto um melhor intervalo de tempo para atenuar os efeitos deletérios da RI¹¹⁸.

APRESENTAÇÃO DA TESE

Para melhor compreensão do estudo desenvolvido, esta tese foi dividida em capítulos. Assim, no capítulo I apresentamos o estabelecimento do protocolo experimental; no capítulo II, introduzimos a fotobiomodulação pré e pós a radioterapia.

CAPÍTULO I- ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1- MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Modelo tumoral

Ao longo do período experimental, utilizamos camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade e massa corporal de aproximadamente 20 g (n=80). Os animais foram fornecidos pelo biotério do IPEN e acomodados em isoladores apropriados, recebendo água e ração *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 h. Os procedimentos experimentais seguiram as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e possuem a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEN-CNEN/SP (parecer nº 190/17).

1.1.2. Células de câncer de mama 4T1

As células 4T1 (ATCC®CRL-2539) e 4T1-LUC (subclone da linhagem 4T1 transfectadas com a enzima luciferase) gentilmente cedida pelo profº Dr. Roger Chammas do instituto do câncer do estado de São Paulo (ICESP), previamente armazenadas e estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Sigma- USA), 1 % de solução antibiótica e antimicótica (Sigma- USA) e armazenadas em incubadora a 37°C com 5 % de CO₂. A manutenção das células foi realizada a cada 2 dias até atingirem confluência de aproximadamente 70 %. Após, alíquotas contendo a concentração de 1x10⁵ células em 40 µL foram transferidas para seringa de 1 mL.

1.1.3. Indução e evolução tumoral

Os animais previamente tricotomizados e sob anestesia inalatória (isoflurano a 2,5 %) receberam injeção no subcutâneo com o concentrado de células na mama inferior esquerda. Após a inoculação, os animais foram acompanhados diariamente para verificar as manifestações clínicas e a efetiva instalação do tumor. A avaliação quantitativa das dimensões do tumor foi realizada com auxílio de um paquímetro digital e o cálculo do volume tumoral foi realizado utilizando a seguinte equação¹¹⁹:

$$V = 0.5.C.L^2 \quad (1)$$

O qual, V significa *volume* em cm^3 , C é o *comprimento* e L é a *largura* do tumor em cm, respectivamente.

1.2. Desenvolvimento de um dispositivo para blindagem e radioterapia

Devido à necessidade de realizar RT localizada na região da mama, foi desenvolvido um dispositivo à base de chumbo para blindagem das demais áreas, pois a fonte disponível para o tratamento era panorâmica.

Cinco quilogramas de chumbo foram expostos a aproximadamente 340 °C durante 10 min e posteriormente inseridos em um molde de alumínio. Após a solidificação do chumbo dentro do molde (aproximadamente 24 h), o mesmo foi moldado dentro das dimensões necessárias para armazenar um camundongo e para atenuação de 2 TVL (*do inglês: Tenth Value Layer- Camada deci-redutora*).

1.2.2. Dosimetria

Para validação do dispositivo, quinze dosímetros termoluminescentes (TLDs) de sulfato de cálcio dopado com disprósio ($Ca_2SO_4:Dy$) produzidos no IPEN foram distribuídos ao longo de um tubo cônico de 50 mL com o intuito de mimetizar a posição do camundongo dentro do tubo e dentro do dispositivo. Os dosímetros possuíam formato circular com massa de 42,2 mg e 0,8 x 6,0 mm de espessura e diâmetro, respectivamente. Os mesmos foram fixados dentro de placas de acrílicos com 1 mm de espessura para manter o equilíbrio eletrônico, conforme figura 5. Para o tratamento térmico, os dosímetros foram expostos a 300 °C por 3 h em forno industrial (Novus® model N1100).

Figura 5- Dosímetros termoluminescentes ao longo do tubo cônico. A região em vermelho (dosímetro 1) refere-se à localização da mama do animal. A distância entre os dosímetros 1 e 10 (posterior a mama) é aproximadamente 3 cm. Os dosímetros 13 e 14 representam a região da cabeça do animal e o dosímetro 15 a região da cauda do animal. A distância entre os dosímetros é aproximadamente 1 mm.

Fonte: Autor da Tese

1.2.3. Irradiação

Para validação do dispositivo, uma curva de calibração utilizando os TLDs foi realizada com as doses de 1 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 10 Gy e 12 Gy. As exposições foram realizadas em uma fonte panorâmica de Co^{60} localizada no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN. A região que representa a mama foi fixada a 10 cm de distância da fonte, conforme figura 6. A taxa de dose no momento da irradiação foi de 65,82 Gy/h, a atividade de aproximadamente 6,00 TBq e tempo de exposição de aproximadamente 9 min para entrega da dose de 10 Gy na região de interesse. Após a irradiação, a leitura dos dosímetros foi processada em leitora termoluminescente (Thermo Scientific™ HARSHAW TLD™ Model 3500, USA).

Figura 6-Dispositivo posicionado no irradiador e a representação da região da mama do animal. Um bloco de chumbo foi posicionado para fixar o dispositivo na distância exata. A distância entre a região da mama e a fonte equivale à 10 cm.

Fonte: Autor da Tese.

1.2.4. Radioterapia- piloto

Para determinação do regime radioterápico, nós nos baseamos em trabalhos descritos na literatura que utilizaram fontes de raios X e gama^{90; 120; 121} e adaptamos a metodologia de acordo com o nosso modelo tumoral. Um estudo piloto foi realizado utilizando as doses de 40 Gy (RT₁₀) e 60 Gy (RT₁₅) divididas em 4 sessões de 10 Gy e 15 Gy, respectivamente e 80 Gy (RT₈) durante 10 sessões com intervalo de dois dias a cada 5 sessões (8 Gy/sessão). Neste estudo, os animais possuíam volume tumoral inicial em aproximadamente 0,1 cm³, receberam anestesia via intraperitoneal (Xilazina 10 mg/Kg e Cetamina 100 mg/Kg) e foram individualmente posicionados dentro de um tubo cônico de 50 mL com furos na região superior para permitir a passagem de oxigênio, de tal modo que, quando

inseridos dentro do dispositivo de chumbo, a região da mama ficasse alinhada com o orifício da blindagem, permitindo sua exposição à RI.

1.3. Fotobiomodulação no modelo tumoral

Os parâmetros utilizados na PBM foram embasados em trabalhos do nosso grupo ^{18; 114; 122}, onde utilizamos um laser de emissão vermelha com $\lambda = 660$ nm (MMOptics- São Carlos, SP, Brasil-Twin Flex Evolution, 3B), potência de saída de 20 mW, em sessão única e em contato direto com o tumor. Os parâmetros de irradiação são descritos na tabela 2.

Tabela 2-Grupos e parâmetros de irradiação na PBM

Grupo	Energia (J)	Fluência (J/cm ²)	Tempo (s)
PBM _{1,2}	1,2	30	60
PBM ₆	6,0	150	300

Fonte: Autor da Tese.

Durante a PBM os animais permaneceram sob anestesia inalatória com isoflurano a 2,5 %. Os animais dos grupos controles: tumor e sadio foram manipulados e submetidos as mesmas condições de estresse, contudo, sem efetiva exposição tanto da RT quanto PBM.

1.4. Análise estatística

O perfil de distribuição dos dados obtidos foi avaliado através do teste de *Shapiro-Wilk*. Após verificação da normalidade dos dados, a análise de variância com um fator *Anova One-Way* foi utilizada para os dados provenientes do volume tumoral e a análise de variância com dois fatores *Anova Two-Way* com medidas repetidas para os dados provenientes da fotobiomodulação. Para comparação entre as médias dos grupos, o teste de *Tukey* foi efetuado e os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os dados são apresentados em Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). A análise de sobrevida foi realizada utilizando o teste de *Kaplan-Meier*. O programa utilizado para análise dos dados foi o *Origin Pro 8.5*.

2- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Volume Tumoral

A Figura 7 apresenta os dados obtidos até 42 dias após a inoculação de 1×10^5 células de câncer de mama 4T1-LUC em camundongos BALB/c fêmeas. No período de 7 dias após a inoculação é possível observar que o volume tumoral está ainda próximo ao valor 0, indicando que o tumor em grande parte dos animais estava palpável, mas não mensurável. Após 14 dias, os animais possuíam volume tumoral aproximado de $0,1 \text{ cm}^3$ e com dimensões bem definidas. O crescimento do tumor apresentou-se exponencial durante o período experimental, contudo, a taxa de crescimento entre os dias experimentais é maior nos primeiros 14 dias. De fato, entre os dias 7 e 14 o volume tumoral aumentou aproximadamente 10 vezes, enquanto que entre os dias 21-28 e 28-35, a taxa foi de 2,96 e 0,7 vezes, respectivamente. Por fim, no último intervalo experimental (35-42 dias) essa taxa aumenta novamente, representando aproximadamente 1,8 vezes em relação ao volume tumoral anterior.

Figura 7- Volume Tumoral (n=5 animais) durante o período pós-inoculação do concentrado de células. Foram identificadas diferenças estatisticamente significantes a partir do período de 21 após a inoculação em relação ao período inicial de 7 dias.

Fonte: Autor da Tese.

A literatura possui um corpo sólido no uso da linhagem celular de câncer de mama murino 4T1 e seus subclones transfectados com luciferase (4T1-LUC). Ambas as linhagens possuem crescimento semelhante (**vide anexo II**). A escolha por tal linhagem se deu por suas características tumorigênicas semelhantes ao câncer de mama humano triplo negativo em estágio IV, bem como seus sítios de metástases. Diferentes concentrações celulares, locais de inoculação como também os hospedeiros são descritos na literatura^{123; 124; 125; 126; 127}.

Nesse trabalho, nós optamos por utilizar os animais BALB/c, devido ao fácil manuseio, disponibilidade como também pela vasta quantidade de trabalhos. Além disso, a linhagem tumoral 4T1 é oriunda de um tumor espontâneo ortotópico de tal espécie, corroborando com o local de inoculação utilizado no desenvolvimento do nosso modelo tumoral^{56; 57}.

Achados na literatura utilizam diferentes concentrados de células, variando desde 1000 a 1000000 células para indução do tumor de mama. O comportamento, o tempo inicial para desenvolvimento de metástases bem como o de morte dos animais por doenças decorrentes, variam de protocolo para protocolo. De fato, Gregório e colaboradores realizaram um estudo inoculando diferentes concentrados celulares afim de avaliar o surgimento do tumor inicial, volume e metástases. O grupo inoculou 5×10^3 , 2×10^4 , 5×10^5 e 1×10^6 células de 4T1 na glândula mamária de camundongos fêmeas BALB/c com 6 semanas de idade. O acompanhamento dos animais para verificação de metástases foi até os mesmos atingirem entre 100 a 200 mm³ ou maior que 250 mm³ de volume tumoral. Nenhuma correlação exata entre a incidência do tumor e a densidade de células inoculadas foi estabelecida. No entanto, o início para detecção palpável do tumor foi diferente entre grupos. Os grupos com as menores concentrações, tiveram o tumor palpável em aproximadamente 17,5 e 16,5 dias, respectivamente, enquanto os grupos com as maiores concentrações tiveram o tumor palpável em aproximadamente 7,6 e 3,6 dias, respectivamente. Em relação à análise de metástases, o estudo mostrou que quantidades menores de células inoculadas apresentam maior incidência de metástases no pulmão, pois para atingirem um volume tumoral sólido gastam mais tempo e com isso o processo de disseminação do câncer para os demais órgãos pode ser mais efetivo¹²⁸.

Nesse estudo, nós optamos por inocular 1×10^5 células nos animais e consideramos como efetiva a instalação do tumor quando o mesmo fosse palpável,

correspondendo a aproximadamente 7 dias após a inoculação. Para início dos protocolos experimentais, estabelecemos o volume tumoral em aproximadamente $0,1 \text{ cm}^3$ que corresponde de acordo com os nossos dados experimentais em 14 dias após a inoculação. Esse volume proporciona um tumor com dimensões avançadas e detectáveis a olho nu, contudo, sem indícios de metástases macroscópicas.

Tao e colaboradores, descrevem que o tumor proveniente da inoculação de células 4T1 possui um comportamento bifásico e que o início de metástases dentro da densidade de células que utilizamos começa no segundo momento de crescimento do tumor, correspondendo ao período de 21 dias após a inoculação⁶¹. De fato, ao observamos o comportamento exponencial do nosso modelo tumoral, verificamos um crescimento bifásico. A taxa de crescimento foi maior no primeiro momento, entre os dias 7 e 14, o volume tumoral aumentou 10 vezes, em um segundo momento, por volta de 14 dias pós-inoculação, a taxa de crescimento começa a diminuir, chegando a aproximadamente 0,7 vezes em relação ao volume anterior e já no último período observado a taxa começa a elevar-se novamente em 1,82 vezes o crescimento tumoral.

2.1.2. Massa

Durante o desenvolvimento do tumor foi possível observar que os animais tiveram aumento na massa corpórea, contudo esses valores não foram estatisticamente significantes entre si e quando comparados ao grupo controle sadio, conforme a Figura 8. No decorrer do período experimental os animais aumentaram em média 20 % da sua massa corpórea (aproximadamente 4 g) em relação ao dia 0. Dentre esses 20 %, é possível observar que nos 7 primeiros dias após a inoculação tumoral, os animais aumentaram aproximadamente 1 g na massa corpórea. Entre os dias 7 e 14 os valores mantiveram-se semelhantes com aumento de aproximadamente 0,56 g. Esse comportamento também pode ser observado entre os dias 35 e 42, onde a massa corpórea praticamente não alterou. O intervalo que os animais apresentaram maior aumento na massa corpórea foi entre 21 e 28 dias, com 1,46 g, representando aproximadamente 5 %.

Figura 8- Massa corpórea dos animais (n=5) dos grupos:Tumor e Controle antes da inoculação celular dia 0 e no período pós- inoculação do concentrado de células.

Fonte: Autor da Tese.

Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada na massa corporal dos animais tanto intergrupos quanto intragrupos e considerando que o tumor é constituinte da massa corpórea dos mesmos, uma relação inversamente proporcional entre as taxas de crescimento do tumor e o ganho de massa corporal foi observada. No período onde o tumor apresentou maior taxa de crescimento (7-14 dias) o ganho de massa foi menor quando comparado ao período de crescimento mais lento (21-28 dias).

1.2. Dispositivo para blindagem e radioterapia

1.2.1. Dimensões

O dispositivo para blindagem a base de chumbo foi projetado para a inserção de um tubo cônico com diâmetro de 3 cm que pudesse armazenar um camundongo para futuras irradiações. Desse modo, após a moldagem, o dispositivo apresentou 14 x 15 x 7 cm (altura, largura e profundidade, respectivamente). Um orifício de aproximadamente 1 cm foi confeccionado a 6,5 cm da base ao longo do eixo x do dispositivo para a radiação γ chegar à mama do animal, conforme apresentado na figura 9. De acordo com a espessura do dispositivo (7 cm), a atenuação da radiação gama na faixa de 1,3 Mev correspondeu a aproximadamente 2 TVL¹²⁹. Vale ressaltar que a atenuação da radiação no tecido é exponencial.

Figura 9- Dispositivo para blindagem a base de chumbo para radioterapia de mama em camundongos BALB/c. A espessura do dispositivo corresponde a 7 cm.

Fonte: Autor da Tese.

1.2.2. Dosimetria

A doses absorvidas pelos TLDs são apresentadas na tabela 3. É possível observar que o dosímetro 1, que representa a região da mama do animal,

apresentou aproximadamente 10 Gy, correspondendo ao valor de dose entregue. Os dosímetros que estão dentro da área blindada (3 a 9) apresentaram valores abaixo de 1 Gy. A dose de 7,5 Gy foi detectada pelo dosímetro 10, que dista 3 cm da região da mama, demonstrando que 25 % da radiação foi atenuada dentro do tubo de propileno. Os demais dosímetros apresentaram valores inferiores às doses absorvidas nos dosímetros 1 e 10 devido à localização dentro do dispositivo bem como ao espalhamento da radiação gama no ar.

Tabela 3- Valores de dose absorvida pelos dosímetros termoluminescentes

Dosímetro	Dose (Gy)
1	9,8
2	3,0
3	<1,0
4	<1,0
5	<1,0
6	<1,0
7	<1,0
8	<1,0
9	<1,0
10	7,5
11	5,3
12	1,6
13	1,5
14	2,0
15	4,1

Fonte: Autor da Tese

2.2.3. Radioterapia- piloto

De acordo com os dados obtidos no estudo piloto, os grupos com RI, exceto o grupo RT₁₀ apresentaram redução estatisticamente significativa no volume tumoral em relação ao grupo Tumor a partir do dia 8, conforme a figura 10. No entanto, os grupos RT₁₅ e RT₈, apresentaram maior redução como também diferença em relação ao grupo RT₁₀. Não foram evidenciadas diferenças no volume

tumoral entre os grupos RT₁₅ e RT₈, porém os animais mostraram-se mais debilitados durante o processo radioterápico para o grupo RT₈ e um óbito ocorreu no dia 10. Essas características, provavelmente, podem ser atribuídas ao fato de o período de tratamento ser mais longo, pois foram 10 sessões com intervalo de 2 dias a cada 5 sessões

Figura 10- Volume tumoral normalizado em relação ao dia 0 (início do protocolo radioterápico) para os grupos Tumor, RT₁₀, RT₁₅ e RT₈ (n= 3 animais) durante as sessões de radioterapia e após o encerramento do protocolo. O sinal * significa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Tumor.

Fonte: Autor da Tese.

Diante dos resultados obtidos, nós verificamos que a quantidade de exposições possivelmente interfere mais efetivamente no bem-estar animal que a intensidade da dose entregue por sessão. Esse fato pode ser corroborado comparando-se os animais dos grupos RT₈ e RT₁₅, pois ambos apresentaram comportamento semelhante em relação ao volume tumoral. No entanto, no que concerne à debilidade dos animais, a menor dose por sessão promoveu óbito no decorrer do protocolo experimental, com redução de mais de 10 % na massa corpórea.

Atualmente tem se discutido na literatura o hipofracionamento de doses no processo radioterápico, pois o prolongado período de tratamento pode gerar

efeitos colaterais mais intensos⁸⁵. Aplicando esse conceito ao modelo animal, nós decidimos utilizar a dose mais efetiva clinicamente, obtendo redução de aproximadamente 90 % do volume tumoral. Desse modo, a dose adotada para desenvolvimento do protocolo experimental foi de 60 Gy fracionada em 4 sessões consecutivas de 15 Gy.

2.3. Fotobiomodulação no modelo tumoral

2.3.1. Volume tumoral

A PBM foi realizada no dia 0 que corresponde aos 14 dias após a inoculação do concentrado de células. Durante o período experimental foi possível observar que os grupos apresentaram comportamentos distintos, pois o grupo $PBM_{1,2}$ apresentou volume tumoral significativamente maior a partir do décimo quarto dia após a PBM quando comparado ao grupo Tumor, fato representado na figura 11. O grupo PBM_6 apresentou volume tumoral semelhante ao grupo Tumor em todo o período experimental e, portanto, significativamente menor que o grupo $PBM_{1,2}$. Embora a taxa de crescimento entre os grupos seja diferente, nota-se que todos possuem tendência ao crescimento exponencial, e esse fato foi observado nos resultados descritos no subitem 2.1 na figura 7 quando não havia presença da luz para a mesma linhagem tumoral.

Figura 11- Volume tumoral durante 28 dias após a PBM para os grupos com energias de 1,2 J e 6,0 J (n= 3 animais). Letras diferentes representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Tumor em cada período experimental.

Fonte: Autor da Tese.

Durante o período experimental foi observado desde o momento da indução do câncer até o último dia experimental um ganho médio de 4 g na massa corpórea dos animais, independentemente do grupo experimental. O aumento de massa ocorreu, particularmente, entre os dias 14 e 21 após a PBM. Se compararmos esses resultados durante o mesmo período com o volume tumoral é possível verificar que houve maior taxa de crescimento também, havendo uma possível relação diretamente proporcional entre o volume do tumor e a massa corpórea dos animais depois de expostos à luz.

A PBM associada ao câncer tem sido constante objeto de estudo nos últimos anos, pois não há um consenso em relação aos seus efeitos e protocolos^{16; 113}. Ao realizar uma única sessão com as energias de 1,2 J e 6 J, verificamos que o comportamento de crescimento exponencial se manteve no desenvolvimento do tumor, diferenciando apenas a taxa de crescimento. No grupo com PBM de menor energia, o volume tumoral alcançou a mesma dimensão do grupo controle 45 dias após a inoculação em apenas 28 dias.

1.3.2. Sobrevida

Afim de verificar o comportamento do tumor de mama após a PBM, verificamos a sobrevida dos animais, conforme apresentado na figura 12. Os resultados indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida dos grupos, pois o grupo PBM_{1,2} apresentou menor porcentagem de sobrevida tendo todos os animais ido a óbito 40 dias após à exposição a PBM. Por outro lado, os grupos Tumor e PBM₆ apresentaram aproximadamente 33 % de morte após 45 e 70 dias do procedimento, respectivamente. O tempo de sobrevida dos grupos Tumor e PBM₆ foi de 58 e 85 dias, respectivamente.

Figura 12- Porcentagem de sobrevivência dos animais após a PBM (n= 3). As curvas entre os grupos possuem diferença estatisticamente significativa com $p= 0,003$.

Fonte: Autor da Tese

Sumarizando, após obtenção dos resultados nestes estudos, definimos o volume inicial de $0,1 \text{ cm}^3$ após aproximadamente 14 dias de inoculação de 1×10^5 células de 4T1 na mama inferior do terceiro quadrante de animais fêmeas BALB/c como inicial para o protocolo radioterápico em 4 sessões consecutivas de 15 Gy e energia de 6 J na PBM.

CAPÍTULO II- FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA À RADIOTERAPIA

A PBM foi associada à RT em dois momentos distintos: **antes** ou **após** a RT, sendo em sessão única ou concomitante a cada sessão.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Animais e tumor de mama

Camundongos fêmeas BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram mantidos nas condições descritas no Capítulo I no subitem 1.1.

Cem mil células (1×10^5) de câncer de mama murino 4T1 em 40 μ L de meio de cultura foram inseridas em seringa de 1 mL e agulha hipodérmica e inoculadas nos animais conforme previamente descrito no Capítulo I no subitem 1.1.3.

Quatorze dias após, quando o tumor alcançou o volume tumoral de aproximadamente 0,1 cm³ os animais foram aleatoriamente divididos em grupos (n= 5 animais/grupos) e submetidos à RT. Os animais sadios foram manuseados igualmente e os seus valores experimentais foram utilizados como intervalos de referência. Os animais do grupo Tumor foram submetidos as situações de estresse causadas pelo manuseio, anestésico e tratamentos.

1.2. Radioterapia

A dose total utilizada durante o processo radioterápico foi de 60 Gy dividida em 4 sessões de 15 Gy em quatro dias consecutivos, utilizando uma fonte panorâmica de Co⁶⁰. Os animais previamente imobilizados com anestesia via intraperitoneal (Xilazina 10 mg/Kg e Cetamina 100 mg/Kg) foram individualmente posicionados dentro de um tubo cônico de 50 mL com furos na região superior para permitir a passagem de oxigênio, de tal modo que, quando inseridos dentro do dispositivo de chumbo, a região da mama ficasse alinhada com o orifício da blindagem, permitindo sua exposição à RI. O tempo de exposição em cada sessão foi entre 12 a 17 minutos, variando de acordo com taxa de dose mensal da fonte. Os animais foram monitorados até o término da anestesia afim de verificar as manifestações clínicas.

1.3. Fotobiomodulação

A PBM foi realizada antes ou depois da exposição à RI utilizando um laser de emissão na região do vermelho com $\lambda = 660$ nm (MMOptics- São Carlos, SP, Brasil-Twin Flex Evolution), potência de saída de 20 mW, área de 0,04 cm², com as energias de 6 J (PBM) ou fracionada em 1,5 J por sessão (PBM_F), conforme os grupos experimentais descritos na Tabela 4.

Tabela 4- Descrição dos regimes de exposição conforme o grupo experimental (antes ou após a RT) e os parâmetros da luz utilizados na PBM

Grupos	Regime	Tempo de exposição (s)	Energia por sessão (J)	Fluência (J/cm ²)
²⁴ PBM+RT	Única exposição 24 h antes do início da primeira sessão de RT	300	6	150
PBM/RT	Concomitantemente antes a cada sessão de RT	300	6	150
PBM _F /RT		75	1,5	37,5
RT+PBM ₂₄	Única exposição 24 h após a última sessão de RT	300	6	150
RT/PBM	Concomitantemente após cada sessão de RT	300	6	150
RT/PBM _F		75	1,5	37,5
RT	Apenas RT	-----	-----	-----
Tumor	-----	-----	-----	-----

Fonte: Autor da tese.

Os procedimentos foram realizados de forma padronizada com a ponteira laser sempre em contato direto na inclinação de 90 ° em relação ao centro da superfície do tumor, conforme figura 13. Os animais estavam sob anestesia via intraperitoneal (Xilazina 10 mg/Kg e Cetamina 100 mg/Kg) durante todo o processo, afim de diminuir as variáveis no processo de entrega de energia.

Figura 13- Fotobiomodulação nos animais usando a ponteira laser em contato direto com o tumor na inclinação de 90° em relação ao centro da superfície do tumor.

Fonte: Autor da Tese

O total de animais utilizados durante todo o procedimento experimental variou de acordo com o grupo, conforme descrito na tabela 5. No entanto, vale ressaltar que a avaliação dos resultados aconteceu com 5 animais/grupo em todos os grupos experimentais.

Tabela 5- Total de animais utilizados durante todo o período experimental para compor a análise dos resultados com n= 5 animais/grupo.

Grupo	Total de animais	Animais analisados por grupo
²⁴ PBM+RT	9	5
PBM/RT	6	5
PBM _F /RT	7	5
RT+PBM ₂₄	6	5
RT/PBM	8	5
RT/PBM _F	8	5
RT	11	5
Tumor	12	5

Fonte: Autor da Tese.

1.4. Análises Hematológicas

Afim de verificar alguma mudança hematológica, uma vez que os animais foram submetidos ao processo de RT, desenvolvemos um cronograma experimental para análise dos dados hematológicos dos animais semanalmente. As amostras foram analisadas nas semanas 0 (antes da RT), 1 (após término da última sessão de RT), 2, 3 e 4 (após a RT).

Os animais foram imobilizados via anestesia inalatória com isoflurano (2,5 %) e aproximadamente 30 µL de sangue foram colhidos via veia caudal adicionando-se 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio (Na₂-EDTA) a

10 % como anticoagulante. Níveis de leucócitos, eritrócitos e plaquetas (PLQ) foram mensurados em analisador hematológico BC 2800 VET (Mindray, China) no padrão de referência em camundongo em parceria com o Prof. Marcelo Larami do laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantã.

1.4.2. Contagem diferencial- Esfregaço sanguíneo

Com o intuito de diferenciar a população de leucócitos, lâminas com aproximadamente 10 µL de sangue periférico de cada animal no respectivo período experimental foram analisadas. Os esfregaços sanguíneos foram corados com corante pancromático. Para a coloração, 15 gotas do corante Rosenfeld foram adicionadas e mantidas por 90 s, seguida pela adição de 30 gotas de tampão fosfato (NaH_2PO_4 32 mM, Na_2HPO_4 28mM, pH= 6,8) e após 10 min, as lâminas foram lavadas com água e armazenadas até a contagem diferencial.

A contagem diferencial foi realizada em microscópio óptico (NIKON), padronizando-se a região de leitura na segunda metade inferior da lâmina. Para auxílio da contagem, o programa *WBC Counter* foi utilizado totalizando a quantidade final de 100 células.

1.5. Acompanhamento clínico

Com o objetivo de verificar as manifestações clínicas e a resposta tumoral frente ao tratamento, os animais foram acompanhados semanalmente durante todo o período experimental. O volume tumoral e a massa corpórea foram mensurados e pontuações foram atribuídas para os aspectos clínicos apresentado por cada animal do grupo. Os sinais clínicos e sua respectiva pontuação foram adaptados de Fenterner van Vlissingen e colaboradores¹³⁰ e são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Sinais Clínicos observados e suas respectivas pontuações.

Sinal Clínico	Grau	Pontuação
Perda de Massa Corpórea	Não possui	0
	5 %	1
	10 %	5
	20 %	10
Hipocinesia	Atividade Normal	0
	Atividade Reduzida	5
	Inativo	10
Curvatura	Postura Normal	0
	Postura Arqueada	1
Piloereção	Possui	1
	Não possui	0
Necrose tumoral	Possui	1
	Não possui	0
Alteração na Respiração	Possui	1
	Não possui	0

Fonte: Autor da Tese.

Cada grupo apresenta a somatória proveniente de cada animal, portanto dessa forma, quanto maior a pontuação, pior é o estado clínico do animal e consequentemente do grupo no geral. Os dados não são apresentados com nenhum tipo de desvio, pois como supracitado, o valor total refere-se a uma somatória geral do grupo.

1.6. Eutanásia e Necropsia

Os animais foram eutanasiados na semana 5 por meio de excesso de anestésico (60 mg/Kg de Xilazina e 235 mg/Kg de Cetamina). A necropsia e a coleta dos pulmões, tumores e baços foram realizadas. Imagens fotográficas padronizadas foram captadas de cada órgão com o objetivo de comparar os efeitos dos diferentes regimes entre os grupos e a visualização de nódulos. Após a aquisição das imagens, os órgãos foram, então, fixados em solução de formol

tamponado a 10 % por 24 h. Em seguida, o formol foi desprezado e os órgãos foram armazenados em etanol 70 % até a realização do exame macroscópico.

A massa dos órgãos foi aferida com o objetivo de calcular a massa relativa (MR) do tumor como também verificar uma possível relação entre a massa dos pulmões com os sítios de metástases. O cálculo da massa relativa foi realizado utilizando a seguinte fórmula¹³¹:

$$MR (\%) = \frac{\text{massa do tumor}}{\text{massa corpórea}} \times 100 \quad (2)$$

A contagem macroscópica dos nódulos presentes no pulmão foi realizada para cada grupo após a fixação do órgão em formol.

1.7. Análise Estatística

O perfil de distribuição dos dados obtidos foi avaliado através do teste de *Shapiro- Wilk*. Após verificação de normalidade, a análise de variância com dois fatores utilizando o teste *Anova Two-Way* com medidas repetidas foi realizado para os resultados provenientes de volume tumoral, massa corpórea e análises hematológicas. Para as medidas de massa relativa, metástases e massa dos órgãos a análise de variância com um fator utilizando o teste *Anova One-Way* foi utilizado. Para comparação entre as médias dos grupos, o teste de *Tukey* foi efetuado e os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Para os dados de sobrevida o teste de *Kaplan-Meier* foi utilizado. Os dados são apresentados em Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). O programa utilizado para análise dos dados fora o *Origin Pro 8.5*.

2- RESULTADOS

2.1. Volume Tumoral

Conforme descrito anteriormente, os animais foram expostos a 4 sessões de RT e acompanhados durante 3 semanas após esse período. O volume tumoral foi aferido duas vezes na semana e são apresentados nas figuras 14 (PBM pré-RT) e 15 (PBM pós-RT).

Figura 14- Volume Tumoral dos grupos com PBM pré- RT (n=5 animais/grupo). O período destacado refere-se ao período de RT. Os pontos anterior e posterior ao destaque representam um dia antes e depois do tratamento (indicados pela seta), respectivamente. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúscula. O traço a cada dois pontos consecutivos indica o período experimental, por exemplo :semana 2. O intervalo no volume tumoral está entre 1 a 2 cm³.

Fonte: Autor da Tese

O grupo Tumor apresentou aumento significativo no volume tumoral em relação aos demais grupos, independentemente do tratamento a partir da semana 2 e o seu volume final no término da semana 4 foi aproximadamente 3,0 cm³. Os grupos tratados com a PBM adjuvante apresentaram comportamento semelhante ao grupo RT nas primeiras semanas após o tratamento. Contudo, no segundo

momento da semana 3, os grupos começam a apresentar comportamentos distintos rendendo diferenças estatisticamente significantes. Os grupos que possuíam a PBM concomitante antes à RT, independente da energia entregue por sessão, 6 J (PBM/RT) ou 1,5 J (PBM_F/RT), apresentaram redução significativa no volume tumoral em algum momento experimental, entretanto, apenas o grupo com energia fracionada manteve esse comportamento. O grupo com a luz em única exposição (₂₄PBM+RT) mostrou-se abaixo dos valores do grupo RT, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Os valores de volume tumoral para os grupos com PBM pós-RT são apresentados na figura 15.

Figura 15- Volume Tumoral dos grupos com PBM pós- RT (n=5 animais/grupo). O período destacado refere-se ao período de RT. Os pontos anterior e posterior ao destaque representam um dia antes e depois do tratamento (indicados pela seta), respectivamente. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúscula. O traço a cada dois pontos consecutivos indica o período experimental, por exemplo: semana 2. O intervalo no volume tumoral está entre 1 a 2 cm³.

Fonte: Autor da Tese.

A partir do primeiro momento da semana 2 todos os grupos expostos à PBM apresentaram volume tumoral significativamente menor que o grupo Tumor. Esse comportamento só foi evidenciado para o grupo RT a partir do segundo

momento desse mesmo período experimental. No segundo momento da semana 3 foram observadas diferenças estatisticamente significantes dos grupos com PBM concomitante, independente da energia em relação ao grupo RT e esse comportamento manteve-se até o final do período experimental analisado. O grupo com exposição única (RT+PBM₂₄) apresentou volume tumoral similar ao grupo RT. Contudo, no primeiro momento da semana 4, o grupo apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo RT e no segundo momento desse mesmo período apresentou diferença estatística em relação ao grupo RT/PBM. O grupo RT teve o volume no final da semana 4 em aproximadamente 1 cm³ e como mencionado, estatisticamente inferior ao grupo Tumor.

2.1.2- Área sob a curva

Para verificar diferenças intergrupos na evolução do tumor, a área sob a curva foi calculada integrando os valores a partir do segundo momento da semana 3, conforme apresentado nas figuras 16 e 17 para os regimes associando a PBM antes e após a RT, respectivamente.

Figura 16- Valores da área sob a curva dos grupos experimentais com PBM antes da RT a partir do segundo momento da semana 3. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúsculo.

Todos os grupos experimentais apresentaram área significativamente menor quando comparada ao grupo Tumor. Entre os grupos experimentais, o grupo que apresentou menor área foi o grupo PBM/RT, indicando menor evolução do tumor durante o período experimental. Contudo, nenhuma diferença estatística foi observada quando comparado aos outros grupos e em relação ao grupo RT.

Figura 17- Valores da área sob a curva dos grupos experimentais com PBM após a RT a partir do segundo momento da semana 3. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo em maiúsculo.

Fonte: Autor da Tese

Os grupos com a PBM concomitante apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo RT independente da energia entregue por sessão. De fato, a área sob a curva dos grupos RT/PBM e RT/PBMF mostraram-se em média, 2 vezes menores que o grupo RT. Já a área do grupo RT+PBM₂₄, embora não tenha apresentado valor significativamente estatístico, foi menor quando comparado ao grupo RT. O grupo Tumor apresentou valores estatisticamente significantes maiores que todos os outros grupos experimentais, corroborando com os dados obtidos no volume tumoral experimental. O valor da área sob a curva para esse grupo foi aproximadamente 3 vezes maior que o grupo RT e 5 vezes mais que os grupos com PBM concomitante.

2.2. Massa

Quando um paciente é submetido ao tratamento radioterápico, os efeitos colaterais podem acometer as suas condições físicas e indicar uma redução na massa corpórea, esse resultado também é esperado para os animais¹³². Desse modo, nós acompanhamos a evolução da massa corpórea dos animais durante o período experimental. Os dados são apresentados nas Figuras 18 e 19 para os regimes com pré e pós-RT, respectivamente.

Figura 18- Massa corpórea antes do tratamento, 1 dia após o término do processo radioterápico e durante o acompanhamento experimental para todos os grupos experientais com PBM antes da RT e controle negativo. O intervalo na escala do eixo y está entre 7 a 21 g.

Fonte: Autor da Tese

Pode-se observar da figura 18 que no período pós-RT, os animais apresentaram redução na massa corporal. De fato, o grupo PBM_F/RT ficou próximo ao intervalo de 20 g e nas semanas seguintes todos os grupos experimentais expostos à RT mantiveram seus valores próximos aos valores do controle negativo da respectiva semana. O grupo Tumor a partir da semana 3 apresentou valores superiores aos valores do grupo controle negativo, no entanto, sem significância

estatística. Os valores para os grupos experimentais com PBM pós-RT são apresentados a seguir.

Figura 19- Massa corpórea antes do tratamento, 1 dia após o término do processo radioterápico e durante o acompanhamento experimental para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT e controle negativo. O intervalo na escala do eixo y está entre 7 a 21 g.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos experimentais se mantiveram próximos aos valores do grupo controle negativo, exceto os grupos com PBM concomitante à RT no pós-RT, que mostraram redução de aproximadamente 5 % da massa. No entanto, no decorrer do período experimental houve alteração desses valores e os mesmos equiparam-se com os valores do controle negativo da respectiva semana experimental. Com o desenvolvimento do volume tumoral, a massa corpórea dos animais, em geral, apresenta aumento dentro do intervalo de referência entre as semanas 3 e 4. O grupo RT+PBM₂₄ em geral, apresentou valores de massa maiores quando comparados ao grupo controle negativo a partir da semana 3, contudo, diferenças estatisticamente significantes não foram noticiadas.

Analisando temporalmente cada grupo, podemos destacar que os grupos associados à PBM apresentaram massa corpórea final maior que a inicial com aumento de aproximadamente 5 % do valor pré-RT. Em contraste, o grupo RT

que reduziu em média 3 % da massa corpórea quando comparado ao valor pré-RT. Já o grupo Tumor, que apresentou o maior volume tumoral, apresentou durante o período experimental analisado um ganho médio de 14 % na massa corpórea.

2.2.2. Massa Relativa

Considerando que o tumor é um constituinte da massa corpórea do animal e que, conseqüentemente, a sua evolução em dimensões físicas pode impactar diretamente nos valores obtidos na balança, quando o tumor alcançou o volume inicial de 0,1 cm³ e ao final do experimento foi calculado o valor relativo da massa do tumor com a massa corpórea dos animais, como apresentado na figura 20 para a PBM antes da RT.

Figura 20- Massa relativa para todos os grupos experimentais com PBM antes da RT antes do início do protocolo (0,1 cm³) e no término do período experimental para os grupos com PBM antes da RT.

Fonte: Autor da Tese

A MR no início do protocolo experimental, quando o animal possui o volume tumoral de aproximadamente 0,1 cm³ representa em média 0,5 % da sua massa corpórea, sendo esse valor estatisticamente diferente de todos os demais grupos experimentais ao final do experimento. De fato, é possível observar que o tumor do grupo RT representa em média 9 % da massa corpórea dos animais,

enquanto que os grupos com PBM apresentaram valores médios entre 6 % e 7 % do tumor como constituinte da massa corporal. O grupo PBM/RT apresentou o menor valor de MR com apenas 4 % do tumor em relação a massa corpórea e juntamente com o grupo PBM_F/RT apresentaram redução significativa em relação ao grupo Tumor.

Os valores de MR para os grupos com PBM após a RT são apresentados na figura 21.

Figura 21- Massa relativa para todos os grupos experimentais com PBM após a RT antes do início do protocolo (0,1 cm³) e no término do período experimental.

Fonte: Autor da Tese.

Os grupos com a PBM após a RT apresentaram valores semelhantes entre si e em relação ao grupo RT. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo RT. Em relação ao grupo Tumor, todos os grupos tratados com PBM apresentaram MR significativamente menor em aproximadamente 50 %. Os grupos experimentais RT e Tumor não apresentaram diferença estatisticamente significativa, porém nota-se que o grupo RT é em média 1,6 vezes menor.

2.3. Análises Hematológicas

Durante o tratamento do câncer utilizando RI os pacientes são submetidos semanalmente a hemogramas com o objetivo de verificar alterações, como também avaliar a progressão do tratamento, uma vez que o tecido hematopoiético é sensível à RI¹³³.

2.3.1. Eritrócitos

As células da série vermelha possuem basicamente a função de transportar oxigênio e carregar nutrientes. Um *déficit* nos seus valores pode indicar anemia e, conseqüentemente, efeitos nas condições físicas do paciente¹³⁴. Os valores de eritrócitos foram monitorados antes do início do tratamento (semana 0) e nas subsequentes até o término do período experimental, conforme nas figuras 22 e 23 para os regimes com PBM na pré e pós exposição à RT.

Figura 22- Contagem total eritrócitos para os grupos com PBM pré-RT antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM antes da RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Os níveis de eritrócitos decaem após a finalização do processo radioterápico; todos os grupos experimentais expostos à RI apresentaram queda

acentuada em relação ao controle negativo a partir da semana 2. De fato, nesse período é possível verificar que os grupos $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$ e $\text{PBM}_\text{F}/\text{RT}$ estão aproximadamente 40 % e 30 %, respectivamente, abaixo do intervalo inferior de referência. A partir da semana 3, os valores de eritrócitos dos grupos $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$ e $\text{PBM}_\text{F}/\text{RT}$ apresentam um ligeiro aumento, embora ainda continuem abaixo do intervalo inferior de referência, enquanto que o grupo RT mostra ligeira queda. Se analisarmos o grupo RT temporalmente, o nível de eritrócito caiu em média 30 %, enquanto que para os grupos $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$, PBM/RT e $\text{PBM}_\text{F}/\text{RT}$ foram em média, 27 %, 21 % e 22 %, respectivamente.

O grupo Tumor, embora não tenha sofrido nenhuma exposição à RI, apresentou redução na expressão de tais células, com níveis próximos ou abaixo do limite inferior do intervalo de referência. Os valores para os grupos PBM após a RT são apresentados na figura 23.

Figura 23- Contagem total de eritrócitos para os grupos com a PBM pós-RT antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos experimentais com exposição à RI apresentaram queda nos níveis de eritrócito na semana 1, exceto o grupo RT/PBM que se mantém dentro do intervalo de referência. Na semana 2 é observada a maior queda

dos níveis de eritrócitos. Todos os grupos tratados possuem valores semelhantes entre si e fora do intervalo de referência em aproximadamente 20 %. Nas semanas 3 e 4 os valores aumentam, contudo, permanecem abaixo do intervalo de referência.

Analisando temporalmente os grupos, observa-se que o grupo RT/PBM se mantém com comportamento similar a partir da semana 2. De fato, na semana 2, o valor encontrado para grupo é de $8,64 \pm 0,39 \times 10^{12}/L$ e na semana 4 de $8,01 \pm 1,26 \times 10^{12}/L$. O grupo com única exposição à PBM apresenta valores similares desde a semana 1, reduzindo apenas 1 % na semana 4 quando comparado a semana 1. O grupo RT/PBM decai o número total de eritrócitos entre as semanas 1 e 2 em aproximadamente 24 % e na semana 4 apresenta valor inferior ao inicial, em 15 %.

A quantificação do Volume Corpuscular Médio (VCM) e a Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (RDW) experimentais também foram aferidos e são apresentados na figura 24 para os grupos com a PBM pré-RT.

Figura 24- Quantificação do Volume Corpuscular Médio (A) e Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com a PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Os valores experimentais de VCM para todos os grupos experimentais estão dentro do intervalo de referência, exceto alguns momentos pontuais, tais como o grupo $_{24}PBM+RT$, que nas semanas 1 e 2 apresenta-se abaixo do limite inferior e o grupo RT com o mesmo comportamento na semana 1. Um fato a ser destacado seria na semana 3 em que todos os grupos expostos à RT apresentam valores próximos ao limite superior do intervalo, independentemente de ter ou não

exposição à PBM. O grupo Tumor possui valores semelhantes ao longo do período experimental. Apenas na semana 4 o MVC apresenta-se abaixo do limite inferior da referência.

Em relação aos valores experimentais de RDW é possível identificar que nas semanas 1 e 2 os grupos experimentais com RT apresentam-se próximos ao limite inferior do intervalo, no entanto, nas semanas experimentais seguintes os valores ficam dentro do intervalo com proximidade ao limite superior. Um comportamento a ser destacado seria que o grupo PBM/RT alcança os níveis de referência antes dos demais grupos tratados. De fato, na semana 2 a sua expressão é de $16,32 \pm 0,58$ % enquanto que os demais, incluindo o grupo RT, apresentam em média 14,5 %.

Os valores de VCM e RDW para os grupos com PBM pós-RT são apresentados na figura 25.

Figura 25- Quantificação do Volume Corpuscular Médio (A) e Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Em relação ao VCM é possível observar que os grupos experimentais mantêm os seus valores abaixo ou no limite inferior do intervalo de referência durante todo o período experimental. Algumas exceções são observadas, como no grupo experimental RT/PBM_F. Os seus valores são superiores aos demais grupos e está sempre dentro do intervalo de referência, exceto na semana 2. O grupo RT/PBM mantém seus valores praticamente constantes e sempre muito próximo ao limite inferior do intervalo de referência.

Para os valores de RDW, o grupo com PBM fracionado apresenta valores dentro do intervalo de referência, exceto na semana 2, sendo o grupo tratado que mantém o maior valor de RDW durante o período experimental. O grupo RT+PBM₂₄ possui comportamento crescente a partir da semana 1 e na semana 4 expressa valores acima do intervalo de referência. Já o grupo RT/PBM possui expressão praticamente constante entre as semanas 0 e 2 e, após esse período, aumenta os níveis em aproximadamente 24 %. O grupo RT decresce seu valor entre as semanas 2 e 3, aumenta no final do período experimental igualando-se aos demais grupos com associação à PBM. O grupo Tumor mostrou valores semelhantes ao longo do período experimental e em nenhum momento esteve abaixo dos valores de referência.

2.3.2. Hemoglobina

A Hemoglobina é constituinte da série vermelha do sangue e alterações nos seus níveis podem indicar anemia ferropriva, por exemplo. Os valores experimentais são descritos na figura 26 para os grupos experimentais com pré-exposição a PBM e na figura 27 na pós-exposição à RT.

Figura 26- Quantificação de Hemoglobina antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Na semana 2, os grupos tratados apresentaram valores abaixo do intervalo de referência, apresentando diferença em relação ao grupo Tumor. Na semana 4, esses grupos aproximam-se dos valores de referência, com exceção do grupo RT que se manteve praticamente igual a partir da semana 2. Analisando temporalmente os grupos, é possível verificar que o grupo RT decaiu aproximadamente 25 % do seu valor inicial, enquanto que os grupos com PBM concomitante, independente da energia entregue, diminuíram aproximadamente 10 % dos seus valores iniciais de hemoglobina. Embora o grupo $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$ tenha apresentado uma redução de 20 % em relação ao seu valor inicial e estar próximo do grupo RT, o seu comportamento foi diferente, pois no decorrer do período experimental o nível de hemoglobina aumentou, enquanto que no grupo RT esse comportamento não foi observado. O grupo Tumor apresentou nas semanas 1 e 4 valores abaixo do limite inferior do intervalo de referência. Os valores de hemoglobina para os grupos experimentais com PBM após a RT são apresentados a seguir.

Figura 27- Quantificação de Hemoglobina antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Após a semana 1 observa-se redução dos níveis de hemoglobina para os grupos experimentais expostos à RI. De fato, os grupos RT+PBM₂₄ e RT/PBM_F, já na semana 1, apresentam redução de aproximadamente 25 % em relação aos valores iniciais da semana 0. Na semana 2, todos os grupos se apresentam abaixo dos valores de referência, mantendo níveis próximos a 12 g/dL. Nas semanas 3 e 4, os grupos associados à PBM apresentam retomada dos níveis de hemoglobina enquanto que o grupo RT apresenta valores de aproximadamente 12 g/dL desde a semana 2.

Com o intuito de verificar mais sobre as características da distribuição e/ou concentração da hemoglobina, analisamos o seu perfil de concentração e a média corpuscular, os quais são descritos nas figuras 28 e 29 para ambos os regimes, respectivamente.

Figura 28- Quantidades de Hemoglobina Corpuscular Média (A) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

A HCM está dentro do intervalo de referência, com exceção da semana 2, na qual os grupos tratados estão abaixo do limite inferior. Na semana 4, todos os grupos estão acima do intervalo de referência, exceto o grupo PBM/RT que se enquadra dentro do mesmo. O grupo Tumor se manteve dentro do intervalo durante todos os dias experimentais.

Em relação à CHCM, todos os grupos experimentais estão dentro do intervalo de referência, exceto no último período experimental analisado, onde os

grupos excedem o intervalo de referência. Os valores para os grupos experimentais com a PBM pós-RT são apresentados a seguir.

Figura 29- Quantidades de Hemoglobina Corpuscular Média (A) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Os níveis de HCM permanecem semelhantes para todos os grupos durante o período experimental. Na semana 2, os grupos RT+PBM₂₄, RT/PBM apresentam valores abaixo do limite inferior do intervalo de referência. No entanto, nas semanas 3 e 4 os valores experimentais estão dentro ou acima do intervalo de referência do controle negativo. De fato, na semana 3 os grupos RT+PBM₂₄, RT/PBM_F e RT apresentam valores superiores em aproximadamente 7 % do intervalo de referência. Esse comportamento se mantém apenas para os grupos RT/PBM_F e RT na semana 4.

Durante todo o período experimental, nenhum grupo apresentou valores abaixo do intervalo de referência para CHCM, mesmo na semana 2, onde há menor concentração dos níveis individuais de eritrócitos, conforme na figura 29. Na semana 4 observa-se que todos os grupos apresentam níveis acima do valor de referência, com destaque para o grupo RT, que mostrou níveis de CHCM 13%.

2.3.3. Hematócrito

O hematócrito indica a porcentagem de células vermelhas no volume total de sangue e os seus resultados, assim como a hemoglobina, auxiliam no diagnóstico de eventuais desordens, tais como anemias. Os níveis experimentais

para os grupos experimentais para ambos os regimes são apresentados nas figuras 30 e 31, respectivamente.

Figura 30 Porcentagem de hematócrito antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

A menor expressão de hematócritos é apresentada na semana 2, onde todos os grupos tratados independentemente da PBM estão abaixo do limite inferior do intervalo de referência do controle negativo. De fato, o grupo ²⁴PBM+RT apresentou redução de 47 % dos níveis em relação ao controle negativo e o grupo RT 27 %. No decorrer do período experimental é possível verificar retomada dos níveis, embora ainda estejam fora do intervalo de referência. Tal afirmação pode ser observada na semana 4, onde o grupo ²⁴PBM+RT anteriormente citado está 26 % abaixo do limite inferior dos valores referenciais. Ainda nesse tempo experimental é possível constatar que o grupo RT diminui os seus níveis enquanto os grupos com PBM aumentam. De fato, o grupo PBM_F/RT apresenta $49,84 \pm 2,88$ % de hematócritos enquanto o grupo RT expressa $39 \pm 4,48$ %.

Analisando temporalmente cada grupo é verificado que a redução de hematócrito para os grupos ²⁴PBM+RT, PBM/RT e PBM_F/RT foram de

aproximadamente 43 %, 17 % e 15 %, respectivamente enquanto que o grupo RT reduziu temporalmente 44 %. O grupo Tumor apresentou valores abaixo do intervalo de referência a partir da semana 1, correspondendo a uma redução temporal de aproximadamente 24 %. Os valores para os grupos experimentais com PBM pós-RT são apresentados na figura 31.

Figura 31- Porcentagem de hematócrito antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós- RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

A partir da semana 1 todos os grupos experimentais apresentam valores abaixo do intervalo de referência do controle negativo. Na semana 2, todos os grupos expostos à RI apresentam valores mais baixos de hematócrito. De fato, os grupos associados à PBM estão abaixo do intervalo inferior de referência em aproximadamente 33 %. Após esse período, os grupos tendem a aumentar os níveis de hematócrito, comportamento não observado para o grupo RT. Na semana 4, os grupos associados à PBM, independente da energia entregue, apresentam valores de hematócrito em torno de 49 % e o grupo RT apresenta em média 39 %.

Analisando temporalmente os grupos, é possível verificar que o grupo com menor redução de hematócrito em relação à semana 0 seria o grupo

RT+PBM₂₄ com 17 % e o com maior redução seria o grupo RT com 36 %. Os grupos RT/PBM e RT/PBM_F reduziram, aproximadamente, 21 % e 34 %, respectivamente. O grupo Tumor apresenta valores semelhantes e abaixo do intervalo de referência durante todo o período experimental, entretanto, na semana 4, a redução é mais acentuada com o nível de hematócrito em aproximadamente 19 % abaixo do limite inferior do intervalo.

2.3.4 Plaquetas (PLQ)

As plaquetas têm como principal função participar do processo de homeostasia do sangue e sua produção também está na medula óssea e particularmente no câncer há estudos que indicam a capacidade das mesmas em transportar as células cancerígenas e ativar mais brevemente o processo de metástase.¹³⁵ Os níveis experimentais para todos os grupos experimentais para ambos os regimes estão presentes nas figuras 32 e 33, respectivamente.

Figura 32- Expressão dos níveis de plaquetas antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

A contagem de plaquetas reduz para todos os grupos a partir da semana 1, no entanto, na semana 2 é onde se tem os menores e significantes valores em relação ao intervalo de referência. Nesse mesmo período experimental é possível observar uma redução de aproximadamente 90 % dos níveis plaquetários para todos os grupos expostos à RI. Essa redução coincide com as acentuadas reduções nos níveis de eritrócitos descritos no subitem 2.3. Nas semanas seguintes, os grupos experimentais aumentam os seus níveis, porém ainda estão abaixo do limite inferior do intervalo de referência.

Analisando temporalmente os grupos tratados é possível verificar que que os grupos associados à PBM antes da RT, os quais são: ${}_{24}\text{PBM}+\text{RT}$, PBM/RT e PBM_F/RT , apresentaram redução na contagem de plaquetas de aproximadamente 60 %, 57 % e 42 %, respectivamente, enquanto que o grupo RT reduziu em relação ao seu inicial aproximadamente 40 %. A figura a seguir mostra os dados plaquetários para os grupos com a PBM associada após à RT.

Figura 33- Expressão dos níveis de plaquetas antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos experimentais com PBM pós-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

A partir da semana 2 nota-se que todos os grupos experimentais expostos à RI apresentam redução expressiva na contagem de plaquetas em relação ao intervalo de referência. De fato, todos os grupos experimentais com RT apresentam em média $110 \times 10^9/L$ plaquetas, representando uma redução em relação ao limite inferior do intervalo de aproximadamente 98 %. Na semana 3, os grupos tendem a aumentar o número de plaquetas, no entanto, os valores ainda se mantêm abaixo do valor mínimo do intervalo de referência. Esse comportamento também é noticiado na semana 4.

Analisando temporalmente os grupos experimentais, o grupo com maior redução na contagem de plaquetas em comparação a semana 0 seria: RT/PBM_F com 50 %. Em oposto, os grupos com menor redução da contagem de PLQ foram: RT+PBM₂₄ e RT/PBM com 29 % e 37 %, respectivamente. O grupo Tumor, embora não tenha sofrido exposição à RI, apresentou valores abaixo do intervalo de referência e redução de 32 % em relação aos valores iniciais descritos na semana 0.

2.3.5. Volume e Tamanho Plaquetários

O Volume Plaquetário Médio (VPM) e o índice que avalia a variação de tamanho entre as plaquetas (PDW) foram aferidos e analisados para todos os grupos experimentais e são apresentados na figura 34 para os grupos com PBM antes da RT e na figura 35 para os grupos com PBM pós-RT.

Figura 34- Quantificação de VPM (A) e PDW (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pré-RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Os valores de VPM permaneceram dentro do intervalo de referência para todos os grupos independente do período experimental. Nas semanas 2 e 3 é possível verificar um aumento de aproximadamente 12 % nos valores de VPM para todos os grupos tratados com RT. Já na semana 4 esses mesmos grupos retornam aos valores próximos aos iniciais.

Em relação aos dados experimentais de PDW, nas semanas 2 e 3 é observado um aumento de aproximadamente 10 % dos valores para os grupos com RT. Durante todo o período experimental os valores expressos pelos grupos permaneceram dentro do intervalo de referência. O comportamento dos grupos com PBM não diferem entre si como em relação ao grupo RT. O grupo Tumor se manteve constante e dentro do intervalo de referência durante todo o período experimental.

Figura 35- Quantificação de VPM (A) e PDW (B) antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós- RT. O intervalo em destaque refere-se aos níveis de referência do controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos experimentais se mantiveram dentro do intervalo de referência, exceto os grupos RT+PBM₂₄ e RT/PBM na semana 0, onde ambos estão aproximadamente 2 % abaixo do limite inferior do referencial. No entanto, esses grupos apresentam crescimento e a partir da semana 2, os seus valores estão próximos do limite superior. Analisando temporalmente o grupo RT/PBM_F, os valores de VPM foram praticamente semelhantes durante todo o período experimental, apresentando em média 6,5 fL de VPM. O grupo RT aumenta gradativamente o número de VPM entre as semanas 0 e 3, entretanto, na semana 4 observa-se uma redução de aproximadamente 6 % em relação a semana 2, que

foi o pico de sua concentração ($6,8 \pm 0,1$ fL). O grupo Tumor apresenta comportamento e valores semelhantes ao grupo RT durante todo o período experimental.

Em relação aos valores de PDW, no geral, os grupos mantêm os valores dentro do intervalo de referência durante todo o período experimental.

2.3.6. Leucócitos

O acompanhamento dos valores da série branca é um procedimento de rotina durante o tratamento radioterápico, pois através dos seus níveis é possível monitorar a evolução do tratamento. Os valores aferidos durante o período experimental para a fração de células brancas são apresentados na Figura 36 para os grupos experimentais com PBM pré-RT.

Figura 36- Contagem de leucócitos antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pré-RT e controle negativo. A pausa na escala na quantidade de leucócitos está entre o intervalo de 25 a 100 leucócitos ($\times 10^9/L$).

Fonte: Autor da Tese.

Os nossos valores experimentais apresentam níveis mais baixos de leucócitos na semana 2 com valores abaixo dos valores do grupo controle negativo, corroborando com os menores níveis de eritrócitos e PLQ no mesmo período. A partir da semana 3, os níveis de leucócitos aumentaram para os grupos tratados em relação ao controle negativo e na semana 4 esse comportamento se mantém. Analisando temporalmente os grupos tratados com RT, independentemente da PBM é possível verificar que os níveis de leucócitos aumentaram aproximadamente 16 X sobre o valor inicial. No entanto, se compararmos o crescimento entre as semanas 3 e 4, onde ocorre os maiores valores de leucócitos, observa-se que os grupos associados com a PBM aumentaram cerca de 4 X enquanto que o grupo RT triplica. Embora as proporções de aumento dos grupos com PBM tenham sido maiores quando comparadas ao grupo RT, os grupos com exposição concomitante apresentam valores abaixo do grupo RT.

O grupo Tumor apresenta maiores valores em relação ao grupo controle negativo a partir da semana 2 e no último período experimental analisado os seus valores se equiparam com o grupo RT.

Os valores de leucócitos para os grupos com PBM pós-RT são apresentados na figura 37.

Figura 37- Contagem de leucócitos antes do início do protocolo radioterápico (semana 0), após (semana 1) e durante o acompanhamento experimental para os grupos com PBM pós-RT e controle negativo. A pausa na escala na quantidade de leucócitos está entre o intervalo de 25 a 100 leucócitos ($\times 10^9/L$).

Fonte: Autor da Tese.

Nas semanas 1 e 2, os leucócitos estão abaixo dos valores do grupo controle negativo para todos os grupos experimentais expostos à RT. No entanto, na semana 2 observa-se uma acentuada redução dos níveis de leucócitos. De fato, todos os grupos tratados apresentam comportamento semelhantes, entretanto, o grupo RT/PBM_F mostra $0,84 \pm 0,13 \times 10^9/L$ de leucócitos enquanto o grupo RT apresenta $2,18 \pm 1,01 \times 10^9/L$.

Na semana 3, os grupos apresentam acentuado aumento de leucócitos ultrapassando os valores de referência do grupo controle negativo, porém, alguns pontos podem ser destacados. O grupo RT/PBM, mostra $32,22 \pm 6,80 \times 10^9/L$ de leucócitos, e os demais grupos tratados, apresentam em média $80,0 \times 10^9/L$. Na semana 4, os níveis de leucócitos aumentam consideravelmente para todos os grupos, apresentando valor médio de $220 \times 10^9/L$.

Analisando temporalmente os grupos a partir da semana 1, podemos verificar que os grupos associados à PBM apresentaram um aumento na concentração de leucócitos entre as semanas 1 e 4 de aproximadamente 45 % e o

grupo RT apresentou 38 %. Contudo, se analisarmos pontualmente os grupos nota-se que os níveis do grupo RT sempre foram maiores que os demais grupos associados à PBM. De fato, na semana 4, o grupo RT/PBM_F mostra $178,02 \pm 44,20 \times 10^9/L$ e o grupo RT, $244,3 \pm 8,23 \times 10^9/L$ de leucócitos.

2.3.7. Contagem diferencial

A contagem diferencial foi realizada na semana 0 onde os animais não foram expostos ao tratamento, no entanto possuíam tumor, nas semanas 2 e 4, onde foram apresentados os menores e maiores valores, respectivamente, da fração total de leucócitos. Os linfócitos, neutrófilos, células precursoras de neutrófilos e monócitos foram diferenciados na contagem total de 100 células. Os valores absolutos são apresentados para os grupos com PBM pré-RT na figura 38.

Figura 38- Contagem absoluta (n= 3 lâminas/grupo) de linfócitos (A), monócitos (B), células precursoras de neutrófilos (C) e neutrófilos (D), antes do início do protocolo experimental (semana 0), 7 dias após o término do protocolo (semana 2) e no último período experimental analisado (semana 4) para os grupos com PBM pré-RT e controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Na semana 0 apenas os grupos Tumor e Sadio são representados, pois nesse período experimental todos os grupos possuíam apenas o tumor sem nenhuma intervenção da RT ou PBM. Nesse momento os monócitos representam aproximadamente 40 % e 35 %, os linfócitos 30 % e 27 % seguidos de 25 % e 27 % de neutrófilos, respectivamente da fração de leucócitos.

A figura 39 ilustra esfregaços de sangue para os animais do grupo sadio e Tumor antes dos experimentos.

Figura 39- Fotomiografia das lâminas provenientes do esfregaço sanguíneo dos grupos: Sadio e Tumor antes do início do protocolo experimental (semana 0). A seta aponta para um agregado plaquetário.

Fonte: Autor da Tese.

Na semana 2, que se refere aos menores níveis de leucócitos, podemos observar que os perfis de distribuição dos grupos diferenciam. De fato, analisando individualmente os grupos, verificamos que o grupo $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$ apresenta maior número de linfócitos, com aproximadamente 30 %, enquanto os demais grupos tratados apresentam em média 19 %. Em relação aos monócitos, o grupo supracitado tem a menor expressão com 47 %, enquanto os demais grupos tratados apresentam aproximadamente 50 %. Para neutrófilos, os grupos PBM/RT e PBM_F/RT apresentam aproximadamente 20 %, o grupo $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$ apresenta 27 % e o grupo RT com 30 %. Em relação ao grupo Tumor, há uma evidente concentração de linfócitos com aproximadamente 65 %, enquanto as expressões de monócitos e neutrófilos apresentaram em média 18 %. A figura 40 apresenta imagens do mesmo campo para todos os grupos experimentais no período experimental citado.

Figura 40- Fotomicrografias de esfregaço do sangue para todos os grupos experimentais com PBM pré-RT na semana 2. A seta indica plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas.

Fonte: Autor da Tese.

Durante a semana 2, a ausência de plaquetas bem como de células da série branca dificultou a contagem celular para os grupos experimentais expostos à RT independente da PBM. No grupo Tumor é possível observar um agregado plaquetário bem como células estouradas. Essas características refletem nos dados obtidos e apresentados anteriormente.

Na semana 4, todos os grupos apresentaram elevados níveis de leucócitos, que diferenciaram em maiores quantidades de neutrófilos e monócitos, com aproximadamente 50 % e 35 %, respectivamente. Analisando individualmente os grupos experimentais, o grupo PBM/RT apresenta a maior quantidade de monócitos com 41 % e os grupos 24 PBM+RT e RT com 30 %. Em relação aos neutrófilos, o comportamento diferencia para o grupo 24 PBM+RT, que apresenta 53 %, e os grupos PBM/RT e RT apresentam os menores valores, com aproximadamente 34 % e 49 %, respectivamente. O grupo Tumor apresenta o mesmo comportamento, maior quantidade de neutrófilos e monócitos. A figura 41 apresenta imagens do mesmo campo para todos os grupos experimentais neste momento experimental.

Figura 41-Fotomicrografias de esfregaço do sangue para todos os grupos experimentais com PBM pré-RT na semana 4. A seta indica plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas,

Fonte: Autor da Tese.

Durante a semana 4, a contagem celular foi rápida até atingir a quantidade final de 100 células. No campo definido havia elevada quantidade de células e foi possível identificar muitas células estouradas bem como uma quantidade maior de plaquetas em relação ao período experimental anterior. O grupo sadio apresentou maior concentração plaquetária e os grupos RT e Tumor apresentaram a maior quantidade de células estouradas no campo em relação aos demais grupos.

Os dados provenientes da contagem diferencial para os grupos que tiveram a PBM associada pós-RT são apresentadas a partir da figura 42

Figura 42- Contagem absoluta (n= 3 lâminas/grupo) de linfócitos (A), monócitos (B), células precursoras de neutrófilos (C) e neutrófilos (D), antes do início do protocolo experimental (semana 0), 7 dias após o término do protocolo (semana 2) e no último período experimental analisado (semana 4) para os grupos com PBM pós-RT e controle negativo.

Fonte: Autor da Tese.

Na semana 2, que se refere aos menores valores totais de leucócitos, podemos observar que os perfis de distribuição dos grupos associados à PBM diferenciam-se do grupo RT. De fato, verificamos que os grupos associados à PBM apresentam maior número de monócitos com aproximadamente 55 % enquanto o grupo RT apresenta 50 %. Em relação ao número de células precursoras de neutrófilos, os grupos com PBM apresentam valor médio de 5,6 % e o grupo RT em média de 1 %. Em contraste, de acordo com a figura 42 (D), o grupo RT mostra nível de neutrófilos aproximado de 30 %, enquanto que os demais grupos apresentam, em média, 18 % de neutrófilos da fração de leucócitos.

Durante a semana 2, pouquíssimas células foram observadas dentro do campo definido para contagem, bem como constatou-se a ausência de plaquetas, exceto para o grupo Tumor. Em relação ao grupo Tumor, há uma evidente concentração de linfócitos (aproximadamente 65 %) enquanto que os níveis de monócitos e neutrófilos apresentaram média de 18 %. Algumas particularidades

podem ser destacadas nesse período. Embora os grupos tratados com PBM possam apresentar comportamento semelhante, o grupo com PBM concomitante apresentou menor concentração de linfócitos e monócitos (aproximadamente 20 % e 38 %, respectivamente). A figura 43 ilustra nossos achados.

Figura 43- Fotomicrografia de esfregaço de sangue para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT na semana 2. A seta aponta para um agregado de plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas.

Fonte: Autor da Tese.

Na semana 4, todos os grupos tratados apresentaram elevadas concentrações de leucócitos, sendo diferenciada em maiores proporções de neutrófilos e monócitos, com aproximadamente 50 % e 35 %, respectivamente. O grupo Tumor apresenta o mesmo comportamento que os demais grupos tratados, maior quantidade de neutrófilos e monócitos. A figura 44 apresenta imagens dos grupos experimentais no mesmo campo de contagem.

Figura 44- Fotomiografia de esfregaço de sangue para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT na semana 4. A seta indica plaquetas e o asterisco sinaliza possíveis células estouradas.

Fonte: Autor da Tese.

Durante a semana 4, a contagem celular foi rápida até atingir a quantidade final de 100 células. No campo definido havia elevada quantidade de células e foi possível identificar agregados plaquetários, conforme a seta indica no grupo Sadio na figura acima. Os grupos RT e Tumor apresentaram uma grande quantidade de células que, possivelmente, estão estouradas, representadas pelo asterisco na figura acima.

2.3.8. Relação Neutrófilo/Linfócito (NLR)

A relação neutrófilo/linfócito é um indicativo para avaliação da progressão tumoral. Os dados experimentais para as semanas 2 e 4 para os grupos com PBM pré-RT são apresentados na figura 45.

Figura 45- Relação Neutrófilo/ Linfócito (NLR) para os grupos experimentais com PBM pré-RT e controle negativo (n=3/grupo) nas semanas 2 e 4. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo maiúsculo.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos apresentaram aumento estatisticamente significativo na NLR na semana 4 quando comparado a semana 2. No entanto, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais na semana 4, porém nesse período, os grupos que apresentaram maior razão foram: ²⁴PBM+RT e PBM_F/RT e o grupo com menor razão foi o grupo controle negativo que noticiou diferença estatisticamente sigificante em relação ao grupo RT.

Os dados equivalentes para NLR para os grupos experimentais com PBM pós-RT são apresentados na figura 46.

Figura 46- Relação Neutrófilo/ Linfócito (NLR) para os grupos experimentais com PBM pós-RT e controle negativo (n=3/grupo) nas semanas 2 e 4. Letras minúsculas representam diferença estatisticamente significativa em relação ao seu respectivo maiúsculo.

Fonte: Autor da Tese.

A razão entre neutrófilos e linfócitos aumentou estatisticamente para todos os grupos experimentais na semana 4 em relação aos valores da semana 2. Nesse período, o grupo RT/PBM apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Tumor, com aumento de aproximadamente 100 x, e em relação ao grupo RT, em aproximadamente 5 x. Foram evidenciadas diferenças intergrupos, pois os grupos RT+PBM₂₄ e RT/PBM_F apresentaram redução de aproximadamente 2,5 e 3,5 vezes, respectivamente, em relação ao grupo RT/PBM na semana 4. O grupo RT apresentou valor aproximadamente 20 vezes maior em relação ao grupo Tumor nesse mesmo período experimental, rendendo diferença estatisticamente significativa.

2.4. Aspectos Clínicos

O estado clínico do animal pode representar diretamente as suas condições de saúde¹³⁰ e pontuações atribuídas aos seus sinais clínicos é de grande importância para a evolução do tratamento. Para minimizar erros sugestivos, fotos dos animais foram retiradas para observar a curvatura, piloereção e necrose tumoral. Essas fotos foram direcionadas a mais de um observador que inicialmente estava fora do experimento, mas com o decorrer da experimentação adquiriu

treinamento. A coleta de dados foi realizada por ambos os observadores e após comparado os resultados. Os critérios para análise de piloereção e inclinação foram instituídos como: o pelo deveria ser no mínimo 30° em relação a um animal do controle negativo para a piloereção. Já para a hipocinesia, o animal era posicionado em um local fixo e durante 2 min era observado o seu movimento, por exemplo, qual a distância percorrida por ele no intervalo de tempo e sempre comparado a um animal do grupo controle negativo. Por fim, para definição da alteração na respiração, durante o intervalo de tempo definido para a hipocinesia era observado o modo de respiração do animal. A figura 47 destaca alguns sinais clínicos apresentados pelos animais durante o período experimental.

Figura 47- Ilustração de alguns sinais clínicos apresentados pelos animais durante o período experimental analisado. Em (A) piloereção, (B) curvatura e em (C) hipocinesia.

Fonte: Autor da Tese.

Com o objetivo de averiguar diferenças entre os tratamentos propostos e possuir análises quantitativas, somamos a pontuação obtida por cada animal e apresentamos o valor total obtido por grupo na figura 48 para o grupo experimental com a PBM antes da RT.

Figura 48- Pontuação obtida pelos grupos com PBM antes da RT nas 4 semanas experimentais após a exposição à RT e PBM. A somatória seria com n=5 animais por grupo.

Fonte: Autor da Tese.

Na semana 1 os animais foram submetidos ao protocolo experimental e apresentaram com maior incidência hipocinesia bem como piloereção. Contudo, o grupo RT apresentou aproximadamente o dobro da pontuação obtida pelos scores em relação aos grupos com PBM adjuvante. Esse resultado indica que há um número maior de animais por grupo debilitados ou com efeitos colaterais mais acentuados. Os grupos com PBM concomitante antes à RT apresentaram melhores condições clínicas que os grupos RT e Tumor, principalmente o grupo PBM_F/RT. De fato, na semana 4, os animais desse grupo apresentaram pontuação 2 e 3 vezes menor que o grupo RT e Tumor, respectivamente.

Analisando temporalmente os grupos experimentais, observamos distintos comportamentos. De fato, o grupo PBM/RT decresce entre a semana 1 e semana 2, aumenta a pontuação no intervalo entre a semana 2 e semana 3, que se mantém na semana 4. O grupo PBM_F/RT diminui a pontuação nas 3 primeiras semanas experimentais e na última semana aumenta a pontuação em aproximadamente 8 pontos em relação ao momento anterior. O grupo RT apresenta

pontuação constante desde o início do período experimental. O grupo Tumor aumenta a pontuação desde o início, permanecendo com valores próximos entre as semanas 2 e 3.

Na semana 4, que seria 21 dias após o término do tratamento, foram encontrados os maiores valores de pontuação praticamente para todos os grupos. A partir dessa data o número de animais por grupo começou a mudar devido ao óbito dos animais. Na figura 49 são apresentados os valores obtidos para os grupos experimentais com a PBM após a RT.

Figura 49- Pontuação obtida pelos grupos experimentais com PBM após a RT nas 4 semanas experimentais após a exposição à RT e PBM. A somatória seria com n=5 animais por grupo.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos experimentais associados à PBM apresentaram pontuação abaixo do grupo RT desde a semana 1. Analisando individualmente esses grupos, podemos encontrar algumas distinções. Os grupos com exposição concomitantemente após a RT apresentaram comportamento mais semelhante e com pontuação inferior que o grupo em única exposição. De fato, na semana 2, o grupo RT+PBM₂₄ apresentou 13 pontos, sendo praticamente o dobro dos valores

obtidos pelos grupos RT/PBM e RT/PBM_F, que apresentaram somatória de 6 e 7 pontos, respectivamente.

Interessantemente, o grupo RT/PBM_F mostra pontuação mais baixa durante todo o período experimental, indicando provavelmente evolução mais lenta dos aspectos clínicos debilitantes. Na semana 4, a sua pontuação aumenta, contudo, ela é aproximadamente 35 % menor que os demais grupos, incluindo RT, e 60 % menor comparada ao grupo Tumor.

O grupo RT/PBM, embora apresente aumento da pontuação nas semanas 2 e 3, apresentou pontuação 28 % abaixo do grupo RT+PBM₂₄ e 32 % e 51 % quando comparado aos grupos RT e Tumor, respectivamente.

2.4.2 Sobrevida

A curva de sobrevida dos animais durante o período experimental foi acompanhada e é apresentada na figura 50 para os animais com PBM antes da RT e na figura 40 para os animais do regime PBM após RT. Importante ressaltar que o dia 0 se refere ao dia anterior do início do processo radioterápico e a avaliação da sobrevida ocorre com a quantidade de animais avaliada experimentalmente (n=5 animais/grupo).

Figura 50- Curva de sobrevida para todos os grupos experimentais com PBM antes da RT durante todo o período experimental a partir do primeiro dia do início do protocolo radioterápico para o n=5 animais/grupo.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos experimentais, exceto o grupo PBM_F/RT na semana 5 (a partir de 27 dias) reduziram o número de animais por grupo. Os grupos com menor sobrevida foram: $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$, RT e Tumor com incidência de 40 % de óbitos. Os grupos PBM/RT e PBM_F/RT, apresentaram sobrevida de 80 % e 100 %, respectivamente durante todo o procedimento experimental. O grupo PBM_F/RT apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos com $p= 0,04$.

Figura 51 - Curva de sobrevida para todos os grupos experimentais com PBM após a RT durante todo o período experimental a partir do primeiro dia do início do protocolo radioterápico para o n=5 animais/grupo

Fonte: Autor da Tese.

A curva de sobrevida mostra que os grupos com maior incidência de óbitos são os grupos RT e Tumor, ambos com 60 % de sobrevida durante todo o período experimental analisado. Os grupos com única exposição à PBM e energia fracionada apresentam a mesma porcentagem de sobrevida com 80 %. Já o grupo RT/PBM mostrou 100 % de sobrevida durante todo o período experimental analisado, indicando diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos RT e Tumor.

2.5. Necropsia e Metástases

A necropsia dos animais foi realizada na semana 5 e a quantidade de animais por grupo não foi igual, pois como relatado anteriormente, os animais começaram a ir a óbito, mas não apresentaram perda de massa corpórea consecutiva para interromper o experimento. Durante o momento da necropsia, algumas características, tais como esplenomegalia, fígado com tecido friável e metástases, principalmente no pulmão, foram encontradas nos animais. Nas

figuras 52 e 53 apresentamos imagens representativas para cada grupo experimental com o tumor, pulmão e baço dos animais para ambos os regimes, respectivamente.

Figura 52- Imagens do tumor, pulmão (centro) e baço (direita) para os animais dos grupos experimentais com PBM antes da RT na semana 5 e para o grupo Tumor também quando o volume tumoral atingiu 0,1 cm³. A seta indica a localização de nódulos.

Fonte: Autor da Tese.

Figura 53- Imagens do tumor, pulmão (centro) e baço (direita) para os animais dos grupos experimentais com PBM após a RT na semana 5 e para o grupo Tumor também quando o volume tumoral atingiu 0,1 cm³. A seta indica a localização de nódulos.

Fonte: Autor da Tese.

As imagens dos órgãos no momento da necropsia, para ambos os regimes (PBM no pré e pós-RT- figs.52 e 53, respectivamente) nos permite visualizar os nódulos nos pulmões (pontos brancos) bem como a dimensão dos tumores e baços de acordo com o grupo experimental. Nas imagens também se observa a região de necrose no tumor e a diferença entre as dimensões dos órgãos temporalmente para o grupo Tumor, no início, com volume de 0,1 cm³ e após período experimental, na semana 5.

2.5.2. Contagem Macroscópica de Metástases

Após a fixação dos órgãos em formol foi realizada a contagem macroscópica da quantidade de nódulos presente no pulmão. Quatorze dias após a inoculação das células tumorais o mesmo procedimento foi realizado, afim de averiguar algum nódulo macroscópico. Assim apresentamos os valores para a semana 5 na figura 54 para os grupos com PBM pré-RT.

Figura 54- Contagem macroscópica da quantidade de nódulos presentes no pulmão dos animais de acordo com o grupo experimental no regime PBM pré-RT.

Fonte: Autor da Tese.

O pulmão é um dos principais sítios de metástase para o câncer de mama, principalmente para o modelo celular utilizado nesse trabalho⁹⁰. Os nossos resultados mostram que os grupos que receberam a PBM concomitantemente antes da RT possuíam uma quantidade menor de nódulos no pulmão em relação ao grupo RT, apresentando diferença estatisticamente significativa no grupo PBM/RT.

Os dados de metástases macroscópicas para os grupos experimentais com PBM pós-RT são apresentados na figura 55.

Figura 55-- Contagem macroscópica da quantidade de nódulos presentes no pulmão dos animais de acordo com o grupo experimental no regime PBM pós-RT.

Fonte: Autor da Tese.

Os grupos experimentais associados à PBM apresentaram quantidade inferior de metástases quando comparado ao grupo RT, com diferença estatisticamente significativa para os grupos RT+PBM₂₄ e RT/PBM. Embora o grupo RT/PBM_F tenha apresentado quantidade de metástases 60 % inferior em relação ao grupo RT, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Comparando com o grupo Tumor, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

2.5.3. Pulmões

Afim de verificar uma relação entre a quantidade de nódulos presente no pulmão e a sua massa, aferimos no momento da necropsia e 14 dias após a inoculação das células de câncer de mama 4T1 a massa dos pulmões e apresentamos na figura 56 para o regime com PBM pré-RT.

Figura 56- Massa dos pulmões para todos os grupos experimentais com PBM pré-RT na semana 5 e aproximadamente 14 dias após a inoculação quando o tumor atingiu o volume de 0,1 cm³ para os grupos Tumor e Sadio.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos associados à PBM apresentaram massa pulmonar estatisticamente menor quando comparado ao grupo RT. O comportamento entre tais grupos tratados com PBM foi semelhante com valores próximos. Contudo, um fato observável seria que os grupos com PBM concomitantemente antes apresentaram valores muito próximos e maior que o grupo com única exposição. De fato, enquanto os grupos PBM/RT e PBM_F/RT apresentaram massa de aproximadamente 400 µg, o grupo 24PBM+RT apresentou massa pulmonar de $323,5 \pm 19,1$ µg. Os animais do grupo Tumor apresentaram aumento na massa pulmonar entre o período de volume inicial com 0,1 cm³ e na semana 5 em aproximadamente 188 %, indicando que a progressão tumoral e o tempo de vida dos animais tendem a aumentar a massa pulmonar. Corroborando que a idade pode ser um fator que influencia o aumento de massa pulmonar, se analisarmos o grupo Sadio que não possui nenhuma intervenção de tratamento, também apresentou aumento na massa pulmonar entre o período inicial do experimento e o momento final. Essa diferença consiste em média um aumento de 35 % na massa dos pulmões. O grupo RT apresentou a maior massa pulmonar

($713,07 \pm 200,65 \mu\text{g}$), como também a maior quantidade de metástases macroscópicas identificadas no pulmão, conforme apresentado na figura 55.

Os valores da massa dos pulmões para os grupos experimentais com o regime PBM pós-RT são apresentados na figura 57.

Figura 57- Massa dos pulmões para todos os grupos experimentais com PBM pós-RT na semana 5 e aproximadamente 14 dias após a inoculação quando o tumor atingiu o volume de $0,1 \text{ cm}^3$ para os grupos Tumor e Sadio.

Fonte: Autor da Tese.

Todos os grupos experimentais apresentam massa significativamente menor que o grupo RT. Entre os grupos associados à PBM algumas distinções podem ser observadas. O grupo RT/PBM_F apresentou massa superior em 24 % e 42 % em relação aos grupos RT+PBM₂₄ e RT/PBM, respectivamente.

Sumarizando os nossos resultados, as tabelas 10 e 11 apresentam os dados compilados em relação aos seus controles: Tumor e RT, respectivamente.

Tabela 7- Comportamento dos dados experimentais do grupo RT em relação ao grupo Tumor. Os sinais: ↑, ↓ e =, significam maior, menor e igual, respectivamente em relação ao grupo Tumor.

RT								
	Volume Tumoral (cm ³)	Aspectos Clínicos	RBCs (x10 ¹² /L)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	RDW (%)	WBCs (x10 ⁹ /L)	Plaquetas (x10 ⁹ /L)
semana 2	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓
semana 3	↓	=	↓	↓	↓	=	↓	↓
semana 4	↓	↓	↓	↓	↓	↑	=	=
	Linfócitos (x10 ⁹ /L)	Monócitos (x10 ⁹ /L)	Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	C.P.Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	NRL	Metastases		Sobrevida (%)
semana 2	↓	↑	↑	↓	↑	semana 5	=	=
semana 4	↓	=	↓	↑	↑			

Fonte: Autor da Tese.

Tabela 8- Comportamento dos dados experimentais expostos à PBM em relação ao grupo RT. Os sinais: ↑, ↓ e =, significam maior, menor e igual, respectivamente em relação ao grupo RT.

Grupos						
	²⁴ PBM+RT	PBM/RT	PBM _F /RT	RT+PBM ₂₄	RT/PBM	RT/PBM _F
Volume Tumoral (cm ³)						
semana 2	=	=	=	=	=	=
semana 3	=	↓	=	↓	↓	↓
semana 4	=	↓	↓	=	↓	↓
Aspectos Clínicos						
semana 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓
semana 3	↑	↓	↓	=	↓	↓
semana 4	=	↓	↓	↓	↓	↓
RBCs (x10 ¹² /L)						
semana 2	↓	=	↓	=	=	=
semana 3	↓	↑	↓	↑	↑	↑
semana 4	↑	↑	↑	↑	↑	=
Hemoglobina (g/dL)						
semana 2	↓	↓	↓	=	=	=
semana 3	=	↑	↓	↑	↑	↑
semana 4	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Hematócrito (%)						
semana 2	↓	=	↓	=	↓	=
semana 3	=	↑	=	↑	↑	↑
semana 4	↑	↑	↑	↑	↑	↑
RDW (%)						
semana 2	=	↑	=	=	=	=
semana 3	↑	=	=	=	=	↑
semana 4	=	↓	=	=	=	↑
WBCs (x10 ⁹ /L)						
semana 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓
semana 3	↓	↓	↓	↓	↓	=
semana 4	=	↓	↓	↓	↓	↓
Linfócitos (x10 ⁹ /L)						
semana 2	↑	↑	↓	↑	↑	↑
semana 4	↓	=	↓	↓	↓	=
Monócitos (x10 ⁹ /L)						
semana 2	=	=	↑	=	↑	↑
semana 4	=	↑	↑	=	↓	↑
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)						
semana 2	=	↓	↓	↓	↓	↓
semana 4	↑	↓	=	↑	↑	↑
C.P.Neutrófilos (x10 ⁹ /L)						
semana 2	↑	↑	↑	↑	↑	↑
semana 4	↓	↑	↓	↓	↓	↓
Plaquetas (x10 ⁹ /L)						
semana 2	=	↓	↓	↓	↑	↑
semana 3	↓	↑	=	↑	↑	↑
semana 4	↓	↓	=	↑	↑	↓
NRL						
semana 2	=	=	=	=	=	=
semana 4	=	=	=	=	↑	=
Metastases						
semana 5	=	↓	=	↓	↓	=
Sobrevida (%)						
semana 5	=	↑	↑	↑	↑	↑

Fonte: Autor da Tese.

1- DISCUSSÃO

A literatura reporta a PBM como um possível radiomodificador^{26; 136; 137}. No entanto, pouquíssimos trabalhos na literatura a usam associada à RT, principalmente em ensaios pré-clínicos. Um radiomodificador pode se comportar como radioprotetor ou radiosensibilizador ou ainda pode ser ambos em tecidos diferentes¹³⁸. Nesse embasamento, a PBM foi utilizada pré e pós-RT em duas condições: concomitantemente antes ou após cada sessão de RT (fluência única ou fracionada) ou em única exposição 24 h antes do início do protocolo ou após 24 h do término do processo radioterápico.

A dose total utilizada na RT foi de 60 Gy, sendo essa, ainda enquadrada dentro do intervalo utilizado na prática clínica para tumores com dimensões avançadas, como nesse estudo^{83; 84}. Os nossos achados indicaram que a RT atenuou a progressão tumoral em relação ao grupo sem irradiação (**figuras 14 e 15**), contudo, não foi efetiva como modalidade terapêutica única para erradicação do câncer de mama triplo negativo, enfatizando a dificuldade para tratar tal subtipo molecular de câncer e indicando a necessidade de associação com uma modalidade terapêutica adjuvante^{6,139}. A RT localizada na mama provavelmente induziu danos na medula óssea dos animais, sendo esse um efeito esperado, principalmente pela localização anatômica das regiões irradiadas que correspondem às regiões pélvicas e do tórax^{140; 141}.

A PBM associada concomitante antes ou após a RT (**figura 14 e figura 15**), a princípio apresentou efeito radiomodulatório, pois de fato os animais desses grupos apresentaram progressão atenuada do volume tumoral, rendendo diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo RT a partir da semana 3. O grupo ²⁴PBM+RT, embora tenha sido exposto à PBM, apresentou evolução tumoral atenuada em relação ao grupo RT, contudo, diferenças estatísticas não foram evidenciadas. Já o grupo RT+PBM₂₄, apresentou diferença estatisticamente significativa apenas em um momento da semana 3, no entanto, seu comportamento mostrou-se semelhante ao grupo RT após esse período. No último período experimental, observamos diferenças estatisticamente significantes intergrupos na PBM pós-RT.

Acreditamos que o intervalo de tempo entre as radiações em conjunto com a exposição única da PBM (antes ou depois) foram os fatores determinantes

para as diferenças intergrupos (**figura 15**) e o comportamento similar dos grupos $^{24}\text{PBM}+\text{RT}$, $\text{RT}+\text{PBM}_{24}$ e RT , pois os animais desses grupos foram expostos ao mesmo protocolo, contudo, somente 24 h antes ou depois do protocolo radioterápico sofreram intervenção da PBM. Alguns relatos na literatura indicam que o tempo de exposição entre as duas radiações influencia o resultado final, indicando que há um possível limiar de tempo para a ação da PBM. Corroborando com tal hipótese, Voskanyan e colaboradores verificaram que a PBM ($\lambda = 650 \text{ nm}$) após 2 h ou 24 h em animais expostos a RI com 5 Gy ou 10 Gy de corpo inteiro é efetiva. Entretanto, os melhores resultados hematológicos bem como de sobrevida foram evidenciados quando o intervalo entre as duas irradiações foi de 2 h¹¹⁸.

A perda de massa corporal é muito comum durante o processo radioterápico e ela é relatada em aproximadamente 90 % dos pacientes submetidos ao tratamento do câncer^{142; 143}. Essa redução é involuntária e pode estar diretamente relacionada ao regime de tratamento. No entanto, a evolução dessa redução pode acarretar em caquexia e, conseqüentemente, influenciar na qualidade de vida do paciente bem como na mortalidade¹⁴². Ações para manter os valores de massa do paciente durante o tratamento e após são realizadas em hospitais, pois mesmo após o término do tratamento, é difícil que os pacientes voltem às suas condições físicas basais¹⁴⁴. Observando os achados experimentais, os grupos tratados apresentaram valores próximos ao grupo RT durante todo o período experimental e próximos aos valores do grupo controle negativo (**figuras 18 e 19**), havendo uma acentuação nos períodos finais. Esse comportamento pode estar relacionado com as evoluções físicas do tumor que é um constituinte da massa corpórea dos animais e a sua evolução pode gerar debilidades. Desse modo, a princípio avaliar a MR seria mais indicado. Os grupos com PBM antes da RT (**figura 20**) não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si, porém apresentaram valores entre 4 e 8 % do tumor como constituinte da massa corporal, enquanto o grupo RT apresentou aproximadamente 9 %. Já no regime PBM pós- RT (**figura 21**) os nossos achados, indicaram que os animais expostos à PBM apresentam MR inferior em aproximadamente 25 % quando comparado ao grupo RT , mas tal diferença não foi representativa estatisticamente. Contudo, esses resultados indicam que os animais tratados com PBM independente do regime apresentaram menor redução de massa corpórea para o desenvolvimento físico do tumor.

Alguns trabalhos têm descrito a influência da PBM associada à RI nas análises hematológicas^{20; 118} e embora ainda não exista um consenso sobre os efeitos sistêmicos da PBM através da irradiação local¹⁴⁵, os nossos achados mostraram que a PBM foi capaz de promover alterações no hemograma de camundongos portadores de câncer de mama. Importante salientar que, durante a semana 2, os níveis hematológicos, no geral, diminuíram drasticamente em relação ao intervalo de referência, indicando um possível dano temporário na medula óssea causado pela RT, conforme descrito anteriormente¹⁴⁰. De fato, se observarmos a evolução temporal dos grupos com a PBM concomitante antes à RT, houve alterações nos níveis totais de eritrócitos. O grupo PBM/RT, por exemplo, na semana 2, manteve seus valores próximos ao grupo RT e nas semanas subsequentes expressou maiores níveis de hematócrito, hemoglobina, VCM, RDW, HCM, CHCM e consequentemente eritrócitos (**figuras 24,26, 28 e 30**) em relação ao grupo RT. Já na PBM pós-RT os valores experimentais referentes a fração total vermelha (**figura 23**), sugerem que os grupos associados à PBM tendem a retornar aos valores referenciais mais brevemente que o grupo RT a partir da semana 3. Os dados de hemoglobina, hematócrito e VCM no mesmo período experimental corroboram com a tendência supracitada indicando uma redução no possível quadro anêmico causado pela RT. Entretanto, a quantidade e a concentração de hemoglobina média nas hemácias mantiveram-se semelhantes ao grupo RT. (**figuras 25,27,29 e 31**). Já os níveis de RDW aumentaram no último período experimental (**figura 31-B**), podendo efetivamente constatar uma anemia no animal, pois o desenvolvimento de anemia pode ser esperado durante a RT, contudo é estimado que após o tratamento esse resultado seja atenuado progressivamente¹³⁴. O processo de recuperação dos níveis de referência para a expressão de eritrócito podem estar fortemente relacionados às condições físicas do paciente, ao desenvolvimento do tumor e a dose de RI absorvida pela medula óssea¹⁴⁰. Outra hipótese sobre o aumento dos valores de RDW no último período experimental poderia estar associado a sinalização de um processo inflamatório, uma vez que nos últimos anos tem se discutido o papel do RDW como um marcador inflamatório, inclusive para o câncer de mama^{67; 146}.

Os valores de eritrócitos juntamente com os seus constituintes para o grupo Tumor também apresentaram níveis abaixo do intervalo de referência, principalmente na semana 4, mesmo sem exposição à RT. Esses achados indicam

que a progressão tumoral per si desenvolve um quadro de anemia no hospedeiro, corroborando com os achados de Wang e colaboradores ao observarem o mesmo perfil em camundongos BALB/c com câncer de mama⁷⁰. No entanto, a associação da RT com o câncer de mama intensifica o quadro anêmico, como podemos comprovar nos nossos achados e com o perfil hematológico descrito por Hans Geinitz e colegas em um estudo retrospectivo com pacientes com câncer de mama após o tratamento com RT⁶⁹.

Com relação às plaquetas, sabe-se que elas possuem um papel fundamental na homeostase sanguínea¹³⁵ e alguns achados na literatura indicam que os seus valores em pacientes oncológicos podem indicar metástase quando estão muito acima do intervalo de referência^{65; 147}. Os nossos resultados experimentais apresentaram queda na expressão total das plaquetas na semana 2 e nas subseqüentes semanas experimentais. Entretanto, no regime PBM antes da RT, o grupo PBM/RT apresentou retomada mais rapidamente dos níveis plaquetários em relação ao grupo RT (**figura 32**). Mesmo com danos evidenciados na análise hematológica, o volume plaquetário médio permaneceu dentro do intervalo de referência durante todo o período experimental analisado (**figura 34- A**). No entanto, especificamente na semana 2, os valores de PDW (**figura 34- B**) estão acima dos valores referenciais, corroborando com o dano temporário sofrido na medula óssea¹⁴⁰. Em relação ao nível plaquetário, dos grupos associados à PBM pós-RT (**figura 33**), valores superiores ou iguais foram apresentados a partir da semana 2 quando comparados ao grupo RT. Os valores de PDW e VPM (**figura 35**) permaneceram dentro do intervalo de referência durante todo o período experimental. Um estudo retrospectivo com pacientes portadoras de câncer de mama, descreve que o nível plaquetário decai significativamente durante o tratamento com RT e esse efeito pode perpetuar por até 2 meses após o término do protocolo⁶⁹. Embora, o grupo Tumor não tenha sofrido nenhuma exposição à RT, o nível plaquetário também se mostrou abaixo dos níveis de referência, indicando que esse fato pode estar associado ao processo inflamatório criado pelo tumor para sua disseminação que pode resultar em sequestro esplênico^{148; 149}. De fato, as imagens no momento da necropsia nos permitem visualizar aumento do baço para os animais do grupo Tumor em relação ao grupo Sadio (**figuras 52 e 53**). Trabalhos em nosso grupo também evidenciaram tal resultado em animais com tumor de mama¹⁸.

A literatura reporta que o câncer e a inflamação podem estar diretamente associados, pois tumores sólidos podem iniciar e perpetuarem inflamações recrutando macrófagos, que associados ao tumor ajudam na evolução e disseminação da doença ou causar efeito antitumoral, dependendo do perfil do macrófago¹⁵⁰. No câncer de mama, quando as células tumorais se instalam no tecido mamário, a ativação imunológica pode causar um processo de densa matriz de colágeno mecanicamente rígida, que pode servir como indicador precoce de um tumor pelo autoexame. Atualmente, oncologistas têm se embasado nos níveis de células de defesa para verificar a evolução tumoral após os tratamentos e consequentes progressões de metástase, uma vez que tais células estão expressas na corrente sanguínea¹⁵¹. Nossos resultados para PBM associada antes ou depois da RT mostram que os valores totais da série branca ultrapassam o intervalo de referência do grupo controle negativo a partir da semana 3 (**figuras 36 e 37**). Contudo, os grupos com PBM concomitante antes ou após apresentam progressão mais lenta dos leucócitos em relação ao grupo RT. Esses valores, possivelmente, estão relacionados ao desenvolvimento tumoral. Dentro da contagem diferencial, inicialmente os grupos tratados com PBM antes da RT, apresentam maior concentração de monócitos e neutrófilos (**figura 38**) e esse perfil se acentua na semana 4, aumentando também a quantidade das células precursoras de neutrófilos. Os grupos com PBM após RT, na semana 2 apresentam maior concentração de monócitos e valores similares entre neutrófilos e linfócitos (**figura 42**). Na semana 4 observou-se o mesmo comportamento descrito para o regime com PBM antes da RT.

Alguns relatos descrevem que a NLR seria uma boa abordagem para se verificar a progressão tumoral, a resposta frente ao tratamento bem como a estimativa de sobrevida¹⁵². No entanto, nossos resultados no regime PBM antes da RT foram inconclusivos e mais estudos precisam ser realizados (**figura 45**). De fato, Rubio e colaboradores descrevem que para o câncer de mama há algumas particularidades, por exemplo, se o mesmo é responsivo ao tratamento hormonal ou não, e utilizar esse resultado como fator único para predição de respostas, tais como sobrevida e progressão tumoral, não seria o mais indicado. Deve-se verificar outros aspectos apresentados pelo paciente para assim traçar algo mais conclusivo em relação ao câncer mama¹⁵³. Com relação à NRL no regime PBM pós-RT, nossos achados mostraram que esses grupos apresentaram maiores valores em

comparação aos grupos RT e Tumor. O grupo RT/PBM apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo RT na semana 4 (**figura 46**), bem como intergrupos. Esses dados apresentaram um comportamento diretamente proporcional com a sobrevida e inversamente proporcional com a quantidade macroscópica de metástases nos pulmões dos animais.

O papel dos neutrófilos quando relacionados ao câncer ainda não são elucidados, pois assim como os macrófagos, eles podem ser recrutados pelo microambiente tumoral e se tornarem Neutrófilos Associados ao Tumor (TANs) que dependendo do perfil, podem exercer efeito pró-tumor ou antitumor¹⁵⁴. Alguns autores descrevem que há três subtipos de neutrófilos circulando em pacientes oncológicos e em modelos murinos, os quais seriam: neutrófilos maduros de alta densidade, maduros de baixa densidade e imaturos. Dependendo da prevalência do subtipo, o perfil anti ou protumoral do neutrófilo pode ser desencadeado. Por exemplo, os neutrófilos maduros de alta densidade podem exercer um perfil antitumoral^{155; 156}.

Recentes estudos em modelo animal indicam que quando o câncer é exposto à RT, citocinas pró-inflamatórias recrutam neutrófilos, que podem se infiltrar no microambiente tumoral e produzir ROS para induzir apoptose nas células tumorais e possivelmente há uma correlação entre a quantidade basal de neutrófilos circulantes no sangue periférico com a sobrevida após a RT¹⁵⁷. Analisando os nossos achados, os valores basais de neutrófilos são iguais para todos os grupos, pois adotamos que antes de qualquer tratamento todos tenderiam ao mesmo comportamento. Após o tratamento com a RT, independente da associação ou não com a PBM, os valores de neutrófilos foram semelhantes entre os grupos, sendo, portanto, esse embasamento não correlacionável com os nossos dados e mais investigações necessitam ser realizadas.

Os aspectos clínicos dos animais indicam atividade radiomodificadora da PBM em relação à RT. Os grupos com PBM concomitante antes (**figura 48**) ou depois (**figura 49**) apresentaram pontuações inferiores ao grupo RT e os grupos com única exposição apresentaram pontuação semelhante ao grupo RT durante todo o período experimental. A atividade radiomodificadora da PBM também foi evidenciada na sobrevida dos animais. Os grupos com PBM concomitante antes da RT apresentaram porcentagem de sobrevida maior em relação ao grupo RT (**figura 50**). De fato, o grupo PBM_F/RT apresentou 100 % de sobrevida dos animais

até o encerramento do experimento e o grupo com exposição única apresentou porcentagem de sobrevida igual aos grupos RT e Tumor. A atividade da PBM pós-RT também foi evidenciada (**figura 51**), o grupo PBM/RT apresentou 100 % de sobrevida e os demais 80 %, independente da PBM ser em exposição única ou fracionada. As recomendações médicas atualmente durante o tratamento radioterápico são para que as pacientes permaneçam em repouso e se afastem de suas atividades, devido à ocorrência de prostração física, o que pode acarretar em pausas das sessões de tratamento.⁹ Se contextualizarmos os dados obtidos experimentalmente com o cotidiano, poderíamos dizer que as pacientes que tiveram a PBM concomitante ao tratamento apresentariam prostração física mais branda e tais resultados poderiam interferir diretamente na sua recuperação, continuidade do tratamento e retorno às atividades sociais, como também haveria uma incidência menor de óbitos relacionadas ao câncer de mama, como podemos verificar com os dados experimentais.

O pulmão é um dos principais sítios de metástase para o câncer de mama, principalmente para o modelo celular utilizado nesse estudo⁹⁰. Os nossos resultados mostraram que todos os grupos expostos à PBM apresentaram quantidade de nódulos macroscópicos inferior ao grupo RT. No entanto, foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes apenas para os grupos: PBM/RT (**figura 54**), RT+PBM₂₄ e RT/PBM no Pós-RT (**figura 55**). Em relação à massa dos pulmões, foi observado a ação da PBM em todos os grupos a ela exposto, independente do regime, pois todos apresentaram massa significativamente menor quando comparado ao grupo RT (**figuras 56 e 57**).

Diante desse compilado, os nossos achados indicam que a PBM apresentou indicativos de radioproteção quando realizada concomitantemente antes da RT e de radiossensibilizador quando associada concomitantemente após à RT. Considerando que os efeitos da PBM podem estar relacionados com a fluência, nossa hipótese era que regimes de PBM poderiam interferir nos resultados da RT. Nossos achados mostraram que a energia entregue por sessão de 1,5 J ou 6 J não influenciou nos resultados, pois os grupos apresentaram comportamentos semelhantes. Desse modo, parece que dentro desse intervalo de energia não há diferença no resultado final se o regime for concomitante à RT, independente da ordem, antes ou após à RT¹⁵⁸.

Em contraste, há diferença entre os regimes concomitante e único. Com relação ao regime de fluência única, também observamos diferenças dependendo da exposição, antes ou após a RT, principalmente no número de metástases e sobrevida dos animais. O grupo com PBM após a RT apresentou resultados semelhantes aos grupos concomitantes enquanto o grupo com PBM antes da RT mostrou resultados similares ao grupo RT, principalmente na sobrevida.

A literatura reporta que os mecanismos de ação da RI e da PBM são completamente diferentes. A RI possui energia suficiente para atingir diretamente o DNA, sendo esse seu principal alvo, podendo causar danos permanentes ou não, tais como a quebra simples ou dupla nas suas bases. A sua ação pode ser por via direta ou indireta, através da geração de ROS e o seu sucesso enquanto terapia consiste em ultrapassar os limites do sistema de defesa antioxidante celular^{73; 74; 75}. Já a PBM possui fótons com energia muito menores (aproximadamente 1,7 eV) que impede rupturas diretas na banda covalente. Como a radiação é absorvida na cadeia respiratória, seu mecanismo de ação promove a geração de ATP^{105; 107; 145}.

Diante desse conceito, acreditamos que a PBM quando exerce efeito radioprotetor fortalece o sistema de defesa antioxidante possivelmente com a geração de ATP e sinaliza diretamente no sistema de defesa do alvo, atenuando os efeitos deletérios da RI bem como auxiliando na recuperação do quadro clínico geral do alvo. Quando a PBM age com efeito radiosensibilizador indica que a mesma possivelmente potencializa a produção de ROS, através da prevalência dos neutrófilos antitumorais (perfil N1) associados ao tumor recrutados durante o protocolo radioterápico, refletindo diretamente na quebra dos limites de defesa antioxidante do alvo, possibilitando maior efeito da RI em induzir as células tumorais a morte, ou seja, com a mesma dose de RI consegue-se obter resultados mais expressivos no combate ao câncer ¹⁵⁴.

Dentro dos nossos achados, hipotetizamos que a PBM de algum modo equilibrou os efeitos no sistema de defesa antioxidante, pois ao mesmo tempo que observamos características de radioproteção também observamos características de radiosensibilização dentro do mesmo regime. No entanto, os indicativos não foram conclusivos para o enquadramento definitivo. Ainda acreditamos que esse suposto equilíbrio ocorreu sob a influência do intervalo de tempo entre os regimes, pois a PBM foi imediatamente antes ou imediatamente depois, não havendo um intervalo de tempo significativo entre as duas irradiações nos diferentes regimes

para que a PBM pudesse exercer um efeito majoritariamente de radioproteção ou radiosensibilização.

Corroborando com a nossa hipótese, os trabalhos de Karu¹⁹ e Voskanyan¹¹⁸ descrevem sobre os diferentes resultados obtidos dentro do intervalo de tempo entre as duas radiações, tanto no regime antes como após a RT. Contudo, esse intervalo de tempo indica ter um limiar que poderia estar entre 1 h e 3 h, conforme os trabalhos supracitados e até mesmo dentro dos nossos achados, pois 24 h antes da RT não apresentou ser um bom intervalo de tempo para ação da PBM.

Por fim, acreditamos que a PBM exerceu um efeito radiomodificador no panorama geral, pois o padrão ouro para verificar a eficácia de um novo radiomodificador seria a avaliação da sobrevida dos expostos durante 30 dias em relação ao controle¹³⁸. Diante dos nossos achados, verificamos influência no período de 30 dias na sobrevida, aspectos clínicos e progressão do tumor. Contudo, esperamos encorajar maiores estudos para efetiva comprovação e aplicação da luz como um radiomodificador.

2- CONCLUSÕES

Dentro dos parâmetros utilizados neste trabalho podemos concluir que:

- 1- Os resultados obtidos indicam que a PBM pode ser um radiomodificador associada à RT no tratamento do câncer de mama triplo negativo em modelo animal;
- 2- Os regimes com PBM concomitante apresentaram volume tumoral, aspectos clínicos, metástases e sobrevida dos animais melhores que o grupo RT, independente da energia entregue por sessão;
- 3- A PBM em exposição única se comporta diferente das exposições concomitantes, independente do regime e da energia por sessão, no volume tumoral, nos aspectos clínicos, na relação neutrófilo/linfócito, na quantificação macroscópica de metástases e sobrevida dos animais;
- 4- A PBM concomitantemente antes da RT indica um possível efeito radioprotetor, pois houve melhora nos aspectos clínicos, maior sobrevida dos animais e redução do volume tumoral em relação à RT isoladamente;
- 5- A PBM concomitantemente ou em única exposição após a RT indicam efeito radioprotetor, pois houve redução no volume tumoral, na quantificação macroscópicas de metástases, de mortes e melhora dos aspectos clínicos durante o período experimental. Entretanto, o grupo RT/PBM pode ter um efeito radiosensibilizador, porque promoveu aumento da relação neutrófilo/linfócito em relação ao grupo RT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARM, I. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries - Bray - 2018 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library. 2019. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492#caac21492-fig-0003> >.
- 2 ALENCAR, M. D. S.-I. N. D. C. J. G. D. Estimativa 2020- Incidência de Câncer no Brasil. 2020. Disponível em: < <http://inca.gov.br/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> >. Acesso em: Janeiro/2020.
- 3 HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134-1150, Mar 18 2017. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31891-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31891-8) >.
- 4 CLEERE, D. W. Triple-negative breast cancer: a clinical update. 2010. Disponível em: < <https://www.infona.pl/resource/bwmata1.element.elsevier-04b85fe5-a8af-3582-9633-a139b32eb7ce> >.
- 5 POP, L. A. et al. Genetic alterations in sporadic triple negative breast cancer. **Breast**, v. 38, p. 30-38, Apr 2018. ISSN 0960-9776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2017.11.006> >.
- 6 AL-MAHMOOD, S. et al. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Deliv Transl Res**, v. 8, n. 5, p. 1483-1507, Oct 2018. ISSN 2190-393x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3> >.
- 7 MAUGHAN, K. L.; LUTTERBIE, M. A.; HAM, P. S. Treatment of breast cancer. **Am Fam Physician**, v. 81, n. 11, p. 1339-46, Jun 1 2010. ISSN 0002-838x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 8 WANG, W. Radiotherapy in the management of early breast cancer. **J Med Radiat Sci**, v. 60, n. 1, p. 40-6, Mar 2013. ISSN 2051-3895 (Print)2051-3895. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmrs.1> >.
- 9 SJOVALL, K. et al. Adjuvant radiotherapy of women with breast cancer - information, support and side-effects. **Eur J Oncol Nurs**, v. 14, n. 2, p. 147-53, Apr 2010. ISSN 1462-3889. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejon.2009.09.002> >.
- 10 BOLDERSTON, A. et al. The prevention and management of acute skin reactions related to radiation therapy: a systematic review and practice guideline. **Support Care Cancer**, v. 14, n. 8, p. 802-17, Aug 2006. ISSN 0941-4355 (Print)0941-4355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-006-0063-4> >.

- 11 DA SILVA, D. F. T., ALMEIDA-LOPES, L., RIBEIRO, M.S, NUÑEZ, S.C., GARCEZ, A.S. Interação Laser - Tecido Biológico e Princípios de Dosimetria. In: ELSELVIER (Ed.). **Laser de Baixa Potência - Princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**, 2012. cap. 2, p.14-26.
- 12 GARCEZ, A.; NÚÑEZ, S. **Mecanismos de terapia laser de baixa potência. Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia.** 2012.
- 13 DE BRITO, A. et al. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. **Lasers Med Sci**, Nov 27 2017. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2392-6> >.
- 14 FORTUNA, T. et al. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. **Int Wound J**, Dec 13 2017. ISSN 1742-4801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/iwj.12861> >.
- 15 NATERSTAD, I. F. et al. Comparison of Photobiomodulation and Anti-Inflammatory Drugs on Tissue Repair on Collagenase-Induced Achilles Tendon Inflammation in Rats. **Photomed Laser Surg**, Dec 21 2017. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2017.4364> >.
- 16 MURAYAMA, H. et al. Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 87-93, Jan 2012. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-011-0924-z> >.
- 17 C, K. et al. Low Level Laser Therapy Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Cancer Cells. **Cell proliferation**, v. 51, n. 2, Apr 2018 2018. ISSN 1365-2184. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160001> >.
- 18 PEREIRA, S. D. T. **Efeitos de uma única irradiação de luz de baixa potência em camundongos portadores de tumor de mama** 2019. 71 (Dissertação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 19 KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALEND, G. Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation. **Int J Radiat Biol**, v. 65, n. 6, p. 691-7, Jun 1994. ISSN 0955-3002 (Print)0955-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 20 EFREMOVA, Y.; SINKOROVA, Z.; NAVRATIL, L. Protective effect of 940 nm laser on gamma-irradiated mice. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 2, p. 82-91, Feb 2015. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2014.3824> >.

- 21 DJAVID, G. E.; GOLIAIE, B.; NIKOOFAR, A. Analysis of Radiomodulatory Effect of Low-Level Laser Irradiation by Clonogenic Survival Assay. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 9, p. 452-9, Sep 2015. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2015.3893> >.
- 22 DJAVID, G. E. et al. Photobiomodulation leads to enhanced radiosensitivity through induction of apoptosis and autophagy in human cervical cancer cells. **J Biophotonics**, v. 10, n. 12, p. 1732-1742, Dec 2017. ISSN 1864-063x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201700004> >.
- 23 MARTINS, A. F. L. et al. Effect of photobiomodulation on the severity of oral mucositis and molecular changes in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy: a study protocol for a cost-effectiveness randomized clinical trial. **Trials**, v. 20, n. 1, p. 97, Feb 1 2019. ISSN 1745-6215. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-019-3196-8> >.
- 24 CENSABELLA, S. et al. Photobiomodulation for the management of radiation dermatitis: the DERMIS trial, a pilot study of MLS((R)) laser therapy in breast cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 24, n. 9, p. 3925-33, Sep 2016. ISSN 0941-4355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-016-3232-0> >.
- 25 ROBIJNS, J. et al. The use of low-level light therapy in supportive care for patients with breast cancer: review of the literature. **Lasers Med Sci**, v. 32, n. 1, p. 229-242, Jan 2017. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2056-y> >.
- 26 MORCOS, N. et al. Phototherapeutic Effect of Low-Level Laser on Thyroid Gland of Gamma-Irradiated Rats. **Photochem Photobiol**, v. 91, n. 4, p. 942-51, Jul-Aug 2015. ISSN 0031-8655. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/php.12465> >.
- 27 TEIXEIRA, L. A., FONSECA, C.O. **De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil** 2007.
- 28 AGGARWAL, B. B. et al. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 9, p. 1083-94, Nov 1 2009. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.027> >.
- 29 SI, H. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, 03/01/2011 2011. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960499> >.
- 30 WOLFF, J. **Die Lehre von der Krebskrankheit von den ältesten Zeiten bis zur Gegenwart**: Jena: G.Fischer 1907-1928.
- 31 HAJDU, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. **Cancer**, v. 118, n. 4, p. 1155-68, Feb 15 2012. ISSN 0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26320> >.

- 32 MORGAGNI, G. B., DE SEDIBUS, E.T. **Causis Morborum per Anatomem Indagatis Libri Quinque**. Venettis, Italy: 1761.
- 33 BICHAT, X. **Traite des Membranes en General et de Diverse Membranes en Particulier**. Paris, France: Richard and Associates, 1800.
- 34 LAENNEC, R. **De l'Auscultation Mediate, ou Traite du Diagnostic des Maladies des Poumons et du Coeur** Paris, France: Brosson et Chaude, 1819.
- 35 RECAMIER, J. **Recherches sur le Traitement du Cancer**. Paris, France: Gabon, 1829.
- 36 HAJDU, S. I. A note from history: Rudolph Virchow, pathologist, armed revolutionist, politician, and anthropologist. **Ann Clin Lab Sci**, v. 35, n. 2, p. 203-5, Spring 2005. ISSN 0091-7370 (Print)0091-7370. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 37 VIRCHOW, R. **Die krankhaften Geschwulste. Dreissing Vorlesungen gehalten wahrend des Wintersemesters** Berlin, Germany: Universitat zu Berlin, 1862-1865.
- 38 WALDEYER-HARTZ, H., W., G. **Die Entwicklung der Carcinome** Virchows Arch Pathol Anat 1867.
- 39 HAJDU, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. **Cancer**, v. 118, n. 20, p. 4914-28, Oct 15 2012. ISSN 0008-543x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.27509> >.
- 40 ALBERTS, B., JOHSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K AND WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre, BR.: 2004.
- 41 CALDAS, C. Cancer sequencing unravels clonal evolution. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 408-410, 2012-05-07 2012. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.nature.com/nbt/journal/v30/n5/full/nbt.2213.html> >.
- 42 GOODSON, W. H., 3RD et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: the challenge ahead. **Carcinogenesis**, v. 36 Suppl 1, p. S254-96, Jun 2015. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgv039> >.
- 43 NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 220-8, Mar 2010. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2858> >.

- 44 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9) >.
- 45 _____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> >.
- 46 TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 5, p. 309-324, May 2018. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.142> >.
- 47 World Health Organization. Global Health Observatory., Geneva, 2018. Disponível em: < who.int/gho/database/en/ >. Acesso em: janeiro.
- 48 WOOSTER, R. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088-90, Sep 30 1994. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.8091231> >.
- 49 CHEN, S.; PARMIGIANI, G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 11, p. 1329-33, Apr 10 2007. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2006.09.1066> >.
- 50 BARETTA, Z. et al. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 40, p. e4975, Oct 2016. ISSN 0025-7974. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000004975> >.
- 51 HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 5, n. 1, p. 66, Sep 23 2019. ISSN 2056-676x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2> >.
- 52 **American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting. Manual for Staging of Cancer.** COMMITTEE, A. J. Chicago 1977.
- 53 HORTOBAGYI, G. N.; EDGE, S. B.; GIULIANO, A. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, v. 38, p. 457-467, May 23 2018. ISSN 1548-8748. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1200/edbk_201313 >.
- 54 STEENBRUGGE, J. et al. Comparative Profiling of Metastatic 4T1- vs. Non-metastatic Py230-Based Mammary Tumors in an Intraductal Model for Triple-Negative Breast Cancer. **Front Immunol**, v. 10, 2019. ISSN 1664-3224 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.02928> >.

- 55 KAUR, P. et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. **BMC Cancer**, v. 12, p. 120, Mar 27 2012. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-120> >.
- 56 DEXTER, D. L. et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer Res**, v. 38, n. 10, p. 3174-81, Oct 1978. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 57 ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Res**, v. 52, n. 6, p. 1399-405, Mar 15 1992. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 58 HU, Y. et al. Synergistic effect of adoptive immunotherapy and docetaxel inhibits tumor growth in a mouse model. **Cell Immunol**, p. 104036, Dec 31 2019. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.104036> >.
- 59 ARZI, L. et al. Anti-metastatic properties of a potent herbal combination in cell and mice models of triple negative breast cancer. **Life Sci**, v. 243, p. 117245, Jan 8 2020. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117245> >.
- 60 PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 20, p. Unit 20.2, May 2001. ISSN 1934-3671. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39> >.
- 61 TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, p. 228, Aug 09 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-8-228> >.
- 62 SPELL, D. W. et al. The value of a complete blood count in predicting cancer of the colon. **Cancer Detect Prev**, v. 28, n. 1, p. 37-42, 2004. ISSN 0361-090X (Print)0361-090x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cdp.2003.10.002> >.
- 63 PRITCHARD, C. C. et al. Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. 2012-03-01 2012. Disponível em: < <https://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/content/5/3/492.short> >.
- 64 KHOJA, L. et al. The full blood count as a biomarker of outcome and toxicity in ipilimumab-treated cutaneous metastatic melanoma. **Cancer Med**, v. 5, n. 10, p. 2792-2799, Oct 2016. ISSN 2045-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.878> >.

- 65 AKINBAMI, A. et al. Full blood count pattern of pre-chemotherapy breast cancer patients in Lagos, Nigeria. In: (Ed.). **Caspian J Intern Med**, v.4, 2013. p.574-9. ISBN 2008-6164 (Print)2008-6172 (Electronic).
- 66 OKUTURLAR, Y. et al. Utility of peripheral blood parameters in predicting breast cancer risk. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 6, p. 2409-12, 2015. ISSN 1513-7368. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2409> >.
- 67 SERETIS, C. et al. Is red cell distribution width a novel biomarker of breast cancer activity? Data from a pilot study. **J Clin Med Res**, v. 5, n. 2, p. 121-6, Apr 2013. ISSN 1918-3003 (Print)1918-3003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4021/jocmr1214w> >.
- 68 ZENAN, H. et al. Clinical prognostic evaluation of immunocytes in different molecular subtypes of breast cancer. **J Cell Physiol**, v. 234, n. 11, p. 20584-20602, Nov 2019. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28662> >.
- 69 GEINITZ, H. et al. Fatigue, serum cytokine levels, and blood cell counts during radiotherapy of patients with breast cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 51, n. 3, p. 691-8, Nov 1 2001. ISSN 0360-3016 (Print)0360-3016. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3016\(01\)01657-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0360-3016(01)01657-1) >.
- 70 WANG, C. et al. Low local blood perfusion, high white blood cell and high platelet count are associated with primary tumor growth and lung metastasis in a 4T1 mouse breast cancer metastasis model. **Oncol Lett**, v. 10, n. 2, p. 754-760, Aug 2015. ISSN 1792-1074 (Print)1792-1074. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2015.3304> >.
- 71 CITRIN, D. E. Recent Developments in Radiotherapy. **N Engl J Med**, v. 377, n. 11, p. 1065-1075, Sep 14 2017. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1608986> >.
- 72 ALLEN, C.; HER, S.; JAFFRAY, D. A. Radiotherapy for Cancer: Present and Future. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 109, p. 1-2, Jan 15 2017. ISSN 0169-409x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2017.01.004> >.
- 73 KAM, W. W.; BANATI, R. B. Effects of ionizing radiation on mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 607-19, Dec 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024> >.
- 74 BERNIER, J.; HALL, E. J.; GIACCIA, A. **Radiation oncology: a century of achievements**. Nat Rev Cancer. England. 4: 737-47 p. 2004.
- 75 HOLLEY, A. K. et al. Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 10, p. 1567-89, Apr 1 2014. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5000> >.

- 76 KUEFNER, M. A. et al. Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks in Radiology. **Rofo**, v. 187, n. 10, p. 872-8, Oct 2015. ISSN 1438-9010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1553209> >.
- 77 MAANI, E. V.; MAANI, C. V. Radiation Therapy. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls PublishingStatPearls Publishing LLC., 2020.
- 78 POLLARD, J. M. et al. The future of image-guided radiotherapy will be MR guided. **Br J Radiol**, v. 90, n. 1073, p. 20160667, May 2017. ISSN 0007-1285. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1259/bjr.20160667> >.
- 79 O'SHEA, T. et al. Review of ultrasound image guidance in external beam radiotherapy part II: intra-fraction motion management and novel applications. **Phys Med Biol**, v. 61, n. 8, p. R90-137, Apr 21 2016. ISSN 0031-9155. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/61/8/r90> >.
- 80 UHLMANN, E. M.; HSIEH, C. L.; LOOTENS, C. L. The linear electron accelerator as a source of fast electrons for cancer therapy. **Radiology**, v. 66, n. 6, p. 859-70, Jun 1956. ISSN 0033-8419 (Print)0033-8419. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1148/66.6.859> >.
- 81 DAVIS, L. W. Cobalt and megavoltage therapy. **Int J Dermatol**, v. 16, n. 10, p. 793-8, Dec 1977. ISSN 0011-9059 (Print)0011-9059. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4362.1977.tb04297.x> >.
- 82 GIUGLIANO, F. M. et al. External radiotherapy for breast cancer in the elderly. **Aging Clin Exp Res**, v. 29, n. Suppl 1, p. 149-157, Feb 2017. ISSN 1594-0667. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s40520-016-0655-x> >.
- 83 CARVALHO, H. A.; VILLAR, R. C. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 73, n. suppl 1, p. e557s, Dec 10 2018. ISSN 1807-5932. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2018/e557s> >.
- 84 BOUCHARD, G. et al. Pre-irradiation of mouse mammary gland stimulates cancer cell migration and development of lung metastases. **Br J Cancer**, v. 109, n. 7, p. 1829-38, Oct 1 2013. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.502> >.
- 85 NAHUM, A. E. The radiobiology of hypofractionation. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 27, n. 5, p. 260-9, May 2015. ISSN 0936-6555. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2015.02.001> >.
- 86 HICKEY, B. E. et al. Hypofractionated radiation therapy for early breast cancer. In: (Ed.). **Cochrane Database Syst Rev**, v.2016, 2016. ISBN 1469-493X (Electronic).

- 87 DELOCH, L. et al. Low-Dose Radiotherapy Ameliorates Advanced Arthritis in hTNF- α tg Mice by Particularly Positively Impacting on Bone Metabolism. **Front Immunol**, v. 9, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01834> >.
- 88 HABETS, T. et al. Fractionated Radiotherapy with 3 x 8 Gy Induces Systemic Anti-Tumour Responses and Abscopal Tumour Inhibition without Modulating the Humoral Anti-Tumour Response. In: (Ed.). **PLoS One**, v.11, 2016. ISBN 1932-6203 (Electronic).
- 89 YANG, W. et al. Effects of knockdown of miR-210 in combination with ionizing radiation on human hepatoma xenograft in nude mice. In: (Ed.). **Radiat Oncol**, v.8, 2013. p.102. ISBN 1748-717X (Electronic).
- 90 PILONES, K. A. et al. Invariant natural killer T cells regulate anti-tumor immunity by controlling the population of dendritic cells in tumor and draining lymph nodes. **J Immunother Cancer**, v. 2, n. 1, p. 37, 2014. ISSN 2051-1426 (Print)2051-1426. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-014-0037-x> >.
- 91 KAPLON, R. et al. The application of radiation therapy to the Pediatric Preclinical Testing Program (PPTP): results of a pilot study in rhabdomyosarcoma. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 3, p. 377-382, Mar 2013. ISSN 1545-5009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.24210> >.
- 92 SILVA, C. R., PEREIRA, S.T., NAPOLITANO, C. M., SOMESSARI, E.S.R. E RIBEIRO, M.S. **Desenvolvimento de uma blindagem para radioterapia de camundongos com câncer de mama**. International Joint Conference Radio 2019, 2019. p.
- 93 HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation for Alzheimer's Disease: Has the Light Dawned? **Photonics**, v. 6, n. 3, Sep 2019. ISSN 2304-6732 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/photonics6030077> >.
- 94 _____. Photobiomodulation for the management of alopecia: mechanisms of action, patient selection and perspectives. In: (Ed.). **Clin Cosmet Investig Dermatol**, v.12, 2019. p.669-78. ISBN 1178-7015 (Electronic).
- 95 WANG, Y. et al. Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810nm and 980nm lasers operates via different mechanisms of action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 2, p. 441-9, Feb 2017. ISSN 0006-3002 (Print)1878-2434 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.008> >.
- 96 MESTER, E., NAGYLUCSKAY, S., DOKLWN., TISZA, S. **Laser stimulation of wound healing**: Acta Chir Acad Sci Hung. 17 1976.

- 97 MESTER, E., SPIRY, T., SZENDE, B., TOTA, G. **Effect of laser rays on wound healing**: J.Surg. 122: 532-5 p. 1971.
- 98 MESTER, E., SZENDE, B., TOTA, J.G. **Effect of Laser on hair growth of mice**: Jiserl Orvostud. 19: 628-31 p. 1967.
- 99 SOUZA, N. H. C. et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. In: (Ed.). **J Cell Mol Med**, v.22, 2018. p.4922-34. ISBN 1582-1838 (Print)1582-4934 (Electronic).
- 100 PALLOTTA, R. C. et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 71-8, Jan 2012. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-011-0906-1> >.
- 101 NEVES, L. M. S. et al. Photobiomodulation Therapy Improves Acute Inflammatory Response in Mice: the Role of Cannabinoid Receptors/ATP-Sensitive K(+) Channel/p38-MAPK Signalling Pathway. **Mol Neurobiol**, Oct 4 2017. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0792-z> >.
- 102 DE OLIVEIRA, F. A.; SANDERS-PINHEIRO, H. Low-level laser therapy decreases renal interstitial fibrosis. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 10, p. 507-8, Oct 2013. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2013.9872> >.
- 103 DE LOURA SANTANA, C. et al. Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122042, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122042> >.
- 104 LEONARDUZZI, G. et al. New insights into redox-modulated cell signaling. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 36, p. 3994-4006, Dec 1 2011. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 105 KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 49, n. 1, p. 1-17, Mar 1999. ISSN 1011-1344 (Print)1011-1344. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344\(98\)00219-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1011-1344(98)00219-x) >.
- 106 KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 4, p. 355-61, Aug 2005. ISSN 1549-5418 (Print)1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2005.23.355> >.
- 107 CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng**, v. 40, n. 2, p. 516-33, Feb 2012. ISSN 0090-6964. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7> >.

- 108 TAFUR, J.; MILLS, P. J. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 4, p. 323-8, Aug 2008. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2007.2184> >.
- 109 HUANG, Y. Y. et al. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. In: (Ed.). **Dose Response**, v.7, 2009. p.358-83. ISBN 1559-3258 (Electronic).
- 110 _____. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose Response**, v. 9, n. 4, p. 602-18, 2011. ISSN 1559-3258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin> >.
- 111 VOLPATO, L. E. et al. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. **J Biomed Opt**, v. 16, n. 7, p. 075004, Jul 2011. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1117/1.3602850> >.
- 112 WERNECK, C. E. et al. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 3, p. 300-3, Jun 2005. ISSN 1549-5418 (Print)1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2005.23.300> >.
- 113 FRIGO, L. et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. **BMC Cancer**, v. 9, p. 404, 2009. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-9-404> >.
- 114 RAMOS SILVA, C. et al. Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. **J Biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1157-1166, Dec 2016. ISSN 1864-063x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.201600107> >.
- 115 BULYAKOVA, N. V.; AZAROVA, V. S. Regeneration of skeletal muscles and state of thymus in gamma-irradiated rats under laser therapy of the area of muscle trauma. **Minim Invasive Ther Allied Technol**, v. 15, n. 5, p. 277-85, 2006. ISSN 1364-5706 (Print)1364-5706. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/13645700600803950> >.
- 116 EL MOBADDER, M. et al. Photobiomodulation Therapy in the Treatment of Oral Mucositis, Dysphagia, Oral Dryness, Taste Alteration, and Burning Mouth Sensation Due to Cancer Therapy: A Case Series. **Int J Environ Res Public Health**, v. 16, n. 22, Nov 15 2019. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16224505> >.
- 117 ACAUAN, M. D. et al. Effect of low-level laser therapy on irradiated parotid glands--study in mice. **J Biomed Opt**, v. 20, n. 10, p. 108002, Oct 2015. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1117/1.jbo.20.10.108002> >.

- 118 VOSKANYAN, K., VOROZHTSOVA, S., ABROSIMOVA, A., MITSYN, G AND GAEVSKIY, V. The Effectiveness of Radiation Damage Reduction in Mice by Laser Light in Dependence of the Time Interval between Exposures. **Journal of Physical Science and Applications**, v. 5, n. 4, p. 291-295, 2015.
- 119 MATSUMOTO, K. et al. Antitumor effects of 2-oxoglutarate through inhibition of angiogenesis in a murine tumor model. **Cancer Sci**, v. 100, n. 9, p. 1639-47, Sep 2009. ISSN 1347-9032. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01249.x> >.
- 120 HENDRY, J. H.; SUTTON, M. L. On the sensitisation of skin radionecrosis in mice by misonidazole at low doses. **Br J Radiol**, v. 57, n. 678, p. 507-14, Jun 1984. ISSN 0007-1285 (Print)0007-1285. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1259/0007-1285-57-678-507> >.
- 121 CRITTENDEN, M. R. et al. The peripheral myeloid expansion driven by murine cancer progression is reversed by radiation therapy of the tumor. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69527, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069527> >.
- 122 SILVA, C. R., PEREIRA, S.T AND RIBEIRO, M.S. **Effects of PBM on breast tumor-bearing mice**. *SPIE- Photonics West*. San Francisco- California- USA 2018.
- 123 M, L. et al. A Novel Orthotopic Model of Breast Cancer Metastasis to Bone. **Clinical & experimental metastasis**, v. 17, n. 2, Mar 1999 1999. ISSN 0262-0898. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411109> >.
- 124 GUO, S. et al. Nano-pulse stimulation induces potent immune responses, eradicating local breast cancer while reducing distant metastases. **Int J Cancer**, v. 142, n. 3, p. 629-640, Feb 1 2018. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31071> >.
- 125 K, G.; S, T.; MA, M. The Effect of Adjuvant Therapy With TNF- α on Animal Model of Triple-Negative Breast Cancer. **Therapeutic delivery**, v. 9, n. 5, May 2018 2018. ISSN 2041-6008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29681232> >.
- 126 EJT, D. O. et al. New Bis Copper Complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) Amino) -4-oxobut-2-enoyl) Oxy): Cytotoxicity in 4T1 Cells and Their Toxicogenic Potential in Swiss Mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 356, 10/01/2018 2018. ISSN 1096-0333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30092250> >.
- 127 KUBATKA, P. et al. Anticancer Activities of Thymus vulgaris L. in Experimental Breast Carcinoma In Vivo and In Vitro. In: (Ed.). **Int J Mol Sci**, v.20, 2019. ISBN 1422-0067 (Electronic).

- 128 GREGÓRIO, A. C. et al. Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model. **PLoS One**, v. 11, n. 11, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165817> >.
- 129 MCALISTER, D. R. **Gamma Ray Attenuation Properties of Common Shielding Materials**. USA: University Lane Lisle, IL 60532, USA 2013.
- 130 FENTENER VAN VLISSINGEN, J. M. et al. The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report. **Lab Anim**, v. 49, n. 4, p. 267-83, Oct 2015. ISSN 0023-6772. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0023677215584249> >.
- 131 ZHANG, P. et al. The Effect of Gamma-Ray-Induced Central Nervous System Injury on Peripheral Immune Response: An In Vitro and In Vivo Study. **Radiat Res**, Aug 8 2019. ISSN 0033-7587. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1667/rr15378.1> >.
- 132 WORKMAN, P. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **Br J Cancer**, v. 102, n. 11, p. 1555-77, 2010. ISSN 0007-0920 (Print)1532-1827 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605642> >.
- 133 LUNDGREN, M. S. F. S., CAVALCANTI, M.S.M, SAMPAIO, D.A. Weekly monitoring of the effects of conventional external beam radiation therapy on patients with head and neck, chest, and pelvis cancer by means of blood cells count. **Radiol Bras**, v. 41, n. 1, 2008.
- 134 GONZÁLEZ-ALONSO, J. et al. Erythrocytes and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of erythrocyte count and oxygenation state of haemoglobin. **J Physiol**, v. 572, n. Pt 1, p. 295-305, Apr 01 2006. ISSN 0022-3751 (Print)1469-7793 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101121> >.
- 135 KOUPENOVA, M. et al. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. **Circ Res**, v. 122, n. 2, p. 337-51, Jan 19 2018. ISSN 0009-7330 (Print)1524-4571 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.117.310795> >.
- 136 ABRAMOFFMEIRE, M. F. et al. Low-Level Laser Therapy on Bone Repair of Rat Tibiae Exposed to Ionizing Radiation. **Photomedicine and Lasers Sugery**, v. 32, n. 11, 2014-11-05 2014. Disponível em: < <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2013.3692> >.
- 137 BARASCH, A. et al. Effects of pre-radiation exposure to LLLT of normal and malignant cells. **Support Care Cancer**, v. 24, p. 2497-2501, Dec 16 2015. ISSN 0941-4355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-015-3051-8> >.

- 138 GC, J.; MS, B. Evaluation of the Radioprotective Effect of the Leaf Extract of *Syzygium Cumini* (Jamun) in Mice Exposed to a Lethal Dose of Gamma-Irradiation. **Die Nahrung**, v. 47, n. 3, Jun 2003 2003. ISSN 0027-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12866620> >.
- 139 ORTH, M. et al. Current concepts in clinical radiation oncology. In: (Ed.). **Radiat Environ Biophys**, v.53, 2014. p.1-29. ISBN 0301-634X (Print)1432-2099 (Electronic).
- 140 SHAO, L.; LUO, Y.; ZHOU, D. Hematopoietic Stem Cell Injury Induced by Ionizing Radiation. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 9, p. 1447-62, 2014. ISSN 1523-0864 (Print)1557-7716 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5635> >.
- 141 TM, F. et al. Hemopoietic Response to Low Dose-Rates of Ionizing Radiation Shows Stem Cell Tolerance and Adaptation. **Dose-response : a publication of International Hormesis Society**, v. 10, n. 4, Dec 2012 2012. ISSN 1559-3258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304110> >.
- 142 RIER, H. N. et al. The Prevalence and Prognostic Value of Low Muscle Mass in Cancer Patients: A Review of the Literature. **Oncologist**, v. 21, n. 11, p. 1396-1409, Nov 2016. ISSN 1083-7159. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0066> >.
- 143 L, C.-M. et al. Nutritional Assessment Tools for the Identification of Malnutrition and Nutritional Risk Associated With Cancer Treatment. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, v. 70, n. 3, 2018 2018. ISSN 0034-8376. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29943772> >.
- 144 HOPKINSON, J. Psychosocial Support in Cancer Cachexia Syndrome: The Evidence for Supported Self-Management of Eating Problems during Radiotherapy or Chemotherapy Treatment. **Asia Pac J Oncol Nurs**, v. 5, n. 4, p. 358-368, Oct-Dec 2018. ISSN 2347-5625 (Print)2347-5625. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4103/apjon.apjon_12_18 >.
- 145 HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, v. 4, n. 3, p. 337-361, 2017. ISSN 2377-9098 (Print)2377-9098. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3934/biophy.2017.3.337> >.
- 146 HU, L. et al. Prognostic value of RDW in cancers: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 16027-35, 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.13784> >.
- 147 M, L.; S, B.; RO, H. Direct Signaling Between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes

- Metastasis. **Cancer cell**, v. 20, n. 5, 11/15/2011 2011. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094253> >.
- ¹⁴⁸ BUTLER, C. et al. Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. Cd009072, Mar 28 2013. ISSN 1361-6137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD009072.pub2> >.
- ¹⁴⁹ HARRIS, I. M.; MC, A. J.; PRANKERD, T. A. Splenomegaly and the circulating red cell. **Br J Haematol**, v. 4, n. 1, p. 97-102, Jan 1958. ISSN 0007-1048 (Print)0007-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1958.tb03838.x> >.
- ¹⁵⁰ GALDIERO, M. R., BONAVIDA, E., BARAJON, I., GARLANDA, C., MONTAVANI, A., JAILON, S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. **Immunobiology**, v. 218, n. 11, p. 1402-1410, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ¹⁵¹ MUNN, L. Cancer and Inflammation. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 9, n. 2, Mar 2017. ISSN 1939-5094 (Print)1939-005X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1370> >.
- ¹⁵² HOWARD, R.; KANETSKY, P. A.; EGAN, K. M. Exploring the prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019-12-23 2019. ISSN 2045-23222045-2322. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-019-56218-z> >.
- ¹⁵³ RUBIO, A. I. et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in metastatic breast cancer is not an independent predictor of survival, but depends on other variables. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019-11-18 2019. ISSN 2045-23222045-2322. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-019-53606-3> >.
- ¹⁵⁴ SHAUL, M. E.; FRIDLENDER, Z. G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 601-620, 2019-06-03 2019. ISSN 1759-47821759-4782. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41571-019-0222-4> >.
- ¹⁵⁵ SAGIV, J. Y. et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. **Cell Rep**, v. 10, n. 4, p. 562-73, Feb 3 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.039> >.
- ¹⁵⁶ LEY, K. et al. Neutrophils: New insights and open questions. **Sci Immunol**, v. 3, n. 30, Dec 7 2018. ISSN 2470-9468. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aat4579> >.
- ¹⁵⁷ TAKESHIMA, T. et al. Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 40, p. 11300-11305, Oct 4 2016. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1613187113> >.

- ¹⁵⁸ KARU, T. Photobiological Fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE-Journal of Quantum Electronics**, v. 23, n. 10, 1987.

ANEXOS

Comitê de Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da luz de baixa potência em tumor de mama e radionecrose”, registrada com o nº **190/17** sob a responsabilidade de **Martha Simões Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), em **04/05/2017**.

Finalidade: Pesquisa Científica ou Ensino	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Junho/2017 a Junho/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos isogênicos Balb/C (Mus musculus)
Nº de animais	70
Peso/Idade	Balb/C: 70F - ~20 g - 6 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do IPEN-CNEN/SP

São Paulo, 4 de maio de 2017.

Patrick Jack Spencer
Vice-coordenador da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IPEN
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP
Telefones: (011) 3133-9696 – Fax (011) 3133-9709
E-mail: ceuaipen@ipen.br

Curva de crescimento das linhagens 4T1 e 4T1-LUC

Curva de crescimento das células 4T1 e 4T1+Luc, utilizando o método de exclusão por azul de tripan durante 7 dias. Os resultados são apresentados em média $\pm$ desvio padrão com $n=3$.

Fonte: Autor da Tese

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de
Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.**