AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Efeitos de uma única irradiação de luz de baixa potência em camundongos
portadores de tumor de mama**

SAULO DE TOLEDO PEREIRA

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

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2019

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Efeitos de uma única irradiação de luz de baixa potência em camundongos
portadores de tumor de mama**

Versão corrigida

Versão Original disponível no IPEN

SAULO DE TOLEDO PEREIRA

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

Orientadora:

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2019

Fonte de Financiamento: CNPq

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

Como citar:

DE TOLEDO PEREIRA, S. *Efeitos de uma única irradiação de luz de baixa potência em camundongos portadores de tumor de mama*. 2019. 69 p. Dissertação (Mestrado 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)

de Toledo Pereira, Saulo
Efeitos de uma única irradiação de luz de baixa potência em
camundongos portadores de tumor de mama / Saulo de Toledo
Pereira; orientador Martha Simões Ribeiro. -- São Paulo, 2019.
69 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. tumor. 2. luz de baixa potencia. 3. 4t1. 4. hipoxia. I.
Simões Ribeiro, Martha, orient. II. Título.

Aos meus pai

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À minha mãe Elaine, por ser a melhor pessoa do mundo e sempre ter apoiado em tudo.

Ao meu pai, que sempre me incentivou a estudar e não mediu esforços para me fazer feliz.

À Prof^a Dra. Martha Simões Ribeiro, por ter me aceitado e guiado durante esses anos de mestrado.

Aos colegas de grupo, Carolina, Camila, Fernanda, Maressa, Mayara, Tania, Ismael, por deixarem os dias mais agradáveis.

À Prof^a Dra. Sofia Nascimento dos Santos, por ter cedido a linhagem celular utilizada neste trabalho.

Aos professores Ernani Castilho da Conceição e Ricardo Rada Ahmad Hayek, por terem indicado o caminho por onde tudo começou.

Ao IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - pela oportunidade de realização deste trabalho de mestrado e por toda infraestrutura disponibilizada.

Ao CELAP – Centro de Lasers e Aplicações – pela oportunidade e infraestrutura disponibilizada.

Ao Biotério, por ter sido essencial para realização desse trabalho.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado a mim concedida.

A todos que, de alguma forma, colaboraram com esse trabalho.

“Cada sonho que você deixa pra trás,
é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.”

Steve

RESUMO

DE TOLEDO PEREIRA, S. Efeitos de uma única irradiação de luz de baixa potência em camundongos portadores de tumor de mama. 2019. 69

p.Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

A fotobiomodulação (FBM) vem sendo utilizada nas áreas da Saúde como estratégia terapêutica para doenças de etiologias variadas. No entanto, seus efeitos em células tumorais ainda não são bem elucidados, gerando controvérsias sobre sua utilização na prática clínica. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da FBM em tumor de mama *in vitro* e em modelo animal. *In vitro*, nós verificamos a ação da FBM na viabilidade de células de tumor de mama de linhagem murino (4T1) em condições de normoxia e hipóxia. *In vivo*, as células foram inoculadas em camundongos. Após indução do tumor, o seu volume foi acompanhado diariamente com um paquímetro digital. Quando o tumor atingiu 100 mm³, o tratamento foi iniciado. Para a FBM, foi utilizado um LED na região do vermelho (660 ±20nm) com irradiância de 24,3 mW/cm². Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos onde cada grupo recebeu uma dose de energia diferente: G0 (não recebeu irradiação), G1 (1,2 J), G3 (3,6 J) e G6 (6 J). Após a irradiação, dados como volume tumoral, nível de plaquetas e células brancas e vermelhas, foram acompanhados durante 3 semanas após tratamento para a obtenção de dados estatísticos. Os dados mostram que as células irradiadas com a energia de 6 J apresentaram significativa redução na viabilidade celular em condições de normoxia. Para o experimento *in vivo*, os grupos irradiados têm uma sobrevida maior em relação ao grupo controle, embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos com relação ao volume tumoral. Em relação ao hemograma, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação ao número total de células brancas, vermelhas e plaquetas.

Palavras-chave: Análise hematológica, sobrevida, LED de emissão vermelha, células 4T1, hipóxia

ABSTRACT

DE TOLEDO PEREIRA, S. Effects of a single low-power light irradiation in mice with breast tumor. 2019.69 p.Dissertation (Masters in Nuclear Technology). Nuclear Energy Research Institute, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Photobiomodulation (PBM) has been used in healthcare as a therapeutic strategy for diseases of various etiologies. However, its effects on tumor cells are not yet well elucidated, generating controversies about their use in clinical practice. The objective of this work is to evaluate the effects of PBM on in vitro breast tumor cells and animal model. In vitro, we verified the action of PBM on the viability of murine lineage (4T1) breast tumor cells under normoxia and hypoxia conditions. In vivo, cells were inoculated in mice. After tumor induction, its volume was monitored daily with a digital caliper. When the tumor reached 100 mm³ treatment was started. For PBM, a red LED (660 ± 20 nm) with irradiance of 24.3 mW / cm² was used. The animals were randomly divided into groups where each group received a different energy dose: G0 (no irradiation), G1 (1.2 J), G3 (3.6 J) and G6 (6 J). After irradiation, data such as tumor volume, platelet, white and red cell levels were followed for three weeks after treatment. The results show that cells irradiated with 6 J energy showed significant reduction in cell viability under normoxia conditions. For the in vivo experiment, the irradiated groups have a longer survival compared to the control group, although no significant differences were observed between the groups regarding tumor volume. Regarding the blood count, no significant differences were observed among the groups regarding the total number of white, red cells and platelets.

Keywords: Hematological analysis, survival curve, red emission LED, 4T1 cells, hypoxia

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

CLA - Centro de *Lasers* e Aplicações

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

DMSO – Dimetilsulfóxido

FBM - Fotobiomodulação

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IB - Instituto Butantan

MTT - Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS - Solução tampão fosfato salina sem cálcio e magnésio

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SFB - Soro fetal bovino

USP - Universidade de São Paulo

WBC - Glóbulos brancos

RBC - Glóbulos vermelhos

PLQ - Plaquetas

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

LYMPH - Linfócitos

MON - Monócitos

GRAN - Granulócitos

HGB - Hemoglobina

MCV - Volume corpuscular médio

MCH - Hemoglobina corpuscular média

MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média

LISTA DE SÍMBOLOS

cm²: centímetros cuadrados

CO₂: dióxido de carbono

nm: nanometro

mm: milímetro

h: hora

mW: miliwatt

J cm⁻²: joule por centímetro cuadrado

W.cm⁻²: watt por centímetro cuadrado

J: joule

°C: graus celsius

s: segundo

μL: microlitro

mL: mililitro

λ: comprimento de onda

g: força g

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Gerais	19
2.2	Específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	Câncer	20
3.2	Fotobiomodulação	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
	ETAPA 1 – EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	29
4.1	Cultivo celular	29
4.2	Curva de crescimento	33
4.3	Hipóxia	33
4.4	Fotobiomodulação	33
4.5	Ensaio MTT (atividade mitocondrial)	35
4.6	Ensaio vermelho neutro (viabilidade celular)	35
	ETAPA 2 – Experimentos <i>in vivo</i>	37
4.7	Animais	37
4.8	Indução tumoral	37
4.9	Fotobiomodulação <i>in vivo</i>	38
4.10	Aspectos clínicos	39
4.11	Hemograma	40
4.12	Necropsia	40
4.13	Análise estatística	40
5	RESULTADOS	41
	ETAPA 1 – Experimentos <i>in vitro</i>	41
5.1	Curva de crescimento	41

5.2	Ensaio MTT	41
5.3	Ensaio Vermelho Neutro	43
ETAPA 2	– Experimentos <i>in vivo</i>	45
5.4	Aspectos clínicos	46
5.5	Massa	47
5.7	Plaquetas	49
5.8	Glóbulos brancos	50
5.9	Glóbulos vermelhos	52
5.10	Curva de sobrevivência	55
5.11	Necropsia	55
6	Discussão	58
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de metástase.....	21
Figura 2 – Principais casos de incidências de câncer.....	22
Figura 3 - Mecanismo celular após irradiação com luz.....	24
Figura 4 – Profundidade de penetração.....	25
Figura 5 – Fotomicrografia da cultura celular 4T1.....	28
Figura 6 – Esquema do processo de descongelamento e cultivo celular.....	29
Figura 7 – Esquema do processo de contagem de células.....	30
Figura 8 – irradiação com LEDbox.....	32
Figura 9 – Esquema de irradiação in vivo.....	37
Figura 10 – Curva de crescimento linhagem celular de tumor murino 4T1.....	39
Figura 11 – Atividade mitocondrial em condições de normóxia.....	40
Figura 12 - Atividade mitocondrial em condições de hipóxia.....	41
Figura 13 – Viabilidade celular (%) em condições de normóxia.....	42
Figura 14 - Viabilidade celular (%) em condições de hipóxia.....	43
Figura 15 – Acompanhamento dos aspectos clínicos.....	45
Figura 16 - Acompanhamento da massa tumoral.....	46
Figura 17 – Acompanhamento do volume tumoral.....	47
Figura 18 – Níveis de plaquetas.....	48
Figura 19 - Níveis de glóbulos brancos.....	49

Figura 20 - Níveis de linfócitos, monócitos e granulócitos.....	50
Figura 21 - Níveis de glóbulos vermelhos.....	51
Figura 22 – Curva de sobrevivência.....	53
Figura 23 – Comparativo dos órgãos entre os grupos tratados e sadio.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de luz utilizados na FBM in vitro.....	31
Tabela 2 – Parâmetros de luz utilizados na FBM in vivo.....	36
Tabela 3 – Escore dos aspectos clínicos.....	37
Tabela 4 – Dados da contagem de células vermelhas.....	52
Tabela 5 - Dados dos órgãos.....	54

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial,¹ sendo descrito na literatura como um crescimento anormal de células e formando tumores que podem invadir órgãos e tecidos próximos ou distantes do tumor primário.²³

De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde, em 2030 a carga global será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes ocasionadas por essa doença.¹ No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer, surgiram 600 mil casos em todo o território nacional no ano de 2018, sendo o câncer de mama o segundo mais incidente totalizando aproximadamente 58 mil casos (28,1%).⁴

Os principais tratamentos para o câncer consistem na remoção do tumor por cirurgia; quimioterapia, que utiliza medicamentos para atingir células tumorais; e radioterapia, que utiliza radiação ionizante para destruir ou inibir o crescimento tumoral, sendo meticulosamente planejada a fim de diminuir o dano causado aos tecidos saudáveis.⁵

A luz de baixa potência ou fotobiomodulação (FBM) como opção terapêutica vem sendo utilizada desde início da década de 70, quando experimentos em camundongos previamente tricotomizados e queimados foram expostos à luz de um laser de rubi em baixa irradiância ($<500 \text{ mW/cm}^2$), e foi observado que o processo de cicatrização foi mais rápido nos animais do grupo irradiado.⁶

Segundo a literatura, a FBM possui uma gama de efeitos em nível celular, onde há evidências de que o mesmo atua na cadeia respiratória aumentando a produção de adenosina trifosfato (ATP), a modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a indução de fatores de transcrição que são responsáveis pela síntese proteica e, com isso, podem desencadear efeitos de proliferação, migração celular, além do aumento da oxigenação tecidual.⁷

Na década de 90, diodos emissores de luz (LEDs, do inglês *light-emitting diodes*) foram introduzidos e logo se popularizaram devido ao seu baixo custo. Atualmente, vem sendo reportado bons resultados da FBM nas áreas da Saúde, utilizando-se lasers e LEDs.⁸⁻¹⁰ Os LEDs possuem como vantagem a

capacidade de fornecer densidades de potência adequadas em áreas relativamente extensas do corpo.¹¹

O efeito bioestimulatório da FBM depende do estado fisiológico das células. De acordo com a literatura, é necessário que as células da região de interesse sofram algum tipo de estresse.¹² Há trabalhos na literatura que descrevem que células tumorais, em consequência da sua intensa atividade metabólica, encontram-se em constante deficiência nutricional e com isso seriam sensíveis a ação da FBM.^{13 14} Embora existam estudos da FBM em câncer, os resultados são contraditórios.¹⁵⁻¹⁸

Atualmente a FBM se disseminou pela área da saúde, e é utilizada para diversos fins como doenças vasculares, tratamentos em algumas desordens neurológicas, alívio de dores, modulação de processos inflamatórios, aceleração de processos de restauração tecidual, alopecia, aumento de performance atlética e na produção de leite materno após a gestação.¹⁹⁻²⁸

Apesar do uso da FBM nos efeitos colaterais do tratamento de câncer, como a mucosite oral ou linfedema,^{29 30} sua utilização é contraindicada no câncer. No entanto, a FBM poderia ser utilizada em mulheres que amamentam, para tratamento de fissuras de mamilo ou aumento da produção de leite, com câncer de mama ainda não diagnosticado. Assim, o objetivo desse trabalho consiste em investigar os efeitos de uma única exposição de luz em células de câncer de mama da linhagem 4T1 *in vitro* e *in vivo* com diferentes energias (1,2, 3,6 e 6,0 J), visando a possibilidade da fototerapia ser usada tanto como estratégia terapêutica para o câncer, como para dar segurança aos usuários da luz de baixa potência na prática clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

O objetivo deste trabalho consiste em avaliar os efeitos da luz na região do vermelho ($\lambda = 660 \pm 20$ nm) com diferentes energias em células de câncer de mama e tumor de mama induzido em modelo animal.

2.2 Específicos

- Investigar o tempo de duplicação e comportamento da linhagem de câncer de mama 4T1;
- Verificar os efeitos da luz na viabilidade celular e atividade mitocondrial de células com diferentes energias;
- Desenvolver um modelo de tumor de mama em camundongos;
- Avaliar os efeitos da luz em modelo murino com diferentes energias no volume tumoral, hemograma e aspectos clínicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer

A palavra “câncer” é oriunda do latim “cancer” que é traduzido para o português como caranguejo.³¹ Possui como definição o descontrole do crescimento celular, e o seu espalhamento pelo corpo de forma semelhante às patas do caranguejo.³

Mesmo não havendo um primeiro registro científico formal sobre a doença, sabemos que o câncer é uma enfermidade milenar, já que achados paleopatológicos indicam que os tumores existiam em animais em tempos pré-históricos, muito antes de os homens aparecerem na Terra.³²

Em aproximadamente 3000 antes de Cristo, Edwin Smith fez menções em seu papiro sobre tumores na região da mama, cujo único meio de tratamento era a cauterização.³³

No século IV a.C, estudos na escola de medicina de Hipócrates, melhor definiram o câncer caracterizando-o como um tumor duro que muitas vezes surgia novamente após ser retirado, ou com o tempo, se disseminava para várias partes do corpo levando ao óbito. Nesta época foi estudado o câncer de pele, boca, estômago e mama. Hipócrates e seus discípulos consideraram o câncer de mama e o câncer de colo do útero como tumores de alto risco à vida e a estes, o tratamento era apenas paliativo. As lesões superficiais eram tratadas com cauterizações, já as mais profundas eram retiradas cirurgicamente ou considerados intratáveis dependendo do local de origem.³⁴

Após a Grécia se tornar parte do império romano em 146 a.C, Aulus Celso (25 AC-AD 50) acabou se tornando muito influente por seus estudos sobre o câncer e por ter tornado o latim a língua da medicina. Para tumores, Celso recomendava a terapia cirúrgica precoce e agressiva pois sabia que poderia perder o controle com o passar do tempo devido às metástases, e assim, acabar se espalhando para outros órgãos do corpo dificultando a recuperação do paciente. ^{32 34}

O terceiro médico grego que ficou famoso por seu conhecimento sobre tumores foi Claudius Galeno (131–AD 200). Foi apontado como médico dos gladiadores onde recebia salário por suas habilidades cirúrgicas. Escreveu cerca de 500 documentos médicos, sendo que 100 deles eram sobre câncer. Seus escritos foram traduzidos do grego para o latim e foram distribuídos em cópias manuscritas em todos os países conhecidos. Embora as habilidades cirúrgicas de Galeno fossem formidáveis para a época, o mesmo recomendava tratamentos com fármacos e ervas, para pacientes com dores e doenças terminais. Galeno prescrevia pomadas feitas a partir de papoulas. Ele acreditava que o melhor cirurgião era aquele que só utilizava métodos cirúrgicos como último recurso.³²

34

Aretaus (AD 81-138) viveu e exerceu seu papel como médico em Alexandria. Fez descobertas relevantes para a medicina como quem primeiro descreveu de forma clara e compreensiva sinais e sintomas do câncer de uretra. Em suas anotações, ele menciona 2 tipos distintos de câncer, sendo um, sólido ao tato e não ulcerável, e outro, ulcerável e com mal cheiro. Suas considerações eram de que ambos os tipos de cânceres poderiam ser crônicos e mortais, porém, a forma ulcerável era mais agressiva e não possuía nenhuma chance de cura.³²

Após a queda do império romano, Bagdá e Constantinopla tornaram-se as novas potências da medicina. Oribásio (325-403) de Bagdá, estudou a morfologia de tumores e observou que alguns possuíam tecido sólido com regiões moles e negras, que conhecemos hoje como necrose. O mesmo não conseguia resultados satisfatórios na cura de tumores ulcerados, o que reforçava a teoria de Aretaus de que tumores ulcerados eram mais agressivos e não possuíam chances de cura.³⁴

O médico do imperador de Constantinopla Justiano, Aécio (527-565), obteve sucesso ao iniciar tratamentos de amputação de todo seio em câncer de mama. Também tratou lesões não ulceradas no colo do útero, lábios e ânus com a técnica de cauterização.³⁴

No ano de 1215, o papa proibiu atos cirúrgicos dizendo que a igreja não estava satisfeita com o derramamento de sangue. No entanto, mesmo com a proibição, Theodoric (1205-1296), um bispo e médico da Itália continuou com

seus estudos e contribuições para a medicina. Sabia que cânceres poderiam envolver músculos, vasos, nervos e que para a remoção completa do tumor, era necessário também ter uma margem de segurança em volta dele, assim, o tumor era retirado juntamente com tecido sadio para diminuir as chances de o tumor voltar a crescer. Foi o primeiro médico a utilizar anestesia geral em suas cirurgias, utilizando uma esponja saturada com suco de ópio e mandrágora.³⁵

Lanfranc (1252-1315), nativo de Milão, foi expulso da Itália por razões políticas, exerceu sua profissão na França, foi o primeiro a dar uma descrição de como diferenciar tumores benignos de malignos na região da mama. Aconselhou os médicos a estudarem muito bem a anatomia complexa de vasos e nervos antes de operarem para diminuir os riscos cirúrgicos.³⁵

A partir de trabalhos de Virchow (1821-1902), o câncer foi relacionado ao processo de divisão celular. No século XIX, Winhelm Waldeyer (1836-1921), descobriu que o câncer se desenvolve a partir de células do próprio corpo.³⁶

Atualmente sabe-se que o processo de carcinogênese, ou a formação do tumor, em geral ocorre lentamente e pode levar anos para que se torne visível, e até atingir esse ponto, as células passam por algumas etapas:

Na primeira etapa as células são expostas ao agente cancerígeno e sofrem alterações no código genético se tornando células modificadas ou mutadas.

Na segunda etapa, as células já geneticamente modificadas, continuam sendo afetadas por agentes cancerígenos externos, e lenta e gradualmente vão se tornando malignas.

Por fim, em seu último estágio, o descontrole das funções celulares acontece, e com isso, o processo natural de apoptose não ocorre e a célula começa a sua proliferação formando o tumor visível.^{2 37}

Devido à duplicação ininterrupta das células neoplásicas, as mesmas necessitam de mais energia e, dessa forma, possuem maior captação de glicose se comparadas às células sadias. Para manter o fornecimento de oxigênio e nutrientes para essas células, o processo de angiogênese é contínuo, resultando em uma vascularização desorganizada e ineficiente, o que leva à compressão e obstrução de vasos sanguíneos, e formação de regiões com baixa concentração de oxigênio chamadas de hipóxia.^{38 39}

A medida que o tumor vai progredindo, as células tumorais que o compõe podem adquirir a capacidade de se desprenderem do seu local de origem e se locomoverem através da corrente sanguínea ou vasos linfáticos, invadindo tecidos e órgãos vizinhos ou distantes do seu ponto inicial, iniciando assim, o processo chamado de metástase.

Figura 1 – Processo de metástase.

Fonte – Adaptado de Fidler ⁴⁰

De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde, em 2030 a carga global será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes ocasionadas por essa doença.¹

Segundo dados do INCA, os tipos mais frequentes de cânceres no Brasil são o de pulmão, mama nas mulheres e próstata nos homens.⁴ Mesmo possuindo um bom prognóstico, se descoberto em fases iniciais, o câncer ainda é a segunda maior causa de mortalidade no Brasil, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares.^{2 41}

Figura 2 – Principais casos de incidências de câncer separados por sexo em 2018

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte – INCA⁴

Tratamentos para pacientes oncológicos se baseiam na associação de diferentes modalidades terapêuticas como procedimentos cirúrgicos, removendo toda área do tumor e regiões adjacentes com margem de segurança, afim de diminuir o risco de haver recidiva; quimioterapia, que consiste no uso de fármacos que atingem células de crescimento rápido, consequentemente causando danos ao tumor; e a radioterapia, que utiliza altas doses de radiação ionizante na região tumoral onde primeiramente o paciente passa por um planejamento acurado com o propósito de diminuir o dano causado aos tecidos sadios que se encontram próximos ao tumor.⁴²⁻⁴⁴

3.2 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação é o nome dado ao uso de luz na região do vermelho ou infravermelho como método terapêutico para curar, restaurar ou estimular processos fisiológicos e assim reparar danos causados por lesões físicas ou doenças.¹¹

A luz é radiação eletromagnética e se a fonte de luz é um laser, suas características são únicas, como acolimação, coerência espacial e temporal e monocromaticidade. Tais características foram descritas inicialmente por Theodore Maiman em 1960.⁴⁵

Na década de 90, diodos emissores de luz (LEDs) foram introduzidos e logo se popularizaram devido ao seu baixo custo. Atualmente, vem sendo reportado bons resultados da fotobiomodulação nas áreas da Saúde, utilizando-se lasers e LEDs.^{8 9 10} Os LEDs possuem como vantagem a capacidade de fornecer densidades de potência adequadas em áreas relativamente extensas do corpo.¹¹

A FBM teve início no início da década de 70, onde experimentos em camundongos previamente tricotomizados e queimados foram expostos à luz de um laser de rubi em baixa irradiância ($<500 \text{ mW/cm}^2$), e foi observado que o processo de cicatrização foi mais rápido nos animais do grupo irradiado.⁶

Segundo a literatura, a FBM possui uma gama de efeitos em nível celular, onde há evidências de que o mesmo atua na cadeia respiratória aumentando a produção de adenosina trifosfato (ATP), a modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a indução de fatores de transcrição que são responsáveis pela síntese proteica e, com isso, podem desencadear efeitos de proliferação, migração celular, além do aumento da oxigenação tecidual. (Figura 3)⁷

Figura 3 -Mecanismo celular após irradiação com luz. A imagem demonstra a absorção da luz pelos cromóforos localizados na cadeia respiratória, para desencadeamento de efeitos biológicos.

Fonte - Adaptado de Chung ⁷

O comprimento de onda influencia na profundidade de penetração que a luz pode alcançar em diferentes tecidos, esquematizado na figura 4. Ainda que não seja possível estabelecer o melhor comprimento de onda para cada enfermidade em questão, trabalhos na literatura sugerem que a região do vermelho (630-690 nm) é a melhor alternativa para tratamentos de feridas expostas, úlceras e herpes. ⁴⁶⁻⁴⁸

Figura 4— Profundidade de penetração de diferentes comprimentos de onda na pele humana.

Fonte – Laser de Baixa Potência – Princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia ⁴⁶

Devido à curva de dose resposta bifásica, é necessário um conjunto de parâmetros (comprimento de onda, potência de saída, exposição radiante, irradiância e tempo de exposição) precisos para fornecer os efeitos desejados para a enfermidade em questão. Caso esses parâmetros não sejam os adequados, os benefícios não acontecem.^{7 11}

Atualmente a FBM se disseminou pela área da saúde, e é utilizada para diversos fins como doenças vasculares, tratamentos em algumas desordens neurológicas, alívio de dores, modulação de processos inflamatórios, aceleração de processos de restauração tecidual, alopecia, aumento de performance atlética e na produção de leite materno após a gestação.¹⁹⁻²⁸

O efeito bioestimulatório da FBM depende do estado fisiológico das células. De acordo com a literatura, é necessário que as células da região de interesse sofram algum tipo de estresse.¹² Contudo, há trabalhos na literatura que descrevem que a célula tumoral, em consequência da sua intensa atividade metabólica, encontra-se em constante deficiência nutricional e com isso seriam sensíveis à ação da FBM.^{13 14} Embora existam estudos da FBM em câncer, os resultados são contraditórios.¹⁵⁻¹⁸

Powell e colaboradores utilizaram diferentes linhagens celulares, tais como, carcinoma de câncer de mama, melanoma e células epiteliais de mama imortalizadas, variando as densidades de energia como também os comprimentos de onda. Para o comprimento de onda 780 nm (50 mW) as densidades de energia foram 0,5, 1, 2, 3, 4, 10 e 12 J/cm², para os lasers de 830 nm (30 mW) e 904 nm (90 mW) as densidades de energia foram de 0,5, 1, 2,3, 4, 10 e 15 J/cm² com exposições únicas ou fracionadas.

Foi reportado que o câncer de mama poderia aumentar seu nível de proliferação ou não sofrer nenhuma influência da FBM e que a resposta variava de acordo com a quantidade de irradiações e doses de energia entregue.¹⁶

Frigo e colaboradores utilizaram uma linhagem de células de melanoma murino (B16F10) para irradiação com um laser emitindo em $\lambda = 660$ nm, com potência de 50 mW e irradiância de 2.5 W/cm² com diferentes densidades de energia 150 J/cm² e 1050 J/cm² fracionando a energia entregue em três dias consecutivos 9 J e 63 J respectivamente. Concluíram que não houve diferença estatística em relação ao grupo não irradiado.¹⁷

Crous e colaboradores estudaram os efeitos da FBM com uma única irradiação em células de câncer de pulmão utilizando três densidades de energia diferentes (5, 10, e 20 J/cm²) utilizando um laser de diodo com $\lambda = 636$ nm e potência de 85 mW. Como resultado, a proliferação celular foi estimulada e houve aumento no número de células viáveis.¹⁸

Zhu e colaboradores fizeram experimentos com dois tipos de células de melanoma humano utilizando um laser pulsado, e densidade de energia de 3,2 J/cm² fracionado em 2 vezes por semana durante 4 semanas (8 irradiações). Os resultados demonstraram que houve aumento na proliferação celular das duas linhagens de melanoma.¹⁵

Atualmente, a FBM é reconhecida como método eficaz e é utilizada como terapia coadjuvante no tratamento de mucosite oral, radiodermite e linfedema, que são causados por efeitos colaterais de tratamentos em pacientes oncológicos.^{3049 50}

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada em duas etapas, primeiramente a FBM *in vitro* no laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) e no laboratório de Radiobiologia do Centro de Biotecnologia (CB). Na segunda etapa, a FBM foi realizada em modelo animal no biotério. Todos ficam localizados nas instalações do IPEN-CNEN/SP. As leituras hematológicas foram realizadas em parceria com o laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantã (IB). Nesta seção será descrita a metodologia usada durante o desenvolvimento deste trabalho.

ETAPA 1 – EXPERIMENTOS *IN VITRO*

4.1 Cultivo celular

A linhagem celular 4T1 (Figura 5), utilizada para o desenvolvimento desse estudo foi gentilmente cedida pela Dra. Sofia Nascimento dos Santos do Centro de Radiofarmácia (IPEN – CNEN/SP), e mantidas no Laboratório de Terapia Óptica (Centro de Lasers e Aplicações, IPEN – CNEN/SP) a -196°C até o início dos experimentos. A escolha por essa linhagem celular se deu a sua vasta descrição na literatura, afinidade com o modelo animal BALB/c e semelhança ao modelo de câncer de mama humano.⁵¹⁻⁵⁵

Figura 5—Fotomicrografia da cultura celular da linhagem de tumor murino 4T1.

Fonte – Autor da dissertação

Tubos criogênicos contendo amostras foram descongelados em temperatura ambiente e, em seguida, seu conteúdo foi transferido para um tubo cônico contendo 5 ml de meio de cultura fresco cada, para remover a substância crioprotetora (di-metil-sulfóxido) – DMSO e, então, o mesmo foi centrifugado a 276 g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, EUA). As células foram semeadas em frasco de cultura (75 cm²) com 10 ml de meio de cultura e mantidas em incubadora a 37°C e 5 % CO₂ até atingirem 80 % de confluência para que pudéssemos dar início aos experimentos.

Figura 6–Esquema do processo de descongelamento e cultivo celular.

Fonte – Autor da dissertação

Para a expansão da cultura celular, os meios de cultura dos frascos foram removidos, e as células aderidas em monocamada foram lavadas com 2mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem cálcio e magnésio (pH= 7,2). Em seguida foi adicionado 3mL de tripsina EDTA (Vitrocell, Brasil) deixado por 5 minutos a 37°C para remoção das células. Para a inativação da tripsina, as células foram inseridas em um tubo cônico junto a 6mL de meio de cultura, em seguida foram centrifugadas a 276g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o concentrado de células ressuspenso em 1 mL de meio de cultura onde foi dividido e semeado em frascos de cultivo celular (75 cm²). Para manutenção da viabilidade celular, a troca do meio de cultura foi feita a cada dois dias. Alíquotas dessas culturas foram congeladas em nitrogênio líquido a fim de manter estoque das linhagens.

Para iniciar os experimentos o número de células viáveis foi medido através do método por exclusão de células coradas com azul de tripan, já que este é capaz de penetrar em células não viáveis pois estas possuem poros em sua membrana, apresentando permeabilidade e, por consequência,

permitem a penetração do corante na célula.⁵⁶ A contagem de células viáveis foi feita no hemocitômetro (Câmara de Neubauer).

Quando as células atingiram 80% de confluência no frasco de cultura, foram feitos os mesmos procedimentos adotados para a expansão celular. Após a ressuspensão do *pellet* em 1 mL de meio de cultura, foram adicionados em um microtubo do tipo *ependorf* 80 uL de PBS, 10 µL de azul de tripan e 10 µL da suspensão celular. Em seguida, a solução foi homogeneizada e 10 µL foram retirados da solução e adicionados no hemocitômetro. As células não coradas foram contadas em um microscópio invertido.

O número total de células foi obtido através da equação 1:

(1)

$$\text{Número de células viáveis} = \frac{\text{Nº de células contadas} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4}{4}$$

Figura 7–Esquema do processo de contagem de células viáveis por meio de exclusão por azul de tripan.

Fonte – Autor da dissertação

4.2 Curva de crescimento

Para verificarmos a curva de crescimento, as células foram semeadas na densidade de 1×10^4 células por poço, em triplicata, em uma placa de 96 poços e incubada a 37°C e 5 % CO_2 . A contagem das células viáveis foi realizada durante 7 dias consecutivos, por meio do método de exclusão de células coradas por azul de tripan.

O tempo de duplicação das células 4T1 foi calculado de acordo com a fórmula de Patterson,⁵⁷ como demonstrado na equação 2:

$$Td = T_x \frac{\log 2}{\log \left(\frac{N_2}{N_1} \right)} \quad (2)$$

Onde N_1 representa o número de células no primeiro dia da fase exponencial, N_2 representa o número de células após T horas do plaqueamento (fim da fase exponencial), e T representa o tempo decorrido de N_1 para N_2 .

4.3 Hipóxia

Com o objetivo de simular o ambiente de hipóxia, as células foram semeadas na concentração de 1×10^4 e mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 overnight e, logo após a constatação da adesão celular na placa de 96 poços, foram incubadas em condições de hipóxia com 1 % de oxigênio (Whitley H35 Hypoxystation) a 37°C e 5 % CO_2 . O mesmo procedimento foi realizado para os experimentos em normoxia, porém em concentrações normais de oxigênio.

4.4 Fotobiomodulação

As placas foram irradiadas de maneira homogenia utilizando um LEDBox (Biolambda, Brasil) na região do vermelho ($\lambda = 660 \pm 20 \text{ nm}$) e irradiância de 40 mW/cm^2 . Os seguintes parâmetros de luz foram utilizados:

Tabela 1 – Parâmetros de luz utilizados na FBM *in vitro*

Grupo	Energia (J)	Fluência (J/cm ²)	Tempo de exposição (s)
G ₀	0	0	0
G _{1,2}	1,2	4	100
G _{3,6}	3,6	12	300
G ₆	6	20	500

Fonte – Autor da dissertação

Figura 8– irradiação com LEDbox.

Fonte – Autor da dissertação

4.5 Ensaio MTT (atividade mitocondrial)

O ensaio MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um método conhecido por medir a atividade mitocondrial presente nas células. Esse método baseia-se na conversão do tetrazólio solúvel (um sal amarelo) em cristais de formazan (insolúveis e roxos) pela enzima succinato desidrogenase presente nas células.⁵⁸

Para a realização desse experimento foi retirado 100 µL de meio dos poços e adicionados 10 µL de MTT na concentração de 5 µg/mL em cada poço experimental e, então, foram levadas à estufa novamente, de acordo com a condição de oxigênio onde permaneceram por 4 h. Em seguida, 85 µL da solução foi retirada de cada poço e adicionado 50 µL de DMSO para a solubilização dos cristais formados. As placas foram levadas à estufa novamente onde permaneceram por 10 minutos. Após esse período as placas foram levadas ao espectrofotômetro (Spectramax M4, Molecular Devices, EUA) onde foi feita a medida da absorbância com comprimento de onda em 540nm.⁵⁸

As leituras foram feitas no mesmo diado plaqueamento e 24 horas após a irradiação.

4.6 Ensaio vermelho neutro (viabilidade celular)

O ensaio de captação de vermelho neutro é um dos testes de viabilidade celular bem descrito na literatura. O método consiste na capacidade das células viáveis de absorver o corante vermelho neutro. Este corante penetra na membrana celular e se concentra nos lisossomos. O corante então é extraído das células viáveis por meio de uma solução de etanol acidificado e a absorbância do corante é quantificada usando um espectrofotômetro.⁵⁹

Para a realização do mesmo, o meio de cultura dos poços experimentais foi aspirado e foram adicionados 150 µL de PBS para a remoção de resíduos. Em seguida a solução foi aspirada cuidadosamente e então, foi adicionado 100 µL de uma solução contendo vermelho neutro e meio RPMI sem SFB e, então, as placas foram mantidas em 37°C e em atmosfera de CO₂ a 5 % por 2 horas. Após esse período, a solução foi removida dos poços e adicionou-

se 150 μ L da solução de descoloração do vermelho neutro. As placas foram mantidas em um agitador de placas por 10 minutos e, então, levadas ao espectrofotômetro (Spectramax M4, Molecular Devices, EUA) para a leitura em 540 nm.⁵⁹

ETAPA 2 – Experimentos *in vivo*

4.7 Animais

O estudo em animais foi realizado de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) nº 214/18. Para o desenvolvimento da parte experimental *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c (n=35), fêmeas, com aproximadamente 5 semanas de idade e massa corpórea de aproximadamente 20 g. Os animais foram mantidos em horários de iluminação alternados de 12 h de luz e 12 h no escuro, com ração e água à vontade durante todo o período experimental.

4.8 Indução tumoral

Para a preparação do inóculo, células da linhagem 4T1 foram tripsinizadas, quantificadas em câmara de Neubauer e suspensas na concentração de 1×10^5 células em 40 μ L de PBS. Para a indução do tumor, os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (2,5 %) e manutenção com 1,5 %. Sob anestesia, os animais foram tricotomizados na região da glândula mamária. Posteriormente, foi realizada assepsia local e os animais receberam um inóculo subcutâneo na região da mama esquerda do quadrante inferior com seringa de 1 mL e agulha hipodérmica.

Os animais foram acompanhados diariamente, observando-se as manifestações clínicas, desde o momento inicial após a inoculação até ser possível observar um nódulo delimitado em todos os animais (aproximadamente 7 dias). Nesse momento, teve início a avaliação quantitativa do tumor com auxílio de um paquímetro digital. O volume do tumor foi determinado utilizando a equação 3.⁵⁷

$$V = 0,5 \cdot C \cdot L^2 \quad (3)$$

Na equação 3, V é o volume em mm^3 , C é o comprimento e L a largura do tumor, ambos em mm .

Após a inoculação, quando a massa tumoral alcançou o volume de aproximadamente 100 mm³ (aproximadamente 14 dias), foi considerado positiva a instalação do processo neoplásico.

4.9 Fotobiomodulação *in vivo*

Após o volume tumoral atingir 100 mm³, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos e submetidos à fotobiomodulação utilizando um LEDBox (Biolambda, Brasil), na região do vermelho ($\lambda = 660 \pm 20$ nm), e irradiância de 24,3 mW/cm². Os grupos experimentais foram submetidos a uma única irradiação com os seguintes parâmetros de luz:

Tabela 2 – Parametros de luz utilizados na FBM *in vivo*

Grupo	Energia (J)	Fluência (J/cm ²)	Tempo de exposição (s)
G ₀	0	0	0
G _{1,2}	1,2	1,8	49
G _{3,6}	3,6	5,6	148
G ₆	6	9,4	246

Fonte – Autor da dissertação

O procedimento foi realizado de forma padronizada, os animais foram anestesiados por via inalatória durante todo o processo, a distância do LED foi mantida constante afim de não sofrer variação na energia entregue. Os animais foram cobertos com um acessório de cor preta onde só o tumor foi exposto à luz durante a irradiação.

Figura 9—Esquema de irradiação *in vivo*. A seta vermelha indica o local onde o modelo animal é anestesiado via inalatória. A seta branca indica o local onde o tumor está exposto.

Fonte – Autor da dissertação

4.10 Aspectos clínicos

Durante o período experimental, sinais clínicos como perda de peso corporal, curvatura, hipocinesia, piloereção, foram acompanhados e os dados foram convertidos em pontuação ao final do experimento de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 – Escore dos aspectos clínicos.

Sinal clínico	Grau	Pontuação
Perda de peso	Não possui	0
	5%	1
	10%	5
	20%	10
Hipocinesia	Atividade normal	0
	Atividade reduzida	1
	Inativo	5
Curvatura	Postura normal	0
	Postura arqueada	1
Piloereção	Possui	1
	Não possui	0

Fonte – Adaptado de Fentener.⁶⁰

4.11 Hemograma

Afim de identificar alguma mudança hematológica desenvolvemos um cronograma de hemograma onde os animais foram acompanhados durante 3 semanas após o tratamento com a FBM. As grandezas analisadas foram: glóbulos brancos (WBC), vermelhos (RBC) e plaquetas (PLQ).

Para recolher as amostras de sangue, os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (2,5 %) e manutenção com 1,5 %. As amostras (aproximadamente 30 μ L) foram colhidas via veia caudal e como anticoagulante foi utilizado 1 μ L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10 %. As amostras foram lidas em analisador hematológico (Mindray, BC 2800 VET) com o padrão de referência em camundongo.

4.12 Necropsia

Os animais foram eutanasiados na quinta semana após irradiação, por meio de excesso de anestésico (60 mg/kg de Xilazina e 235 mg/kg de Ketamina). Foram realizadas as necropsias e coletada pulmões, fígado, baço, rins e tumor, órgãos esses que são descritos como sítios principais de metástases.⁵⁴ Imagens fotográficas padronizadas foram captadas de cada órgão e tumor com o objetivo de comparar os efeitos da fotobiomodulação entre os grupos.

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no programa Graph Pad Prism 7.0. Para verificar a distribuição dos dados, o teste Shapiro Wilk foi realizado. Após tal análise, utilizou-se o teste Anova One-Way para os experimentos *in vitro* e Anova Two-Way para os ensaios *in vivo*. Como pós- teste foi utilizado o teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Os dados são apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

ETAPA 1 – Experimentos *in vitro*

5.1 Curva de crescimento

A figura 10 representa a curva de crescimento da linhagem celular de tumor de mama murino 4T1. Observa-se que as células estão em proliferação até aproximadamente 60 h após plaqueamento, quando elas entram na fase estacionária de crescimento. O tempo de duplicação das células é de $29,2 \pm 3,5$ h.

Figura 10 – Curva de crescimento linhagem celular de tumor murino 4T1

Fonte – Autor da dissertação

5.2 Ensaio MTT

A figura 11 demonstra a atividade mitocondrial, em porcentagem, das células de tumor de mama murino 24 horas após a FBM em condições de normóxia. Os grupos G3 e G6 mostraram aumento em sua atividade mitocondrial em relação ao grupo controle (G0), entretanto, não foi estatisticamente significativo.

Figura 11 – Atividade mitocondrial da linhagem celular de tumor murino 4T1 em condições de normóxia 24 horas após FBM. (N=9) Os dados foram normalizados em relação ao grupo G0.

Fonte – Autor da dissertação

A figura 12 por sua vez representa o comportamento das células em condições de hipóxia 24 horas após a FBM. O grupo G1 mostra um aumento de 8% em sua atividade mitocondrial em relação ao grupo G0, porém, sem significância estatística.

Figura 12 - Atividade mitocondrial da linhagem celular de tumor murino 4T1 em condições de hipóxia 24 horas após FBM. (N=9) Os dados foram normalizados em relação ao grupo G0 e são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

5.3 Ensaio Vermelho Neutro

A figura 13, apresenta a viabilidade celular, em porcentagem, das células de tumor de mama murino em condições de normóxia 24 horas após a FBM. A viabilidade celular do grupo G6 mostrou diminuição em sua viabilidade celular estatisticamente significativo em relação ao grupo G0.

Figura 13 – Viabilidade celular (%) para as células de tumor de mama murino em condições de normóxia 24 horas após a FBM (N=9). Os dados foram normalizados em relação ao grupo G0 e são apresentados com valores da média $\pm$ EPM. O símbolo * representa diferença estatística em relação aos grupos G0 e G6.

Fonte – Autor da dissertação

A figura 14 exibe a viabilidade celular, em porcentagem, das células de tumor de mama murino em condições de hipóxia 24 horas após a FBM. A viabilidade celular de todos os grupos caiu expressivamente após 24 h. Os grupos irradiados demonstram um pequeno aumento em relação ao grupo G0 não irradiado, entretanto não são significativos estatisticamente.

Figura 14 - Viabilidade celular (%) para as células de tumor de mama murino em condições de hipóxia 24 horas após a FBM (N=3). Os dados foram normalizados em relação ao grupo G0 no tempo experimental 0h e são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

ETAPA 2 – Experimentos *in vivo*

Inicialmente, os dados foram coletados durante 5 semanas, entretanto, devido ao índice de mortalidade dos animais aumentar após o dia 21, foi estabelecido que para fins estatísticos, os dados seriam contabilizados até a

terceira semana de experimento. Os dados subsequentes foram colhidos para realizar a curva de sobrevivência entre os grupos.

5.4 Aspectos clínicos

A figura 15 mostra em forma de pontuação os aspectos clínicos em relação ao tempo, divididos por cada grupo experimental de acordo com a tabela 3. Uma semana após a irradiação, nenhum sinal foi computado. O grupo G0 não irradiado se manteve com escore acima dos grupos tratados a partir do dia 10 até o final do experimento. A partir do dia 14 o grupo G1 foi o que teve melhor desempenho comparado aos outros grupos irradiados. Ao final do experimento, o grupo G0 se mostrou com maior pontuação. Entre os grupos irradiados, o G3 foi o que teve maior pontuação.

Figura 15– Acompanhamento dos aspectos clínicos dos animais após serem submetidos à FBM (n=20). Os dados foram somados de acordo com a tabela 3.

Fonte – Autor da dissertação

5.5 Massa

A figura 16 apresenta os dados de massa corpórea dos animais por grupo durante 3 semanas após o tratamento com a FBM. Os dados demonstram que os níveis de massa corpórea do grupo G3 se mantiveram abaixo dos demais grupos a partir da primeira semana de experimento. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 16 - Acompanhamento da massa tumoral (g) dos animais (n=32) após serem submetidos à FBM. Os dados foram normalizados em relação a cada

animal no dia do tratamento que representa a massa corpórea após a exposição à FBM e são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

5.6 Volume tumoral

A figura 17exibe as medidas do volume tumoral em mm³ no modelo animal. Os animais do grupo G0 que não foram submetidos a FBM mostraram crescimento mais lento em relação aos grupos tratados, entretanto, não houve diferença estatística. Entre os grupos que foram sujeitos àFBM, não foi observada diferença significativa em nenhum momento experimental.

Figura 17 – Acompanhamento do volume tumoral (mm³) dos animais (n=32) após serem submetidos à FBM. Os dados foram normalizados em relação a cada

animal no dia do tratamento que representa o volume tumoral após a exposição à FBM e são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

5.7 Plaquetas

Os dados da figura 18 apresentam os níveis de plaquetas ($\times 10^9/L$) dos grupos desde o início da fase experimental. Os dados mostraram queda nos níveis de plaquetas com o passar do tempo, sendo que todos os grupos chegaram ao fim do experimento com os níveis de plaquetas abaixo dos seus valores iniciais. Não houve diferença estatística entre dos grupos.

Figura 18 – Níveis de plaquetas ($\times 10^9/L$) relacionados com o tempo experimental ($n=35$). A área entre as linhas pontilhadas representa os valores de referência em que os animais do grupo controle negativo se encontram (animais sem tumor). Os dados são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

5.8 Glóbulos brancos

Os dados da figura 19 apresentam os níveis de glóbulos brancos ($\times 10^9/L$) dos grupos desde o início da fase experimental. Os dados mostram que após os animais serem expostos a FBM, todos os grupos com tumor se mantiveram acima dos níveis de referência do controle negativo (sadio). Houve aumento nos glóbulos brancos em todos os grupos no decorrer do experimento, contudo não foi observado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e intragrupos.

Figura 19 - Níveis de glóbulos brancos($\times 10^9/L$) relacionados com o tempo experimental ($n=35$). A área entre as linhas pontilhadas representa os valores de

referência em que os animais do grupo controle negativo se encontram. Os dados são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

Com o propósito de observar mais profundamente o comportamento do sistema imune após os grupos serem expostos à FBM, foram coletados dados dos níveis de linfócitos, monócitos e granulócitos circulantes na corrente sanguínea. O gráfico A da figura 20, apresenta os níveis de linfócitos. Os dados mostram aumento na contagem de células de todos os grupos com tumor a partir da segunda semana após a FBM permanecendo acima dos valores de referência. Os gráficos B e C representam, respectivamente, os níveis de monócitos e granulócitos. Ambos apresentaram níveis acima dos valores de referência a partir da primeira semana após a FBM e se mantiveram até o fim do período experimental. Não foi observado diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Interessantemente, parece que os linfócitos se mantêm nos mesmos níveis durante todo o procedimento experimental, ao contrário de monócitos e granulócitos, que após 4 semanas de indução do tumor, aumentaram significativamente na corrente sanguínea, independente do grupo analisado.

Figura 20—Os gráficos A, B e C representam, respectivamente, os níveis de linfócitos, monócitos e granulócitos na corrente sanguínea (n=35). A área entre as linhas pontilhadas representa os valores de referência em que os animais do grupo controle negativo se encontram. Os dados são apresentados com valores da média $\pm$ EPM. Os dados são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

5.9 Glóbulos vermelhos

Os dados da figura 20 apresentam os níveis de glóbulos vermelhos ($\times 10^{12}/\text{L}$) dos grupos desde o início da fase experimental. Os dados mostram que os níveis de glóbulos vermelhos a partir do da segunda semana após a FBM se mantiveram abaixo dos valores de referência do controle negativo. Não houve diferença estatística significativa em nenhum momento do experimento.

Figura 21 - Níveis de glóbulos vermelhos ($\times 10^{12}/L$) relacionados com o tempo experimental (n=35). A área entre as linhas pontilhadas representa os valores de referência em que os animais do grupo controle negativo se encontram. Os dados são apresentados com valores da média $\pm$ EPM.

Fonte – Autor da dissertação

Com o mesmo intuito de observar mais profundamente o comportamento dos eritrócitos, dados de células sanguíneas vermelhas também foram coletados, mais precisamente, hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), após os grupos serem expostos à FBM. Os dados apresentados na tabela 4 mostram que, diferente dos glóbulos brancos, os glóbulos vermelhos não sofreram variação significativa, nem mudança de comportamento, durante todo o período experimental.

Tabela 4 – Dados de média e desvio padrão da contagem das células vermelhas, os dados foram separados respectivamente por hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

		HGB	MCV	MCH	MCHC
Antes da FBM	G0	15,3±0,02	50,02±0,91	14,86±1,63	29,07±0,35
	G1	17,07±0,61	51,14±1,49	14,87±1,49	28,72±1,47
	G3	17,3±2,05	52,04±0,30	14,15±0,43	28,8±0,08
	G6	17,06±0,50	52,96±1,26	14,62±1,09	27,6±0,67
FBM	G0	16,6±0,09	53,85±0,01	15±0,14	27,95±0,21
	G1	17,07±0,61	52,25±2,56	14,87±0,43	28,57±1,47
	G3	17,3±2,05	52,96±1,72	14,86±0,33	27,76±1,26
	G6	17,06±0,50	53,12±1,14	14,86±0,23	28,04±0,67
1 Semana	G0	15,15±1,06	50,5±2,26	14,45±0,07	27,6±0,42
	G1	18,16±1,49	51,46±2,03	14,9±0,38	28,86±1,15
	G3	16,56±0,82	50,42±0,96	14,58±0,40	29,04±0,92
	G6	14,08±3,76	52,04±2,05	14,62±0,40	27,78±1,03
2 Semanas	G0	14,85±0,63	49,15±0,91	14,15±0,07	28,8±0,42
	G1	15,68±1,75	50,28±1,15	14,46±0,18	28,88±0,34
	G3	15,5±0,94	50±1,49	14,34±0,11	28,72±0,75
	G6	14,75±0,40	51,14±2,64	14,64±0,32	28,78±1,35
3 Semanas	G0	15,85±1,42	49,1±1,41	14,1±0,97	28,2±0,53
	G1	15,93±0,55	49,3±1,13	14,3±0,2	29,06±0,35
	G3	15,2±0,75	50,73±1,95	14,43±0,30	28,56±0,61
	G6	16,42±1,27	50,02±0,76	14,45±0,1	28,95±0,28

Fonte – Autor da dissertação

5.10 Curva de sobrevida

A figura 21 mostra a curva de sobrevida dos animais durante o período experimental (n=32). O grupo G0 foi o que apresentou maior índice de mortalidade (66,7%), enquanto os animais dos grupos G1 e G6 submetidos a FBM apresentaram respectivamente 37,5% e 50% de mortalidade. O grupo G3 foi o que chegou ao final do experimento com o menor índice de mortalidade com 28,6%. No dia 32 os animais foram eutanasiados, sendo esse considerado o último dia experimental.

Figura 22 – Curva de sobrevida. Os dados são mostrados em porcentagem.

Fonte – Autor da dissertação

5.11 Necropsia

Após a eutanásia dos animais, os órgãos e tumor foram coletados. A figura 22 faz um comparativo macroscópico entre os grupos. As imagens dos grupos com tumor mostram aumento do baço em relação ao grupo controle negativo (sadio). Entre os grupos com tumor não foi observado diferença macroscópica significativa no tamanho dos órgãos.

Figura 23 – Comparativo dos órgãos entre os grupos tratados e sadio.

Fonte – Autor a dissertação

Os dados de massa foram coletados no dia da eutanásia. Apesar da massa tumoral do grupo controle ser aproximadamente 40% maior que àquela dos grupos irradiados, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os dados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Dados de média e desvio padrão dos valores de massa dos órgãos e tumor dos grupos após a eutanásia (N=4). Não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

		Baço	Fígado	Rins	Pulmão	Tumor
Massa (mg)	Sadio	159,23±17,14	1245,46±88,66	335,33±5,02	216,13±18,45	
	G0	1387,42±265,31	1672,15±255,84	343,72±140,42	384,07±91,52	3580,5±746,69
	G1	1084,7±627,83	1590,85±456,38	298,57±30,56	325,27±188,26	2254,22±1185,18
	G3	1266,4±388,11	1284,8±189,10	313,42±47,34	414,85±322,04	2178,87±1368,54
	G6	1400,8±226,56	1471,57±199,58	333,62±43,93	373,45±260,02	2324,1±674,73

Fonte – Autor da dissertação

6 Discussão

Na primeira etapa deste trabalho, células de tumor de mama murino foram submetidas à FBM em condições de normoxia e em hipóxia, a fim de verificar se a luz poderia promover comportamentos distintos. Foram utilizadas três energias com o objetivo de verificar se energias mais baixas ou mais altas poderiam influenciar na viabilidade celular. Os resultados obtidos apontam que a FBM na região do vermelho, entregando 6 J, foi capaz de reduzir a viabilidade celular em condições de normoxia.

Segundo a literatura, para que a luz possa exercer algum efeito é necessário que as células sofram algum tipo de estresse.^{61 62} Estudos apontam que devido as células cancerosas possuírem alto metabolismo, estão constantemente em estresse⁶³. No entanto, diferente do que é sugerido pela literatura, nossos resultados mostraram menor viabilidade celular para o G6, quando comparado ao GC.

Embora os mecanismos não estejam completamente elucidados até o momento, parece haver algum consenso sobre o papel do citocromo c na resposta celular à FBM^{11,62}. O citocromo c é considerado como um dos principais fotoaceitadores da luz visível e também do infravermelho próximo⁶². Portanto, essa molécula pode ser crucial para os efeitos da FBM nas células. É importante ressaltar que Shafer et al. mostraram que o comportamento do citocromo c em células de tumor de mama é diferente quando comparado às células normais⁶⁴, o que poderia explicar nossos resultados.

Outra questão importante é o fato dessas células adaptarem seu metabolismo por meio de fatores de transcrição com intuito de continuar sua proliferação mesmo em condições de baixos níveis de oxigênio, gerando ATP por meio da glicólise anaeróbia,⁶⁵ efeito evidenciado nos resultados do experimento em hipóxia. Com as células se adequando ao estresse induzido com o ambiente de hipóxia, a FBM com os parâmetros utilizados, não surtiram efeitos significativos.

Na segunda etapa, camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram inoculadas na região da mama inferior direita com células de câncer de mama

murino e foram submetidas a uma única exposição de FBM a fim de verificarmos quais os efeitos da luz no processo tumoral.

Existem controvérsias acerca do uso da FBM em câncer, já que trabalhos indicam aumento na proliferação de células malignas.^{55 66 67} Entretanto, a FBM se mostra bem eficaz em tratamentos de efeitos colaterais causados por métodos terapêuticos contra o câncer, como mucosite oral e linfedema^{30 50}. Recentemente, Hamblin e colaboradores¹¹ incentivaram o estudo da FBM em câncer, não só para usá-la como abordagem terapêutica, mas também chamando a atenção para o uso da FBM em outros tratamentos de saúde, no caso do usuário ter um câncer não diagnosticado.

Nossos resultados mostram que a FBM na região do vermelho, nos parâmetros adotados nesse trabalho, não causou diferença significativa na evolução do volume tumoral. Os resultados da figura 17 mostram que o volume tumoral do grupo G0 que não foi exposto a luz teve uma progressão mais lenta nas 2 semanas seguintes ao tratamento, entretanto ao final do acompanhamento os dados de todos os grupos com tumor se mantiveram próximos e sem diferença estatística, mostrando que a FBM não surtiu nenhum efeito que estimulasse o tumor a evoluir com mais rapidez.

Segundo Fentener e colaboradores,⁶⁸ os aspectos clínicos podem representar diretamente as condições de saúde do animal. Os dados da figura 15 indicam que o grupo G0, que não foi exposto à FBM, teve maior pontuação indicando pior estado clínico no final do tempo experimental, enquanto os grupos que foram expostos a luz tiveram uma baixa pontuação. Esses resultados indicam que a FBM, nos parâmetros utilizados, pode ter promovido algum efeito, que refletiu na curva de sobrevida dos animais, mas que não foi identificado através da análise hematológica.

A análise hematológica traz dados importantes em relação à evolução tumoral. As plaquetas fazem parte das células sanguíneas e tem como principal função, parar sangramentos se aglomerando e formando coágulos. Circulam na corrente sanguínea de 8 a 10 dias quando são retiradas e destruídas pelo baço.⁶⁹ Trabalhos na literatura demonstram que variações na contagem de plaquetas circulantes no sangue indicam alterações no funcionamento do baço.⁶⁹

Segundo Nash⁷⁰, a contagem de plaquetas circulantes no sangue pode ajudar no diagnóstico de possíveis cânceres, uma vez que vem acompanhado de alterações em seus valores. Além disso, foi mostrada uma correlação entre o número de plaquetas e incidência de metástases. Por outro lado, Erpenbeck⁷¹ mostra que células cancerosas possuem receptores que se ligam às plaquetas e, assim, facilitam o deslocamento para locais distantes do tumor primário indicando que o número elevado na contagem de plaquetas poderia ser prejudicial. Também, Dosisio e colaboradores⁷² mostram que plaquetas têm papel fundamental em inflamações, já que ativam fatores de transcrição que direcionam o sistema imune para o local inflamado. Entretanto, os números elevados de plaquetas também causam agregados que dificultam a passagem de células brancas pelos vasos sanguíneos. Estes trabalhos sugerem que agentes que inibem as plaquetas de formarem aglomerados podem diminuir a incidência de metástases em casos de câncer. Em contraste, a baixa contagem de plaquetas circulantes no sangue possui algumas causas principais que são por alguma condição de saúde que afeta a medula óssea, alguns tipos de anemia, uso de medicamentos e o aumento do baço.^{69 73}

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem de tumor de mama murino que se dissemina pelo organismo, principalmente pelos vasos linfáticos, possibilitando o aparecimento de metástases no baço. Assim, o baço pode sofrer alterações em seu tamanho e funções, ocasionando problemas na quantidade de plaquetas circulantes no sangue^{74 75}. Nossos resultados mostraram níveis de plaqueta abaixo dos valores de referência, independente do grupo experimental, o que pode ser explicado pelo tamanho do baço mostrado na figura 23.

Em relação aos glóbulos brancos, estudos mostram que o ambiente tumoral induz processos inflamatórios, que por sua vez, são ativados pelo sistema imunológico⁷⁶⁻⁷⁸. Conforme o tumor vai progredindo, mais inflamações são geradas aumentando a contagem de glóbulos brancos na circulação sanguínea.⁷⁶⁻⁷⁸ As células tumorais instruem as células do sistema imunológico a promoverem angiogênese, resultando na evolução do crescimento tumoral e possíveis metástases.^{79 80}

Além disso, trabalhos demonstram que com a incidência de metástases no baço, granulócitos se infiltram no órgão de maneira massiva alterando suas

funções e causando esplenomegalia.⁸⁰⁻⁸² Esse dado corrobora com as imagens macroscópicas dos órgãos que foram captadas após a eutanásia (figura 23), onde é possível observar o tamanho aumentado do baço em relação ao grupo sadio, e com os resultados mostrados no Gráfico C da figura 20, onde o número de granulócitos aumentou significativamente no decorrer do experimento se comparado aos outros dados hematológicos. No entanto, esse efeito ocorreu em todos os grupos com tumor, indicando que a FBM também não influenciou nesse resultado.

A curva de sobrevida se mostrou um dado bem relevante, pois o grupo G0, que não foi exposto à FBM, foi o grupo onde o índice de mortalidade foi maior, mesmo a FBM não influenciando em nenhum resultado mencionado anteriormente. Os grupos tratados com luz tiveram uma sobrevida maior. O grupo que foi irradiado com 3,6 J de energia foi o que chegou ao final do acompanhamento experimental com o menor índice de mortalidade, menor volume tumoral, e valores hematológicos de células brancas mais próximos dos níveis normais de referência, indicando que dentre os parâmetros utilizados nesse trabalho, a energia de 3,6 J sugere ter melhores efeitos. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Sumarizando, dentro dos parâmetros adotados neste estudo, a FBM, embora tenha diminuído a viabilidade celular com a energia mais alta (6 J), não influenciou a evolução tumoral nem o número total de plaquetas, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos no sangue. Este resultado sugere que uma única irradiação com luz de baixa potência não afetaria pacientes com câncer não diagnosticado.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo *in vitro* mostram que a luz na região do vermelho ($\lambda = 660 \text{ nm}$) diminui a viabilidade celular do grupo irradiado com 6 J em condições de normoxia.

Os resultados do estudo *in vivo* indicam que a luz na região do vermelho ($\lambda = 660 \text{ nm}$), nos parâmetros adotados nesse trabalho, não causou diferença significativa na evolução do volume tumoral e na análise hematológica. Entretanto, os grupos que foram submetidos à FBM demonstraram melhores aspectos clínicos do que o grupo não irradiado e a curva de sobrevida dos animais submetidos à FBM também foi maior que a do grupo não tratado.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health report 2018. World Health Organization, 2018.
2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Inca, p.17-19, 2011.
3. HANAHAN D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. v 144, n. 5, p. 646-74. 2011
4. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro: INCA, p.25, 2018.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS - sistema de informações ambulatoriais. Brasília - DF – brasil. 13ª Edição, agosto/2011.
6. MESTER, Endre, Andrew F. Mester, Adam Mester. The Biomedical Effects of Laser Application. Lasers in Surgery and Medicine. p. 531-39. 1985.
7. CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. Ann Biomed Eng. v.40, p.516–533. 2012.
8. SMITH, K. C.Laser (and LED) Therapy Is Phototherapy. Photomedicine and Laser Surgery. N.23, n. 1, p. 78–80.2005.
9. CHAVES, Maria Emília de Abreu et al . Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. An. Bras. Dermatol., Rio de Janeiro , v. 89, n. 4, p. 616-623, Aug. 2014 .
- 10.FUKUDA, M. Laser and LED reliability update. J. LightwL3e Technol. vol. 6, pp. 1488-1495, 1988.
- 11.HAMBLIN, M. R.; Nelson, S. T.; Strahan, J. R. Photobiomodulation and Cancer: What is the truth?. Photomedicine and Laser Surgery, v. 20, n. 20, p. 1-5, 2018.
- 12.ALMEIDA, Lopes L, Rigau J, Amaro Zângaro R, Guidugli-Neto J, Marques Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured

- human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* V. 29, p. 179–184. 2001.
13. SHEA, C.R., Sherwood E.M., Flotte, T.J., et al. Rhodamine 123 phototoxicity in laser-irradiated MGH-U1 human carcinoma cells studied in vitro by electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. *Cancer Res.* V. 50, p. 4167–4172. 1990.
 14. PROGEL, M.A, Chen, J.W., and Zheng, K. Effects of low energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Laser Surg. Med.* V. 20, p. 426–432. 1997.
 15. ZHU N, Perks CM, Burd AR, Holly JMP. Changes in the levels of integrin and focal adhesion kinase (FAK) in human melanoma cells following 532 nm laser treatment. *Int J Cancer.* v. 82, p. 353–358. 1999.
 16. POWELL K, Low P, McDonnell A, Laakso E, Ralph SJ. The effect of laser irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. *Photomed Laser Surg.* v. 28, p. 115–123. 2010.
 17. FRIGO L, Luppi JSS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, Bensadoun RJ, Lopes-Martins RAB. The effect of low-level laser irradiation (in-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer* v. 20, p. 9:404. 2009.
 18. CROUS A, Abrahamse H. Low intensity laser irradiation at 636nm induces increased viability and proliferation in isolated lung cancer stem cells. *Photomed Laser Surg.* v.34, n. 11, p. 525–532. 2016.
 19. STEIN, S. et al. Pain reduced by low-level laser therapy during use of orthodontic separators in early mixed dentition. *J Orofac Orthop*, 2015.
 20. SELLA, V. R. et al. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers Med Sci*, v. 30, n. 3, p. 1061-8, 2015.
 21. DE LOURA Santana C, de Fátima Teixeira Silva D, Deana AM, Prates RA, Souza AP, Gomes MT, et al. Tissue Responses to Postoperative Laser Therapy in Diabetic Rats Submitted to Excisional Wounds. *Plos one.* V. 10, n. 4. 2015.

- 22.CALISTO FCFS et al. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* - V. 30, n.3. 2015.
- 23.MERIGO, E. et al. Efficacy of LLLT in swelling and pain control after the extraction of lower impacted third molars. *Laser Ther*, v. 24, n. 1, p. 39-46, Mar 31 2015. ISSN 0898-5901 (Print)0898-5901. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.5978/islsm.15-OR-05> >.
- 24.NUNEZ, S. C. et al. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. *Lasers Med Sci*, v. 28, n. 2, p. 633-41, Feb 2013. ISSN 0268-8921.
- 25.TOMAZ DE MAGALHAES, M. et al. Light therapy modulates serotonin levels and blood flow in women with headache. A preliminary study. *Exp Biol Med* (Maywood), Jul 22 2015. ISSN 1535-3699.
- 26.FEKRAZAD, R. et al. The effect of red, green and blue lasers on healing of oral wounds in diabetic rats. *J Photochem Photobiol B*, v. 148, p. 242-5, Jul 2015. ISSN 1011-1344.
- 27.LEAVITT M, Charles G, Heyman E, Michaels D. HairMax LaserComb laser phototherapy device in the treatment of male androgenetic alopecia: a randomized, double-blind, sham device-controlled, multicentre trial. *Clin Drug Invest*. V.29, p.283–292.2009
- 28.AMAL El Taweel, Amel Yousef, Marwa Hasanin, Adly Sabour, Laila Rashed.Effect of low level laser therapy of the breasts on milk production and composition in supplement dependent mothers. *Breastfeeding medicine*. Volume 12, n 22, p.9–12. 2017
- 29.STEPHEN T. Sonis, Sepehr Hashemi, Joel B. Epstein, Raj G. Nair, Judith E. Raber-Durlacher. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncology*. V. 54, p. 7-14. 2016.
30. BAXTER, G.D., Liu, L., Petrich, S. et al. Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. *BMC Cancer*. V. 17, n. 833. 2017.
- 31.FERREIRA, A. B. H. Novo Dicionário da Língua Portuguesa. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. p.332

- 32.HAJDU, Steven I. "A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 1." *Cancer*, vol. 117, n. 5, 19 Oct, p. 1097–1102. 2010
- 33.BREASTED JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. Chicago: University of Chicago Press; 1930.
- 34.HAJDU SI. Greco-Roman thought about cancer. *Cancer*. V.100, p. 2048-2051.2004
- 35.IMAULT-HUART, M. J. História do cancro. In: LE GOFF, Jacques. *A Doença tem história*. Lisboa: Terramar 1991.
- 36.AZEVEDO, S. L. B. A Luta contra o câncer na França e na Alemanha. In: KROEFF, Mario. *Resenha da luta contra o câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Documentário do Serviço Nacional de Câncer: 35-38 p. 1947
- 37.ALBERTS, B., JOHSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K AND WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre, BR.: 2004.
- 38.BRITO LGO, Schiavon VF, Marana HRC. Hipoxia and breast cancer: a future possibility as targeted therapy. *Rev Bras Mastologia*. 21(1):38-41. 2011.
- 39.ONUCHIC AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med (São Paulo)*. jan.-mar.;89(1):21-31. 2010
- 40.FIDLER, I. J. Hypothesis revisited. V. 3, June, p. 1-6. 2003.
- 41.FITZGIBBONS PL, Page DL, Weaver D, et al. Prognostic factors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. v.124, p. 966-78. 1999.
- 42.TIEZZI, Daniel G. Cirurgia conservadora no câncer de mama *Rev Bras Ginecol Obstet*. v.29, n.8, p. 428-34. 2007.
- 43.BONADONNA G, Valagussa P, Brambilla C, et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience an the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol*. v. 16, p. 93-100. 1998.
- 44.MARTA, Gustavo Nadermarta et al. Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização. *Rev Assoc Med Bras*. v.57, n. 4, p. 468-474. 2011.
- 45.MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*, v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960.
- 46.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. cap. 2, p.14-26. 2012
- 47.DAMIEN P Kuffler. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative Medicine*. V. 11, n. 1, p. 107-122. 2016.
 - 48.PANDESHWAR, P. , Roa, M. D., Das, R. , Shastry, S. P., Kaul, R. and Srinivasreddy, M. B. Photobiomodulation in oral medicine: a review. *J Invest Clin Dent*. V.7, p. 114-126. 2016
 - 49.ROBIJNS, J., Censabella, S., Claes, S., Pannekoeke, L., Bussé, L., Colson, D., Kaminski, I., Bulens, P., Maes, A., Noé, L., Brosens, M., Timmermans, A., Lambrichts, I., Somers, V. and Mebis, J. Prevention of acute radiodermatitis by photobiomodulation: A randomized, placebo-controlled trial in breast cancer patients (TRANSDERMIS trial). *Lasers Surg. Med*. V. 50,p.763-771. 2018
 - 50.MIGLIORATI C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Supportive Care in Cancer*. v. 21, n.1, p. 333–341. 2013.
 - 51.LIAO D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA. Cancer Associated Fibroblasts Promote Tumor Growth and Metastasis by Modulating the Tumor Immune Microenvironment in a 4T1 Murine Breast Cancer Model. *PLoS ONE*. V. 4, n. 11. 2009.
 - 52.LE, H. K., Graham, L., Cha, E., Morales, J. K., Manjili, M. H., & Bear, H. D. (2009). Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *International Immunopharmacology*. V. 9, n. 7, p. 900–909. 2009.
 - 53.KHORI, V., Alizadeh, A. M., Gheisary, Z., Farsinejad, S., Najafi, F., Khalighfard, S., Khodayari, H. The effects of low-level laser irradiation on breast tumor in mice and the expression of Let-7a, miR-155, miR-21, miR125, and miR376b. *Lasers in Medical Science*. V. 31, n. 9, p. 1775–1782. 2016.
 - 54.PULASKI, BA & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan . [et al.]. Chapter 20. Unit 20.2. 10.1002/0471142735.im2002s39. 2001.

- 55.SROKA R, Schaffer M, Fuchs C, et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers Surg Med* v.25, p. 263–271. 1999.
- 56.STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability Current protocols in immunology. Edited by John E. Coligan, 2015.
- 57.ZHONG, X., et al. Comparison of the multi-drug resistant human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402/ADM model established by three methods. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 29, n. 1, 2010.
- 58.KUMAR, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*. V. 6. 2018.
- 59.REPETTO, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*. V. 3, n. 7, p. 1125–1131. 2008.
- 60.FENTENER van Vlissingen et al.The reporting of clinical signs in laboratory animals. *Laboratory Animals* 2015, Vol. 49(4) 267–283. 2015.
- 61.KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.49, n.1, p.1–17.1999.
- 62.KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.*, v.56, p.691-704.1989.
- 63.JONES RG, Thompson cb. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. V.23, p.537–48. 2009.
64. SCHAFER ZT, PARRISH AB, WRIGHT KM, MARGOLIS SS, MARKS JR, DESHMUKH M, KORNBLUTH S. Enhanced sensitivity to cytochrome c-induced apoptosis mediated by PHAPI in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66(4):2210-8.
- 65.WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. V.123, p. 309–14. 1956.
- 66.SPERANDIO FF, Giudice FS, Correa L, Pinto DS Jr, Hamblin MR, de Sousa SC. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. *J Biophotonics* 2013;6:839–847.
- 67.NAVRATIL L, Kymplova J. Contraindications in noninvasive laser therapy: truth and fiction. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:341–343.

- 68.FENTENER V. V, 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.
- 69.HARRIS I. M. J. McAlister T. A. J. Pranker. Splenomegaly and the Circulating Red Cell. *Brit. J. Hoemat.N.* 1, V.4, P. 97-102. 1958
- 70.NASH, GF LF Turner, MF Scully, and AK Kakkar. Platelets and cancer. *Lancet Oncol* V. 3, P. 425–30. 2002.
- 71.ERPENBECK L, SCHO M. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood*. V. 115, n. 17. 2010.
- 72.DOVISIO, M. Sara A, Paloma G. Paola P. Role of Platelets in Inflammation and Cancer: Novel Therapeutic Strategies. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. V. 114, p. 118-127. 2014.
- 73.GAUER, R. L.; BRAUN, M. M. Thrombocytopenia. *American Family Physician*, Kansas City, MO, v. 85, n. 6, p. 612-622.
- 74.KLEIN, B, Stein M, Kuten A, Steiner M, Barshalom D, Robinson E, et al. Splenomegaly and solitary spleen metastasis in solid tumors. *Cancer*. V. 60, p. 100-2. 1987
- 75.MARTINS, Rubens Nascimento et al . Correlation between splenomegaly and thrombocytopenia in hepatosplenic schistosomiasis. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, São Paulo , v. 23, n. 4, p. 254-258. 2010.
- 76.BALKWILL, F., and A. Mantovani. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. v. 357, p. 539 –545. 2001.
- 77.COUSSENS, L. M., and Z. Werb.. Inflammation and cancer. *Nature* v. 420, p. 860 – 867. 2002.
- 78.NISHIKAWA H, S. Sakaguchi, Regulatory T cells in tumor immunity, *Int. J. Cancer*. V.127, n. 4, p.759–767. 2010.
- 79.GALDIERO M.R., E. Bonavita, I. Barajon, C. Garlanda, A. Mantovani, S. Jaillon, Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer, *Immunobiology*. V. 218, n. 11, p.1402–1410. 2013.
- 80.OSTRAND-Rosenberg S, P. Sinha, Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer, *J. Immunol*. V.182, n.8, p. 4499–4506. 2008.

- 81.DUPRE, Sa, Hunter KW Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol*. V. 82, p. 12–24. 2007.
- 82.FRANCO, Marina Santiago, Marjorie Coimbra Roque, André Luís Branco de Barros, Juliana de Oliveira Silva, Geovanni Dantas Cassali, Mônica Cristina Oliveira. Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V. 109, P. 1728-1739. 2019.
- 83.CASBON, Aj, Reynaud D, Park C, Khuc E, Gan DD, Schepers K, et al. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. V. 112, p.56-75. 2015.

ANEXOS

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da fotobiomodulação em tumor de mama. Estudo in vivo", registrada com o nº 214/18, 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 CEUA-IPEN - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em **21/06/2018**.

We certify that the proposal titled "Effects of photobiomodulation on breast tumor. An in vivo study", registration number 214/18, under the responsibility of **Martha Simões Ribeiro**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching, is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the CEUA-IPEN - Ethic Committee on Animal Use of the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN-SP) in **6/21/2018**.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Julho/2018 a Dezembro/2020
Espécie/linhagem/raça:	Mus Musculus Camundongo Isogênico Balb/C
Nº de animais:	60
Peso/Idade:	6 semanas - 20 g
Sexo:	Fêmeas
Origem:	Biotério do IPEN-CNEN/SP

São Paulo, 21 de Junho de 2018.

Patrick Jack Spencer
Coordenador da CEUA-IPEN

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP)
Centro de Biotecnologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP. 05508-000 - São Paulo - Estado de São Paulo
Telefone: (011) 3133-9696 - E-mail: ceuaipen@ipen.br

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.**