AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM CÉLULAS DE LINHAGEM TUMORAL E
FIBROBLASTOS SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE**

Camila Ramos Silva

**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

2015

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

**EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM CÉLULAS DE LINHAGEM TUMORAL E
FIBROBLASTOS SUMETIDAS À RADIAÇÃO IONIZANTE**

Camila Ramos Silva

**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

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

DEDICO ESTE
TRABALHO PARA
TODOS AQUELES QUE
FAZEM E ACREDITAM
NA CIÊNCIA

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Eu agradeço aos meus pais **Petrucio** e **Teresinha**, por me ensinarem os valores da vida e que com toda a dificuldade e falta de recursos tentaram proporcionar o melhor para a minha educação, mesmo que inconscientemente.

Agradeço a paciência e o companheirismo das minhas irmãs: **Anny**, **Alice** e **Ana Clara**. Espero e desejo o melhor para vocês.

Agradeço à minha querida avó **Secy** que quando em vida com seu jeito modesto contribuiu muito para a minha educação e formação quanto aos valores familiares e à minha tia **Maria** que não tenho palavras para agradecer, sinto muito a falta de vocês.

Agradeço à minha avó **Valda**, que mesmo com todo seu jeito alterado, sempre esteve de prontidão para nos auxiliar.

Agradeço aos meus tios **Tonho** e **Rita**, por continuarem com os valores familiares e a receptividade imensa conosco. **Mary** e **Vitória**, vocês também não poderiam ficar de fora dos agradecimentos, pois vocês também são nossas irmãs.

Agradeço também aos **amigos da vida**, que não ousou mencionar nomes, pois posso esquecê-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. **Martha Simões Ribeiro**, por me aceitar e receber no seu grupo, acreditar em mim mesmo com todas as minhas maluquices e me ajudar a construir esse trabalho. Marthinha, muito obrigada pela amizade e consideração adquirida nesses anos.

Agradeço à prof. Dra. **Marcia Marques**, do laboratório de Pesquisa Básica Prof. Dr. Edmir Matson da Faculdade de Odontologia da USP e à sua aluna **Grabriela Abbe**, pela concessão das células utilizadas nesse trabalho.

Agradeço ao prof. **Dr. Durvanei Augusto Maria**, do laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantã que abriu as portas do seu laboratório com imensa alegria e receptividade disponibilizando o seu aluno **Arthur Cássio de Lima Luna** para me ajudar.

Agradeço à prof. Dra. **Vanessa Freitas** e sua aluna **Suély Vieira da Silva**, pela concessão das células utilizadas nesse trabalho e auxílio no cultivo e manutenção das mesmas.

Agradeço aos engenheiros **Carlos** e **Elisabeth**, do Centro de Tecnologia das Radiações, pela receptividade e conhecimento proporcionado durante a execução desse trabalho.

Agradeço aos meus colegas de grupo, pois vocês foram fundamentais na execução desse trabalho: Drale, Caetano, China, Débora, Claus, Fernandinha, Sayuri, Tanha. Nós temos muita LUZ !!!

Agradeço aos colegas do Centro de Lasers e Aplicações, em especial ao Luketi, por conviver ao meu lado por muitas horas e dias da semana, sempre dividindo a sua “chocolícia” com todos.

Agradeço ao IPEN pela infraestrutura, à **Comissão Nacional de Energia Nuclear** e à **FAPESP** pelo auxílio financeiro para execução desse trabalho.

"SE VI MAIS LONGE
FOI POR ESTAR DE PÉ SOBRE
OMBROS DE GIGANTE (...) SE FIZ
DESCOBERTAS VALIDAS, FOI
MAIS POR TER **PACIÊNCIA** DO QUE
QUALQUER OUTRO TALENTO."

SIR. ISSAC NEWTON

EFEITOS DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM CÉLULAS DE LINHAGEM TUMORAL E FIBROBLASTOS SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE

Camila Ramos Silva

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública mundial. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que no Brasil, no ano de 2015, 576 mil novos casos surgiram, representando a segunda maior causa de mortes por esta doença. Entre os tratamentos oferecidos para o câncer, podemos destacar a radioterapia, que utiliza fontes ionizantes para erradicar ou impedir a proliferação das células tumorais. Entretanto, o uso da radiação ionizante (R.I), pode acarretar danos às células não tumorais circunvizinhas ao tumor. Assim, tratamentos coadjuvantes que possam diminuir os efeitos deletérios da radiação são extremamente importantes. Neste contexto, o laser de baixa potência (LBP) surge como alternativa para modular a resposta das células frente à radiação ionizante. Sendo esse nosso objetivo, células de fibroblastos de gengiva humana (FMM1) e câncer de mama (MDA-MB-231) foram expostas as doses de 2,5 e 10 Gy e após 24 h receberam LBP ($\lambda = 660$ nm, 40 mW e $0,04$ cm²) com as densidades de energia de 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². A viabilidade celular foi quantificada através do teste de exclusão com azul de tripan durante quatro dias. A influência do LBP nas fases do ciclo celular e a expressão do *Antígeno Nuclear de Proliferação celular* (PCNA) foram realizadas por citometria de fluxo. A expressão de β -Galactosidase foi considerada para quantificar a senescência celular. Considerando os parâmetros utilizados, observou-se aumento na viabilidade celular, da expressão de PCNA, maior população nas fases S e G₂/m do ciclo celular, e a diminuição de células senescentes para as células não tumorais, enquanto que para as tumorais, nenhuma resposta foi observada na viabilidade celular, maior população nas fases S e G₂/m do ciclo celular e na quantidade de células senescentes enquanto que a expressão de PCNA diminuiu. Diante disso, concluímos que o LBP exerceu efeitos em ambas as linhagens celulares.

LOW POWER LASER EFFECTS IN CANCER CELLS AND FIBROBLASTS SUBMITTED THE IONIZING RADIATION.

Camila Ramos Silva

ABSTRACT

Cancer is considered a public health problem worldwide. According to the Brazil's National Cancer Institute (INCA), 576,000 new cases of cancer were estimated for 2015 in Brazil, representing the second leading cause of death. Radiotherapy may be a treatment to several of types of cancer, frequently using ionizing radiation to eradicate or prevent the proliferation of tumor cells. This treatment, however, can lead to death of non-tumor cells around in irradiated tissue. Given this, adjuvant therapies that can minimize the side effects of ionizing radiation are of extremely importance. In this context, low power laser (LPL) may be an alternative to modulate the response of healthy cells to ionizing radiation. In this study, cells of human gingival fibroblasts (FMM1) and breast cancer (MDA-MB-231) were exposed to gamma radiation at doses of 2.5 and 10 Gy. After twenty-four hours, cell were irradiated with LPL ($\lambda = 660$ nm, 40 mW and total area of 0.04 cm²) with energy densities of 30, 60, 90, 120 and 150 J/cm². The cell viability was measured during four days, using the trypan blue technique. The influence of LPL on the cell cycle and on expression of the nuclear antigen of cellular proliferation (PCNA) was evaluated by flow cytometry. The expression of β -Galactosidase was the chosen method to assess cell senescence. Considering our adopted parameters, and focusing on the non-tumor cells, we have observed an increase in: 1) cell viability; 2) cell population in phases S and G₂/M cell cycle; 3) PCNA expression with decrease in senescence. No alterations were observed in the cell viability, with greater population in phases S and G₂/M cell cycle, while the number of senescent cells and the expression of PCNA were decreased. Therefore, we have concluded that the LPL promoted effects on both cell lineages, with increased cell viability on FMM1 cells, whether cancer cells maintained a decreased proliferation.

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Objetivos	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. Revisão da Literatura.....	13
3.1. Câncer	13
3.2. Radiação Ionizante (R.I).....	20
3.3. Laser de baixa potência	25
3.3.1. LBP em células tumorais.....	28
3.3.2. LBP em células não tumorais.....	29
3.3.3. LBP associado à R.I.....	31
4. Material e métodos.....	32
4.1. Cultivo Celular.....	32
4.2. Radiação Ionizante	34
4.3. Laser de Baixa Potência (LBP)	36
4.4. Viabilidade Celular: Integridade de Membrana.....	38
4.5. Citometria de Fluxo	39
4.5.1. Ciclo Celular	40
4.5.2. Marcador PCNA.....	40
4.6. Senescência celular	41
5. Resultados e Discussão.....	43
5.1. Viabilidade Celular: Integridade de Membrana – FMM1	46
5.2. Ciclo Celular – FMM1	55
5.3. Marcador PCNA – FMM1	63
5.4. Senescência – FMM1	67

5.5. Viabilidade Celular: Integridade de Membrana – MDA-MB-231.....	69
5.6. Ciclo Celular – MDA-MB-231	77
5.7. Marcador PCNA- MDA-MB-231	84
5.8. Senescência – MDA-MB-231	88
6. Conclusões.....	91
7. Referências	92
8. Apêndices	100
Apêndice A- Fotos experimento de senescência – células FMM1	100
Apêndice B- Fotos experimento de senescência – células MDA-MB-231	101

Lista de Figuras

Figura 1: Evolução clonal de células mutantes na geração de um tumor.....	15
Figura 2: Etapas da carcinogênese até a efetivação da metástase.	17
Figura 3: Densidade da distribuição dos casos de incidência mundial de câncer para os sexos feminino e masculino respectivamente.	18
Figura 4: Distribuição dos casos de câncer por regiões do país para os sexos masculino e feminino.	19
Figura 5: Ionização do átomo e liberação dos elétrons livres.	21
Figura 6: - Mecanismo celular após o laser de baixa potência. 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 as espécies reativas de oxigênio são geradas.....	26
Figura 7: Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda.	27
Figura 8: Delineamento Experimental proposto.	32
Figura 9: Sequência do processo de descongelamento e expansão da cultura celular...	33
Figura 10: Imagens da Irradiação Celular: (A) – Irradiador Cobalto- 60 tipo Gama-cell – (B) – Células no tubo criogênico prontas para serem irradiadas.	35
Figura 11: Distribuição dos poços experimentais (vermelhos) na placa de 96 poços.	36
Figura 12: - Método de Irradiação: (A) – Máscara escura usada durante a irradiação- (B)- Ponteira do laser em contato constante com a placa (técnica pontual)	38
Figura 13: Imagens da Citometria de fluxo: (A) – Citômetro – (B) – Leitura das amostras no citômetro.....	41
Figura 14: Valores normalizados da viabilidade celular em relação ao grupo controle das células FMM1 submetidas às variadas doses de radiação ionizante.....	43
Figura 15: Valores normalizados da viabilidade celular em relação ao grupo controle das células MDA-MB-231 submetidas à radiação ionizante..	45
Figura 16:- Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 24 h após a exposição à dose de R.I + LBP.	47
Figura 17: - Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 48 h após a exposição à dose de R.I + LBP.....	49
Figura 18:- Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 72 h após a exposição à dose de R.I + LBP.....	51

Figura 19:- Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 96 h após a exposição à dose de R.I + LBP.....	53
Figura 20:- Análise das fases do ciclo celular em células de fibroblastos FMM1 dos grupos controle e Luz.	56
Figura 21:- Análise das fases do ciclo celular em células de fibroblastos FMM1 dos grupos R.I + LBP no dia (1).....	59
Figura 22:- Análise das fases do ciclo celular em células de fibroblastos FMM1 dos grupos R.I + LBP no dia (4).....	61
Figura 23:- Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo –	64
Figura 24: Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo – O gráfico demonstra o nível de expressão de PCNA.	65
Figura 25: Número de células senescentes avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) para os grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm ² e Luz.....	67
Figura 26: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 24 h após a exposição à dose de R.I + LBP..	70
Figura 27: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 48 h após a exposição à dose de R.I + LBP..	72
Figura 28: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 72 h após a exposição à dose de R.I + LBP.....	74
Figura 29: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 96 h após a exposição à dose de R.I + LBP.	75
Figura 30: Análise das fases do ciclo celular em células MDA-MB-231 dos grupos controle e Luz..	78
Figura 31: Análise das fases do ciclo celular em células MDA-MB-231 dos grupos R.I + LBP no dia (1).	80
Figura 32: Análise das fases do ciclo celular em células MDA-MB-231 dos grupos R.I + LBP no dia (4).....	82
Figura 33: Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo.	85
Figura 34: Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo – O gráfico demonstra o nível de expressão de PCNA.....	86
Figura 35: Número de células senescentes avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) nos grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm ² e Luz.....	88

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dados referentes à radiação ionizante a qual as células foram submetidas.

Tabela 2: Parâmetros utilizados na irradiação com Laser de Baixa Potência.

Lista de Símbolos e Unidades

cm²: centímetros quadrados

CO₂: dióxido de carbono

nm: nanometro

mm: milímetro

h: hora

μm: micrometro

mW: miliwatt

J: Joule

J/cm²: Joule por centímetros quadrados

cm: centímetro

°C: graus Celsius

s: segundos

μL: microlitro

mL: milímetro

λ: comprimento de onda

1. Introdução

O câncer é um problema de saúde pública mundial. De acordo com as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de novos casos e um total de 8,2 milhões de mortes ocasionadas pelo câncer em 2012. Estima-se que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por câncer, devido ao crescimento e envelhecimento da população, bem como a redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento¹.

No Brasil, segundo as estimativas de 2015 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), 576 mil novos casos em média surgiram, representando a segunda maior causa de mortes por doença. Entre os tipos mais incidentes de câncer, há o câncer de próstata com 69 mil e em seguida o de mama feminina com 57 mil novos casos².

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, e sua origem se dá por condições multifatoriais. Por se tratar de uma doença multifatorial, ela pode ser resultante de vários fatores, tais como, os ambientais, os hormonais, hereditários ou inter-relação entre eles^{2,3}.

A célula cancerosa é definida por duas propriedades hereditárias. Ela e sua descendência reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular, gerando um tumor que pode invadir e colonizar regiões normalmente destinadas a outras células. Um tumor só é considerado um câncer se ele for maligno, ou seja, possuir a capacidade de invadir os tecidos vizinhos, gerando metástases em outros locais do corpo. Quanto mais um tumor se dispersar, mais difícil será erradicá-lo⁴.

Os tratamentos padrões oferecidos atualmente para o câncer são: cirurgias, radioterapia e quimioterapia. A conduta terapêutica é baseada na etiologia do câncer, mas em muitos casos é necessário combinar mais de uma modalidade. No caso do câncer de mama, a intervenção cirúrgica e a radioterapia têm sido amplamente utilizadas e os tratamentos sistêmicos como as hormono e quimioterapias são também bastante difundidos⁵.

Entre os tratamentos oferecidos, a radioterapia é bastante utilizada, associada ou não a outras técnicas. Esta consiste em utilizar fontes que emitem radiações ionizantes que ao interagirem com as moléculas causam desequilíbrio eletrostático, ejetando íons negativos, ocasionando sucessivos danos à estrutura molecular que podem ser reparados ou não⁶.

O tipo de radiação ionizante (R.I) vai depender da sua origem e massa. Para a realização da radioterapia, utilizam-se o grupo compreendido no espectro de ondas eletromagnéticas com altas frequências que correspondem aos raios X e γ (gama). Entre as fontes de raios γ mais utilizadas para a radioterapia podemos destacar o ^{60}Co , obtido a partir do bombardeamento por nêutrons do cobalto 59, que apresenta meia vida de 5,24 anos e energia do fóton na faixa de 1,17 MeV e 1,33 MeV⁷.

A radiação ionizante no tratamento do câncer é utilizada para erradicar ou impedir a proliferação das células cancerosas. A radiação pode ser aplicada, externamente ou internamente ao paciente. Quando aplicada externamente chama-se teleterapia e internamente braquiterapia.

Quando o paciente é exposto à radiação ionizante para fins de tratamento, um volume em volta das células tumorais é demarcado, tentando abrigar a região a ser atingida com maior precisão possível, buscando minimizar a exposição em células circunvizinhas, variando a dose, a taxa de dose e o número de exposições, para alcançar o melhor resultado minimizando os efeitos deletérios provenientes de tal exposição⁸.

Pacientes que possuem como forma de tratamento o uso de radiação ionizante associada ou não com outras técnicas, podem, muitas vezes, sofrer com efeitos colaterais, entre eles a dermatite, mucosite, candidose, xerostomia. A intensidade dos efeitos esta relacionada com a dose, exposição e as condições clinicas do paciente.⁹

Técnicas menos invasivas de tratamentos vem gerando grande interesse mundial na área da saúde. O uso do laser de baixa potência (LBP) como modalidade terapêutica coadjuvante tem obtido grande destaque no tratamento de uma variedade de condições patológicas, que incluem modulação do processo inflamatório^{10,11}, redução de dor em quadros algícos agudos e crônicos^{12,13} e aceleração do processo de reparação tecidual^{14; 15} De fato, o laser vem sendo utilizado em pacientes com mucosite oral induzida por radioterapia de

cabeça e pescoço e, recentemente, a Secretaria de Atenção à Saúde aprovou o uso do laser de baixa intensidade como tratamento de suporte para mucosite oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. (portaria no. 516, 17/06/2015, Diário Oficial da União).

A introdução do uso do laser de baixa potência com fins terapêuticos nas áreas biológicas e médicas foi realizada inicialmente por Endre Mester e colaboradores, que perceberam a aceleração da cicatrização em processos de reparação tecidual com um laser de rubi de baixa intensidade (1 J/cm^2)¹⁶.

A luz monocromática, especialmente o laser, pode alterar funções celulares e de tecidos, tendo estudos que sugerem vários mecanismos pelos quais os efeitos terapêuticos do laser de baixa potência ocorrem¹⁷. Os mecanismos responsáveis pelos efeitos biomoduladores do LBP com comprimentos de ondas dentro do espectro visível e do infravermelho são ainda controversa na literatura científica.¹⁸

Entre os efeitos biomoduladores do laser de baixa potência descritos na literatura, foi possível verificar a sua ação em células expostas à radiação ionizante, descritos por KARU e colaboradores (1994). O grupo utilizou um laser de baixa potência de emissão vermelha com densidade de energia de 100 J/m^2 em células He-La antes da exposição à radiação ionizante com doses variando entre 0,2 a 10 Gy. Os resultados mostraram que a fração de sobrevida das células expostas à fototerapia antes da exposição à radiação ionizante, aumentou em relação às células não irradiadas¹⁹.

Assim, neste trabalho estudamos os efeitos do laser de baixa potência em células tumorais provenientes do câncer de mama (MDA- MB-231), e células não tumorais (fibroblastos de gengiva humana – FMM1), submetidas à radiação ionizante.

2. Objetivos

2.1. Geral:

O objetivo do presente estudo consiste em verificar os efeitos do laser de baixa potência de emissão vermelha ($\lambda = 660 \text{ nm}$) com diferentes densidades de energia em células de linhagem tumoral (MDA-MB-231) e não tumoral (FMM1) submetidas à radiação ionizante.

2.2. Objetivos Específicos

1. Investigar a ação de diferentes doses de radiação ionizante na viabilidade celular de células tumorais e não tumorais;
2. Investigar diferentes densidades de energia do laser de baixa potência de emissão vermelha associado às doses de 2,5 e 10 Gy na viabilidade celular de células tumorais e não tumorais;
3. Investigar diferentes densidades de energia do laser de baixa potência de emissão vermelha associado à dose de 10 Gy nas fases do ciclo celular de células tumorais e não tumorais por citometria de fluxo;
4. Investigar os efeitos do laser de baixa potência de emissão vermelha associado à dose de 10 Gy de RI na proliferação celular através do marcador PCNA citometria de fluxo;
5. Investigar os efeitos do laser de baixa potência de emissão vermelha associado à dose de 10 Gy de RI na senescência celular através do marcador β -galactosidase.

3. Revisão da Literatura

3.1. Câncer

A palavra câncer de origem latina (*cancer*) possui significado de “caranguejo” que possivelmente foi empregada em analogia ao modo de crescimento invasivo, que pode ser comparado às pernas do crustáceo que, ao se fixar, torna dificultosa a sua remoção.²⁰

Atualmente, a definição científica utiliza o termo neoplasia que defini um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo.²

As neoplasias são descritas desde os egípcios, persas e indianos, trinta séculos antes de Cristo. Os estudos da escola hipocrática grega, datados do século IV a.C., definiram o conceito de câncer o caracterizando como um tumor duro, que, muitas vezes, reaparecia depois de extirpado, ou que se alastrava para diversas partes do corpo levando á morte. O câncer era visto pelos hipocráticos como um desequilíbrio dos fluidos que compunham o organismo²¹.

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 (1662- 1771) e o médico francês Marie François Xavier Bichat (1771-1802) foram de grande importância²².

Morgagni enfatizou a localização corpórea das doenças, que passavam a se caracterizar como uma entidade específica localizada em determinado órgão do corpo. 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 tissulares²².

Ainda no século XVIII, René Théophile Laennec (1781-1826), aumentou a precisão do diagnostico de câncer ao distinguir os quistos dos rins e dos ovários e os fibromas uterinos dos casos de câncer. Joseph Claude Anthelme Recamier (1744- 1852), observando um tumor no cérebro de uma paciente com câncer de mama, começou a estudar o conceito de metástase²².

No século XIX, o desenvolvimento da teoria celular, a partir dos trabalhos de Virchow (1821-1902), finalmente possibilitou a vinculação da doença às células no seu processo de divisão. Em meados do século XIX, o anatomista Wilhelm Waldeyer (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 linfática²³.

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 perigoso⁴

A maioria das células tumorais humanas apresentam indícios de uma alta taxa de mutação, ou seja, as células são geneticamente instáveis. Algumas células cancerígenas são deficientes na capacidade de reparo a danos no DNA¹ ou de corrigir erros de replicação que afetam nucleotídeos isoladamente. Estas células tendem a acumular maiores mutações pontuais e maior quantidade de pequenas anomalias em sequências do DNA. Já outras células cancerígenas possuem dificuldade de manterem a integridade dos cromossomos, consequentemente apresentam anomalias grosseiras nos seus cariótipos²⁴.

Os cânceres geralmente desenvolvem-se por um processo no qual uma população inicial de células levemente anormais, descendentes 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 tumor²⁵. (Figura 1).

¹ Ácido desoxirribonucleico

Figura 1: Evolução clonal de células mutantes na geração de um tumor. Adaptado de CALDAS- Nature Biotechnology [25].

As alterações que geram as neoplasias podem ocorrer em genes especiais denominados proto-oncogenes (controlam os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular) que a princípio são inativados em células não tumorais. Quando esses genes são ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (transformação) das células não tumorais. Estas células diferentes são, então, denominadas cancerígenas, ou melhor, tumorais²⁶.

Segundo Foye e colaboradores os estágios de formação do câncer geralmente são lentos, podendo levar vários anos para que a célula cancerígena forme um tumor detectável. Entretanto, há um processo que se denomina

carcinogênese, com diferentes estágios para a formação do tumor²⁷. Esses estágios seriam:

1. **Estágio de iniciação:** É o primeiro estágio da carcinogênese. As células nesse estágio sofrem a grande influência de um agente carcinógeno que provoca modificações em alguns de seus genes. Nessa fase as células encontram-se geneticamente instáveis, porém o tumor ainda não é detectável.
2. **Estágio de promoção:** As células geneticamente instáveis sofrem efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. Durante esse processo a célula é promovida em maligna, de forma lenta e gradual.
3. **Estágio de progressão:** É o terceiro e último estágio e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo até as primeiras manifestações clínicas da doença.

Após o processo de carcinogênese, quando há efetivamente a instalação do tumor, sendo este considerado maligno, as células que o compõem podem adquirir a capacidade de se desprenderem e migrarem, invadindo inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através destes, disseminarem-se, chegando a órgãos distantes do local inicial do tumor, gerando assim metástases⁴. (Figura 2).

Figura 2: Etapas da carcinogênese até a efetivação da metástase. Retirado de ALBERTS-Biologia Molecular da Célula. [4]

A metástase é um o aspecto do câncer mais temido e menos compreendido. Ao disseminar-se pelo corpo, o câncer torna-se praticamente impossível de ser erradicado com cirurgias ou irradiações localizadas ⁴.

A literatura descreve que o câncer é classificado de acordo com o tipo de célula não tumoral que o originou, mesmo realizando metástase e colonizando outros tecidos, a sua classificação é de acordo com a célula primária e geralmente a denominação dos grandes grupos termina com o sufixo *oma* que significa tumor²⁸.

Diante das classificações acerca do câncer, pode-se verificar que a sua incidência na população mundial tem se tornado um problema de saúde pública mundialmente. A estimativa para a população mundial em 2030, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é de aproximadamente 22 milhões de novos casos. A estimativa descreve que a proporção de incidências será grande em países desenvolvidos, mas será ainda maior em países em desenvolvimento, caso medidas preventivas não sejam realizadas ¹. (Figura 3).

Figura 3: Densidade da distribuição dos casos de incidência mundial de câncer para os sexos feminino e masculino respectivamente. Adaptado de World Health Organization. [1]

No Brasil, a incidência de novos casos também tem se tornado um problema de saúde pública, cujo controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas cultural, social e economicamente até as mais desiguais.

A estimativa para o ano de 2014, mas podendo ser considerada em 2015, é de 576 mil novos casos, incluindo os casos de pele do tipo não melanoma. A densidade de distribuição por regiões do país é realizada pelo INCA a cada dois anos. Podemos observar que as regiões com maior incidência de câncer seriam as regiões sudeste com aproximadamente 300 mil casos, seguida da região sul com aproximadamente 117 mil novos casos². (Figura 4).

Figura 4: Distribuição dos casos de câncer por regiões do país para os sexos masculino e feminino. Adaptado de INCA [2]

Diante da alta taxa de incidência do câncer, as formas de prevenção e tratamentos, mesmo que estes sejam coadjuvantes, tornam-se extremamente necessárias, para que o mal que acarreta a sociedade atual seja reparado e as altas taxas de incidência comecem a decrescer.

O câncer de mama, dentre os diversos tipos de câncer, assume um papel de destaque, por ser o primeiro em incidência, entre as mulheres de todo o mundo.^{1,2}

A linhagem celular epitelial MDA-MB-231 é derivada de um adenocarcinoma mamário humano, número ATCC: HTB-26, receptor de estrógeno e progesterona negativos. A mesma é invasiva e metastática e é bem utilizada como modelo para experimentação *in vitro*.²⁹

3.2. Radiação Ionizante (R.I)

Radiação é a propagação de energia através do espaço ou da matéria, sendo normalmente divididas em dois grupos, as radiações corpusculares e eletromagnéticas. Partículas subatômicas como elétrons, prótons, nêutrons, pósitrons e alfas, quando possuem alta velocidade, formam feixes de radiações corpusculares. Por exemplo: emissões alfa, beta (β^+ , β^-) que são emitidas espontaneamente de núcleos instáveis de um elemento radioativo³⁰.

Considerando que todas as partículas possuem massa e velocidade, podemos determinar a sua energia através da formula para energia cinética, pois essas partículas corpusculares estão em constante movimento carregando energia. Segue a formula:

$$E \text{ [J]} = \frac{1}{2} m \cdot v^2 \quad (1)$$

São enquadradas como radiações eletromagnéticas todas as radiações que possuem oscilações elétricas e magnéticas: são ondas que viajam numa mesma velocidade e diferem somente no comprimento de onda, com massa de repouso nula e independem de um meio físico para propagação^{31 31}.

Em 1901 Plank desenvolveu a teoria dos “*quanta*” e os chamou de fótons, pacotes ou quantas de energia eletromagnética. A energia desses fótons não é constante, mas é diretamente proporcional a frequência da radiação. De acordo com a teoria quântica, a energia de um quanta é determinada por:

$$E \text{ [J]} = h \cdot f \quad (2)$$

As radiações eletromagnéticas, fundamentalmente, podem ser divididas em dois tipos, as não ionizantes e ionizantes. As não ionizantes podem ser definidas por ondas de radiofrequência, tais como, as ondas de rádio,

televisão, telefonia móvel, micro-ondas e a luz. As ionizantes são compreendidas pelas ondas eletromagnéticas do ultravioleta, raios gama e raios X. ^{32, 33,}

Quando radiações eletromagnéticas estão interagindo em um meio, transferem aos elétrons do meio, energia suficiente para removê-los do átomo, causando um processo chamado de ionização, denominada radiação ionizante. O elétron ejetado (-) e o átomo remanescente (+) formam um par de íons³³.

A interação das radiações ionizantes com a matéria é um processo que ocorre em nível atômico. Ao atravessarem um material, estas radiações transferem energia para as partículas que forem encontradas em sua trajetória. Caso essa energia for maior que a energia de ligação do elétron com o restante da estrutura atômica, este é ejetado de sua órbita. O elétron arrancado desloca-se no meio, impulsionado pela energia recebida no processo, podendo causar instabilidades na eletrosfera dos átomos atingidos, provocando ionizações que são diretamente dependentes da taxa de energia transferida na interação ³⁴. (Figura 5).

Figura 5: Ionização do átomo e liberação dos elétrons livres.

Retirado de www.fisica.net.com

A Transferência Linear de Energia (“*Linear Energy Transfer*”-LET) é a grandeza física que quantifica a taxa de energia transferida nas interações, e a partir da sua taxa de quantificação a radiação ionizante pode ser subclassificada em espécies de alto LET (baixo poder de penetração e alto poder de ionização, como as partículas α e os nêutrons) e as de baixo LET (alto poder de penetração e menor poder de ionização, como os raios gama)³⁵.

A interação da radiação ionizante com a matéria pode ocorrer de duas maneiras, por via direta ou indireta. Na ionização direta, os elétrons livres reagem diretamente com as proteínas do organismo, alterando totalmente sua configuração e alterando sua função. Na atuação direta em sua grande maioria, os elétrons livres reagem diretamente com o DNA das células, atacando principalmente suas muitas pontes de hidrogênio. Dependendo da intensidade da energia absorvida pelas células, o DNA pode sofrer alterações estruturais que irão interferir diretamente nos processos de reprodução celular e síntese proteica.

Na ionização indireta, os elétrons livres não reagem diretamente com proteínas ou DNA, mas, sim, com as moléculas de água, e, assim, produzem os radicais livres provenientes da radiólise da água, que são altamente reativos e poderão posteriormente, reagir com as estruturas celulares, de modo a alterar a sua função³⁶.

Os efeitos biológicos da radiação incluem principalmente danos à molécula de DNA, possuindo basicamente dois tipos de dano, as mutações gênicas e as quebras. Nas mutações gênicas, as alterações introduzidas na molécula de DNA resultam na perda ou na transformação de informações codificadas na forma de genes, e essas alterações podem perpetuar e acarretar em anomalias genéticas. Quando há quebra da molécula de DNA, a integridade do material é modificada e dependendo do grau de dano provocado pela R.I pode acarretar em morte celular^{32,33,36}.

Um dos principais danos primários induzidos pela radiação ionizante é a quebra na fita dupla do DNA, envolvendo ambas as fitas. É considerado o dano mais importante por ser mais difícil de ser reparado e por estar envolvido em vários efeitos de grande significado biológico, tais como as más formações, mutações, letalidade celular como também o câncer. Uma dose de 1 Gy causa em média, uma quebra na fita dupla do DNA por cromossomo. A variação da

dose de radiação pode acarretar em maiores danos ao tecido biológico, dificultando-se assim o seu reparo^{9,32}.

Aproximadamente 33% das quebras nas fitas do DNA são produzidas pela ação direta da radiação ionizante, o restante, age por meio dos radicais livres de oxigênio explicando assim que tecidos em hipóxia são cerca de três vezes mais resistentes aos efeitos da radiação ionizante. Alguns tumores possuem mais resistência aos efeitos da radiação ionizante devido à má oxigenação no seu interior, dificultando assim a obtenção de melhores resultados nos tratamentos^{37; 38}.

O uso da radiação ionizante atualmente tem suas aplicações na medicina, tais como a esterilização de materiais utilizando doses a partir de 20 KGy³⁹, inativação de venenos para uso em imunógenos⁴⁰ e ainda para tratamento do câncer, utilizando fontes de radiação gama ao realizar a radioterapia^{31,32,36}.

A utilização da radiação ionizante como tratamento para o câncer pode ser utilizada associada ou não com outras técnicas e ela consiste em utilizar fontes de radiação gama direcionando a radiação diretamente ao DNA da célula cancerígena³⁸. O tratamento consiste em duas modalidades, a braquiterapia e teleterapia. A braquiterapia consiste em utilizar as fontes radioativas diretamente no tumor ou em uma área muito próxima. Já a teleterapia consiste em utilizar as fontes de raios gama externamente ao paciente, selecionando a área do tecido que necessita receber a radiação^{41; 42}.

Na radioterapia, principalmente com o uso de feixes de alta energia, torna-se obrigatória uma precisa localização do volume a ser irradiado, para que os níveis pré- estabelecidos de doses sejam quantificados bem homogeneamente dentro desse volume e que estruturas sadias adjacentes sejam preservadas ou recebam a menor deposição de dose possível^{43; 44}.

Quando o paciente é submetido ao tratamento com fontes ionizantes, alguns planejamentos, tais como, a dose, taxa de dose e as sessões tornam-se necessárias para que a dose adequada seja entregue e devem ser elaborados juntamente com um especialista. Dependendo da área irradiada utilizam-se atenuadores de chumbo, para minimizar o efeito da dose nas áreas circunvizinhas.

A dose a ser administrada nos tratamentos depende da região a ser tratada e do tipo de tumor. Atualmente, as frações de doses aplicadas no tratamento do câncer estão dentro do intervalo de 1,5 a 2,5 Gy, necessitando de uma grande quantidade de exposições para chegar ao valor necessário para obtenção dos resultados desejados ou esperados⁴⁵.

Normalmente, células tumorais necessitam de altas doses para completa erradicação (de 50 a 100 Gy).³² Para obtenção de bons resultados em um câncer localizado na próstata torna-se necessário o fracionamento de doses superiores a 68 Gy, porém, como a área é limitada pela região gastrointestinal, a utilização da dose deve ser muito bem controlada, para preservação dos tecidos adjacentes.⁴⁶

Estudos indicam que a população mundial possui uma baixa exposição anual à R.I, aproximadamente de mGy, dentro dos limites recomendados pela ICRP (*International Commission on radiological protection*).⁴⁷ Uma exposição entre o intervalo de 4 a 6 Gy, causa problemas hematopoiéticos graves. Para atingir o sistema pulmonar e gerar morte do indivíduo exposto, são necessárias dose entre 8 a 9 Gy.⁹

Entretanto, quando se trata de acidentes nucleares ou grandes exposições à R.I, o efeito continua condicionado à dose de exposição. Uma exposição a doses superiores a 10 Gy causa danos ao sistema cerebral e o indivíduo morre em poucas horas por colapso.⁹

3.3. Laser de baixa potência

A palavra laser é um acrônimo para Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação (*Light amplification by stimulated emission of radiation*). A teoria da emissão estimulada foi descrita inicialmente por Einstein em 1917 de forma teórica, mas somente em 1960, Theodore Maiman anunciou o funcionamento bem sucedido do primeiro dispositivo LASER ⁴⁸. Esta radiação possui características únicas, tais como, a coerência, a colimação e a monocromaticidade,

A terapia com *low power lasers*, do inglês, ou lasers de baixa potência (LBP) consiste em expor tecidos ou células a fontes luminosas coerentes, em baixas densidades de energia e potência, de forma que a interação da luz com a matéria não promova efeitos térmicos⁴⁹.

A introdução do uso do LBP com fins medicinais foi descrito 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 acelerado de pelos em camundongos em regiões previamente depiladas¹⁶. Os estudos do grupo perduraram durante a década de 70 com o uso do laser na estimulação da reparação tecidual^{50,51}.

Atualmente, o LBP tem ganhado grande destaque mundial nas Ciências da Saúde devido à busca por formas menos invasivas de tratamento. Uma variedade de condições patológicas utilizando o LBP são descritos na literatura, tais como, a modulação do processo inflamatório, aceleração do processo de reparação tecidual, alívio de dor e tratamento de algumas desordens neurológicas ^{10, 11, 12, 13, 14,15,52,53}.

Os mecanismos de ação do LBP em células ainda não são muito elucidados na literatura, porém, Karu (1999) descreve que os efeitos do LBP em nível celular são resultantes da absorção do fóton por um fotorreceptor que, após absorver a energia da radiação luminosa, assume um estado eletricamente excitado, desencadeando um efeito biológico mensurável representado pelo aumento da síntese de DNA e RNA², pela modulação da resposta imunológica, pela produção de NO (óxido nítrico), entre outros. Dependendo do comprimento

² Ácido ribonucléico

de onda utilizado, é possível aumentar a produção de adenosina trifosfato (ATP) na cadeia respiratória, como também a formação de espécies reativas de oxigênio (Figura 6). A ativação da cadeia respiratória celular pode desencadear efeitos adicionais, tais como, o aumento e migração da proliferação celular, a modulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios.⁵⁴

Figura 6: - Mecanismo celular após o laser de baixa potência. 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. Adaptado de Hoon Chung e colaboradores em *The nuts and Bolts of LLLT* [49].

O comprimento de onda a ser utilizado pode influenciar nos resultados obtidos após a exposição ao LBP. Embora ainda não seja possível determinar o melhor comprimento de onda para cada disfunção, a literatura sugere que o espectro do vermelho, com comprimento de onda dos 630 a 690 nm, é a melhor opção para úlceras, herpes e cicatrização de feridas abertas. A variação do comprimento de onda está relacionada à profundidade de penetração da luz em tecidos saudáveis.⁵⁵ (Figura 7).

Figura 7: Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda. Retirado de DA SILVA e colaboradores [55].

A literatura descreve que, em células mamíferas, o fotoabsorvedor primário responsável pelos efeitos estimulantes com a luz seria o *citocromo c oxidase*, que absorve no intervalo do vermelho ao infravermelho próximo. WONG-RILEY e colaboradores (2005) demonstraram que a irradiação no infravermelho aumentou a atividade do *citocromo c oxidase in vitro* em células neuronais primárias.⁵⁶

No tratamento com LBP torna-se necessário estabelecer protocolos de irradiação para obtenção de resultados positivos, visto que trabalhos mais recentes têm mostrado que a dosimetria associada ao tratamento desempenha papel fundamental na eficiência da terapia.⁵⁷

Nas últimas décadas, a literatura tem reportado um grande interesse em compreender os mecanismos do LBP no processo tumoral. O crescente interesse é justificado devido a grande incidência de novos casos de câncer como também os efeitos biomodulatórios promovidos pelo LBP na proliferação e migração celular.

3.3.1. LBP em células tumorais

WERNECK e colaboradores (2005) descreveram que a célula tumoral possui deficiência nutricional, devido a sua intensa atividade metabólica, e por isso é suscetível à ação do LBP.⁵⁸

SCHAFFER e colaboradores (1997) utilizaram a linhagem de carcinoma gengival humano- ZMK na exposição ao laser $\lambda = 805$ nm com diferentes densidades de energia, variando do 0 ao 20 J/cm². Os autores verificaram crescimento significativo até a densidade de energia de 4 J/cm², após foi observado redução do padrão de crescimento das células.⁵⁹

OÇAÑA-QUERO e colaboradores (1998), estudaram os efeitos biológicos da irradiação laser He-Ne em linhagem celular de mieloma (Sp2-Ag14) de camundongo, observaram um aumento de células nas fases G₀/G₁ e uma diminuição significativa de células na fase S do ciclo celular, nos grupos irradiados com densidades de energia entre 8 e 64 J/cm² quando comparado com o grupo controle e nenhuma diferença foi observada nas fases G₂/m do ciclo celular.⁶⁰

RENNO e colaboradores (2007) utilizaram linhagens de osteoblasto – MC3T3 e osteosarcoma – MG63, com lasers de comprimento de onda de 670, 780 e 839 nm, com o objetivo de avaliar os efeitos estimulantes na proliferação celular. O grupo verificou que utilizando densidades de energia de 0,5, 1 e 5 J/cm² no comprimento de onda 830 nm, não houve diferença estatística significativa para a linhagem o osteosarcoma, porém para os demais comprimentos de onda, foi verificado aumento significativo na proliferação celular.⁶¹

FRIGO e colaboradores (2009) utilizaram 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. Após realizarem o teste de exclusão por azul de tripan, não identificaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.⁶²

POWELL e colaboradores (2010) 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. Após 24 horas do uso do LBP, foi aferida a proliferação celular através de XTT. Foi verificado que somente na linhagem celular do câncer de mama com exposição única houve aumento significativo da proliferação celular com todas as densidades de energia, porém os autores sugerem prudência no uso do LBP em casos de pacientes com câncer ⁶³.

Segundo MURAYAMA e colaboradores (2012) o uso do LBP em cultura de células de glioblastoma A-172, teve a viabilidade celular diminuída em relação ao grupo controle que, por sua vez aumentou a viabilidade durante o tempo experimental. Foi utilizado um laser diodo de comprimento de onda de 808 nm e potências de 30 e 60 mW com densidades de energia de 18, 36 e 54 J/cm². Após 20, 40 e 60 minutos de exposição ao LBT foi realizado o ensaio colorimétrico MTT e verificada diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao grupo controle. ⁶⁴

3.3.2. LBP em células não tumorais

Para as células de fibroblastos, o uso do LBP possui maior consenso em relação aos efeitos biomodulatórios.

SOUZA e colaboradores (2014), com objetivo de verificar os efeitos do LBP na atividade mitocondrial de macrófagos. Eles utilizaram dois parâmetros, o primeiro é descrito por $\lambda = 780$ nm, 70 mW e 3 J/cm², já o segundo parâmetro é descrito por $\lambda = 660$ nm, 15 mW e 7.5 J/cm². A atividade mitocondrial foi realizada por MTT nos dias 1, 3 e 5 após a irradiação, com três experimentos independentes. O grupo concluiu que os comprimentos de onda descritos podem modular a ativação celular dos macrófagos no processo de reparação, inflamações. ⁶⁵

WALTER e colaboradores (2015), com o objetivo de verificar os efeitos do LBP em células de fibroblastos da gengiva humana (HGF), osteogênico humano (HHOB-c) e queratinócitos oral humano (HOK), utilizaram um laser com comprimento de onda de 670 nm, potência de 280 mW e exposição de 60 s. O LBP aumentou a viabilidade celular em relação ao controle das células de

queratinócitos e osteogênico, porém para os fibroblastos não foi verificado nenhum efeito.⁶⁶

ZACCARA e colaboradores (2015), utilizaram um laser de InGaAlP com as densidades de energia de 0,5 e 1 J/cm² em células – tronco de polpa dentária, com o objetivo de avaliar os efeitos do laser em células tronco. O grupo verificou que entre o intervalo de tempo 24 a 96 h o grupo irradiado com a densidade de energia de 1 J/cm² apresentou valores superiores e significativos na viabilidade celular, através da atividade mitocondrial.⁶⁷

DASTANPOUR e colaboradores (2015) utilizaram laser com $\lambda = 810$ nm com as densidades de energia de 5,10 e 20 J/cm² em células KG-1^a - células leucêmicas humanas. O grupo realizou duas exposições ao LBP e verificou através do ensaio de MTT, que com a densidade de energia de 20 J/cm², após sete dias, houve aumento significativo na proliferação das células leucêmicas humanas.⁶⁸

GÓRALCZYK e colaboradores (2015) utilizaram células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), com o objetivo de verificar os efeitos do laser com comprimento de onda de 635 nm e densidade de potência de 1,875 mW/cm². O grupo verificou que houve aumento significativo na viabilidade celular com as densidades de energia de 2, 4 e 8 J/cm² em relação ao controle.⁶⁹

CAVALCANTI e colaboradores (2015) verificaram os efeitos do LBP, $\lambda = 660$ nm, 50 mW, em células-tronco da medula óssea de cães (DBMSC), com as densidades de energia entre 1 a 12 J/cm². O grupo verificou que houve aumento significativo na viabilidade celular e na fase G₂/m do ciclo celular com as densidades de energia de 6, 10 e 12 J/cm².⁷⁰

3.3.3. LBP associado à R.I

Quanto aos achados na literatura referente à associação da R.I e o LBP, encontramos uma pequena quantidade de trabalhos, que ainda assim descrevem os efeitos bioestimulatórios do laser. De fato, KARU e colaboradores (1994). O grupo utilizou um laser de baixa potência com densidade de energia de 100 J/m² em células He-La antes da exposição à radiação ionizante com doses variando entre 0,2 á 10 Gy. Os resultados mostraram que a fração de sobrevivência das células expostas à fototerapia antes da exposição à radiação ionizante, aumentou em relação às células não irradiadas.¹⁹

BULUYAKOVA e AZAROVA (2006) utilizaram uma dose semi letal de R.I (6 Gy) em uma região pós-traumática do músculo esquelético de ratos adultos e verificaram mudanças consideráveis no timo e a inibição da regeneração do músculo. Após associarem o LBP com um laser de He-Ne com densidades de energia de 4,5 e 5,4 J/cm², observaram que a ação do laser estimulou a capacidade de regeneração do tecido do músculo esquelético, como também a cicatrização das feridas causadas pela exposição à radiação ionizante.⁷¹

DJAVID e colaboradores (2015) utilizaram células não tumorais – NIH 3T3 e tumorais HeLa expostas ao comprimento de onda de 685 e 830 nm com diferentes densidades de energia antes da exposição às doses de R.I de 2 Gy, 4 Gy e 6 Gy. O grupo observou que a exposição ao LBP influenciou na fração de sobrevivência após a R.I, pois em ambas as linhagens a fração diminuiu em relação ao controle não irradiado previamente.⁷²

4. Material e métodos

Para melhor compreensão do estudo proposto, a figura 8 mostra o delineamento experimental.

Figura 8: Delineamento Experimental proposto.

4.1. Cultivo Celular

As células utilizadas nesse trabalho - FMM1 (fibroblastos da gengiva humana) e MDA-MB-231 (células de câncer de mama) foram cedidas gentilmente pelas professoras Dra. Marcia Marques, da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP) e Dra. Vanessa Freitas, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). As amostras foram estocadas e congeladas em nitrogênio líquido. Um tubo cônico foi descongelado previamente em banho-maria a 37°C e, após o descongelamento, as células foram transferidas para um tubo cônico contendo 5 mL de meio de cultura para remoção da substância crioprotetora (di-metil-sulfóxido)-DMSO e centrifugadas a 300 *g* por 5 minutos em temperatura

ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEN (*Dulbecco's modified Eagle medium*, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone, Thermo Scientific, Logan, Ut, EUA), 1% de solução antibiótico-antimicótica (Sigma) e pH= 7,2. As células foram transferidas para garrafas de cultura celular (75 cm²) com 10 mL de meio de cultura e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ até alcançarem confluência de 100% (figura 9). O tempo de confluência para as células FMM1 é em torno de 72 h e para as MDA-MB-231 é aproximadamente 48 h.

Figura 9: Sequência do processo de descongelamento e expansão da cultura celular.

Para expansão da cultura celular, o meio foi removido e as células aderentes em monocamada foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBSA) sem cálcio e magnésio (pH= 7,2). Foi adicionado 3 mL de tripsina EDTA (Vitrocell-2014) por 5 min a 37°C para remoção das células. Para neutralização da tripsina as células foram colocadas em tubo cônico com 5 mL de meio + soro fetal bovino e centrifugadas a 300 g por 5 min. O sobrenadante foi

descartado e as células em suspensão foram divididas e semeadas em garrafas de cultivo celular (75 cm²). Para que a viabilidade das células fosse preservada, a troca de meio de cultura dos frascos foi realizada a cada dois dias. Alíquotas dessa cultura foram congeladas em nitrogênio líquido para manter estoque da linhagem.

4.2. Radiação Ionizante

As células de fibroblastos e câncer de mama em sua fase de crescimento foram removidas da garrafa de cultivo através de solução de tripsina e separados na concentração de 1×10^5 células/ mL, e colocados em tubo cônico com o meio de cultura. As células foram então irradiadas em um irradiador de Cobalto-60 tipo Gamma Cell- 220 (*Atomic Energy of Canada, LTD*), com as doses 1, 2,5, 5 e 10 Gy, que são reportadas na literatura para irradiação de células tumorais^{19,73} O irradiador fica localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN (figura 9). A taxa de dose do equipamento é alterada mensalmente devido ao decaimento da fonte de ⁶⁰Co, sendo considerado o tempo de meia vida mensal de 0, 989 anos. Os valores da taxa de dose para os meses experimentais são descritos na tabela 1. As doses de 1 e 2,5 Gy possuíam um atenuador de 90 %, conseqüentemente a taxa de dose difere das demais.

Figura 10: Imagens da Irradiação Celular: (A) – Irradiador Cobalto- 60 tipo Gama-cell – (B) – Células no tubo criogênico prontas para serem irradiadas.

Tabela 1- Dados referentes à radiação ionizante a qual as células foram submetidas.

Dose (Gy)	Tempo de exposição (s)	Taxa de Dose- Dez/2014 (Gy/min)	Taxa de Dose Jan/2015 (Gy/min)	Taxa de Dose Fev/2015 (Gy/min)
1	30,7	1,78	1,76	1,74
2,5	81,4	1,78	1,76	1,74
5	13,8	17,77	17,57	17,37
10	30,7	17,77	17,57	17,37

Depois que as células foram expostas à radiação ionizante, o tubo cônico contendo as células foi centrifugado a 300 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura fresco e

semeadas em placas de 96 poços em triplicata com 1×10^5 células/ mL e 200 μ L de meio.

4.3. Laser de Baixa Potência (LBP)

Vinte e quatro horas após a exposição das células à radiação ionizante, aplicamos o laser de baixa potência. O laser utilizado foi o Twin Flex Evolution (MMOptics Ltda, São Carlos, SP, Brasil) classificado como laser classe 3B, emitindo no comprimento de onda do vermelho visível $\lambda = 660$ nm, tendo com meio ativo um diodo InGaAlP. Os grupos experimentais foram submetidos a uma única irradiação de forma pontual em triplicata em três momentos distintos. (figura 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 11: Distribuição dos poços experimentais (vermelhos) na placa de 96 poços.

Os experimentos foram realizados de maneira padronizada, a distância entre o feixe laser e a camada celular foi mantida constante, uma vez que essa distância pode alterar no valor final da energia entregue. A técnica utilizada nesse trabalho foi a técnica pontual, onde a ponteira do equipamento laser estava em contato direto com o fundo da placa utilizada.

Para a irradiação, cada placa foi coberta por cartolina preta, com o vazado somente no diâmetro onde havia a cultura de células. Dessa maneira, o dispositivo impedia que a luz do ambiente interagisse com a amostra e modificasse o protocolo de irradiação. O risco de contaminação da cultura foi minimizado pelo fato da irradiação ser realizada em contato com a base da placa sem necessidade de abrir a tampa. Todas as placas foram colocadas dentro do luxu laminar, inclusive as placas contendo os grupos controle, onde permaneceram até o que o último grupo fosse irradiado. (Figura 12). A perda de energia através da placa é baixa.⁷⁴

Os parâmetros utilizados para a irradiação são descritos na tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros utilizados na irradiação com Laser de Baixa Potência.

Grupos	Área do Spot laser (cm²)	Tempo (s)	Potência de saída (mW)	Densidade de energia (J/cm²)	Energia (J)
Controle	-	-	-	-	-
Grupo 30	0,04	30	40	30	1,2
Grupo 60	0,04	60	40	60	2,4
Grupo 90	0,04	90	40	90	3,6
Grupo 120	0,04	120	40	120	4,8
Grupo 150	0,04	150	40	150	6,0

Figura 12: Método de Irradiação: (A) – Máscara escura usada durante a irradiação- (B)- Ponteira do laser em contato constante com a placa (técnica pontual)

4.4. Viabilidade Celular: Integridade de Membrana

A viabilidade celular foi realizada através do método de exclusão de células coradas com azul de tripan e a contagem de células viáveis no hemocitômetro (Câmara de Neubauer).

As placas, após o LBP, foram levadas novamente para a estufa a 37° C com 5% de CO₂. A cada tempo experimental (dias: 1, 2, 3 e 4 após o LBP), o meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com PBSA e adicionou-se 200 µL de solução tripsina EDTA por 5 min a 37°C. Para remoção da tripsina adicionou-se 300 µL de meio fresco com soro fetal bovino e as células foram centrifugadas a 300 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 100 µL de meio.

Para a aplicação do método de exclusão de células coradas com azul de tripan, foram adicionados 80 µL de PBSA, 10 µL de azul de tripan a 0,4% e 10 µL de suspensão foi colocada em triplicata em uma placa de 96 poços para cada dia experimental.

Após a homogeneização da concentração final, 10 µL foram adicionados ao hemocítômetro e as células não coradas foram contadas em microscópio invertido, pois somente as células mortas aparecem coradas em azul, devido às lesões na membrana celular que possibilitam a penetração do corante. O número total de células foi obtido através da equação matemática:

$$N = \frac{\text{número total de células viáveis} \times \text{diluição} \times 10^4}{4} \quad (3)$$

4.5. Citometria de Fluxo

Os experimentos utilizando a técnica de citometria foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantã.

A técnica de citometria de fluxo baseia-se na mensuração de parâmetros morfológicos e funcionais de células, por meio da detecção do espalhamento da luz e fluorescência emitidas por substâncias (fluorocromos) ligadas à superfície ou interior dessas células, quando interceptadas individualmente por uma fonte luminosa (laser) numa câmara especial ⁷⁵

As amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de R.I. Optamos por usar somente a dose de 10 Gy, pois verificamos que com essa dose obtíamos o menor número de células viáveis, independente da linhagem celular. O LBP foi usado com as cinco densidades de energia, relatadas anteriormente, as células possuíam uma concentração de 2×10^5 células/ mL e 400 µL de meio de cultura fresco. Após a submissão aos protocolos mencionados, as células receberam solução de tripsina e foram centrifugadas a 300 g por 5 min e, o sobrenadante foi descartado. As células em duplicata foram ressuspensas em 500 µL de álcool RNase e FACSFlow com paraformaldeído, e armazenadas a – 20°C e - 4°C respectivamente, durante as medidas experimentais.

Neste trabalho, utilizamos a citometria de fluxo para quantificar o número de células em cada fase do ciclo celular, bem como estudamos a proliferação celular através da utilização de marcador específico.

4.5.1. Ciclo Celular

Para verificar o ciclo celular, utilizamos as células ressuspensas em álcool RNase e centrifugamos a 400 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão FACSFlow. Acrescentamos 5 µL de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos, a 4°C e posteriormente, adicionou-se 10 µL de Iodeto de Propídio (Sigma Aldrich, EUA). As células foram armazenadas em ambiente escuro com temperatura ambiente e levamos para leitura no citômetro FACSCalibur da BD®- (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A leitura foi realizada no canal FL1-H com comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 630 nm. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8.

4.5.2. Marcador PCNA.

O marcador utilizado nesse experimento foi o *Antígeno Nuclear de Proliferação celular* - PCNA (Abcam, Cambridge, MA, United States).

Utilizamos as células suspensas em FACSFlow com paraformaldeído (solução salina para citometria), centrifugamos a 400 g por 5 min, ressuspendemos em 100 µL de tampão FACSFlow. Para inativação dos marcadores inespecíficos utilizamos 10 µL de BSA (*albumina do soro bovino*) e 10 µL de Triton X-100 (0,1%) para permeabilização da célula, e após 30 min colocamos 10 µL do marcador primário (PCNA). Vinte e quatro horas depois, centrifugamos as células a 400 g por 5 min e ressuspendemos em 100 µL de tampão FACSFlow e 10 µL do marcador secundário, o anticorpo anti-IgG de camundongo (*Alexa-Fluor® 488- Invitrogen; Fiocoeritrina- Invitrogen*). As amostras foram armazenadas em - 8° C e levadas para leitura no citômetro, no canal de fluorescência FL1-H (Alexa Fluor 488), com comprimento de onda de excitação de 488 nm.e emissão de 630 nm Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WinMDI 2.8. (Figura 13)

Figura 13: Imagens da Citometria de fluxo: (A) – Citômetro – (B) – Leitura das amostras no citômetro.

4.6. Senescência celular

Este experimento foi realizado para verificar a proporção de células em estado de senescência após a submissão aos protocolos de R.I e LBP. As células FMM1 e MDA-MB-231 foram submetidas à dose de 10 Gy e usamos a densidade de energia de 90 J/cm², analisando os dias experimentais (-1), (0), (1) e (4). Em cada dia experimental o meio foi aspirado e as células lavadas duas vezes com solução de PBS e fixadas com 100 µL de paraformaldeído 2%. Ao término dos dias experimentais, o paraformaldeído foi retirado, as células foram lavadas e acrescentaram-se 100 µL da solução *Senescence β-Galactosidase Staining Kit* (Cell Signaling Technology, 2011). A solução foi mantida por um período de 24 h. Após o período de *overnight*, as células foram lavadas com solução de PBS e foram acrescentados 50 µL de Glicerol 70 %. A leitura foi realizada em microscópio invertido e as fotos capturadas para cada grupo experimental. Para a quantificação da proporção de células coradas (senescentes) e não coradas, foi utilizado o programa *Image J*. As imagens foram divididas em quadrantes com a área por ponto de 125000 pixels². A contagem das células foi realizada através dos *plug in Cell Counter* nos quatro quadrantes centrais sendo realizada a média dos valores.

4.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa *Graph Pad Prism 5.0* com os testes *Shapiro Wilk* para testar normalidade, *Anova One-Way* para comparação das médias e o teste de *Tukey* foi realizado para identificar diferenças significativas. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Nos dados de viabilidade celular, os resultados são apresentados com o Erro Padrão da Média ($\pm$ EPM). Para os dados provenientes do ciclo celular e marcador PCNA não foi realizado estatística, pois foram realizadas para cada grupo duas medidas, com 10.000 eventos cada uma, e os resultados obtidos mostraram o mesmo comportamento. Para os dados de senescência celular foi realizado o teste Tukey para verificar diferença estatística entre as médias dos grupos. Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

Para verificar a susceptibilidade das células à R.I, utilizamos as doses de 1, 2,5, 5 e 10 Gy nas células de fibroblastos (FMM1), e a viabilidade celular foi quantificada através da integridade da membrana por sete dias, juntamente com o grupo controle. O dia (1) refere-se a 24 h após a R.I e, consecutivamente, para os demais dias experimentais. (Figura 14)

Figura 14: Valores normalizados da viabilidade celular em relação ao grupo controle das células FMM1 submetidas às variadas doses de radiação ionizante. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle não irradiado. O controle refere-se aos 100 % em cada dia experimental.

Na Figura 14, os dados apresentados indicam que a viabilidade celular é afetada, indicando uma relação dose-reposta, pois com o aumento da dose há aumento na quantidade da energia liberada no processo de ionização, e, conseqüentemente, menor viabilidade celular. Os grupos que receberam as doses de 5 e 10 Gy, apresentaram significativa redução na viabilidade celular em todos os dias experimentais. Já o grupo 1 Gy possui viabilidade celular inferior ao controle em todos os dias experimentais, havendo significância nos dias (3) e (6). O grupo de células que receberam a dose de 2,5 Gy mostra redução significativa somente nos dias (1), (3) e (6).

A literatura reporta que o principal alvo da R.I é o DNA. Entre os possíveis danos, podemos citar mudanças de uma base, perdas de uma base, quebra das pontes de hidrogênio, quebra de uma ou duas fitas, ligação cruzada dentro da hélice de uma molécula de DNA e uma proteína, etc. Os danos geralmente passam por mecanismos de reparo, porém quando esses danos ocorrem em grandes proporções simultaneamente a reparação torna-se difícil, gerando danos irreversíveis que podem induzir a morte celular.⁷⁶

A intensidade desses danos está associada com a intensidade da dose absorvida pela célula. Fato esse descrito na Figura 14, pois com o aumento da dose, o número de células viáveis diminuiu, indicando que houve uma sucessão de danos irreversíveis, gerando a morte celular.³²

Observando os dados obtidos, as doses de R.I selecionadas para associação com o LBP foram as doses 2,5 Gy por apresentar valores mais uniformes durante os dias experimentais e a dose de 10 Gy, por apresentar menor viabilidade celular durante os dias experimentais.

Uma vez que definimos as doses a serem utilizadas, quantificamos a viabilidade celular vinte e quatro horas após a R.I nas células MDA-MB-231, para verificar a sua viabilidade celular frente a R.I, uma vez que é descrito o seu comportamento na literatura.^{19,73} A viabilidade das células apresentou diminuição significativa em relação ao controle. (Figura 15)

Figura 15: Valores normalizados da viabilidade celular em relação ao grupo controle das células MDA-MB-231 submetidas à radiação ionizante. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle não irradiado. O controle refere-se aos 100 % em cada dia experimental.

Comparando a viabilidade celular das células tumorais com aquela de fibroblastos, nota-se que células de câncer são mais radorresistentes, já que a redução na viabilidade para as doses de 2,5 Gy e 10 Gy foi aproximadamente 27% e 30%. Para células normais, vinte e quatro-h depois da R.I., a viabilidade reduziu em 53% e 72%, respectivamente. Estes dados corroboram com a literatura, pois as células tumorais necessitam de maiores doses de R.I para a erradicação.^{32, 77}

Para melhor compreensão e exploração dos resultados obtidos, eles serão apresentados separados para cada linhagem celular.

5.1. Viabilidade Celular: Integridade de Membrana – FMM1

As células de fibroblastos foram expostas às doses de 2,5 e 10 Gy e após vinte e quatro horas receberam LBP com as densidades de energia 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². Para cada densidade de energia foi realizado um grupo controle luz, ou seja, grupo que não foi exposto a R.I, somente ao LBP. A viabilidade celular dos grupos foi quantificada durante quatro dias.

Os dados apresentados na Figura 16 referem-se à viabilidade celular normalizada em relação aos controles 24 h após a exposição ao LBP. Os grupos que receberam apenas LBP foram normalizados com o grupo controle. Os grupos expostos à R.I +LBP foram normalizados em relação à respectiva dose de R.I. Em **(A)** são apresentados os dados de viabilidade para as células expostas à dose de 2,5 Gy com as diferentes densidades de energia. Em **(B)** são apresentados os dados das células submetidas à dose de 10 Gy com as diferentes densidades de energia.

Figura 16:- Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 24 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Independente da dose de R.I utilizada foi possível notar que os danos causados nas células viáveis após a R.I, não foram irreparáveis, uma vez que na associação com o LBP a viabilidade celular aumentou, apresentando significância nos grupos 90, 120 e 150 J/cm². A literatura reporta a existência de efeito dose-dependente após a exposição a R.I, pois a quantidade de danos é diretamente proporcional à dose utilizada, uma vez que a capacidade de ionização é mais intensa³². Desse modo, é possível verificar que a dose de 10 Gy causou danos mais severos às células comparadas a dose de 2,5 Gy. (Figura 14), mas com a exposição ao LBP foi possível estimular a reparação de tais danos, representando aumento significativo na viabilidade celular.

Há autores que sugerem que os efeitos biomoduladores do LBP dependem do estado fisiológico em que a cultura se encontra antes da exposição, ou seja, se as células se encontram em algum nível de estresse, o LBP pode auxiliar no aumento da viabilidade celular. Fato esse que corrobora com nossos resultados, uma vez que o LBP influenciou no aumento da viabilidade celular.^{78; 79; 80}. Já os grupos que receberam só o LBP mostram viabilidade celular semelhante ao grupo controle, visto que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

A Figura 17 apresenta os dados 48 h após a exposição ao LBP, que mostra o mesmo comportamento da Figura 16. O número de células viáveis aumentou em todos os grupos independente da dose de R.I utilizada. Em **(A)** as células apresentaram aumento comparado ao grupo 2,5 Gy independente da densidade de energia havendo significância nos grupos 90, 120 e 150 J/cm². Em **(B)** as células de fibroblastos provenientes da gengiva humana apresentaram viabilidade superior ao grupo 10 Gy, havendo diferença significativa apenas nos grupos 90, 120 e 150 J/cm². Os grupos que receberam apenas LBP não apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle luz.

Figura 17: - Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 48 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Os dados apresentados na Figura 18 representam os valores normalizados da viabilidade celular após 72 h a exposição ao LBP. Em **(A)** as células expostas a dose de 2,5 Gy continuam apresentando valores superiores ao grupo 2,5 Gy, embora a significância seja considerada nos grupos 90, 120 e 150 J/cm². Em **(B)** as células expostas às doses de 10 Gy apresentam diferença significativa na viabilidade celular a partir do grupo 60 J/cm².

Figura 18:- Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 72 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Noventa e seis horas após a exposição ao LBP (Figura 19), as células expostas à R.I apresentam aumento na viabilidade celular. Em (**A**) as células expostas à dose de 2,5 Gy apresentou aumento, com diferença significativa nos grupos 90, 120 e 150 J/cm². Em (**B**) as células de fibroblastos apresentaram aumento significativo na viabilidade celular em relação ao grupo 10 Gy em todos os grupos experimentais.

Figura 19:- Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 96 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células FMM1 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Diante dos resultados apresentados para as células não tumorais provenientes da gengiva humana, foi possível observar que independente da dose de R.I utilizada, há efeitos na viabilidade celular, mostrando que os efeitos mais severos foram observados nas células expostas a dose de 10 Gy.

O uso do LBP influenciou na viabilidade das células expostas à R.I, independente da densidade de energia utilizada. Houve significância com as densidades de energia 90, 120 e 150 J/cm² em todos os dias experimentais e com as densidades de energia mais baixas, 30 e 60 J/cm², apenas no último dia experimental para a dose de 10 Gy.

Nossos achados corroboram com trabalhos na literatura que mostraram que o LBP pode aumentar a viabilidade celular de fibroblastos submetidos a algum tipo de estresse. No trabalho de BASSO e colaboradores (2012), os autores utilizaram um LBP com $\lambda = 780$ nm com densidades de energia variando dos 0,5 aos 7 J/cm² durante três dias consecutivos. O grupo verificou que células lesionadas de fibroblastos da gengiva apresentaram aumento na viabilidade celular, quantificados através do ensaio de MTT e teste de exclusão com azul de tripan⁷⁹.

Um fato também observado em nossos dados são os efeitos biomoduladores do LBP mesmo após horas à sua exposição. Esses achados concordam com ASAI e colaboradores (2014) que utilizaram LBP com $\lambda = 630$ nm em células MC3T3-E1 com densidade de energia de 1,5 J/cm² e avaliaram a diferenciação e proliferação de osteoblastos através do método de exclusão com azul de tripan. Foi verificado pelo grupo que a viabilidade das células irradiadas foi maior que o controle durante os 7 dias de experimentação.⁸¹

Nossos dados mostraram que o efeito estimulatório depende da densidade de energia utilizada. De fato, em todos os dias experimentais, as doses mais altas mostraram maior viabilidade celular.⁵⁷

5.2. Ciclo Celular – FMM1

A associação da radiação ionizante com o laser de baixa potência foi avaliada quanto à capacidade de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. As células de fibroblastos (FMM1) foram expostas à dose 10 Gy e após vinte e quatro horas, receberam o laser de baixa potência com as densidades de energia de 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm².

A dose de 10 Gy e os dias experimentais 1 e 4 foram selecionados por apresentarem maior frequência de valores significativos nos ensaios de viabilidade celular por integridade de membrana.

O ciclo celular pode ser dividido em duas fases principais: a interfase, que é subdividida em G₀/G₁, S e G₂/m e a mitose. Durante a interfase, a célula geralmente está metabolicamente ativa, embora sua morfologia não apresente grandes alterações entre as fases G₀/G₁, S e G₂/m. Os principais eventos deste período são o crescimento celular e a replicação do DNA. As células que possuem algum dano no DNA ou ainda não acumularam quantidade crítica de proteínas, não evoluem no ciclo ficando temporariamente em G₀. Na fase S ocorre a síntese do DNA e a duplicação dos centrôssomos e centríolos. Por fim, na fase G₂, as células acumulam energia para ser usada durante a mitose e sintetizam tubulina para formar os microtúbulos do fuso mitótico⁸².

Os resultados para o ciclo celular das células não tumorais foram realizados no dia da exposição à radiação ionizante dia (-1), dia (0) que se refere a vinte quatro horas após R.I e aplicação do LBP, dia (1), 24 h após a exposição ao LBP e noventa e seis horas após a exposição ao LBP, dia (4).

Os dados apresentados na Figura 20 referem-se à porcentagem de eventos celulares nas fases do ciclo celular dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais. O grupo Luz é quantificado apenas nos dias (1) e (4), pois seriam esses os dias experimentais após a exposição ao LBP.

Figura 20:- Análise das fases do ciclo celular em células de fibroblastos FMM1 dos grupos controle e Luz. O gráfico apresenta uma medida representativa, considerando a ocorrência de 10 mil eventos. (A) População de células na fase Sub-G₁ dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais; (B) População de células na fase G₀/G₁ dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais. (C) População das células na fase S dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais. (D) População de células na fase G₂/m dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais.

Em **(A)** é apresentado às células na fase Sub- G_1 , fase essa que também é denominada de fragmentação de DNA. É possível verificar que o grupo 10 Gy apresenta valores superiores em relação ao controle em todos os dias experimentais, particularmente nos dois primeiros dias, indicando que a população de células ⁸²nesta fase é maior que o controle em aproximadamente 35 %. Estes achados indicam que a exposição à R.I levou a maior fragmentação do DNA. ³²

Em **(B)** os dados referem-se à população de células na fase G_0/G_1 , fase na qual as células que não estão em G_0 , realizam síntese de RNA e proteínas para seguir no ciclo. O grupo controle possui maior população concentrada nessa fase, já o grupo 10 Gy apresenta valores inferiores, com exceção do dia (4), indicando que realmente uma porcentagem maior de células ficou na fase Sub- G_1 , devido aos efeitos causados pela exposição à R.I.

Em **(C)** os valores apresentados referem-se à população de células na fase S do ciclo celular, fase conhecida como síntese, ou seja, síntese de DNA. Nessa fase verificamos que o grupo controle, possui quantidade maior de células realizando síntese em comparação ao grupo 10 Gy, corroborando com os resultados anteriores, uma vez que há maior população de células na fragmentação de DNA e em G_0/G_1 . Em **(D)**, os valores apresentados demonstram a população de células na fase G_2/m do ciclo celular. Os grupos controle e 10 Gy apresentam valores semelhantes, indicando que há uma população pequena na fase final do ciclo celular.

Os valores apresentados para os grupos controles (controle, R.I e Luz) indicam que tanto a R.I quanto o LBP influenciaram as fases do ciclo celular, uma vez que a população celular difere do grupo controle. Apesar da porcentagem bem menor, comparada àquelas da fase G_0/G_1 , o grupo LBP apresentou populações maiores nas fases S e G_2/m , indicando maior capacidade de síntese destas células e consequente divisão celular, comparadas ao controle.

O maior número de células observado para o grupo luz nas fases S e G_2/m decorre da diminuição da população na fase G_0/G_1 . Estes resultados corroboram com KARU e colaboradores (1990). O grupo descreve que a intensificação na síntese de DNA, ocorre devido ao aumento do número de células que passam da fase G_0/G_1 para S, como ainda o fato da porcentagem de

células em mitose não ser alterada durante as primeiras horas após a irradiação.⁸³

Já a R.I, que possui energia suficiente para causar danos sucessivos ao DNA, mutações e danos irreparáveis que podem conduzir à morte, mostrou maior população celular na fase Sub- G_1 ³².

Os dados apresentados na Figura 21 referem-se aos grupos com associação entre R.I e LBP no dia experimental (1) para todas as densidades de energia.

Figura 21:- Análise das fases do ciclo celular em células de fibroblastos FMM1 dos grupos R.I + LBP no dia (1). O gráfico apresenta uma medida representativa considerando a ocorrência de 10 mil eventos. (A) População de células na fase Sub-G₁ dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (B) População de células na fase G₀/G₁ dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (C) População das células na fase S dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². (D) População de células na fase G₂/m dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm².

Em **(A)** são apresentados os dados referente à população de células na fase Sub- G_1 . É possível verificar que a população de células possui maior concentração nessa fase, independente da densidade de energia utilizada, os grupos apresentaram comportamento semelhante ao grupo 10 Gy, embora o grupo 60 J/cm² apresente valores levemente superiores e o grupo 150 J/cm² inferiores.

Em **(B)** os dados referem-se à população de células na fase G_0/G_1 vinte e quatro horas após a exposição do LBP. Os dados indicam comportamento semelhante entre os grupos, independente da densidade de energia utilizada em relação ao grupo 10 Gy, embora as populações tendam a diminuir linearmente a partir do grupo 90 J/cm².

Em **(C)** os dados referem-se à fase S do ciclo celular. É possível verificar que a partir do grupo 60 J/cm² os valores apresentam-se superiores em relação ao grupo 10 Gy, indicando que o LBP influenciou na população celular da fase de síntese do ciclo celular. Esses achados corroboram com o grupo que recebeu apenas luz, quando verificamos a influência do LBP nos grupos controles (Figura 20).

Em **(D)** os valores referem-se à fase do ciclo celular G_2/m , fase em que as células estão acumulando energia. Nessa fase é possível verificar que todos os grupos mostram população celular maior comparada ao grupo 10 Gy, com exceção do grupo 60 J/cm², ratificando a influência do LBP nesta fase do ciclo celular.

A Figura 22 apresenta os dados das fases do ciclo celular para todas as densidades de energia 96 h após a exposição ao LBP. É possível verificar que o LBP continuou influenciando nas fases do ciclo, sendo possível observar algumas diferenças em relação às 24 h.

Figura 22:- Análise das fases do ciclo celular em células de fibroblastos FMM1 dos grupos R.I + LBP no dia (4). O gráfico apresenta uma medida representativa considerando a ocorrência de 10 mil eventos. (A) População de células na fase dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (B) População de células na fase Sub- G_1 G_0/G_1 dos grupos 10 Gy30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (C) População das células na fase S dos grupos 10 Gy30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². (D) População de células na fase G_2/m dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm².

Em **(A)**, todos os grupos irradiados apresentam valores superiores em relação ao grupo 10 Gy, mas nota-se que a porcentagem de células nessa fase diminuiu em relação às 24 h.

Em **(B)**, por outro lado, observamos que há maior população de células nessa fase e todos os grupos apresentam valores inferiores quando comparados ao grupo 10 Gy na fase G_0/G_1 do ciclo celular, mas maiores em relação às 24 h.⁸⁴ (Figura 21)

Já em **(C)** a população de células na fase de síntese aumentou no grupo 10 Gy comparada às 24 h, porém é possível observar que quando se utilizou o LBP, a população celular é consideravelmente maior que o grupo 10 Gy a partir do grupo 90 J/cm², indicando que as células passaram por um processo de recuperação depois do dano causado pela R.I.³².

Em **(D)**, que representa a fase G_2/m é possível verificar que o grupo 10 Gy possui população menor em relação aos demais grupos. Os grupos com associação ao LBP apresentaram valores de população maior nesta fase, independente da densidade de energia utilizada.

Diante dos resultados acerca do ciclo celular, é possível verificar que o LBP influenciou na distribuição celular nas fases do ciclo, uma vez que nos dia (1) e (4), a quantidade de células nas fases S e G_2/m são maiores em relação ao controle 10 Gy. Nota-se também que as densidades de energia influenciam nas diferentes fases do ciclo celular.

Os nossos achados corroboram com FENG e colaboradores (2012), quando utilizaram um laser He- Ne (632,8 nm, 10 mW) , com densidade de energia de 1,8 J/cm² em células HUVEC-CS. O grupo observou que os efeitos biomoduladores do laser diminuiu em 11 % a população de células na fase G_0/G_1 e aumentou em S e G_2/m .⁸⁵

5.3. Marcador PCNA – FMM1

O PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) desempenha papel importante no metabolismo do ácido nucleico³, pois é uma proteína essencial para a replicação de DNA, possui envolvimento na reparação do mesmo, como também apresenta envolvimento na transcrição de RNA, indicando proliferação celular.⁸⁶

Para a marcação com PCNA utilizamos apenas a densidade de energia de 90 J/cm², pois se mostrou significativa em todos os dias experimentais para as células de fibroblastos quando realizamos a viabilidade celular por integridade de membrana, como também na fase S do ciclo celular, fase em que ocorre a expressão máxima da proteína PCNA.⁸⁷

Os dados apresentados na Figura 23 representam os gráficos *density plots* provenientes da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo com os parâmetros de tamanho (FSC-H)⁴ e fluorescência (FL1-H)⁵ de todos os grupos nos dias experimentais. É possível verificar através desses gráficos que a população de células possui pouca fluorescência, indicando que a expressão de PCNA é baixa, pois há baixa concentração da população celular nos campos onde a fluorescência é significativa.⁷⁵

³ São macromoléculas formadas por unidades monoméricas conhecidas como nucleotídeos.

⁴ *Forward Scatter*.

⁵ Intensidade de Fluorescência.

Figura 23:- Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo – Os *dot plots* representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. As células são avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) nos grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm² e Luz. A análise possui uma ocorrência de 10 mil eventos para cada grupo.

A figura 21 mostra a porcentagem de expressão de PCNA para cada grupo experimental.

Figura 24: Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo – O gráfico demonstra o nível de expressão de PCNA. O gráfico apresenta uma única medida considerando a ocorrência de 10 mil eventos. As células são avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) nos grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm² e Luz.

Verificando a porcentagem da expressão de PCNA descrita na figura 24 é possível verificar que o dia experimental (4) possui a maior expressão de PCNA comparada aos demais.

Esses dados indicam que 96 h após a exposição ao LBP as células possivelmente passaram por um sistema de reparo já que a expressão de PCNA é maior que aquela do grupo 10 Gy.^{32, 86,87}

O grupo controle apresenta maior expressão desta proteína em relação a todos os grupos, provavelmente porque estas células seguem seu curso normal de ciclo celular e não sofreram nenhuma intervenção.

O grupo Luz, que resultou em uma energia entregue de 6 J, apresentou valores iguais ou inferiores ao controle, indicando que o LBP por si só, não exerceu influência na expressão desta proteína, uma vez que é bem descrito na literatura que para efetiva ação do LBP devem ser considerados o estado da célula.^{78,80}

Embora o grupo 90 J/cm² apresente população superior na fase S do ciclo celular em relação aos demais grupos (controle e R.I), a expressão de PCNA foi relativamente baixa, pois a maior concentração de células estava em G₀/G₁, fase que é descrita na literatura como menor expressão da proteína PCNA.⁸⁷

Nossos resultados concordam com BEM-DOV e colaboradores (1999), que encontraram aumento da expressão de PCNA após a submissão ao LBP em células satélites de camundongos. O grupo utilizou um laser de He-Ne (632,8 nm) com potência de 4,5 mW durante 3 s e após 19 h de incubação, verificaram que a expressão de PCNA foi maior que o grupo não Irradiado.⁸⁸

5.4. Senescência – FMM1

A senescência celular é definida pela perda irreversível do potencial de divisão das células com uma variedade de alterações fenotípicas, descritas inicialmente por Hayflick Moorhead (1961). As células senescentes têm como característica uma parada de ciclo na fase G_1 , ficando nesta fase até ocorrer a morte celular.⁸⁹

A utilização do experimento de senescência consistiu em analisar a quantidade de células senescentes para todos os grupos experimentais analisados, uma vez que no ciclo celular houve uma grande população de células abrigadas na fase G_0/G_1 . (Figura 25)

Figura 25: Número de células senescentes avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) para os grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm² e Luz. O sinal * indica diferença estatística significativa em relação ao controle

Os dados apresentados na Figura 25 indicam que o grupo 10 Gy possui quantidade superior de células senescentes em relação ao grupo controle, com exceção do dia experimental (1). No dia (0), que seria 24 h após a exposição a R.I, a quantidade de células senescentes do grupo 10 Gy é significativamente superior comparada ao controle, indicando que a radioindução dos danos influenciou na quantidade de células senescentes, devido aos possíveis danos ao DNA.³²

O grupo Luz quando comparado ao controle em cada dia experimental analisado, não apresentou diferença significativa, embora no dia (4) tenha apresentado valor superior. Já o grupo 90 J/cm² apresentou valores inferiores ao grupo 10 Gy, embora não significativos. Os nossos dados corroboram com LING e colaboradores (2013), que induziram senescência em fibroblastos NIH3T3 utilizando radiação Ultra- Violeta (UV – λ = 314 nm), com densidade de energia de 5 mJ/cm². Vinte e quatro horas depois o grupo utilizou laser de He- Ne (632,8 nm, 10 mW, 12,74mW/cm²) com densidade de energia de 1 J/cm² e verificou uma redução na expressão de β - Gal. O grupo sugere que esse efeito seja explicado, pelo fato que o LBP, estimula um decréscimo na população celular em G₀/G₁ para aumentar em S.⁹⁰

5.5. Viabilidade Celular: Integridade de Membrana – MDA-MB-231

As células provenientes do câncer de mama (MDA-MB-231) foram expostas às doses de 2,5 e 10 Gy e, após vinte e quatro horas, receberam o LBP com as densidades de energia 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². Para cada densidade de energia foi realizado um grupo controle luz, ou seja, grupo que não foi exposto a R.I, somente ao LBP. A viabilidade celular dos grupos foi quantificada durante quatro dias (Figuras 26 a 29).

Figura 26: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 24 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Os dados apresentados na Figura 26 referem-se à normalização da viabilidade celular em relação aos controles 24 h após a exposição ao LBP. Os grupos que receberam apenas LBP foram normalizados com o grupo controle. Os grupos expostos a R.I +LBP foram normalizados em relação às respectivas doses de R.I. Em **(A)** são apresentados os dados de viabilidade celular para as células expostas a dose de 2,5 Gy com as diferentes densidades de energia. Em **(B)** são apresentados os dados das células submetidas à dose de 10 Gy com as diferentes densidades de energia.

Os dados apresentados na Figura 27 referem-se à normalização da viabilidade celular em relação aos controles 48 h após a exposição ao LBP.

Em **(A)** são apresentados os dados de viabilidade celular para a dose de 2,5 Gy, com as diferentes densidades de energia.

Em **(B)** são apresentados os dados das células submetidas à dose de 10 Gy com as diferentes densidades de energia.

A

B

Figura 27: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 48 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Na Figura 28 os dados referem-se à normalização da viabilidade celular em relação aos controles 72 h após a exposição ao LBP. Em **(A)** são apresentados os dados de viabilidade celular para as células expostas a dose de 2,5 Gy com as diferentes densidades de energia. Em **(B)** são apresentados os dados das células submetidas à dose de 10 Gy com as diferentes densidades de energia.

Figura 28: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 72 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP.

Figura 29: Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 96 h após a exposição à dose de R.I + LBP. O gráfico mostra o efeito expresso em média $\pm$ EPM de três experimentos independentes com $n=9$. (A) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 2,5 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. (B) Valores normalizados da viabilidade celular das células MDA-MB-231 expostas à dose de 10 Gy. Os valores referem-se à associação da R.I com LBP e os grupos que receberam apenas LBP. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle 2,5 Gy e 10 Gy.

Diante dos dados apresentados para a viabilidade celular das células MDA-MB-231, é possível verificar que independente da dose de R.I utilizada, densidade de energia e tempo experimental decorrido, o LBP não influenciou nos dados obtidos, uma vez que na associação (R.I + LBP), não observamos diferenças significativas em relação aos grupos controle.

Os nossos resultados corroboram com FRIGO e colaboradores (2009), quando o grupo utilizou células provenientes de melanoma murino B16F10 e irradiaram com laser de He- Ne ($\lambda = 660$ nm, 50 mW e 2.5 W/cm^2), com diferentes densidades de energia 150 e 1050 J/cm^2 , resultando na energia entregue de 9 e 63 J, fracionadas em três aplicações em três dias consecutivos. A análise da viabilidade celular foi realizada através do teste de exclusão com azul de tripan, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle⁶².

Também, trabalho em nosso grupo mostrou que células de melanoma murino B16F10, com e sem déficit nutricional, submetidas ao LBP ($\lambda = 660$ nm, 40 mW), com densidades de energia entre 30 J/cm^2 e 150 J/cm^2 , não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, 24, 48 e 72 h após a exposição.⁹¹

Entretanto, nossos resultados não corroboram com KREISLER e colaboradores (2003) quando utilizaram laser $\lambda = 809$ nm em células provenientes de carcinoma de laringe humana com densidades de energia de 1,96, 3,92 e $7,84 \text{ J/cm}^2$ e investigaram a viabilidade celular através de MTT no período de 24, 48 e 72 h, obtendo diferença significativa em relação ao controle apenas em 72 h.⁹² Provavelmente, a linhagem celular e dosimetria utilizada desempenham papel importante nos efeitos do LBP em células tumorais.

5.6. Ciclo Celular – MDA-MB-231

A associação da radiação ionizante com o laser de baixa potência foi avaliada quanto à capacidade de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. As células de câncer de mama (MDA-MB - 231) foram expostas à dose 10 Gy e após vinte e quatro horas, receberam o laser de baixa potência com as densidades de energia de 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm².

Os resultados para o ciclo celular destas células foram obtidos no dia da exposição à radiação ionizante dia (-1), no dia (0) referente a vinte quatro horas depois da R.I e antes da aplicação do LBP, vinte e quatro horas após a exposição ao LBP dia (1) e noventa e seis horas após a exposição ao LBP dia (4) A figura 30 mostra nossos resultados.

Figura 30: Análise das fases do ciclo celular em células MDA-MB-231 dos grupos controle e Luz. O gráfico apresenta uma medida considerando a ocorrência de 10 mil eventos. (A) População de células na fase Sub- G_1 dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais; (B) População de células na fase G_0/G_1 dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais. (C) População das células na fase S dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais. (D) População de células na fase G_2/m dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais.

Os dados apresentados na Figura 30 referem-se à população de células nas fases do ciclo celular dos grupos controle, 10 Gy e Luz em todos os dias experimentais. O grupo Luz é quantificado apenas nos dias (1) e (4), pois seriam esses os dias experimentais após a exposição ao LBP.

De uma maneira geral, independente do grupo experimental (controle, 10 Gy ou luz), o comportamento é o mesmo como aquele observado para fibroblastos, onde se verificou que a maior população celular é encontrada nas fases Sub-G₁ e G₀/G₁. Particularmente para as células que receberam R.I, nota-se que a percentagem celular em Sub-G₁ é maior que aquela do grupo controle, indicando danos irreversíveis ao DNA. Para as fases S e G₂/m do ciclo celular, observa-se que células que foram submetidas ao LBP mostram maior população comparada ao controle, sugerindo que células que foram expostas ao laser tiveram maior população nessas fases quando comparado ao controle. No entanto, a quantidade de células nestas fases é pequena comparada às fases Sub-G₁ e G₀/G₁.

Em (D) os valores apresentados representam a população de células na fase G₂/m do ciclo celular. O grupo Luz apresenta valores superiores em relação ao controle. Os grupos controle e 10 Gy apresentam valores semelhantes.

Os dados apresentados na Figura 31 referem-se aos grupos com associação entre R.I e LBP no dia experimental (1) para todas as densidades de energia.

Figura 31: Análise das fases do ciclo celular em células MDA-MB-231 dos grupos R.I + LBP no dia (1). O gráfico apresenta uma medida considerando a ocorrência de 10 mil eventos. (A) População de células na fase Sub-G₁ dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (B) População de células na fase G₀/G₁ dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (C) População das células na fase S dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². (D) População de células na fase G₂/m dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm².

Em **(A)** são apresentados os dados referente à população de células da fase Sub- G_1 . É possível verificar que independente da densidade de energia utilizada, os grupos apresentam maior porcentagem de células em Sub- G_1 .

Em **(B)** os dados referem-se à população de células na fase G_0/G_1 vinte e quatro horas após a exposição do LBP. Os dados indicam que independente da densidade de energia utilizada os grupos apresentaram valores inferiores em relação ao grupo 10 Gy.

Em **(C)** os dados referem-se à fase S do ciclo celular. Em **(D)** os valores referem-se à fase do ciclo celular G_2/m . É possível verificar que todos os grupos apresentaram valores superiores, destacando-se os grupos 60 e 150 J/cm^2 , indicando que o LBP influenciou a porcentagem de células nestas fases do ciclo celular. Esses achados corroboram com o grupo que recebeu apenas luz, quando verificamos a influência do LBP nos grupos controles (Figura 30).

A Figura 32 apresenta os dados das fases do ciclo celular para todas as densidades de energia 96 h após a exposição ao LBP.

Figura 32: Análise das fases do ciclo celular em células MDA-MB-231 dos grupos R.I + LBP no dia (4). O gráfico apresenta uma medida considerando a ocorrência de 10 mil eventos. (A) População de células na fase Sub-G₁ dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (B) População de células na fase G₀/G₁ dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm²; (C) População das células na fase S dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm². (D) População de células na fase G₂/m dos grupos 10 Gy, 30, 60, 90, 120 e 150 J/cm².

Em **(A)** os grupos não apresentaram diferença em relação ao grupo 10 Gy. Os valores entre os grupos foram semelhantes, embora o grupo 120 J/cm² apresente valor inferior.

Em **(B)** todos os grupos apresentam valores inferiores em relação ao grupo 10 Gy na fase G₀/G₁ do ciclo celular.

Já em **(C)**, a população de células na fase de síntese aumentou em todos os grupos, indicando que o LBP influenciou na síntese de DNA da população independente da densidade de energia utilizada.

Em **(D)**, que representa a fase G₂/m é possível verificar que todos os grupos, independente da densidade de energia empregada apresentaram valores superiores em relação ao grupo 10 Gy.

Nossos achados corroboram com a literatura, pois apesar dos efeitos do LBP sobre células tumorais não serem ainda compreendidos e controversos, há o consenso sobre a estimulação da síntese de DNA. De fato, SCHARTINGER e colaboradores (2012), observaram aumento nas fases S e G₂/m das células de carcinoma oral humano – SCC-25, após a exposição ao LBP com $\lambda = 660$ nm, $p = 350$ mW e irradiância de 63,7 mW/cm².⁹³

5.7. Marcador PCNA- MDA-MB-231

Para a marcação com PCNA utilizamos apenas a densidade de energia de 90 J/cm², pois embora a mesma não apresente diferença estatística em relação ao controle, ela apresentou valores próximos a maior densidade de energia utilizada (150 J/cm²) e durante o ciclo celular apresentou população superior em S, fase em que ocorre a expressão máxima da proteína PCNA.⁸⁷ (Figura 33)

Figura 33: Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo – Os dot plots representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência. As células foram avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) nos grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm² e Luz.

A Figura 33 apresenta os gráficos *density plot* obtidos através da técnica de citometria de fluxo. Os gráficos possuem como eixos o canal de fluorescência (FL1-H), canal utilizado devido ao comprimento de onda para leitura e excitação do fluorocromo Alexa Fluor® 488 e tamanho da célula (FSC-H). As imagens apresentam as células possuem baixa fluorescência, resultando em baixas expressões da proteína PCNA.⁷⁵

Analisando essa fluorescência como a porcentagem da expressão da proteína PCNA, podemos observar os valores na figura 34 para todos os dias experimentais.

Figura 34: Modulação da expressão de PCNA avaliada por citometria de fluxo – O gráfico demonstra o nível de expressão de PCNA. O gráfico apresenta uma única medida considerando a ocorrência de 10 mil eventos. As células foram avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) nos grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm² e Luz.

O grupo controle nos dias experimentais (-1) e (0) apresenta-se semelhante ao grupo 10 Gy. Nos dias (1) e (4) o grupo 10 Gy expressa uma porcentagem ligeiramente maior de PCNA.

Esse fato está possivelmente relacionado à capacidade de reparo da célula tumoral, uma vez que a mesma possui alto metabolismo e alta taxa de proliferação.^{4, 32}

O grupo Luz expressou valores inferiores em relação ao controle em todos os dias experimentais. Já o grupo 90 J/cm² expressou valores inferiores ao grupo 10 Gy, sugerindo que de alguma maneira o LBP não influenciou na expressão dessa proteína, indicando que outros mecanismos estão envolvidos na expressão de PCNA. De fato, a expressão de PCNA para célula tumoral é maior quando comparado a uma célula não tumoral. O marcador PCNA é utilizado para marcação da malignidade de uma célula tumoral, uma vez que quanto maior for a sua atividade proliferativa, maior será a expressão de PCNA, resultando assim na classificação de malignidade da célula.⁹⁴

5.8. Senescência – MDA-MB-231

Atualmente a definição de senescência seria uma resposta ao *stress* desencadeando uma serie de mecanismos, tais como danos ao DNA, perda da eficiência na divisão dos telômeros. Acredita-se que a senescência poderia parar a evolução das células tumorais, uma vez que elas não prosseguem no ciclo celular.⁹⁵

A densidade de energia utilizada no experimento foi a de 90 J/cm², pois o grupo apresenta valores semelhantes a maior densidade de energia utilizada no trabalho, como também valores semelhantes nas fases do ciclo celular.

Figura 35: Número de células senescentes avaliadas nos dias (-1), (0), (1) e (4) nos grupos controle, 10 Gy, 90 J/cm² e Luz. O sinal * significa diferença estatística em relação ao controle.

Os dados apresentados na figura 35 apresentam a quantidade de células senescentes para cada grupo em cada dia experimental. O grupo controle apresenta valores inferiores ao grupo 10 Gy em todos os dias experimentais, com exceção do dia (4), embora essa diferença de valores não seja significativa. O grupo 10 Gy, grupo que sofreu um dano radioinduzido, apresentou valores superiores ao controle, embora apenas no dia (-1) essa diferença seja significativa. Este resultado sugere que menor número de células continuam no ciclo celular.

Já o grupo 90 J/cm² que recebeu a associação de R.I e LBP, apresenta valores inferiores ao grupo 10 Gy no dia experimental (1), porém no dia (4) apresenta valor superior, embora em nenhum dia seja considerado significativo. O grupo Luz apresentou no dia (1) valor inferior e significativo em relação ao controle, indicando que há um número menor de células senescentes quando expostas ao LBP, porém no dia (4), apresenta valor superior, embora não significativo.

Embora a caracterização da senescência indique a perda da atividade proliferativa celular, as questões acerca da ocorrência de senescência em células tumorais ainda são discutidas na literatura.⁹⁶ Nos nossos dados é possível caracterizar a senescência através do *stress* sofrido pela célula após a exposição à R.I provocando um dano ao DNA.⁹⁷

Os nossos resultados para as células de fibroblastos indicam que o LBP influenciou na viabilidade celular, demonstrando aumento significativo em todos os dias experimentais, dependendo da densidade de energia utilizada. Nas fases do ciclo celular, foi possível verificar que a população de células que tiveram associação entre R.I + LBP apresentaram população maior nas fases S e G₂/m quando comparado com o grupo 10 Gy, reafirmando a fotoestimulação do LBP nas células não tumorais.

A proliferação celular quantificada através da expressão de PCNA corrobora com os resultados obtidos para a viabilidade celular, como também para o ciclo celular, uma vez que houve maior população em S, fase de pico de expressão de PCNA. Já para a senescência celular, os nossos dados indicam que a associação do LBP com a densidade de energia de 90 J/cm² e a dose de 10 Gy,

não influenciou no número de células senescentes, uma vez que os valores são semelhantes ao controle 10 Gy.

Os nossos achados para as células tumorais indicam que o LBP associado a R.I não afetou a viabilidade celular, uma vez que os valores foram semelhantes com os respectivos controles 2,5 e 10 Gy, independente da densidade de energia utilizada, em todos os dias experimentais.

No ciclo celular, os nossos dados apresentaram maior população em S e G_2/m em relação ao grupo 10 Gy, embora a maior concentração da população celular esteja em G_0/G_1 . A proliferação celular quantificada pela expressão de PCNA apresentou valores inferiores no grupo com associação entre R.I + LBP, quando comparado ao controle 10 Gy.

Para a senescência celular, os nossos dados apresentaram quantidade de células senescentes superiores ao controle 10 Gy, embora não significativo, no dia experimental (4). Esses valores indicam que apesar de haver maior população em S e consequentemente em G_2/m , as células não realizaram mitose, uma vez que há *check point* entre as fases G_2 e M.

Entretanto, um aspecto importante é que as células tumorais viáveis após a R.I continuam acumulando mutações em consequência da alta atividade metabólica, que podem alterar a expressão fenotípica dessas células, desencadeando alterações nos receptores de membrana e vias de sinalização. Essas alterações podem interferir nos mecanismos de interação da luz com as células.⁹⁸

6. Conclusões

Dentro dos parâmetros utilizados neste trabalho podemos concluir:

O uso do laser de baixa potência após à exposição radiação ionizante aumentou a viabilidade celular das células não tumorais (FMM1) dependendo da densidade de energia utilizada;

O uso do laser de baixa potência após exposição à radiação ionizante, não afetou a viabilidade celular das células tumorais (MDA-MB-231), independente da densidade de energia utilizada;

Independente da linhagem celular observou-se maior população de células nas fases Sub G_1 e G_0/G_1 do ciclo celular. Entretanto, células tumorais e não tumorais, que receberam o LBP, mostraram maior população que o controle 10 Gy nas fases S e G_2/m ;

Para as células não tumorais, observou-se maior expressão de PCNA e menor quantidade de células senescentes para o grupo laser após R.I, enquanto que para as células tumorais observou-se comportamento inverso.

Diante disso, com os parâmetros utilizados podemos concluir que o laser de baixa potência, pode ser utilizado em células tumorais após a submissão a radiação ionizante.

7. Referências

- 1 ORGANIZATION, W. H. **World Health Statistics** 2015.
- 2 SILVA, I. N. D. C.-J. A. G. D. **INCA** 2014.
- 3 RESEARCH, W. C. R. F. A. I. F. C. **Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective**. WASHINGTON, D.C: AICR 2007.
- 4 ALBERTS, B., JOHSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K AND WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre, BR.: 2004.
- 5 LOPES, M. A. et al. Reconhecendo e controlando os efeitos colaterais da radioterapia. 06/1998 1998. Disponível em: < [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=lnk&base=LILACS&exprSe arch=222797&indexSearch=ID\(=p](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&nextAction=lnk&base=LILACS&exprSe arch=222797&indexSearch=ID(=p) >.
- 6 BUMFORD, C. K., KUNKLER, I.H. **Textbook of radiotherapy- Radiation Physics, Therapy and Oncology**. 6. 2003.
- 7 HALLIDAY, D., RESNICK, J.W. **Fundamentos de Física: Óptica e Física moderna**. Rio de Janeiro, R.J: 2009.
- 8 PODGORSK, E. B. **Radiation oncology physics : a handbook for teachers and students**. Vienna: 2005.
- 9 CARDOSO, E. M. **Aplicações da Energia Nuclear**. Apostila Eduactiva da Comissão Nacional de Energia Nuclear.
- 10 CALISTO, F. C. et al. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 3, p. 204-8, Mar 2015. ISSN 0102-8650. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020150030000007> >.
- 11 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> >.
- 12 STEIN, S. et al. Pain reduced by low-level laser therapy during use of orthodontic separators in early mixed dentition. **J Orofac Orthop**, Aug 13 2015. ISSN 1434-5293. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00056-015-0306-4> >.
- 13 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> >.
- 14 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. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-012-1105-4> >.

- 15 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, Apr 2015. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-015-1710-0> >.
- 16 MESTER, E., SZENDE, B., TOTA, J.G. **Effect of Laser on hair growth of mice**: Jiserl Orvostud. 19: 628-31 p. 1967.
- 17 FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 58-62, Spring 2014. ISSN 2008-9783 (Print)2008-9783. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 18 AVCI, P. et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg**, v. 32, n. 1, p. 41-52, Mar 2013. ISSN 1085-5629. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24049929> >.
- 19 KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, 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 TEIXEIRA, L. A., FONSECA, C.O. **De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil** 2007.
- 21 GURGEL, N. **Estudo do Câncer in : O Brazil - Medico**. 28: 208 p. 1914.
- 22 IMAULT-HUART, M. J. **História do cancro**. In: LE GOFF, Jacques. **A Doença tem história**. Lisboa: Terramar 1991.
- 23 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.
- 24 ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B, ET.AL. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo- celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução**. 28: 118-129 p. 2005.
- 25 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> >.
- 26 SPENCE, R. A. J., JONHSTON, P.G. **Oncology**. 2. 2001.
- 27 FOYE, W. O., SENGUPTA, S.K. **Principles of medicinal chemistry**. 1996.
- 28 SOBIN, L. H., WITTEKIND, CH. **TNM- Classification of malignant tumors**: John willey e Sons, INC. 2002.
- 29 JARDIM-PERASSI, B. V. et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85311, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085311> >.
- 30 KELLER, F. J. **Física**. 1. 1998. ISBN 13:9788534609722.

- 31 SCAFF, L. A. M. **Física da Radioterapia**. 1997. 1997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 32 OKUNO, E., YOSHIMURA, E.M. **Física das radiações**. 2010. 2010. 204-224 ISBN 978-85-7975-005-2. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 33 YOSHIMURA, E. M. **Radiation Physics: interaction of radiation with matter**: Revista Brasileira de Física Médica. 3: 57-67 p. 2009.
- 34 TURNER, J. E. **of ionizing radiation with matter**: Health Physics. 86: 228-52 p. 2004.
- 35 MUROYA, Y. et al. High-LET ion radiolysis of water: visualization of the formation and evolution of ion tracks and relevance to the radiation-induced bystander effect. **Radiat Res**, v. 165, n. 4, p. 485-91, Apr 2006. ISSN 0033-7587 (Print)0033-7587. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 36 MOURÃO, C. A., ABRAMOV, D.M. **Biofísica- Essencial**. 2012. ISBN 978-85-277-1971-1. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 37 HILL, R. P. et al. Hypoxia and Predicting Radiation Response. **Semin Radiat Oncol**, v. 25, n. 4, p. 260-72, Oct 2015. ISSN 1053-4296. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.semradonc.2015.05.004> >.
- 38 WATSON, J. D., BERRY, A. **DNA: The secret of life**. 2003. ISBN 03-4541546-7.
- 39 TOHFAROSH, M. et al. Effects of gamma and e-beam sterilization on the chemical, mechanical and tribological properties of a novel hydrogel. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 53, p. 250-256, Aug 24 2015. ISSN 1878-0180. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.024> >.
- 40 OLIVEIRA, K. C. et al. New insights into the structural characteristics of irradiated crotonine. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 14, 2015. ISSN 1678-9180. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-015-0013-z> >.
- 41 KERTZSCHER, G. et al. In vivo dosimetry: trends and prospects for brachytherapy. **Br J Radiol**, v. 87, n. 1041, Sep 2014. ISSN 0007-1285 (Print)1748-880X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1259/bjr.20140206> >.
- 42 XU, X. G.; BEDNARZ, B.; PAGANETTI, H. A review of dosimetry studies on external-beam radiation treatment with respect to second cancer induction. **Phys Med Biol**, v. 53, n. 13, p. R193-241, Jul 7 2008. ISSN 0031-9155 (Print)1361-6560 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/53/13/r01> >.
- 43 BATUMALAI, V. et al. Imaging dose in breast radiotherapy: does breast size affect the dose to the organs at risk and the risk of secondary cancer to the contralateral breast? **J Med Radiat Sci**, v. 62, n. 1, p. 32-9, Mar 2015. ISSN 2051-3895 (Print)2051-3895. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmrs.91> >.
- 44 RUDAT, V. et al. In vivo surface dose measurement using GafChromic film dosimetry in breast cancer radiotherapy: comparison of 7-field IMRT, tangential IMRT and tangential 3D-CRT. In: (Ed.). **Radiat Oncol**, v.9, 2014. p.156. ISBN 1748-717X (Electronic).

- 45 FRANKEN, N. A. et al. Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review). **Int J Oncol**, v. 42, n. 5, p. 1501-15, May 2013. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2013.1857> >.
- 46 PEETERS, S. T. et al. Dose-response in radiotherapy for localized prostate cancer: results of the Dutch multicenter randomized phase III trial comparing 68 Gy of radiotherapy with 78 Gy. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 13, p. 1990-6, May 1 2006. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.05.2530> >.
- 47 ICRP: ICRP 2013 Proceedings. 2015. Disponível em: < <http://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%202013%20Proceedings> >.
- 48 MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960-08-06 1960. ISSN {footerJournalISSN}. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v187/n4736/abs/187493a0.html> >.
- 49 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> >.
- 50 MESTER, E., SPIRY, T., SZENDE, B., TOTA, G. **Effect of laser rays on wound healing**: J.Surg. 122: 532-5 p. 1971.
- 51 MESTER, E., NAGYLUCSKAY, S., DOKLWN., TISZA,S. **Laser stimulation of wound healing**: Acta Chir Acad Sci Hung. 17 1976.
- 52 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. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/1535370215596383> >.
- 53 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. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.018> >.
- 54 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) >.
- 55 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.
- 56 WONG-RILEY, M. T. et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, p. 4761-71, Feb 11 2005. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M409650200> >.
- 57 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).

- 58 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> >.
- 59 SCHAFFER, M. et al. Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 40, n. 3, p. 253-7, Oct 1997. ISSN 1011-1344 (Print)1011-1344. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 60 OCAÑA-QUERO, J. M., PEREZ DE LA LASTRA, J. GOMEZ-VILAMANDOS, R., MORENO-MILLÁN, M. **Biological effect of helium-neon (He-Ne) laser irradiation on mouse myeloma (Sp2-Ag14) cell line in vitro**: Lasers Med.Sci. 13: 214-218 p. 1998.
- 61 RENNO, A. C. et al. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 25, n. 4, p. 275-80, Aug 2007. ISSN 1549-5418 (Print)1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2007.2055> >.
- 62 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> >.
- 63 POWELL, K. et al. The effect of laser irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 1, p. 115-23, Feb 2010. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2445> >.
- 64 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> >.
- 65 SOUZA, N. H. et al. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Braz J Phys Ther**, v. 18, n. 4, p. 308-14, Jul-Aug 2014. ISSN 1413-3555. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 66 WALTER, C.; PABST, A. M.; ZIEBART, T. Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: An study. **Biomed Rep**, v. 3, n. 1, p. 14-18, Jan 2015. ISSN 2049-9434 (Print)2049-9434. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/br.2014.389> >.
- 67 ZACCARA, I. M. et al. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. **Lasers Med Sci**, Sep 4 2015. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-015-1803-9> >.
- 68 DASTANPOUR, S.; MOMEN BEITOLLAHI, J.; SABER, K. The effect of low-level laser therapy on human leukemic cells. **J Lasers Med Sci**, v. 6, n. 2, p. 74-9, Spring 2015. ISSN 2008-9783 (Print)2008-9783. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 69 GORALCZYK, K. et al. Effect of LLLT on endothelial cells culture. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 1, p. 273-8, Jan 2015. ISSN 0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-014-1650-0> >.

- 70 CAVALCANTI, M. F. et al. Evaluation of the Proliferative Effects Induced by Low-Level Laser Therapy in Bone Marrow Stem Cell Culture. **Photomed Laser Surg**, Nov 18 2015. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2014.3864> >.
- 71 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> >.
- 72 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> >.
- 73 VALGÔDE, F. G. S. **Avaliação do dano radioinduzido, capacidade de reparo e morte celular em células humanas tumorais (T-47D e MCF-7) e não tumorais (MCF-10) de mama**. 2008. (Dissertação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo
- 74 DEANA, A. M. et al. Fully automated algorithm for wound surface area assessment. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 5, p. 755-61, Sep-Oct 2013. ISSN 1067-1927. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12085> >.
- 75 BERTHO, A. L., FERRAZ, R.SALES, M.M., VASCONCELOS, D.M. Citometria de Fluxo: princípios metodológicos de funcionamento. In: ATHENEU (Ed.). **Citometria de Fluxo Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa**, 2013.
- 76 ZHAO, Y. et al. Ionizing radiation-induced adaptive response in fibroblasts under both monolayer and 3-dimensional conditions. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0121289, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121289> >.
- 77 BHIDE, S. A.; NUTTING, C. M. Recent advances in radiotherapy. **BMC Med**, v. 8, p. 25, 2010. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-8-25> >.
- 78 ALMEIDA-LOPES, L. et al. 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, n. 2, p. 179-84, 2001. ISSN 0196-8092 (Print)0196-8092. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 79 BASSO, F. G. et al. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **Int J Dent**, v. 2012, p. 719452, 2012. ISSN 1687-8728. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/719452> >.
- 80 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> >.
- 81 ASAI, T. et al. The long-term effects of red light-emitting diode irradiation on the proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells. **Kobe J Med Sci**, v. 60, n. 1, p. E12-8, 2014. ISSN 0023-2513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 82 JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. Rio de Janeiro, RJ.: 2013.

- 83 KARU, T. I. Effects of visible radiation on cultured cells. **Photochem Photobiol**, v. 52, n. 6, p. 1089-98, Dec 1990. ISSN 0031-8655 (Print)0031-8655. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 84 FRIGO, L. et al. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. **Photomed Laser Surg**, v. 28 Suppl 1, p. S151-6, Aug 2010. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2475> >.
- 85 FENG, J.; ZHANG, Y.; XING, D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. **Cell Signal**, v. 24, n. 6, p. 1116-25, Jun 2012. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.013> >.
- 86 KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, n. 6, p. 629-40, Feb 13 1997. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1200886> >.
- 87 STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Ann Bot**, v. 107, n. 7, p. 1127-40, May 2011. ISSN 0305-7364. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcq243> >.
- 88 BEN-DOV, N. et al. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v. 1448, n. 3, p. 372-80, Jan 11 1999. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 89 ARRUDA, G. **AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR EM MELANÓCITOS E CÉLULAS DE MELANOMA PELA AÇÃO DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE**. 2011. Universidade Federal do Paraná
- 90 LING, Q. et al. Activated ERK/FOXO1 pathway by low-power laser irradiation inhibits UVB-induced senescence through down-regulating p21 expression. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 1, p. 108-16, Jan 2014. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24425> >.
- 91 SANTOS, A., J., S. **Efeitos da Terapia com Laser de Baixa Potência em Melanoma. Ensaios in vitro**. INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES, U. D. S. P. 2013.
- 92 KREISLER, M. et al. Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 100-3, 2003. ISSN 0268-8921 (Print)0268-8921. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-003-0265-7> >.
- 93 SCHARTINGER, V. H. et al. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. **Support Care Cancer**, v. 20, n. 3, p. 523-9, Mar 2012. ISSN 0941-4355. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-011-1113-0> >.
- 94 LIAO, X. H. et al. Estrogen receptor alpha mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent pathway. **Febs j**, v. 281, n. 3, p. 927-42, Feb 2014. ISSN 1742-464x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12658> >.

- ⁹⁵ COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular senescence in cancer and aging. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 223-33, Jul 27 2007. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003> >.
- ⁹⁶ COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 1, p. 51-7, Jan 2010. ISSN 1474-175x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2772> >.
- ⁹⁷ SALEH, J. et al. Effect of low-level laser therapy on radiotherapy-induced hyposalivation and xerostomia: a pilot study. **Photomed Laser Surg**, v. 32, n. 10, p. 546-52, Oct 2014. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2014.3741> >.
- ⁹⁸ LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 3, p. 776-81, Feb 4 2003. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0334858100> >.

8. Apêndices

Apêndice A- Fotos experimento de senescência – células FMM1

As imagens referem-se às células não tumorais (FMM1) no experimento de senescência para todos os grupos experimentais. As células coradas em azul seriam as células senescentes.

Apêndice B- Fotos experimento de senescência – células MDA-MB-231

As imagens referem-se às células tumorais (MDA-MB-231) no experimento de senescência para todos os grupos experimentais. As células coradas em azul seriam as células senescentes.