AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Efeitos do laser de baixa potência de emissão infravermelha (λ = 780 nm) em células de melanoma murino e humano

CAROLINA GOUVÊA DE SOUZA CONTATORI

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

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

São Paulo
2019

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

Efeitos do laser de baixa potência de emissão infravermelha (λ = 780 nm) em células de melanoma murino e humano

CAROLINA GOUVÊA DE SOUZA CONTATORI

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
2019

Fonte de Financiamento: CAPES

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

Como citar:

GOUVÊA DE SOUZA CONTATORI, C. ***Efeitos do laser de baixa potência de emissão infravermelha (comprimento de onda = 780 nm) em células de melanoma murino e humano***. 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/

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

GOUVÊA DE SOUZA CONTATORI, CAROLINA
Efeitos do laser de baixa potência de emissão infravermelha (comprimento de onda = 780 nm) em células de melanoma murino e humano / CAROLINA GOUVÊA DE SOUZA CONTATORI; orientadora Martha Simões Ribeiro. -- São Paulo, 2019.
74 p.

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

1. B16F10. 2. SKMEL37. 3. câncer de pele. 4. VEGF. 5. atividade mitocondrial. I. Simões Ribeiro, Martha, orient. II. Título.

Aos meus pais, por sempre terem batalhado muito a fim de me proporcionar as melhores oportunidades na vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À *Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro* por ter me aceitado em seu grupo, por toda confiança, paciência e orientação ao longo desses anos e, principalmente, por nunca ter desistido de mim mesmo nos momentos mais difíceis.

À *CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – pela bolsa de mestrado a mim concedida.

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

Ao *Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria,* do laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan, por ter aberto as portas de seu laboratório e permitido que eu fizesse um treinamento em cultura celular.

Aos *Profs. Drs. Durvanei Augusto Maria e Emerson Bernardes Soares*, por terem cedido as linhagens celulares utilizadas neste trabalho.

Ao *Dr. Arthur Cássio de Lima Luna* por ter me acompanhado em alguns experimentos, tirando minhas dúvidas, auxiliando e fornecendo dicas valiosas para realização dos mesmos.

À *Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues* por me acompanhar na etapa final desse trabalho, ensinando técnicas importantes para a conclusão do mesmo.

Aos meus colegas de grupo *Camila, Diego, Ismael, Fernanda, Saulo e Tania*, por todas as conversas enriquecedoras e ajuda ao longo desses anos, além de tornarem as tardes mais agradáveis e divertidas.

Aos bolsistas e ex-bolsistas do CLA: *Alan, Amauri*, *Andreia, Armando, Cacau, Cássio*, *Derly, Lucas*, *Merilyn*, *Nielsen*, *Noé* e *Pedro*, pela amizade, discussões e apoio nestes anos.

Aos meus amigos *Giovanna, Caio, Fernando, Priscilla, Luiz, Fernanda, Homero, Juliana, Cecília, Assis e Fábio,* por todo o apoio, companheirismo, compreensão da minha ausência em alguns momentos e, principalmente, por terem me proporcionado bons momentos de diversão e relaxamento.

Aos meus pais, por todo carinho, dedicação, educação oferecida e compreensão sobre os caminhos trilhados por mim.

A todos que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece”

Benjamin Disraeli

RESUMO

CONTATORI, C. G. S. ***Efeitos do laser de baixa potência de emissão infravermelha (λ = 780 nm) em células de melanoma murino e humano***. 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer de pele pode ser do tipo melanoma ou não melanoma, sendo comum em pessoas acima de 40 anos, de pele clara ou com doenças cutâneas prévias. A incidência do melanoma é baixa, porém, é considerado o mais agressivo e mortal devido ao seu alto poder metastático. A cirurgia ainda é a forma de tratamento mais empregada para a doença, sendo muito invasiva e, portanto, terapias coadjuvantes estão sendo empregadas a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, como o laser de baixa potência (LBP). Sabe-se que o LBP pode desencadear efeito bioestimulatório em culturas celulares crescidas sob déficit nutricional, porém em linhagens tumorais sua ação é controversa. Dessa forma, o objetivo desse estudo consiste em investigar os efeitos inibitórios do LBP no comportamento de células de melanoma murino B16F10 e humano SKMEL 37 utilizando um laser de emissão infravermelha (λ = 780 nm) com diferentes densidades de energia. Foram adotados 4 grupos experimentais: G0 (grupo controle), G30 (30 $J.cm^{-2}$), G90 (90 $J.cm^{-2}$) e G150 (150 $J.cm^{-2}$) a fim de verificar a viabilidade celular, através do ensaio de MTT e vermelho neutro; o comportamento de invasão celular, obtido através do ensaio de invasão *transwell*; e o papel do LBP na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), verificado através do ensaio imunoenzimático ELISA. Os resultados mostraram que a densidade de energia de 30 $J.cm^{-2}$ estimulou o comportamento de invasão da linhagem celular B16F10. Por outro lado, o LBP não exerceu influência na expressão do fator de crescimento endotelial vascular, na viabilidade celular, e na atividade mitocondrial de ambas as linhagens celulares, em nenhuma das densidades de energia utilizadas, em comparação ao controle.

Palavras-chave: B16F10, SKMEL37, câncer de pele, VEGF, atividade mitocondrial

ABSTRACT

CONTATORI, C. G. S. ***Effects of near infrared laser (λ = 780nm) on murine and human melanoma cells***. 2019. 74 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Skin cancer can be melanoma or non-melanoma type, being usual in people over 40 years of age, caucasian and with previous skin diseases. Its incidence is low, however, it is considered the most aggressive and fatal due to its great capacity of metastasis. Surgery is the most commonly treatment, nonetheless is highly invasive and therefore coadjuvant therapies, such as low level light (LLL) are being employed to improve patients' quality of life. It is known that LLL has a biostimulatory effect in cell cultures growing in nutritional deficit, however in tumor cell lines its effects remain controversial. Thus, the aim of this study is to evaluate the inhibitory effect of LLL on the behavior of murine and human melanoma cells using an infrared LLL (λ = 780nm) delivering different energy densities. For this purpose, four experimental groups were designed: G0 (control group), G30 (30J/cm^2), G90 (90J/cm^2), G150 (150J/cm^2) to verify cell viability by MTT and neutral red assay; the cell invasion behavior, obtained through the transwell invasion assays; and the role of LLL in the vascular endothelial growth factor expression, as verified by the enzyme-linked immunosorbent assay. The results showed that the lowest energy density stimulated the invasion behavior of B16F10 cells. On the other hand, LLL had no influence in the vascular endothelial growth factor expression, cell viability or in the metabolic activity of both cell lines in any energy density used when compared to control group.

Keywords: B16F10, SKMEL37, *skin cancer*, VEGF, *mitochondrial activity*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP - Adenosina trifosfato

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

CLA - Centro de *Lasers* e Aplicações

CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPCs – Células progenitoras endoteliais

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IB - Instituto Butantan

LBP - Laser de baixa potência

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

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

PBS - Solução tampão fosfato salina sem cálcio e magnésio

RGP – Radial Growth Phase/Fase de crescimento radial

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SFB - Soro fetal bovino

USP - Universidade de São Paulo

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VGP – Vertical growth phase/Fase de crescimento vertical

VPF – Fator de permeabilidade vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm^2: Centímetros quadrados

CO_2: Dióxido de carbono

nm: Nanometro

mm: Milímetro

h: Hora

µm: Micrometro

mW: Miliwatt

$J\ cm^{-2}$: Joule por centímetro quadrados

$W.cm^{-2}$: Watt por centímetro quadrado

J: Joule

°C: Graus Celsius

s: Segundo

µL: Microlitro

mL: Mililitro

$mg.ml^{-1}$: Miligrama por mililitro

$µg.ml^{-1}$: Micrograma por mililitro

ʎ: Comprimento de onda

g: força g

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 OBJETIVOS 14
2.1 Geral 14
2.2 Específicos 14
3 REVISÃO DA LITERATURA 15
3.1 Melanoma 15
3.2 Metástase 20
3.3 Angiogênese 22
3.3.1 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 25
3.4 Laser de Baixa Potência (LBP) 26
3.4.1 LBP em células tumorais 29
4 MATERIAIS E MÉTODOS 32
4.1 Cultivo celular 32
4.2 Concentração celular 34
4.3 Curva de crescimento 34
4.4 Equipamento laser 35
4.5 Testes de viabilidade celular 38
4.5.1 Atividade Mitocondrial 38
4.5.2 Vermelho neutro 40
4.6 Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF-A 41
4.7 Ensaio de invasão *transwell* 42
4.8 Análise estatística 43
5 RESULTADOS 44
5.1 Curva de crescimento 44
5.2 Testes de viabilidade celular 44
5.3 Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF-A 48
5.4 Ensaio de invasão *transwell* 52
6 DISCUSSÃO 55
7 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

1 INTRODUÇÃO

Chama-se de câncer o conjunto de doenças que possuem o crescimento desordenado de células, invadindo tecidos e órgãos, espalhando-se para outras regiões do corpo. Tais células se dividem de forma rápida, levando à formação de tumores ou neoplasias malignas. Tais características, juntamente com os diversos tipos de células do corpo, são responsáveis pela diferenciação dos tipos de câncer[1]. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) são esperados para o biênio 2018-2019, 600 mil novos casos de câncer no Brasil para cada ano[2].

Dentre os mais de 200 tipos diferentes de neoplasias malignas está o câncer de pele, que pode ser do tipo melanoma ou não melanoma, sendo mais comum em pessoas acima de 40 anos e raro em crianças e negros, com exceção daqueles já portadores de doenças cutâneas anteriores. Dessa forma, pessoas de pele clara, sensíveis à ação dos raios solares, ou com doenças cutâneas prévias são as principais vítimas[3, 4].

A incidência mundial desses dois tipos de câncer tem crescido durante as últimas décadas, ocorrendo entre 2 e 3 milhões para os casos não melanoma e 132 mil para melanomas por ano[5]. O câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil, representando 30% dos tumores malignos registrados no país, no entanto seu índice de mortalidade é baixo. Para o biênio 2018-2019 são esperados 165.580 novos casos desse tipo de câncer, sendo 85.170 em homens e 80.410 em mulheres[4]. Por outro lado, a incidência do câncer de pele tipo melanoma é muito baixa, correspondendo a 3% das neoplasias malignas. No ano de 2018 ocorreram 6.260 novos casos, sendo 2.920 em homens e 3.340 em mulheres[6].

Os melanomas se desenvolvem em células primitivas, de origem embrionária, sendo estas os melanócitos. O desenvolvimento do melanoma é mais propenso no tronco, pernas, pescoço e rosto. Pode se manifestar em regiões do corpo não expostas ao sol, apresentando-se na forma de uma pinta escura nova ou através de uma pré-existente que cresce e muda de aspecto. Apesar de o melanoma ser menos comum em relação ao câncer de pele não melanoma, o mesmo é considerado o mais agressivo e mortal sendo quase

sempre curável em seus estágios iniciais, porém se não for diagnosticado rapidamente pode se disseminar para outras regiões do corpo, já que possui grande capacidade de metástase[7,8,9]. A sobrevida de pacientes com melanoma tem melhorado bastante nos últimos anos, sobretudo devido à detecção precoce do tumor[6].

As opções de tratamento para o tipo de câncer melanoma estão relacionadas ao estágio da doença, local e extensão do tumor, estado geral de saúde do paciente e certas características do próprio câncer. A cirurgia é o tratamento atualmente mais empregado, podendo ser excisional, micrográfica ou linfadenectomia. Além das cirurgias, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia também podem ser empregadas no tratamento do melanoma[6,9].

A utilização do laser de baixa potência (LBP) vem gerando grande interesse devido à tendência mundial de procurar formas menos invasivas de tratamentos. Muitos profissionais da área de saúde vêm utilizando esta modalidade terapêutica para a modulação do processo inflamatório[10], redução de dor em quadros álgicos agudos e crônicos[11] e aceleração do processo de reparação tecidual[12].

No entanto, o uso do LBP em células de linhagem tumoral ainda é controverso, havendo resultados que indicam ação estimulante, inibitória e até mesmo nenhuma influência do LBP em tais células[13].

Frigo et al[14] realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo* com células de melanoma murino (B16F10), e os resultados mostraram que não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos controle e irradiados (150 $J.cm^{-2}$ e 1050 $J.cm^{-2}$) *in vitro*, em relação à proliferação celular. Já no experimento in vivo, os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle (não sofreu irradiação), grupo de dose baixa (150 $J.cm^{-2}$) e grupo de dose elevada (1050 $J.cm^{-2}$). Os resultados apresentaram um aumento significativo no volume tumoral, vasos sanguíneos e nas anormalidades celulares para o grupo dose 1050 $J.cm^{-2}$ quando comparado aos outros grupos, enquanto o grupo dose 150 $J.cm^{-2}$ não induziu mudanças no comportamento das células tumorais.

Alguns achados na literatura demonstraram que o LBP é capaz de provocar danos diretos no tumor, potencializar terapias cancerígenas e estimular o sistema imune do hospedeiro, contudo não há elucidação dos efeitos da LBP

em células tumorais. Além disso, o tratamento com LBP também é altamente efetivo na atenuação de inúmeros efeitos colaterais resultantes das terapias contra o câncer[13].

As linhagens celulares de melanoma são altamente tumorigênicas e propensas a metástase[15], sendo, portanto, modelos experimentais úteis para analisar a resposta ao tratamento com LBP. Nesse trabalho foram utilizadas linhagens celulares de melanoma murino e humano, uma vez que tais linhagens apresentam diferentes sensibilidades à radiação[16] e agentes tóxicos[17].

Considerando-se as características apresentadas sobre o melanoma, os tratamentos oferecidos e a falta de elucidação dos efeitos do LBP em células de linhagem tumoral, nesse trabalho pretende-se verificar a ação do LBP no comportamento de células de melanoma murino B16F10 e melanoma humano SKMEL 37 com diferentes densidades de energia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo consiste em investigar os efeitos do LBP no comportamento de células de melanoma murino B16F10 e melanoma humano SKMEL 37 utilizando um laser de emissão infravermelha (λ = 780 nm) com diferentes densidades de energia.

2.2 Específicos

- Investigar os efeitos do LBP na viabilidade celular, com e sem déficit nutricional, utilizando diferentes densidades de energia;
- Investigar o papel do LBP na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF);
- Verificar o comportamento de invasão celular das linhagens celulares B16F10 e SKMEL 37 associado ao LBP.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Melanoma

A pele é formada pelo tecido subcutâneo (mais profundo), derme e epiderme (mais superficial), sendo esta composta por 3 camadas: córnea, granulosa e basal (formada pelas células basais). Além das células basais, há também os melanócitos em tal região. No final do período embrionário, as células da crista neural migram para o mesênquima da derme em desenvolvimento e, então, para a junção dermo-epidérmica, diferenciando-se em melanócitos. Nos complexos dos melanócitos, denominados melanossomos, ocorre a produção de melanina, pigmento que promove a coloração da pele e dos cabelos e cuja função consiste em proteger as camadas mais internas da pele contra os efeitos da radiação ultravioleta do tipo A e B, produzidos pelo sol[18,19,20]. Essa proteção está relacionada à cor da pele através da quantidade de melanina presente nos melanócitos, sendo uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de melanina e os danos causados no DNA, podendo levar ao aparecimento de carcinomas[21].

A produção de melanina começa antes do nascimento, sendo fornecida aos tecidos e órgãos que estão sendo gerados. Após o mesmo, sua síntese é estimulada pela ação da luz ultravioleta[20]. A incidência de radiação UV na pele provoca aumento na síntese de melanina, promovendo o escurecimento da pele[22]. A produção de melanina é responsável pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio no interior dos melanócitos, levando à geração do radical hidroxil e causando danos ao DNA. Consequentemente, um aumento na síntese de melanina pela exposição à luz UV é capaz de aumentar os danos no DNA e mutações[23]. Dessa forma, a malignização dos melanócitos está diretamente relacionada à exposição crônica da radiação solar, sendo a radiação UVA responsável por promover danos ao DNA através da absorção de moléculas endógenas que são sensibilizadas pela radiação e a UVB capaz de promover danos mais severos e diretos ao DNA[24,25]. Tais alterações, juntamente com a ineficiência de renovação dos melanócitos (prejudicando sua sobrevivência e a capacidade de manter a integridade de seu genoma) e dos mecanismos de reparo do DNA em células tumorais, contribuem para a formação do melanoma[26,27].

A primeira referência ao melanoma surgiu nas escrituras de Hipócrates (460 – 375 a.C.), porém o termo foi empregado somente em 1838 por Robert Carswell, descrevendo lesões malignas pigmentadas das células. O melanoma pode ser definido como um tumor maligno de origem neuroectodérmica, formando-se a partir de células melanocíticas e envolvendo primariamente a pele. Geralmente os melanomas são bastante pigmentados, porém podem ser amelanóticos[28,29]. Tal neoplasia apresenta um crescimento radial e as células são capazes de invadir (crescimento vertical), induzir angiogênese e metastatizar ao sofrerem alterações genéticas, levando à recorrência da lesão e morte do paciente[30].

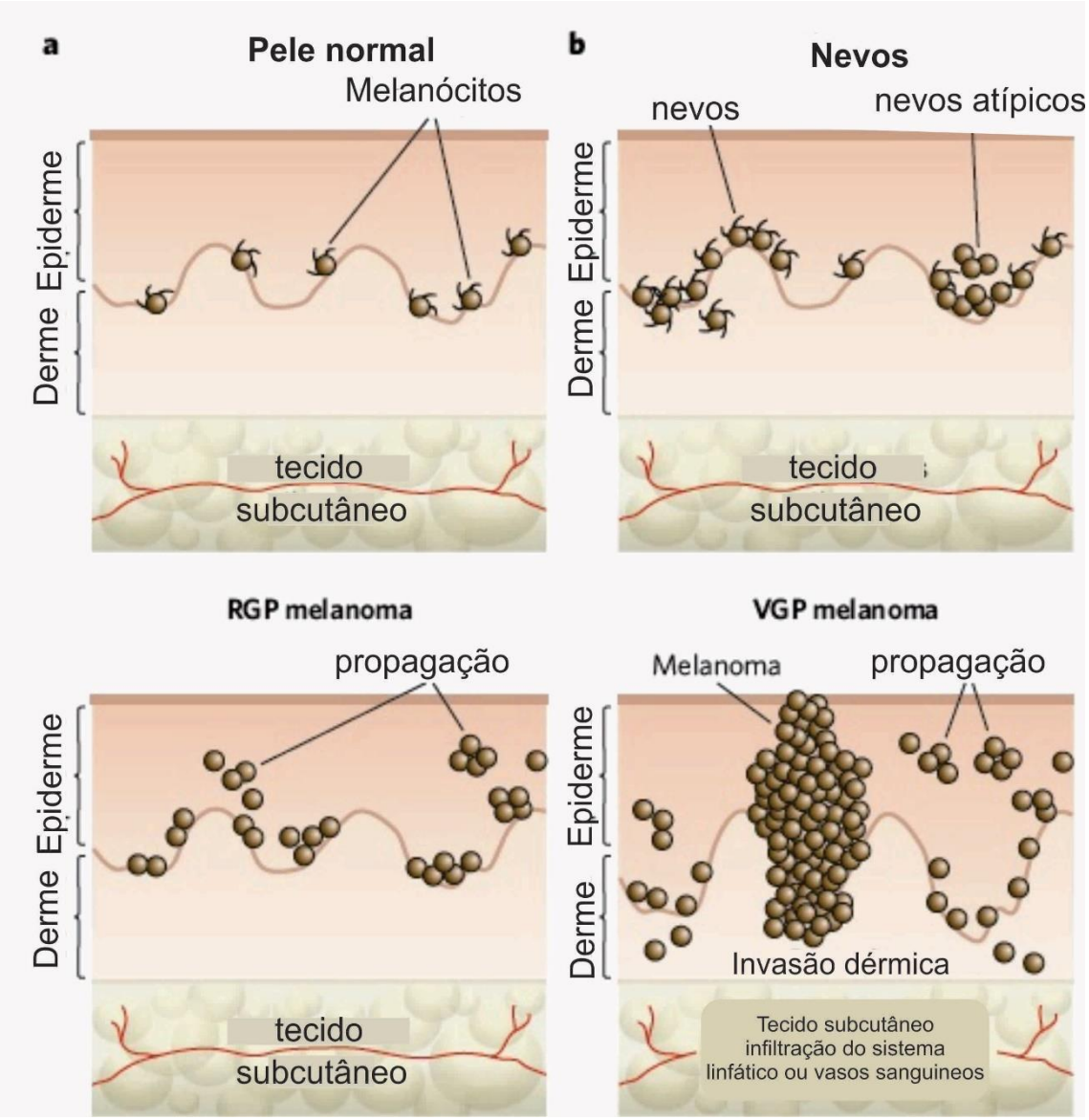
Na população afrodescendente o diagnóstico clínico da doença é difícil, tornando-a uma das mais letais dentre tais indivíduos. Essa neoplasia também pode acometer outras regiões do corpo que contenham melanócitos, como é o caso das leptomeninges, úvea (compreende a íris, corpos ciliares e coroide) e regiões mucosas (trato respiratório, urinário e gastrointestinal)[31]. O melanoma progride através de pequenas máculas pigmentares que evoluem para uma lesão caracterizada por bordas irregulares, variação assimétrica, diversidade de cores e aumento de diâmetro (Figura 1)[32].

Figura 1 - Caracterização do aspecto clínico do melanoma.

Fonte – CERTA Farmácia de manipulção[33]

A produção de fatores de crescimento autócrinos e a perda de receptores de adesão contribuem para a interrupção na sinalização intracelular dos melanócitos, fazendo com que os mesmos proliferem e se espalhem, levando à formação de nevos. Estes costumam ser benignos, porém podem evoluir para o melanoma na fase de crescimento radial (RGP), uma lesão intra-epidérmica que pode envolver alguma microinvasão local da derme (Figura 2). Essas células, por sua vez, podem progredir para a fase de crescimento vertical (VGP), estágio em que as células possuem potencial metastático e nódulos invadem a derme. A metástase consiste na última fase, sendo caracterizada pelo movimento das células tumorais para os linfonodos e órgãos distantes e pela capacidade das mesmas em sobreviver em tais locais[19,34].

Figura 2 - Progressão da transformação dos melanócitos.



Fonte - Adaptado de *Melanoma biology and new targeted therapy*[19]

O primeiro passo para o tratamento dessa neoplasia é o diagnóstico correto, sendo este possível através de uma biópsia, isto é, um procedimento cirúrgico no qual são colhidas células ou pequenos fragmentos de uma lesão para que se obtenha o grau e a natureza dos mesmos. Há diversos tipos de biópsia, dependendo do órgão a ser estudado e o tipo de lesão. As biópsias cutâneas mais comuns são a incisional e a excisional, sendo esta muito empregada para lesões suspeitas de melanoma e removendo todo o tumor[35].

Quando o tumor é detectado em seus estágios iniciais (estágio I ou II), o prognóstico do paciente é considerado bom. No entanto, os pacientes que se

encontram na fase avançada (estágios III e IV) desse tipo de câncer contribuem para a alta morbidade e mortalidade da doença (Tabela 1)[15,36].

Tabela 1 - Caracterização dos estágios clínicos do melanoma.

Estágio Clínico	Características
IA (baixo risco)	Melanoma ≤ 1,0 mm de espessura e nível II ou III (Clark), sem ulceração.
IB-IIA-IIB-IIC (risco intermediário a alto)	Melanoma ≤ 1,0 mm de espessura com ulceração, ou nível IV ou V (Clark). Melanomas > 1,0 mm de espessura com quaisquer características e linfonodos não comprometidos clinicamente.
III	Linfonodos clinicamente palpáveis, ou linfonodo sentinela positivo.
IV	Metástases à distância

Fonte - Avaliação do potencial anticâncer do derivado benzotiazólico (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazo-2 ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em células de melanoma humano[36]

O tratamento da doença iniciou-se em 1858 com a excisão ampla e profunda de tais lesões e alguns anos depois seguiu para a ressecção em blocos com margens amplas. Nas décadas de 50 e 60 alguns pesquisadores trabalhavam na identificação de fatores prognósticos relacionados ao melanoma e, em 1992, o rastreamento linfático e a linfadenectomia seletiva foram introduzidos[28].

As opções de tratamento para o melanoma dependem do estágio em que a doença se encontra além de fatores, como local do tumor e estado geral de saúde[37]. O estágio em que o câncer se encontra está relacionado ao quanto o mesmo se espalhou pelo corpo e qual a melhor forma para tratá-lo. O primeiro estágio do melanoma é chamado estágio 0, ou carcinoma *in situ*, e, em seguida, varia de I a IV[38].

Atualmente a cirurgia é o tratamento mais indicado para a doença, porém a radioterapia e a quimioterapia também podem ser empregadas. Quando a metástase é atingida, o melanoma é quase sempre incurável, sendo tratado com novos medicamentos que apresentam altas taxas de sucesso terapêutico, e cujo objetivo consiste em postergar a evolução da doença e, assim, aumentar a sobrevida dos pacientes[6].

3.2 Metástase

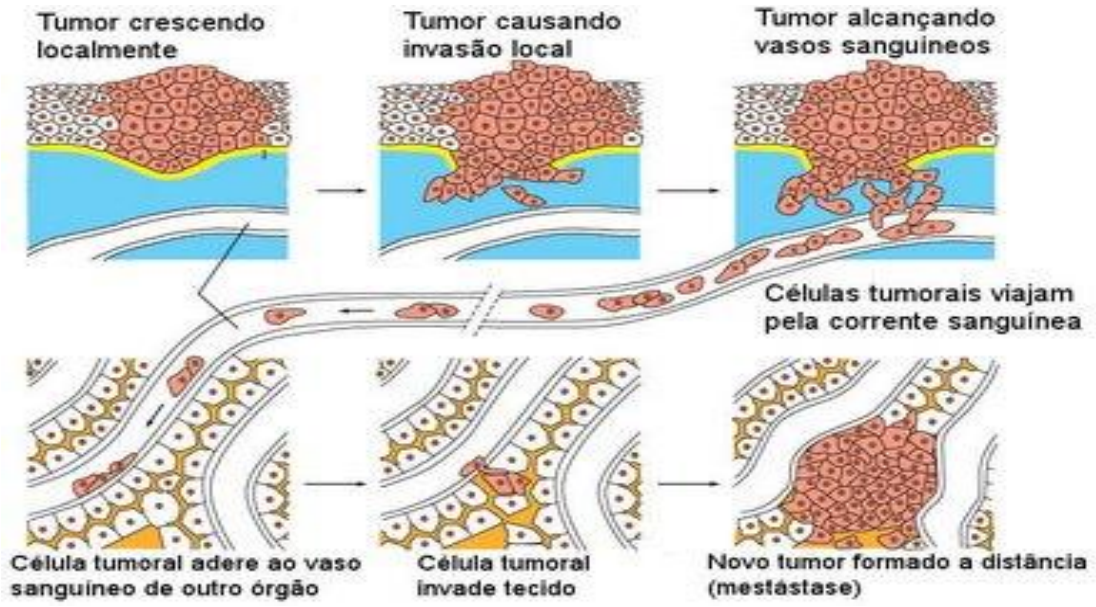
A mestástase pode ser definida como o espalhamento do tumor para além do local onde o mesmo se iniciou (sítio primário), sendo uma marca letal para o câncer, uma vez que os pacientes morrem principalmente como um resultado da disseminação da doença para outros órgãos e não como consequência do tumor primário em si [39,40]. Assim, diz-se que a metástase é o resultado final de um processo biológico complexo conhecido como cascata metastática [41].

Conforme o desenvolvimento da neoplasia maligna, são formadas subpopulações com características diferentes como resultado da instabilidade genética e do acúmulo de várias mutações em diferentes células. Esse processo chama-se de heterogeneidade do tumor e tem grande influência no crescimento do mesmo, uma vez que tais subpopulações têm a capacidade de burlar os obstáculos a que foram submetidas, tornando-se assim uma das principais barreiras no tratamento de metástases [15,42].

Quando as células malignas invadem o tecido adjacente ao sítio primário do crescimento tumoral, estabelecendo-se em um ambiente distante do tumor primário, ocorre a metástase [42]. A base genética da tumorigênese pode variar entre os diferentes tipos de tumor, porém os passos da cascata metastática, isto é, as etapas celulares e moleculares necessárias para que a metástase ocorra, geralmente são similares entre os tumores sólidos [40,41].

Os passos que compreendem a cascata metastática são: perda da adesão celular; invasão local através da matriz celular circundante e estroma e violação da membrana basal; aumento da motilidade e invasividade no tecido adjacente ao sítio primário tumoral; invasão dos vasos linfáticos ou sanguíneos, sobrevivência na circulação; atingir um órgão distante; invasão no parênquima de tecidos distantes; e, por fim, a sobrevivência e proliferação em um novo microambiente para formar metástases (Figura 3)[15,41].

Figura 3 - Simplificação do processo de metastatização.



Fonte – Biologia molecular da célula[1]

Para o sucesso do processo de metastatização, o tumor deve dispor de suprimento sanguíneo (angiogênese) suficiente para as necessidades metabólicas do mesmo, sendo os novos vasos formados responsáveis também pela rota de escape das células metastáticas[15]. Além disso, as células tumorais devem administrar funções celulares que não se limitam apenas às características autônomas das próprias células, mas também são muito dependentes da interação da célula metastática com o tumor e o estroma do hospedeiro [43].

Após as células malignas se destacarem da massa tumoral, o deslocamento das mesmas pela matriz extracelular ocorre através de enzimas proteolíticas liberadas pela própria célula tumoral, pelas células estromais do tecido invadido ou por células inflamatórias[15]. As células metastáticas, então, invadem o tecido adjacente e atingem os vasos sanguíneos, disseminando-se para outros locais. Dentro dos vasos, essas células precisam sobreviver ao choque mecânico causado pelo atrito com o sangue circulante e ao ataque das células do sistema imune, sendo, então, protegidas por meio da interação com as plaquetas circulantes e aumentando suas chances de sobrevivência. Por fim, as células se instalam em um tecido secundário, onde se estabelecem, sobrevivem e crescem[44].

3.3 Angiogênese

Para que os tecidos funcionem e se desenvolvam de maneira adequada, eles necessitam de um suprimento de oxigênio, nutrientes, moléculas e células do sistema imune, os quais são fornecidos através dos vasos sanguíneos[45]. Durante o desenvolvimento embrionário ocorre um processo denominado vasculogênese, responsável por originar vasos de grande calibre por meio de precursores mesodérmicos, no caso os angioblastos[46]. Estes surgem do compartimento mesodermal onde se agregam, alinham e diferenciam-se em células endoteliais, formando uma rede de tubos primitiva (artérias, veias, linfáticos), além de poderem gerar pericitos e células musculares lisas da parede vascular. Dessa forma, a vasculogênese possui papel fundamental na organogênese[47,48].

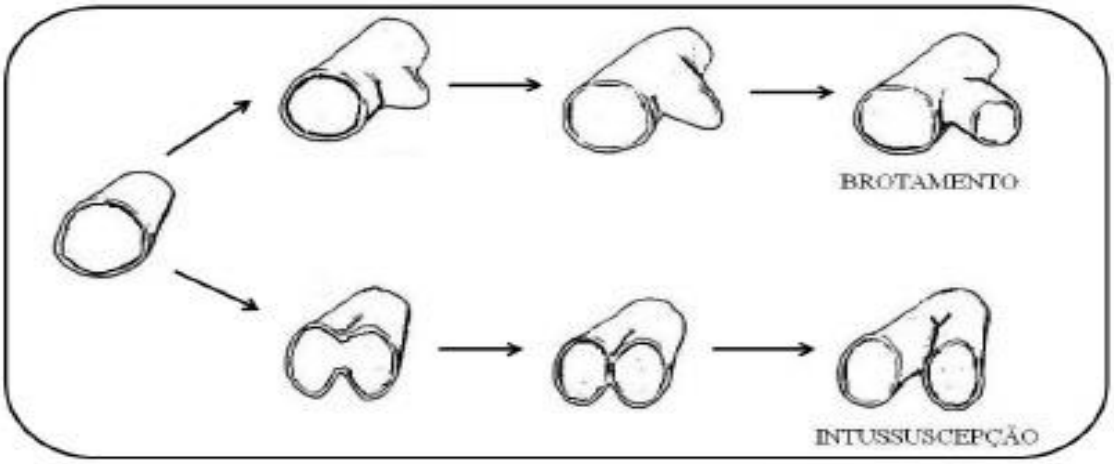
O plexo vascular primitivo sofre, posteriormente, remodelamento transformando-se em uma rede vascular madura. Esse processo envolve a formação de pequenos e grandes vasos, o estabelecimento de um fluxo direcional, associações com células periendoteliais (pericitos e músculo liso) e o ajuste da densidade vascular a fim de atender as necessidades nutricionais do tecido, sendo que tal ajuste envolve a regressão dos vasos desnecessários[49].

Em situações de aumento do consumo de oxigênio e nutrientes (ex: crescimento e regeneração tecidual), a rede vascular basal torna-se insuficiente, uma vez que o aumento do fluxo sanguíneo decorrente a vaso dilatação muitas vezes não supre a demanda tecidual, sendo necessária a formação de novos vasos sanguíneos a partir de pré-existentes. Esse processo é chamado de angiogênese[47]. O termo angiogênese foi instituído em 1935 para descrever a vascularização da placenta, porém atualmente o mesmo é empregado para descrever a formação de vasos sanguíneos a partir de pré-existentes e o crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa[45].

O processo da angiogênese tem início com a dilatação dos vasos pré-existentes, acompanhada pelo aumento na permeabilidade e degradação da matriz circundante, o que permite a proliferação e migração das células endoteliais[50]. As vênulas pré-existentes podem sofrer esse processo através dos seguintes mecanismos (Figura 4): brotamento, em que ocorre degradação

proteolítica da matriz celular seguida pela atração quimiotática e proliferação de células endoteliais circulantes e, por fim, as células epiteliais se reorganizam e terminam sua maturação funcional; intussuscepção, em que um capilar se divide longitudinalmente em dois pela formação de um septo, sendo este possível através do contato de células endoteliais localizadas de lados opostos do vaso ou por colunas de células periendoteliais[47,49,51].

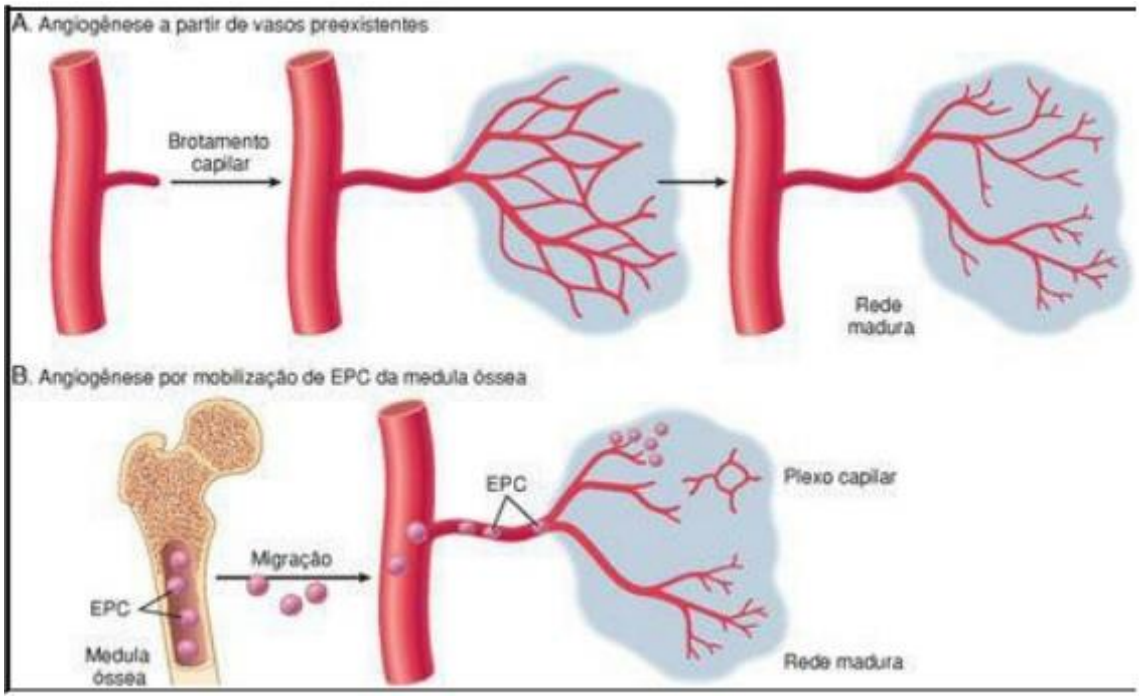
Figura 4 - Esquema dos mecanismos de angiogênese por brotamento e intussuscepção.



Fonte - Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapia[47].

Em indivíduos adultos, novos vasos surgem principalmente por meio da angiogênese, ocorrendo a neovascularização (Figura 5) também através do recrutamento de células semelhantes aos angioblastos, denominadas células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea. Estas migram para o local de lesão (ou crescimento tumoral), diferenciando-se e formando uma rede madura pela ligação a vasos existentes[52,53]. Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos vários tecidos e, assim, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido[51].

Figura 5 - Angiogênese proveniente de vasos preexistentes (A) e por meio da mobilização de EPCs da medula óssea (B).



Fonte - Bases Patológicas das Doenças[53]

As células endoteliais costumam ser o foco da atenção nos processos de neovascularização, no entanto as mesmas não são capazes de finalizá-los sozinhas, sendo dependentes das células periendoteliais para o amadurecimento vascular. Tais células são responsáveis por estabilizar o vaso nascente pela inibição da migração e proliferação endotelial, além de estimular a produção de matriz extracelular. Dessa forma, controlam a homeostase e protegem o novo vaso de rupturas e regressão[51,54].

A formação de novos vasos é essencial para o desenvolvimento de tecidos, homeostasia, cicatrização e reparo, além de processos inflamatórios[49]. Quando o organismo está sob condições fisiológicas controladas, a angiogênese é um processo normal e importante, havendo regressão dos vasos neoformados para evitar um aporte excessivo de oxigênio. Dessa forma, esse processo atua como uma balança, equilibrando os fatores pró-angiogênicos e angiostáticos a fim de aumentar ou diminuir a proliferação vascular[55,56].

No entanto, doenças como o câncer podem descarrilar esse processo, uma vez que a progressão tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese. Inicialmente, as neoplasias existem *in situ* e não induzem o

processo angiogênico, sendo a transição de uma hiperplasia pré-vascular para um tumor vascularizado conhecida como gatilho angiogênico, ou *angiogenic switch*. Esse evento é resultado da secreção de fatores promotores de angiogênese por células do microambiente tumoral, sendo estimulado pelo estresse metabólico, estresse mecânico, respostas inflamatórias e mutações genéticas[51,57].

Os fatores pró-angiogênicos e angiostáticos que controlam o processo consistem em moléculas responsáveis por representar um complexo de eventos, sendo estes regulados por fatores micro e macro-ambientais[51]. O fator pró-angiogênico mais essencial é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo este diretamente implicado na progressão tumoral[50].

3.3.1 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Primeiramente, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi denominado fator de permeabilidade vascular (VPF). Após um tempo, identificou-se um fator de crescimento para células endoteliais, sendo este chamado de VEGF. A estrutura genética do VPF e do VEGF foi posteriormente constatada como idêntica[50].

O VEGF consiste em uma glicoproteína com ligante heparina, sendo a família composta pelos seguintes membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, além do fator de crescimento placentário PLGF[53,58,59]. Possui 4 isoformas diferentes, sendo cada uma codificada por uma porção diferente do gene VEGF. Essas isoformas se diferem na capacidade de ligação à heparina e à matriz celular[60].

O fator de crescimento endotelial vascular é crucial no processo de regulação da proliferação vascular, podendo aumentar a vascularização tecidual através da indução da migração e proliferação das células endoteliais ou pelo aumento da sobrevivência de tais células, por meio da super-regulação do receptor VEGFR-2 e de uma proteína antiapoptótica (Bcl-2). Sendo assim, as principais funções do mesmo consistem em promover a sobrevivência, induzir a proliferação e melhorar a migração e invasão de células endoteliais, contribuindo para a angiogênese. A expressão do VEGF é dependente da oxigenação tecidual[50,55].

O VEGF é produzido por células, como as plaquetas e neutrófilos (ou leucócitos polimorfonucleares), sendo tal produção essencial para o desenvolvimento embrionário e progressão de condições fisiológicas e patológicas, como o reparo e cicatrização tecidual, neovascularização ocular, além da progressão de tumores sólidos e doenças cardiovasculares[59,61,62]. Para que ele possa exercer seus efeitos biológicos, o mesmo deve interagir com receptores presentes na superfície celular, ligando-se a 3 tipos de receptores tirosinoquinases: VEGFR-1 e VEGFR-2, expressos nas células endoteliais vasculares; VEGFR-3, expresso no endotélio linfático. Além destes, há ainda o receptor neuropilina que atua como um correceptor, melhorando a interação entre VEGF e VEGFR-2 e formando complexos com o VEGFR-1[50,63].

O VEGF e seu receptor VEGFR-2 afetam a angiogênese embrionária, neonatal e patológica, sendo alvos terapêuticos. O VEGFR-3 está envolvido na angiogênese embrionária e é expresso na angiogênese patológica, uma vez que o VEGF-C (um ligante do VEGFR-3) é angiogênico na patologia de adultos. Já o envolvimento da sinalização do VEGFR-1 na angiogênese patológica permanece indeterminado[51].

Pode-se dizer que o VEGF-A é uma molécula chave na indução de angiogênese, uma vez que estimula a proliferação, brotamento, migração e formação tubular das células endoteliais. O VEGF-A também é responsável pela mediação do extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas, melhorando a migração de células endoteliais na matriz extracelular. Com relação ao VEGF-B, o mesmo pode estar envolvido na formação coronariana colateral, além de participar na angiogênese inflamatória. O VEGF-C, por sua vez, é considerado primariamente linfangiogênico. É capaz de induzir aumento da permeabilidade vascular e está envolvido em progressões tumorais e processos inflamatórios relacionados à linfangiogênese. No caso do VEGF-D, o mesmo possui potencial angiogênico e linfangiogênico, induzindo o crescimento de vasos linfáticos em adultos em resposta à eventos patológicos[50].

3.4 Laser de Baixa Potência (LBP)

A palavra Laser é um acrônimo para Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação (*Light amplification by stimulated emission of radiation).*

A radiação laser possui características únicas, como a coerência, a colimação e a monocromaticidade, ou seja, suas ondas propagam-se coerentemente no espaço e no tempo, possuem comprimento de onda específico e carregam de forma colimada e direcional a energia. Tais características foram descritas inicialmente por Theodore Maiman em 1960[64,65]. Através destas, o uso do laser tornou-se rotineiro nas aplicações biológicas e médicas.

O LBP com fins terapêuticos foi introduzido inicialmente por Endre Mester e colaboradores, no final da década de 60, quando adaptaram um laser de rubi com a densidade de energia de 1 $J.cm^{-2}$ e verificaram crescimento acelerado de pelos em camundongos com regiões previamente depiladas[66].

A terapia com laser de baixa potência refere-se à exposição de células ou tecidos ao uso do laser de emissão vermelha ou no infravermelho próximo com comprimentos de onda compreendidos entre 600 e 1.100 nm. O comprimento de onda está intimamente relacionado com a profundidade de penetração da luz no tecido, que depende de dois fatores principais: a absorção e espalhamento. Neste intervalo de comprimentos de onda, a absorção é baixa e o espalhamento predomina, e a luz pode atingir até 10 mm na pele. Por outro lado, as densidades de potência são baixas, da ordem de até 1 $W.cm^{-2}$, para que não ocorra o aquecimento no tecido[67,68]. Assim, a luz, ao ser absorvida, desencadeia uma série de reações fotoquímicas e/ou fotofísicas, responsáveis pelo efeito biológico.

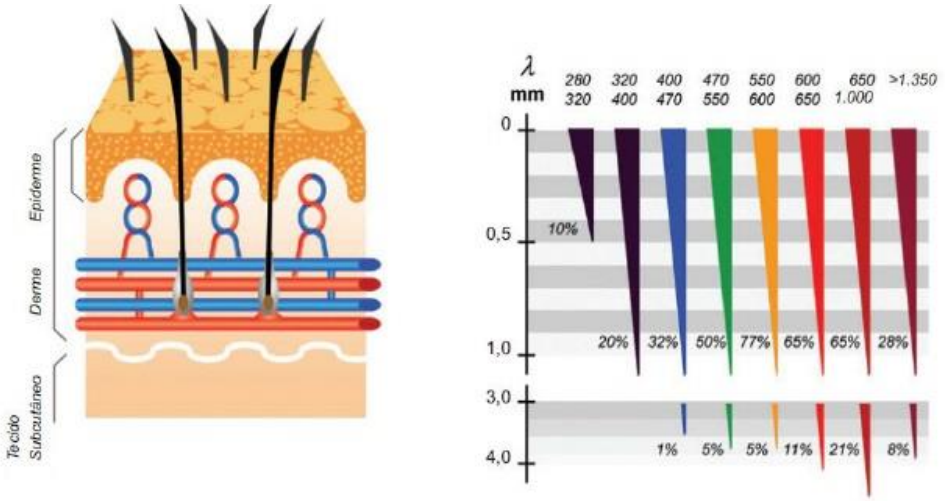
Nos últimos 30 anos, o LBP tem sido utilizado no processo de cicatrização de feridas, e no ramo da medicina regenerativa e odontologia, em que é aplicado a fim de melhorar o processo de cura[67]. O objetivo da terapia laser é promover melhor resolução de processos inflamatórios, redução da dor, evitar a ocorrência de edema, além de preservar tecidos e nervos próximos ao local da injúria[69].

Acredita-se que o LBP tenha uma vasta variedade de efeitos em nível celular, molecular e tecidual, variando sua ação dentre as diferentes aplicações. O mesmo é capaz de induzir uma reação fotoquímica na célula, um processo chamado de bioestimulação, em que o fóton de luz é absorvido pelo cromóforo conhecido como citocromo c oxidase, localizado na mitocôndria, aumentando a produção de adenosina trifosfato (ATP), a modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a indução de fatores de transcrição[68,69,70,71]. Tais fatores são

responsáveis pela síntese proteica que desencadeia efeitos como aumento da proliferação e migração celular, modulação dos níveis de citocina, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, além do aumento da oxigenação tecidual[68].

Cada tipo de laser resulta em um comprimento de onda específico e cada um deste, por sua vez, reage de maneira diferente com os diversos tecidos. A profundidade de penetração (Figura 6) da energia do laser em tecidos depende de dois fatores: absorção e espalhamento[65].

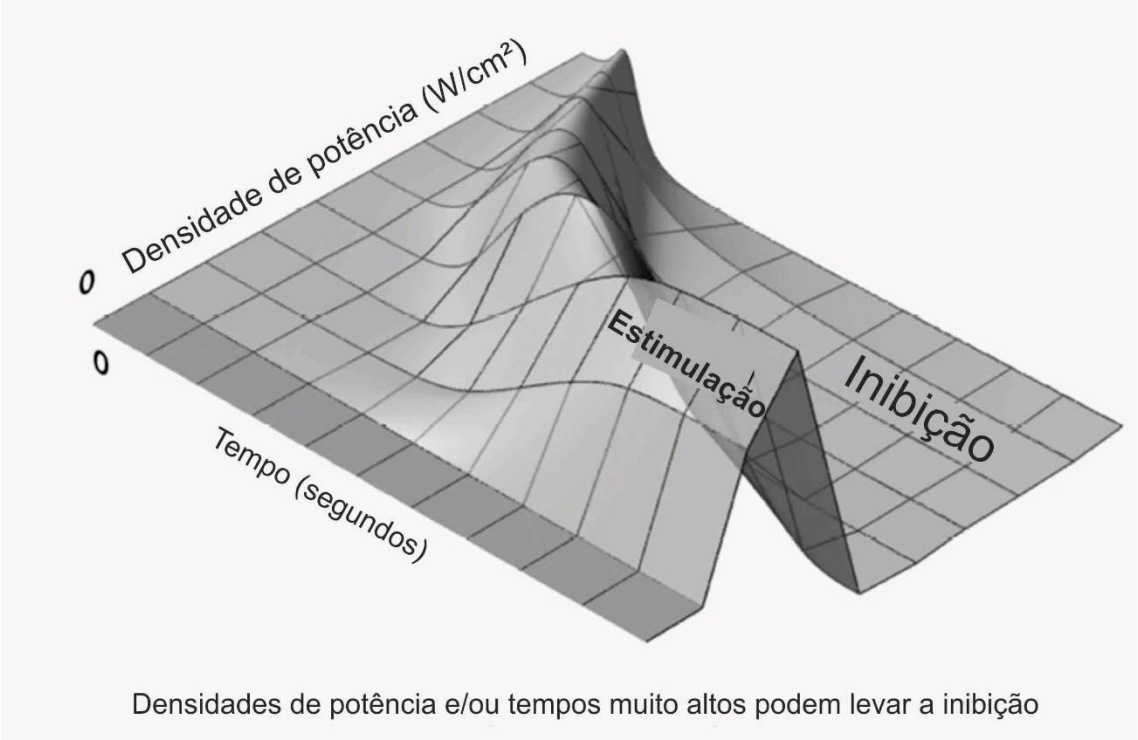
Figura 6 – Profundidade de penetração de diferentes comprimentos de onda na pele humana.



Fonte – Laser de Baixa Potência – Princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia[72]

A biomodulação *in vitro*, por sua vez, é influenciada por diversos fatores, como o tipo celular e os parâmetros de irradiação do laser. Dentre estes estão inclusos o comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia, e tempo de exposição[67,68]. A dosimetria na terapia com laser de baixa potência é altamente complexa, visto que não há um consenso com relação aos parâmetros citados, existindo evidências que sugerem que a efetividade do tratamento varia de acordo com a irradiância e dose utilizadas. Há limiares superiores e inferiores para estes parâmetros, dentre os quais a terapia laser é efetiva e fora de tais limiares, a luz pode exercer nenhum efeito ou mesmo causar efeitos prejudiciais[68,69]. A Figura 7 representa o modelo 3D de *Arndt Schulz* para ilustrar essa situação.

Figura 7 – Modelo tridimensional da curva de *Arndt Schulz* demonstrando como irradiância ou tempo de iluminação (dose) podem ter efeitos bifásicos em resposta à dose da terapia laser.



Fonte – Adaptado de *Biphasic dose response in low level light therapy*[69].

3.4.1 LBP em células tumorais

De acordo com a literatura, para o LBP exercer algum efeito é necessário que a cultura celular esteja em déficit estresse. No entanto, os efeitos da terapia laser em linhagens celulares tumorais permanecem controversos[13], havendo estudos que indicam efeitos estimulatórios, inibitórios ou, até mesmo, nenhuma influência em tais células.

As células neoplásicas possuem uma intensa atividade metabólica, tornando-as nutricionalmente deficientes e levando a uma maior atividade proliferativa das células malignas, resultando clinicamente no aumento da progressão tumoral. Sendo assim, tais células são suscetíveis à ação do LBP[73]. De acordo com os parâmetros de luz adotados e a taxa de proliferação celular no momento da irradiação, a proliferação de células neoplásicas (e normais) pode ser estimulada[74].

Com o objetivo de comparar o efeito de diferentes densidades de energia, Powell e colaboradores[75] utilizaram 3 comprimentos de onda distintos (780, 830 ou 904 nm), 3 linhagens celulares (câncer de mama, melanoma e células

epiteliais) e 7 diferentes densidades de energia, constatando que de acordo com o número de irradiações e dose, a proliferação celular poderia aumentar (especialmente para linhagem de câncer de mama) assim como não sofrer influência ou apresentar uma resposta negativa.

Murayama et al.[76] tinham como objetivo desenvolver uma terapia laser para glioblastoma maligno, uma vez que os efeitos da mesma em células cancerígenas não são bem elucidados. Para isso, a linhagem celular humana A-172 foi irradiada com um laser de emissão infravermelha (λ = 808 nm), utilizando-se 3 densidades de energia diferentes, sendo os efeitos na proliferação e viabilidade celular analisados. Os experimentos conduzidos demonstraram uma redução na viabilidade celular e uma proliferação suprimida.

Outro estudo avaliou o efeito do laser na proliferação, distribuição do ciclo celular e apoptose de 3 linhagens celulares diferentes (carcinoma oral, células epiteliais não malignas e fibroblastos). As células foram expostas a um laser de emissão vermelha (λ = 660 nm) por 3 dias consecutivos e 24 horas após a última exposição os testes foram realizados. Com relação à proliferação celular, os fibroblastos apresentaram um aumento enquanto as células de carcinoma oral e epiteliais mostraram uma diminuição[77].

Por outro lado, Kara et al.[78] avaliaram os efeitos da terapia laser afim de analisar se a mesma poderia ativar células pré-cancerígenas ou aumentar o tecido tumoral existente em situações não detectáveis. Para isso, foram utilizadas células das linhagens Saos-2 e A549, sendo as mesmas irradiadas com um laser de emissão infravermelha (λ = 1064 nm), expostas a 4 diferentes potências e podendo sofrer uma, duas ou três exposições ao laser. Os resultados mostraram uma menor proliferação nas células irradiadas com a maior potência, no entanto observou-se uma maior taxa de proliferação de acordo com o número de aplicações do laser, quando comparado ao controle.

O trabalho de Bamps e colaboradores[79] utilizou 3 linhagens celulares distintas de câncer de cabeça e pescoço e células epiteliais humanas, sendo tais células expostas a um laser cujo comprimento de onda corresponde ao 830 nm e a duas densidades de energia diferentes (1 e 2 J/cm^2). Após a irradiação, analisou-se a proliferação celular constatando-se um aumento da mesma nas linhagens de câncer de cabeça e pescoço quando irradiadas com a menor

densidade de energia. Já para as células epiteliais, não foram observados efeitos na proliferação celular em nenhuma das densidades de energia utilizadas.

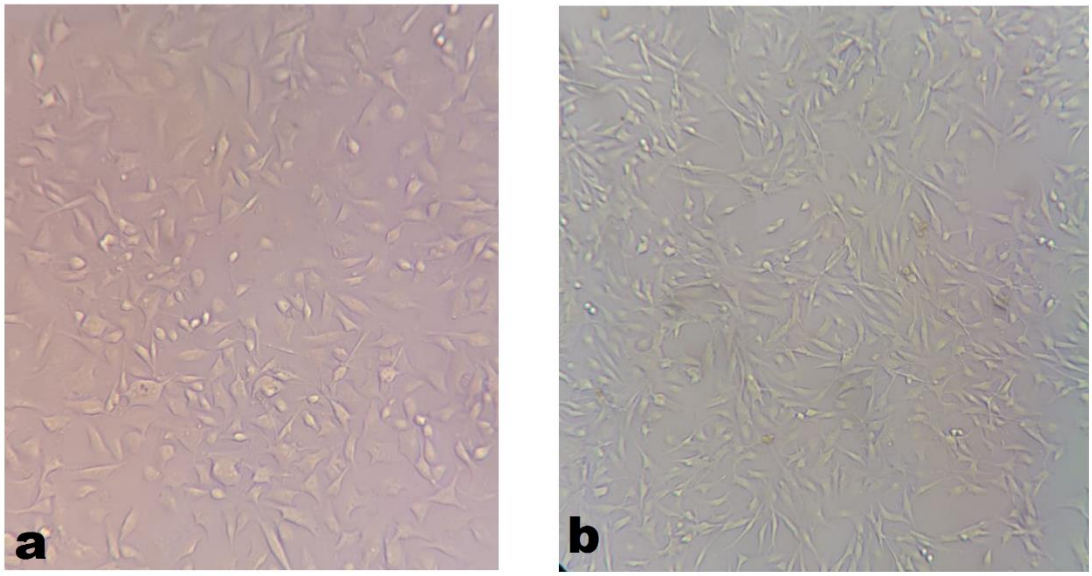
4 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN-CNEN/SP, que possui a infraestrutura necessária para realização dos experimentos. Nesta seção serão descritas as técnicas usadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

4.1 Cultivo celular

As linhagens celulares de melanoma murino B16F10 e humano SKMEL 37 (Figura 8) utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Durvanei Augusto Maria do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan (IB) e pelo Dr. Emerson Bernardes Soares do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), respectivamente.

Figura 8 - Fotomicrografia da cultura de células da linhagem de melanoma humano SKMEL 37 (a) e melanoma murino B16F10 (b).

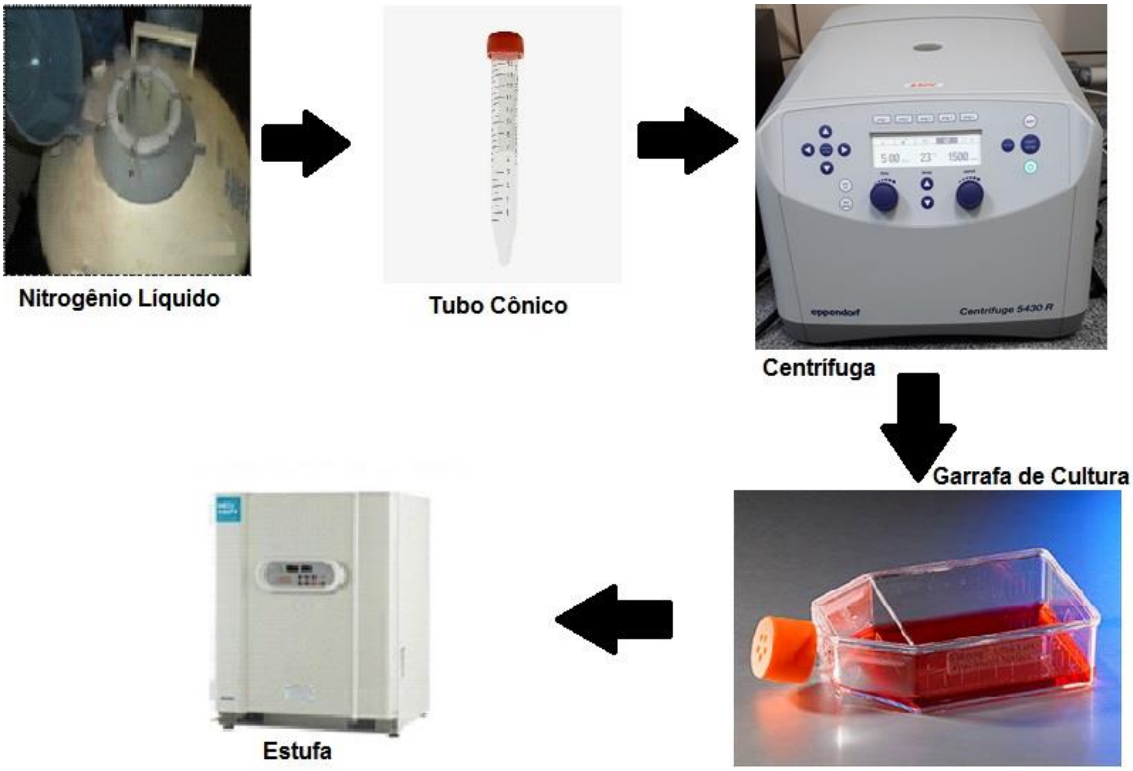


Fonte - Autor da dissertação

As amostras foram estocadas e congeladas em nitrogênio líquido. Dois tubos criogênicos contendo as amostras foram descongelados em temperatura ambiente e, em seguida, seus conteúdos foram transferidos para dois tubos

cônicos contendo 5 ml de meio de cultura fresco cada, a fim de remover a substância crioprotetora (di-metil-sulfóxido) – DMSO e, então, os mesmos foram centrifugados a 300 *g* por 5 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram desprezados e as células precipitadas foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) ou 5% (Vitrocell, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, EUA). As células foram semeadas em frasco de cultura (75 cm^2) com 10 ml de meio de cultura e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 até atingirem confluência (Figura 9).

Figura 9 – Esquema sequencial do processo de cultivo celular.



Fonte: Autor da dissertação

Para o subcultivo celular, o meio foi removido dos frascos e as células aderidas em monocamada foram lavadas com solução tampão fosfato-salina (PBS) sem cálcio e magnésio (pH=7,2). Em seguida, foram adicionados 4 ml de solução de tripsina EDTA 0,25% por 5 minutos a 37°C, em cada frasco, para que as células fossem desprendias. A fim de neutralizar a tripsina, adicionou-se 6 ml de meio de cultura contendo SFB, sendo as células em suspensão transferidas para um tubo cônico e, então, centrifugadas a 300 *g* por 5 minutos em

temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspenso em 1 ml de meio de cultura fresco. Para que as linhagens celulares perpetuassem, frações dessa suspensão celular foram subcultivadas em novos frascos de cultura (75 cm^2), garantindo a manutenção da cultura. O meio de cultura dos frascos celulares foi trocado a cada 2 dias, preservando a viabilidade das células. Alíquotas das culturas trabalhadas foram congeladas em nitrogênio líquido para manter estoque da linhagem.

4.2 Concentração celular

O número de células utilizadas nos experimentos foi obtido através do método de exclusão de células coradas por azul de trypan, uma vez que este é capaz de penetrar apenas em células não viáveis visto que estas possuem poros na membrana, apresentando permeabilidade e, consequentemente, permitindo a penetração do corante na célula[80]. A contagem das células viáveis foi feita por meio do hemocitômetro (Câmara de Neubauer).

No momento em que as células contidas no frasco atingiram a confluência, o mesmo foi lavado com PBS sem cálcio e sem magnésio e, então, os mesmos procedimentos adotados para o subcultivo celular foram empregados. Após a ressuspensão do pellet em 1 ml de meio de cultura fresco foram adicionados 80 µL de PBS, 10 µL de azul de trypan e 10 µL da suspensão celular em um tubo tipo *eppendorf*, sendo a solução bem homogeneizada. Em seguida, uma das câmaras do hemocitômetro recebeu 10 µL da solução homogeneizada e as células não coradas foram contadas em microscópio invertido.

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

$$N = \frac{Número\ total\ de\ células\ contadas \times Diluição \times 10^4}{Número\ de\ quadrantes\ contados} \quad (1)$$

4.3 Curva de crescimento

As linhagens celulares utilizadas foram semeadas em uma densidade de $5x10^3$ células por poço, em triplicata, sendo as placas incubadas a 37ºC e 5%

CO_2. A contagem das células viáveis foi acompanhada por 7 dias consecutivos por meio do método de exclusão de células coradas por azul de trypan utilizando-se o hemocitômetro.

A cada 24 horas, o meio de cultivo do respectivo dia foi aspirado e 200 µL de tripsina foi adicionado em cada poço, sendo as placas mantidas em incubadora a 37ºC e 5% CO_2 por 5 minutos. Após esse período, o líquido foi retirado e armazenado em tubos do tipo *eppendorf*, adicionando-se 200 µL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB afim de inativar a ação da tripsina. Os tubos então foram centrifugados a 300 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 200 µL de meio de cultura contendo 10% de SFB. Em um tubo tipo *eppendorf* foram adicionados 80 µL de PBS, 10 µL de azul de trypan e 10 µL da suspensão celular, sendo a solução bem homogeneizada. Uma das câmaras do hemocitômetro recebeu 10 µL da solução homogeneizada e as células não coradas foram contadas em microscópio invertido.

O tempo de duplicação (Td) de cada linhagem celular foi calculado de acordo com a fórmula de Patterson[81], como demonstrado pela equação 2:

$$Td = \mathrm{T\,x}\ {}^{\log 2}\Big/_{\log\left(\frac{N2}{N1}\right)} \qquad (2)$$

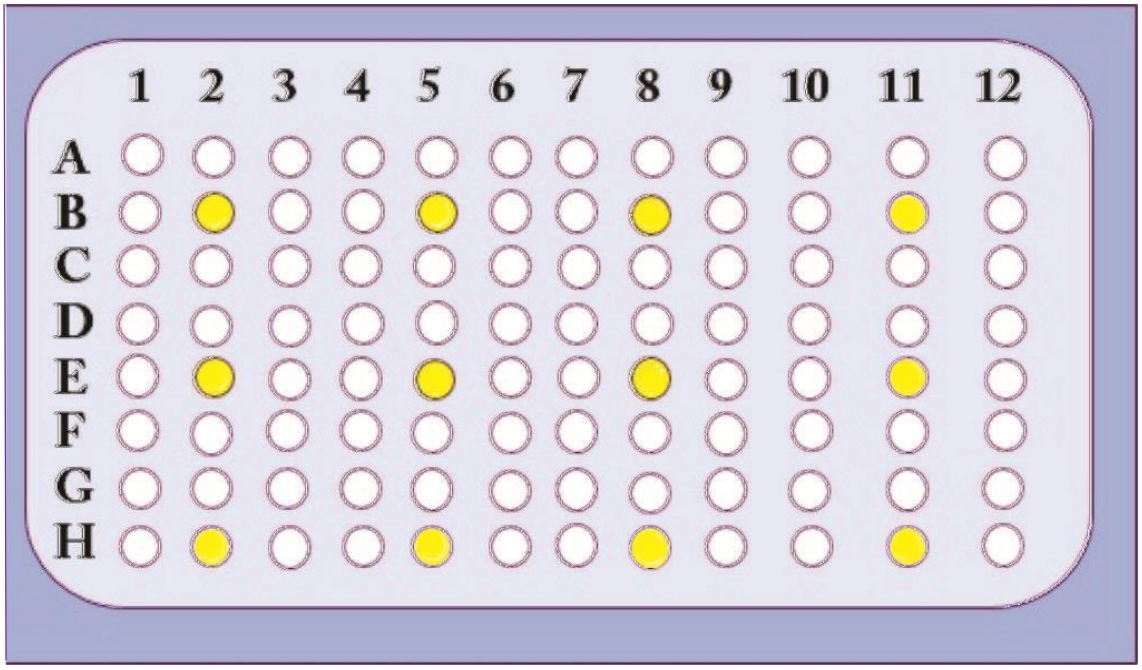
N1 representa o número de células no primeiro dia da fase exponencial, N2 representa o número de células após T horas do plaqueamento (fim da fase exponencial), e T representa o tempo decorrido de N1 para N2.

4.4 Equipamento laser

Nesse estudo utilizou-se o equipamento laser *Twin Flex Evolution* (MMOptics Ltda, São Carlos, SP, Brasil) classificado como laser classe 3B, emitindo no comprimento de onda correspondente ao infravermelho (λ = 780 nm), com uma potência de saída de 40 mW, área do feixe laser de 0,04 cm^2 e irradiância de 1 $W.cm^{-2}$. Os grupos experimentais foram submetidos a uma única

irradiação de forma pontual em triplicata (Figura 10), sendo analisadas 3 diferentes energias de acordo com o tempo de exposição. Os parâmetros do laser são demonstrados no Quadro 1, sendo as densidades de energia utilizadas previamente adotadas em trabalhos anteriores[82] e representando energias mais altas, intermediárias e mais baixas.

Figura 10 - Distribuição dos poços experimentais (amarelos) em uma representação de placa Elisa de 96 poços.



Fonte – Autor da dissertação

Quadro 1 - Parâmetros utilizados durante as irradiações com laser.

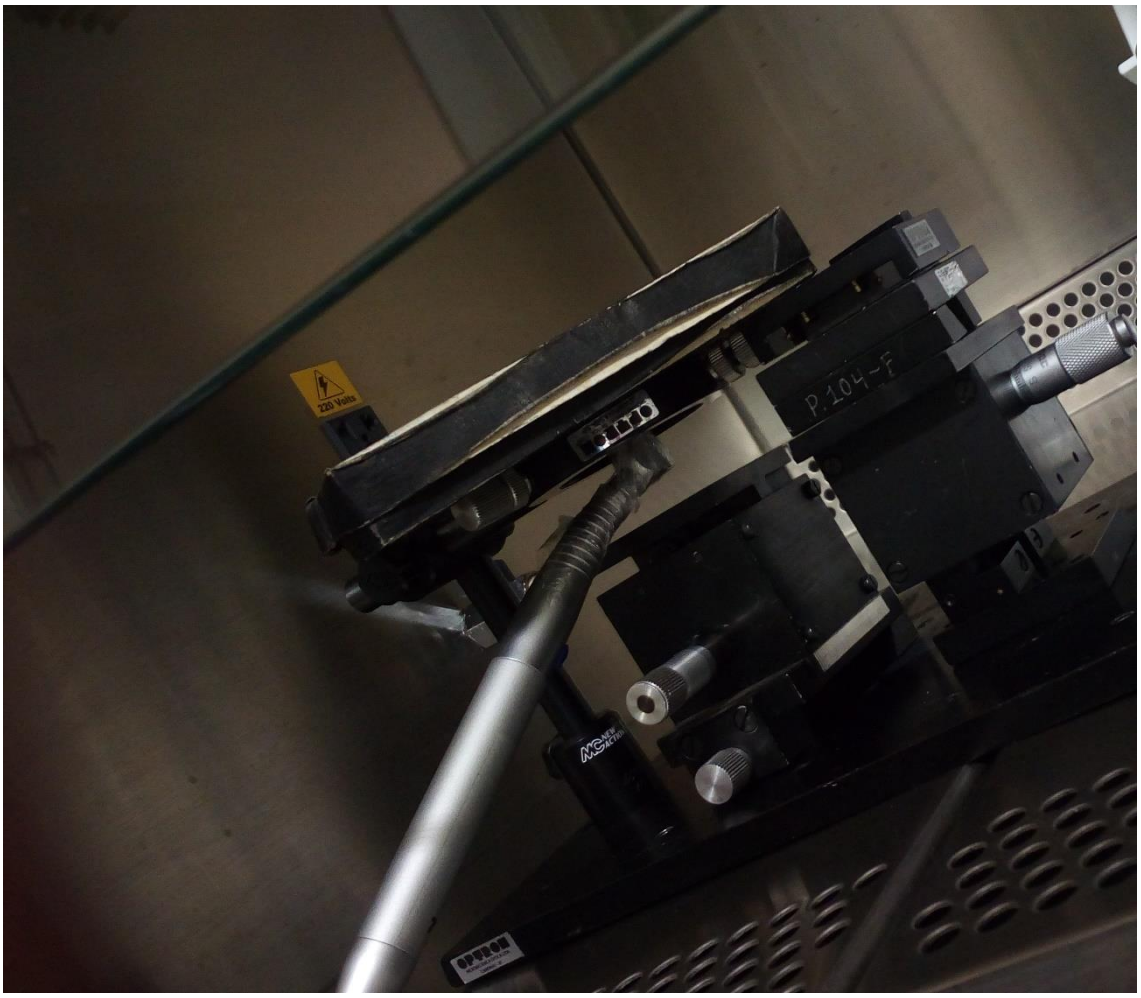
	Tempo de Exposição (s)	Energia (J)	Densidade de Energia ($J.cm^{-2}$)
G0	0	0	0
G30	30	1,2	30
G90	90	3,6	90
G150	150	6	150

Fonte – Autor da dissertação

Os experimentos foram realizados de maneira padronizada, sendo a distância entre o feixe laser e a monocamada celular mantida constante, visto que tal distância pode interferir no valor da energia entregue. Nesse estudo

utilizou-se a técnica pontual, em que a ponteira do equipamento laser permanece em contato direto com a base de cada poço experimental (Figura 11), não sendo necessária a abertura da placa durante todo o processo de irradiação realizado dentro do fluxo laminar e, dessa forma, o risco de contaminação foi atenuado.

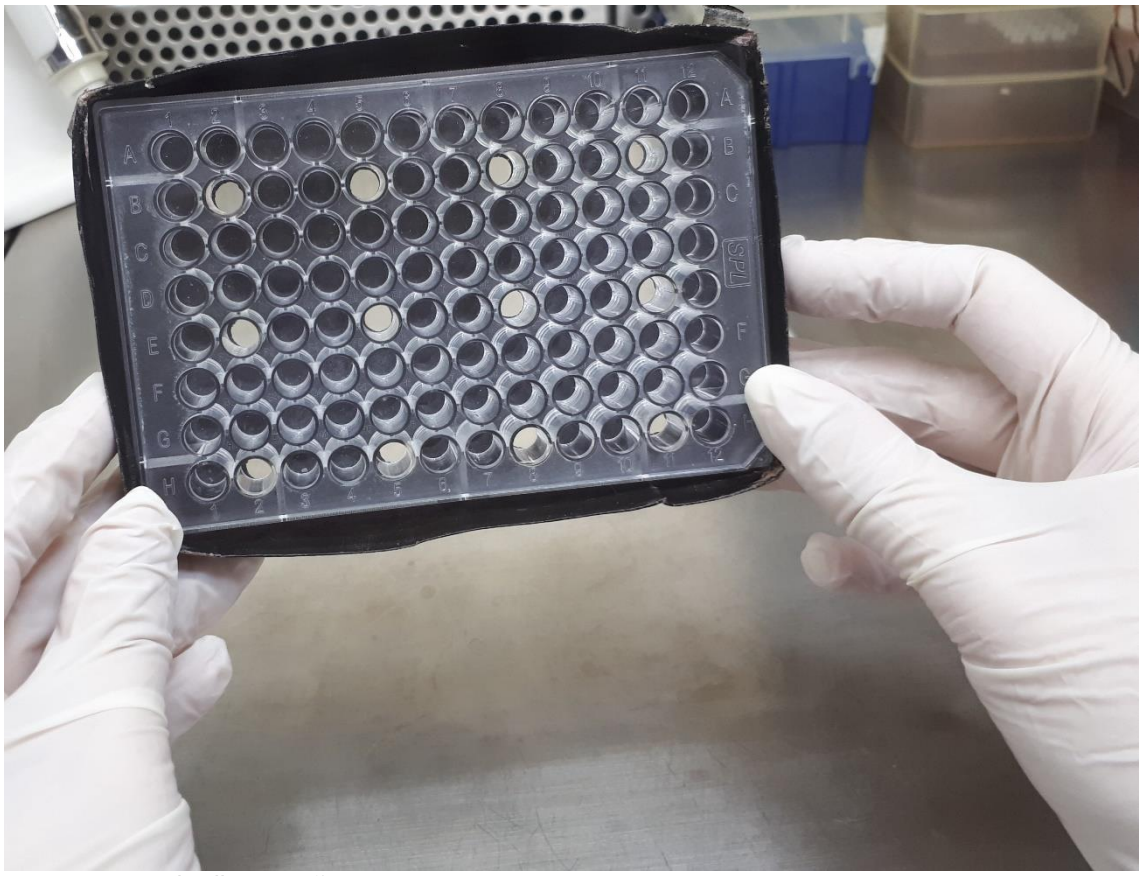
Figura 11 – Método utilizado para fixar a ponteira laser em contato constante com a base do poço experimental durante o tempo de irradiação.



Fonte - Autor da dissertação

Para a irradiação, as placas foram cobertas por uma máscara escura (Figura 12), elaborada por papel cartolina preto fosco, com abertura apenas onde se encontravam os poços experimentais, fazendo com que somente estes recebessem a luz do equipamento laser e impedindo que a luz ambiente interagisse com a amostra e modificasse o protocolo de irradiação.

Figura 12 – Máscara escura utilizada durante o processo de irradiação.



Fonte - Autor da dissertação

4.5 Testes de viabilidade celular

4.5.1 Atividade Mitocondrial

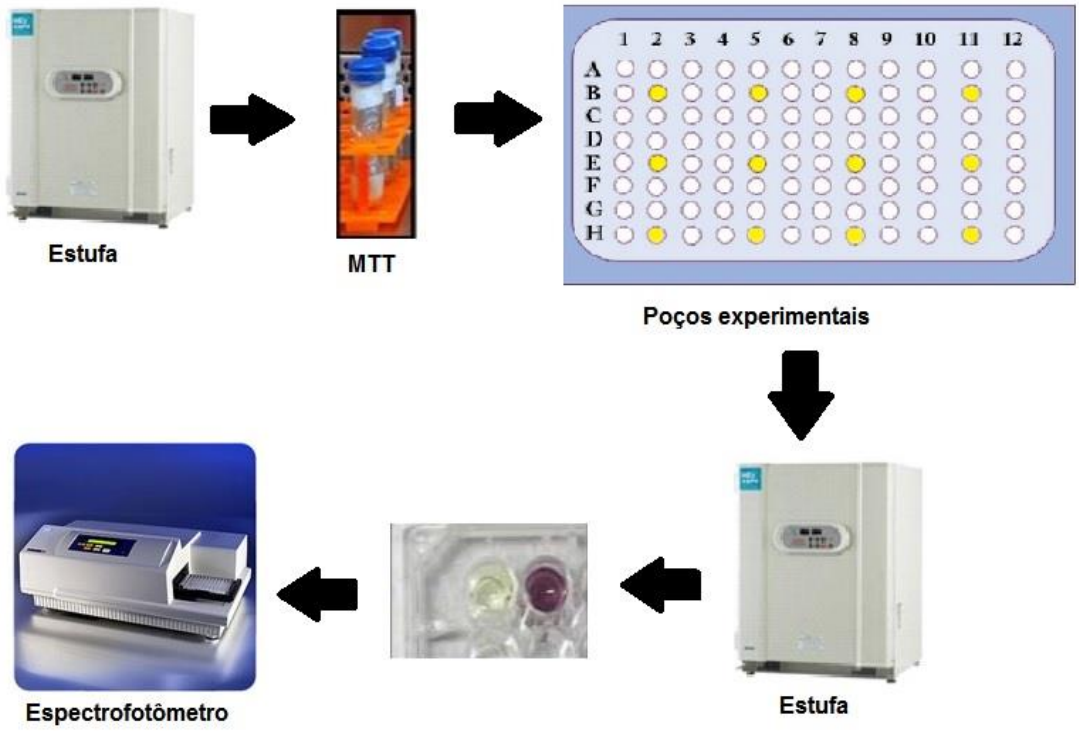
O ensaio MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um método mundialmente conhecido por avaliar a atividade mitocondrial, sendo baseado na conversão do tetrazólio solúvel (um sal amarelo) em cristais de formazan (insolúveis e roxos) por enzimas presentes em células viáveis[83].

Para a realização deste ensaio, as linhagens celulares de melanoma humano e murino foram cultivadas sob condições nutricionais ideais e déficit nutricional. Uma densidade de $5x10^3$ células por poço foi plaqueada em triplicata para cada grupo experimental, sendo as placas irradiadas 24 horas após o plaqueamento. Após a irradiação, as placas foram incubadas novamente a uma temperatura de 37ºC e em atmosfera de CO_2 a 5%. Decorridas 24 horas da exposição ao laser, as placas contendo os grupos experimentais tiveram seu meio de cultura aspirado. Para a análise da atividade mitocondrial foram

adicionados 180 µL de PBS e 20 µL de MTT (5 mg.ml^{-1} de PBS) em cada poço experimental e, então, as placas foram incubadas em estufa a 37ºC e atmosfera de CO_2 a 5% por 3 horas e meia.

Após o período decorrido, aspirou-se cuidadosamente a solução (PBS + MTT) contida em cada poço experimental a fim de não remover os cristais de formazan formados, adicionando-se 100 µL de DMSO em cada poço para a solubilização dos mesmos. As placas foram colocadas novamente em estufa de CO_2, onde permaneceram por 30 minutos. Após esse período, as placas foram levadas ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 570 nm (Figura 13).

Figura 13 – Processo sequencial do ensaio de MTT.



Fonte: Autor da dissertação

A porcentagem de atividade mitocondrial foi calculada por meio da equação 3:

$$AM(\%) = {}^{ODi}/_{ODc}\ x\ 100 \qquad (3)$$

AM(%) representa a porcentagem de atividade mitocondrial, ODi é a densidade óptica da suspensão irradiada e ODc consiste na média das densidades ópticas obtidas através do controle 0 h.

4.5.2 Vermelho neutro

O ensaio de captação de vermelho neutro é um dos testes de viabilidade mais utilizados, fornecendo uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em uma cultura. Esse teste se baseia na capacidade de células viáveis incorporarem o corante vermelho neutro nos lisossomos[84].

Para a realização deste ensaio, as linhagens celulares de melanoma humano e murino foram cultivadas sob condições nutricionais ideais e déficit nutricional. Uma densidade de $5x10^3$ células por poço foi plaqueada em triplicata para cada grupo experimental, sendo as placas irradiadas 24 horas após o plaqueamento. Após a irradiação, as placas foram incubadas novamente a uma temperatura de 37ºC e em atmosfera de CO_2 a 5%.

Uma solução estoque de vermelho neutro dissolvido em PBS foi preparada a uma concentração de 4 $mg.ml^{-1}$. Uma alíquota dessa solução foi diluída (1:100) em meio RPMI sem SFB no dia anterior ao experimento, formando uma solução contendo 40 $\mu g.ml^{-1}$. Tal solução foi centrifugada a 600 *g* por 10 minutos ao início do experimento, a fim de remover possíveis cristais de corante.

Decorridas 24 horas da exposição à luz laser, as placas contendo os grupos experimentais tiveram seu meio de cultura aspirado. Os poços experimentais foram lavados com PBS e, então, 100 µL de uma solução contendo vermelho neutro e meio RPMI sem SFB foi adicionada em cada poço experimental. As placas permaneceram incubadas em estufa a 37ºC e atmosfera de CO_2 a 5% por 2 horas. Após esse período, a solução foi removida dos poços e os mesmos foram novamente lavados com PBS. Por fim, adicionou-se 150 µL da solução de descoloração do vermelho neutro (50% etanol, 49% água destilada e 1% ácido acético).

As placas foram mantidas em agitação por 10 minutos e, então, levadas ao espectrofotômetro para a leitura em 540 nm. O número de células viáveis, em porcentagem, foi obtido através da equação 4:

$$CV(\%) = {}^{ODi}/_{ODc}\ x\ 100 \qquad (4)$$

CV (%) representa a porcentagem de células viáveis, ODi é a densidade óptica da suspensão irradiada e ODc consiste na média das densidades ópticas obtidas através do controle 0 h.

4.6 Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF-A

Nesse trabalho, a dosagem de VEGF foi realizada através do teste ELISA sanduíche. As células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de SFB e uma densidade de $5x10^3$ células por poço foi plaqueada em triplicata para cada grupo, sendo as placas irradiadas como descrito anteriormente.

As amostras, isto é, os sobrenadantes produzidos pelas linhagens celulares B16F10 e SKMEL 37, foram removidas dos poços experimentais 24 horas após a irradiação laser, sendo acondicionadas em tubos do tipo *eppendorf* identificados de acordo com a densidade de energia e a linhagem celular. Os tubos, então, foram armazenados em freezer -26ºC e posteriormente os sobrenadantes foram utilizados para quantificar a expressão de VEGF-A através do ensaio imunoenzimático ELISA.

A diluição dos reagentes presentes no kit (Sigma, EUA) foi realizada seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e 100 µL de cada uma, assim como das soluções padrão, foram adicionados em uma placa de 96 poços revestida com anticorpos (anti VEGF-A humano ou murino), sendo incubadas *overnight* a 4ºC sob leve agitação.

Após tal procedimento, as soluções foram descartadas e a placa lavada 4 vezes com o tampão de lavagem presente no kit, sendo secada em papel toalha. Foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção em cada poço experimental, sendo a placa incubada em temperatura ambiente sob leve agitação. O procedimento de lavagem foi repetido e 100 µL de estreptavidina foi adicionado em cada poço, sendo a placa incubada novamente por 45 minutos nas mesmas condições anteriores. A solução foi descartada, repetiu-se o processo de lavagem e adicionou-se o último reagente. A placa, então, foi incubada em temperatura ambiente sob leve agitação e protegida da luz por mais

30 minutos. Após esse período, adicionou-se a solução de parada e a placa foi submetida à leitura em espectrofotômetro em 450 nm.

4.7 Ensaio de invasão *transwell*

O ensaio de invasão *transwell* é muito importante para a patologia investigativa, uma vez que possibilita o estudo do comportamento de invasão de diferentes tipos celulares. Essa técnica é composta por câmaras bipartites para cultura de células, sendo dispositivos de fácil manipulação, baixo custo e significativa acurácia, pois simula *in vitro* a membrana basal[82].

Para o ensaio de invasão foram utilizados filtros com poros de 8 µm em placas de 24 poços (Corning, EUA). As células cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB foram colocadas sob estresse nutricional, isto é, meio RPMI suplementado com 5% de SFB, por 12 horas antes do plaqueamento. O matrigel (Corning, EUA) foi diluído em meio RPMI sem SFB de acordo com as instruções do próprio fabricante (1:5), sendo transferidos 100 µL do mesmo ao compartimento superior de cada inserto. Os insertos foram colocados em uma placa de 24 poços, sendo incubados a 37°C para polimerização do matrigel, por 2 horas, antes do plaqueamento celular.

As células foram tripsinizadas e uma suspensão de 500 µL, contendo $1x10^6$ células.mL^{-1}, foi colocada em tubos do tipo *eppendorf* para cada grupo adotado nesse estudo e, dessa forma, 3 tubos sofreram irradiação laser. Após esse procedimento, 100 µL da suspensão presente nos tubos foram adicionados no compartimento superior de cada inserto, em triplicata para cada grupo adotado, enquanto no compartimento inferior foram adicionados 600 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB. A placa foi incubada por 24 h a 37°C em estufa de CO_2 para que ocorresse a adesão e invasão das células.

Transcorrido o período de incubação, o conteúdo do compartimento superior foi descartado e os insertos foram lavados em PBS. Em uma placa de 24 poços foram adicionados 700 µL de paraformol 4%, por poço experimental, e os insertos foram acomodados em tais poços por 2 minutos em temperatura ambiente. Os insertos foram novamente lavados em PBS e, então, foram acomodados em uma placa de 24 poços contendo 700 µL de metanol por 20 minutos. Após o período decorrido, os insertos foram lavados em PBS e

colocados em uma placa de 24 poços contendo 700 µL de cristal violeta, por poço experimental, sendo aguardados 10 minutos para a coloração das células que foram capazes de invadir. Para finalizar, os insertos foram lavados em água destilada e, então, o excesso de cristal violeta foi removido com o auxílio de uma haste flexível, de forma a evitar que a membrana fosse deformada. Por fim, os insertos foram colocados em uma placa contendo 700 µL de PBS, sendo adicionados 200 µL de PBS no compartimento superior dos insertos também. As células foram contadas em microscópio invertido.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no programa *Graph Pad Prism 6.0* (CA, USA), utilizando-se o teste *D'Agostino & Pearson* para testar a normalidade dos dados. Após tal análise utilizou-se o teste *Anova One-Way* seguido do teste de *Tukey*. Por fim, os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p<0,05$. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média (EPM). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata no mínimo em 2 momentos distintos.

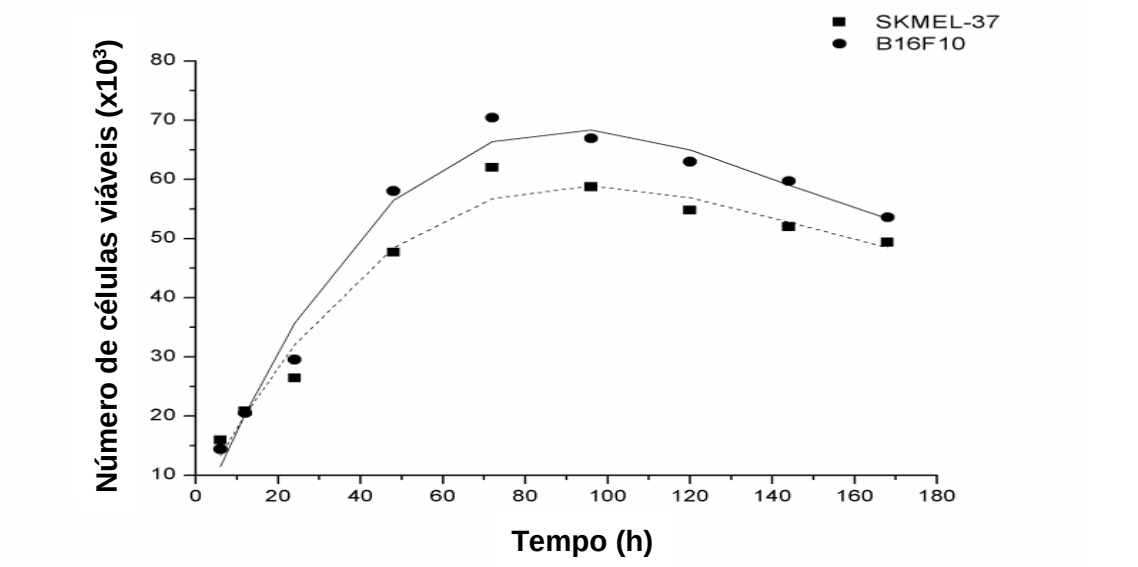
5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento

A Figura 14 representa as curvas de crescimento para as linhagens celulares de melanoma murino e humano, sendo estas um parâmetro importante para estimar o tempo necessário para a proliferação celular.

É possível notar que a linhagem celular B16F10 apresenta um crescimento celular mais rápido em comparação a linhagem celular SKMEL 37. Dessa forma, o tempo de duplicação para as células de melanoma murino e humano são, respectivamente, 24±4 h e 28,6±3 h. Ambas as linhagens apresentaram pico de crescimento exponencial 72 h após o plaqueamento.

Figura 14 – Curvas de crescimento para as células de melanoma murino e humano (n = 6).



Fonte – Autor da dissertação.

5.2 Testes de viabilidade celular

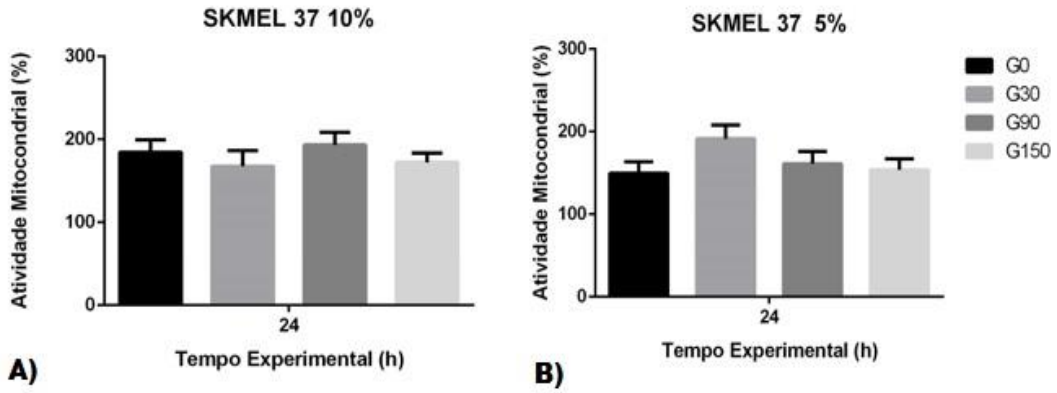
A Figura 15 apresenta a atividade metabólica, em porcentagem, das células de melanoma humano SKMEL 37 cultivadas em condições nutricionais ideais (Figura 15A) e em condições de déficit nutricional (Figura 15B).

Sob condições ideais de nutrição, após 24 h da exposição à luz os grupos G30 e G150 demonstraram um comportamento semelhante, representando uma queda de aproximadamente 9% e 7%, respectivamente, em relação ao grupo

G0. Já o grupo G90 apresentou uma atividade metabólica similar ao grupo G0. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

As células cultivadas sob condições de déficit nutricional, um dia após à irradiação, mostraram um aumento de aproximadamente 28% na atividade mitocondrial do grupo G30 quando comparado ao grupo G0. No entanto, tal aumento não foi considerado estatisticamente significante. O grupo G150 demonstrou um comportamento semelhante ao controle e o grupo G90 apresentou um aumento de 8% em relação a este.

Figura 15 - Atividade mitocondrial (%) para as células de melanoma humano pertencentes à linhagem celular SKMEL 37 cultivadas em condições nutricionais ideais (A) e déficit nutricional (B). Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 9).



Fonte – Autor da dissertação.

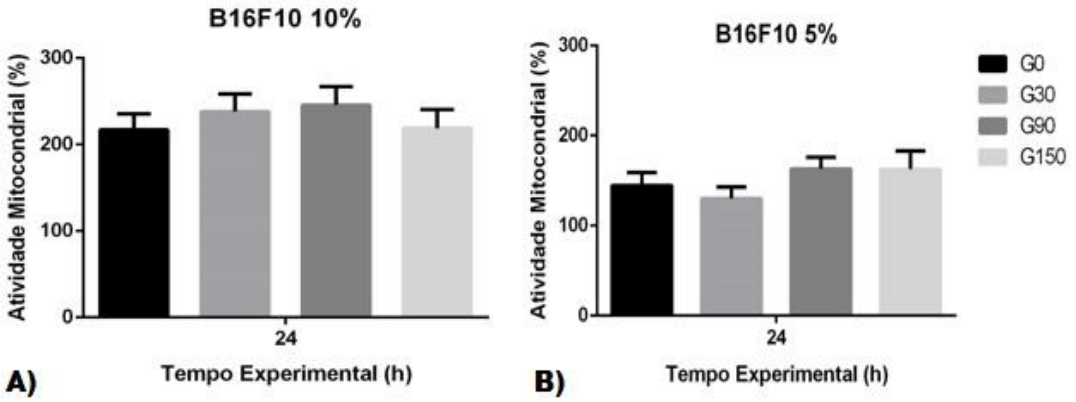
A Figura 16 apresenta os dados referentes às células de melanoma murino pertencentes à linhagem celular B16F10, mantidas em condições nutricionais ideais (Figura 16A) e déficit nutricional (Figura 16B).

Os dados pertencentes às células cultivadas sob condições nutricionais ideais mostram que, decorridas 24 horas da exposição à luz, os grupos G0 e G150 apresentaram uma atividade metabólica similar, enquanto os demais grupos tratados, G30 e G90, demonstraram um aumento de aproximadamente 10% e 13% com relação ao controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Sob condições nutricionais não ideais, após um dia da irradiação laser, os grupos que receberam 3,6 J e 6 J tiveram suas atividades mitocondriais aumentadas em aproximadamente 13% e 12,5%, respectivamente, com relação

ao controle. Apesar disso, não foi possível detectar diferenças significantes entre os grupos. Já o grupo que recebeu 1,2 J decaiu sua atividade em 10% quando comparada ao controle, porém não foram constadas diferenças estatisticamente significativas.

Figura 16 – Atividade mitocondrial (%) para as células de melanoma murino pertencentes à linhagem celular B16F10 cultivadas em condições nutricionais ideais (A) e déficit nutricional (B). Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 9).



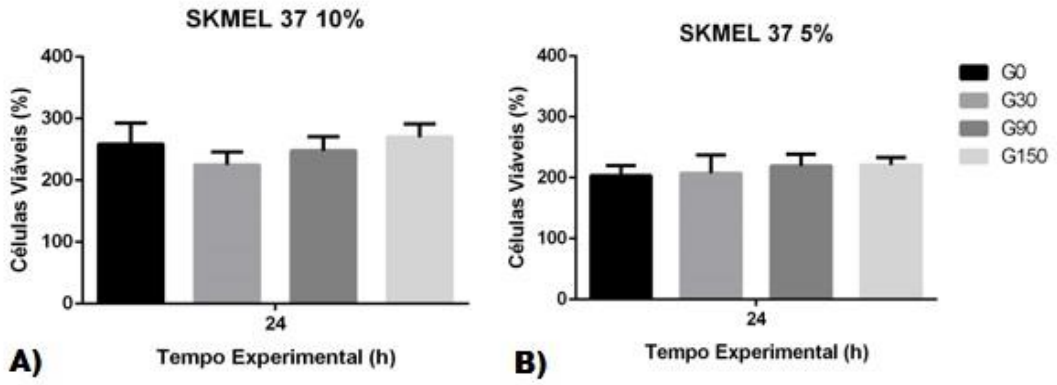
Fonte – Autor da dissertação

A Figura 17, por sua vez, representa a quantidade de células viáveis, em porcentagem, das células de melanoma humano SKMEL 37 cultivadas em condições nutricionais ideais (Figura 17A) e não ideais (Figura 17B).

Sob condições nutricionais ideais, após 24 horas da irradiação laser os grupos G0 e G150 apresentaram uma viabilidade similar, já os grupos G30 e G90 mostraram uma porcentagem reduzida quando comparados ao controle. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes.

Sob condições de déficit nutricional, após um dia da exposição à luz, o grupo G30 mostrou um comportamento semelhante ao grupo G0. Já os grupos G90 e G150 apresentaram um aumento em sua viabilidade de aproximadamente 8% e 8,5%, respectivamente, em comparação ao grupo G0. Não foram constatadas diferenças significantes entre os grupos.

Figura 17 – Células viáveis (%) para as células de melanoma humano pertencentes à linhagem celular SKMEL 37 cultivadas em condições nutricionais ideais (A) e déficit nutricional (B). Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 9).



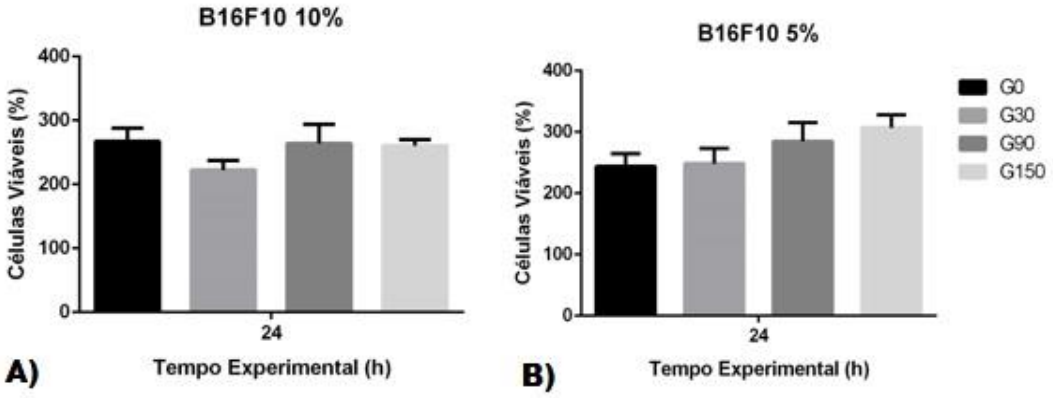
Fonte – Autor da dissertação.

Os dados representados na Figura 18 são referentes à porcentagem de células viáveis que incorporaram o corante vermelho neutro, sendo estas pertencentes à linhagem celular B16F10 e cultivadas sob condições nutricionais ideais (Figura 18A) e condições de déficit nutricional (Figura 18B).

Decorridas 24 horas da aplicação laser, os grupos G90 e G150, referentes às células cultivadas em condições nutricionais ideais, apresentaram um comportamento similar ao G0, enquanto o grupo G30 apresentou uma queda de aproximadamente 17%. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Já nas células cultivadas sob condições de déficit nutricional, o grupo tratado G30 teve sua viabilidade assemelhada ao grupo G0, enquanto os grupos G90 e G150 apresentaram um aumento quando comparados ao grupo controle, após 24 horas da exposição à luz. Os grupos G90 e G150 mostraram um aumento de aproximadamente 17% e 26%, respectivamente. No entanto, tais valores não foram considerados estatisticamente significantes.

Figura 18 – Células viáveis (%) para as células de melanoma murino pertencentes à linhagem celular B16F10 cultivadas em condições nutricionais ideais (A) e déficit nutricional (B). Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 9).



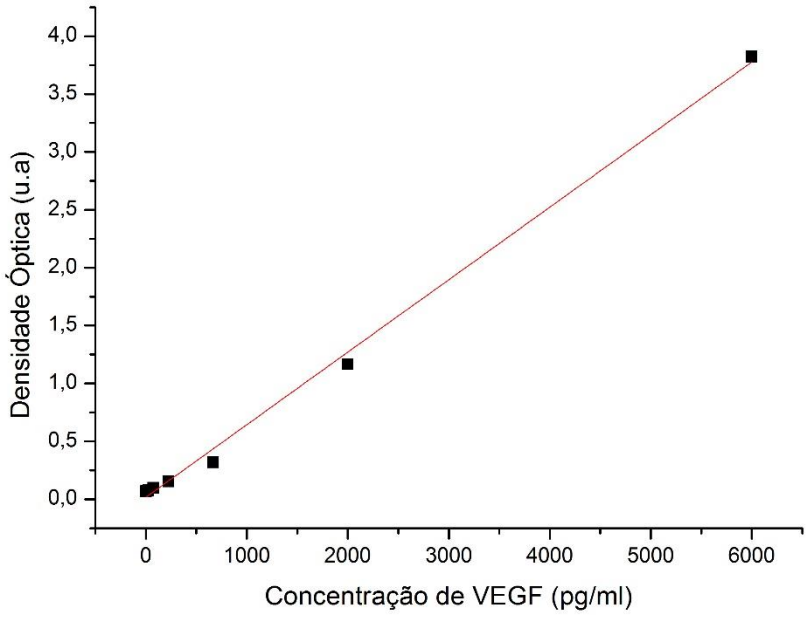
Fonte – Autor da dissertação.

5.3 Ensaio imunoenzimático para dosagem de VEGF-A

Para tornar possível a quantificação da concentração de VEGF presente nas amostras coletadas, fez-se um gráfico correlacionando a densidade óptica obtida a partir das amostras padrões fornecidas pelo kit com a concentração (pg/ml) das mesmas.

Os valores das concentrações para as amostras padrões variavam de acordo com o kit (humano ou murino). A correlação para a dosagem de VEGF humano é mostrada na Figura 19.

Figura 19 – Gráfico representando a correlação entre os valores de densidade óptica e concentração de VEGF para o kit ELISA humano.



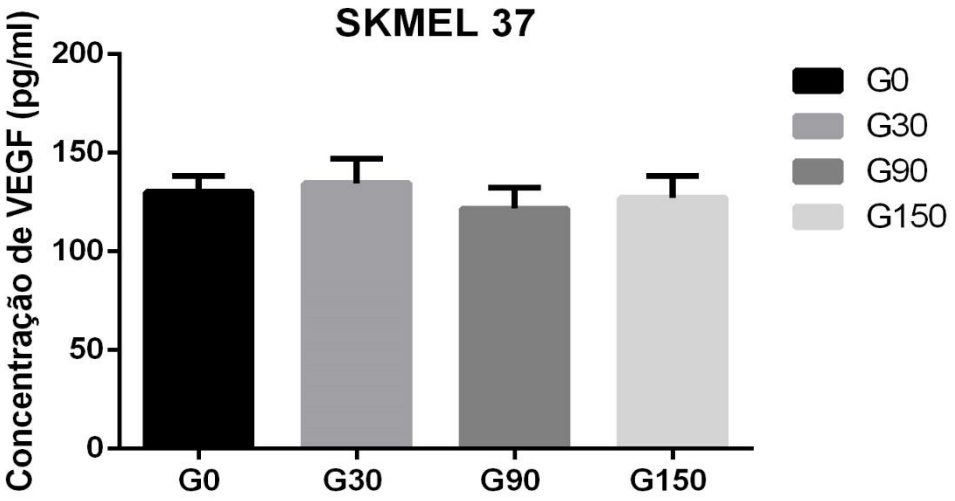
Fonte – Autor da dissertação.

A partir do gráfico apresentado foi possível obter a equação (Equação 5) relacionando as duas variáveis (densidade óptica e concentração).

$$y = 0{,}0006x + 0{,}0176 \tag{5}$$

Através da equação obtida por meio do gráfico de correlação foi possível quantificar a concentração de VEGF presente nas amostras da linhagem celular SKMEL 37 (Figura 20), retiradas 24 h após a irradiação com diferentes densidades de energia.

Figura 20 – Concentração de VEGF presente em células da linhagem de melanoma humano SKMEL 37 irradiadas com diferentes densidades de energia. Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 6).



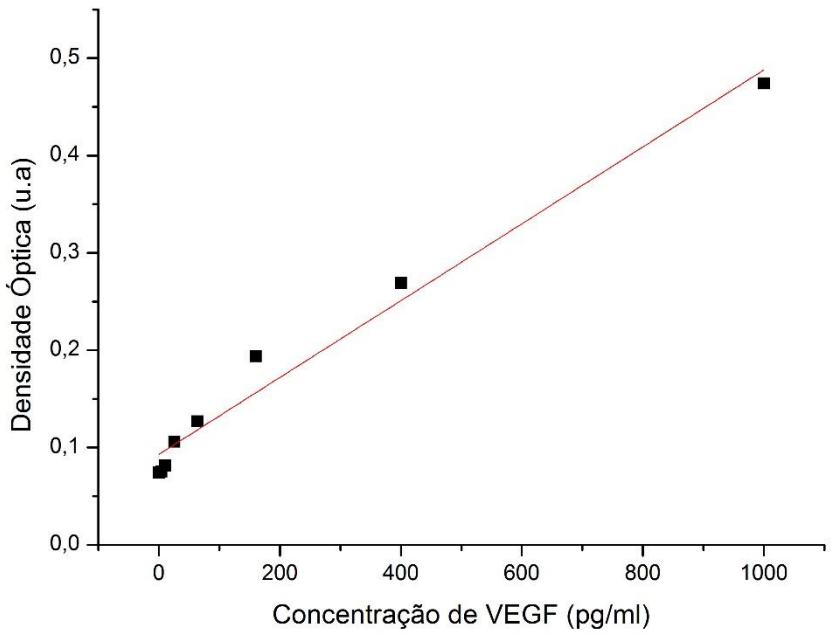
Fonte – Autor da dissertação.

Partindo de uma análise geral e comparativa entre as diferentes densidades de energia utilizadas, foi possível observar após 24 h da irradiação que o LBP promoveu um efeito inibitório no grupo que recebeu 3,6 J. O grupo em questão sofreu uma diminuição de aproximadamente 7% na expressão de VEGF com relação ao grupo controle, no entanto não foram constatadas diferenças estatísticas significativas.

Para os grupos em que foram entregues as energias de 1,2J e 6 J, a expressão quantificada de VEGF assemelhou-se ao grupo controle, não havendo diferenças estatísticas significantes. Ao comparar os grupos irradiados entre si, também não foram notadas diferenças significantes entre os mesmos.

Já para a linhagem de melanoma murino B16F10, obteve-se o seguinte gráfico (Figura 21) de correlação entre a densidade óptica das amostras padrões presentes no kit ELISA murino e as concentrações das mesmas.

Figura 21 - Gráfico representando a correlação entre os valores de densidade óptica e concentração de VEGF para o kit ELISA murino para detecção de VEGF.



Fonte – Autor da dissertação.

A partir do gráfico apresentado foi possível obter a equação (Equação 6) relacionando as duas variáveis.

$$y = 0{,}0004x + 0{,}093 \quad (6)$$

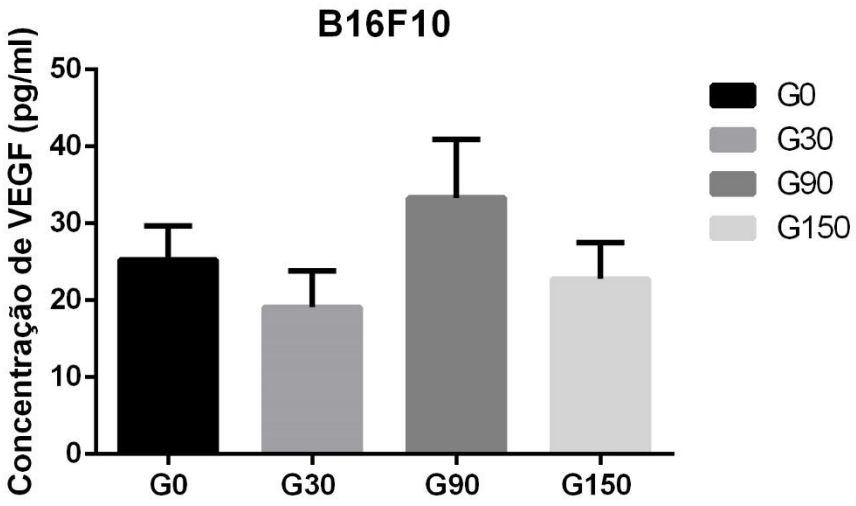
Através da equação obtida por meio do gráfico de correlação foi possível quantificar a concentração de VEGF presente nas amostras da linhagem celular B16F10 (Figura 22), retiradas 24 horas após a irradiação com diferentes densidades de energia.

Após 24 horas da exposição ao laser, o grupo G90 apresentou um aumento de aproximadamente 32% na concentração de VEGF, em relação ao grupo controle. No entanto não foram constatadas diferenças estatísticas significativas.

Analisando-se o comportamento dos demais grupos irradiados (G30 e G150) e o grupo controle (G0) foi possível observar uma tendência inibitória de aproximadamente 25% e 10%, respectivamente, não havendo diferença estatística significante entre os grupos laser e o controle. Ao comparar os grupos

irradiados entre si, também não foram notadas diferenças significantes entre os mesmos.

Figura 22 - Concentração de VEGF presente em células da linhagem de melanoma murino B16F10 irradiadas com diferentes densidades de energia. Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 6).



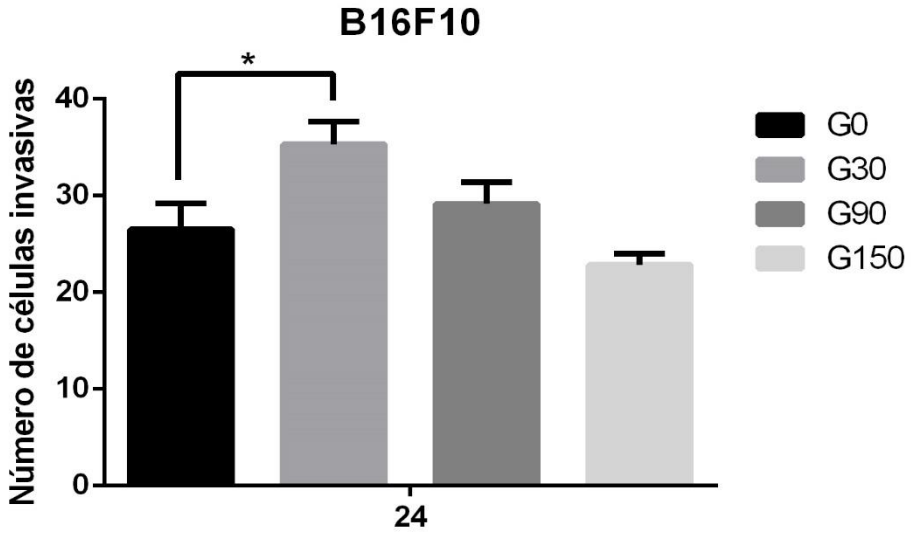
Fonte – Autor da dissertação.

5.4 Ensaio de invasão *transwell*

As Figuras 23 e 24 mostram a média do número de células que foram capazes de invadir a simulação da membrana basal em direção ao estímulo quimiotático, isto é, nutrientes no compartimento oposto ao que as células se encontravam.

Os dados representados pela Figura 23 referem-se às células de melanoma murino B16F10, após 24 horas da irradiação laser. O grupo que recebeu uma energia de 1,2 J apresentou um aumento de aproximadamente 33% no seu comportamento de invasão, em relação ao controle, sendo esse dado considerado estatisticamente significante. O grupo G90 mostrou um aumento de aproximadamente 9,5%, enquanto o grupo G150 decaiu seu comportamento de invasão em aproximadamente 14% em relação ao grupo G0. No entanto, tais grupos não influenciaram significantemente o comportamento de invasão das células neoplásicas comparados ao controle.

Figura 23 – Número de células, em média, da linhagem celular B16F10 capazes de migrar através do matrigel em busca de nutrientes. Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 6).

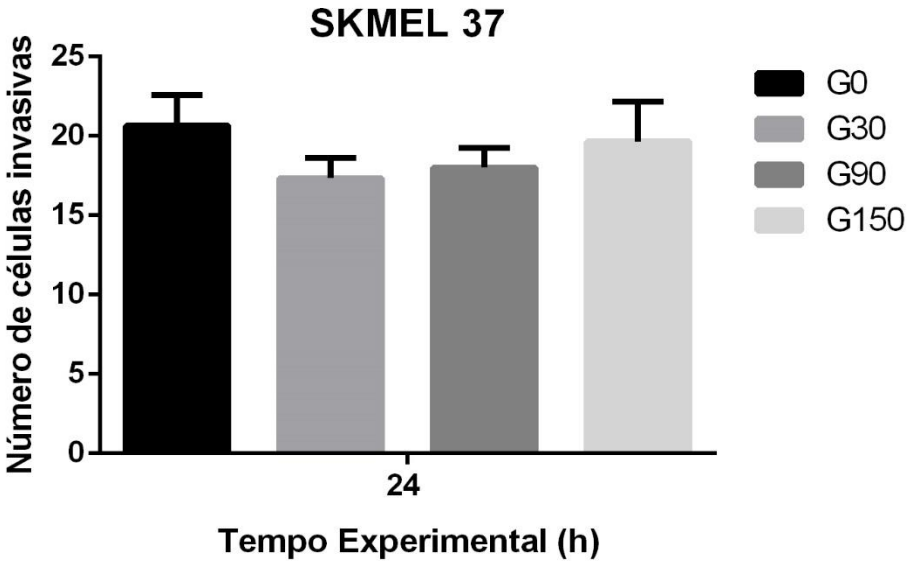


Fonte – Autor da dissertação.

Já os dados representados pela Figura 24 referem-se às células de melanoma humano SKMEL 37. Decorridas 24 horas da exposição à luz laser, os grupos G0 e G150 apresentaram um comportamento de invasão muito semelhante. Os grupos G30 e G90, por sua vez, apresentaram uma queda de aproximadamente 16% e 13%, respectivamente, em sua invasão celular. No entanto, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes.

Comparando-se os dois gráficos (Tabela 2) é possível notar que as células irradiadas com uma energia de 6 J comportaram-se de maneira similar ao controle para a linhagem de melanoma humano, enquanto apresentou uma tendência inibitória para a linhagem murina. No entanto, os grupos que receberam 1,2 J e 3,6 J apresentaram comportamentos antagônicos ao compararmos ambas as linhagens e, dessa forma, para as células de melanoma murino tais grupos mostraram uma tendência à estimulação, enquanto para as células de melanoma humano demonstraram uma tendência à inibição.

Figura 24 – Número de células, em média, da linhagem celular SKMEL 37 capazes de migrar através do matrigel em busca de nutrientes. Os dados são apresentados como os valores da média ± EPM (n = 6).



Fonte – Autor da dissertação.

Tabela 2 – Valores da média referentes ao número de células que migram para as linhagens celulares de melanoma murino B16F10 e humano SKMEL 37.

LINHAGENS	GRUPOS	MÉDIA
SKMEL 37	G0	20,6
	G30	17,3
	G90	18
	G150	19,6
B16F10	G0	26,5
	G30	35,3
	G90	29
	G150	22,8

Fonte – Autor da dissertação.

6 DISCUSSÃO

A literatura é rica sobre os efeitos do LBP em promover a proliferação de células normais sob condições de estresse. No entanto, seu efeito em células malignas permanece controverso[13]. Portanto, células neoplásicas de duas linhagens celulares diferentes de melanoma foram cultivadas em meio suplementado com 10% e 5% de SFB, assim como descrito em estudo anterior[85], a fim de verificar se o LBP poderia promover diferentes comportamentos devido à absorção de energia luminosa.

Nesse trabalho foram utilizadas 3 energias diferentes com o objetivo de verificar se energias mais altas ou mais baixas poderiam influenciar a atividade metabólica das linhagens celulares trabalhadas. Os resultados obtidos demonstraram que o laser de emissão infravermelha (λ=780nm) entregando diferentes energias, não foi capaz de promover efeitos significativos na atividade mitocondrial das linhagens celulares SKMEL 37 e B16F10 em relação ao grupo controle, em nenhuma das condições nutricionais sob as quais as células foram submetidas.

De acordo com as condições de crescimento celular, o que pode incluir a suplementação de soro em uma cultura, a redução do MTT pode variar, alterando o sinal metabólico e, assim, fornecendo informações sobre o efeito de determinada substância[86]. A partir das análises de ambas as linhagens celulares utilizadas, nas diferentes condições nutricionais as quais foram submetidas, foi possível observar que as células cultivadas em déficit nutricional apresentaram uma porcentagem menor na atividade metabólica com relação às células cultivadas sob condições nutricionais ideais, o que era esperado uma vez que as células necessitam de uma suplementação ideal de nutrientes, além de pH e temperatura em condições ideais, para manter seu metabolismo[87].

O ensaio de MTT consiste em um dos testes mais utilizados para avaliar a proliferação e viabilidade celular, uma vez que se considera a conversão do sal amarelo solúvel (tetrazólio) em um precipitado de formazan, proporcional ao número de células metabolicamente viáveis. A mitocôndria consiste em um dos locais onde ocorre essa redução, através da enzima succinato desidrogenase. Todavia, mudanças na atividade de oxidorredutases mitocondriais e não

mitocondriais, perturbações celulares metabólicas e energéticas, além de estresse oxidativo podem modificar significantemente os resultados desse teste[86,88]

Apesar de ser um teste bem estabelecido, no caso do LBP pode não ser o mais indicado, visto que o principal fotorreceptor nas regiões do vermelho e infravermelho próximo do espectro de luz é o citocromo c oxidase, enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons (também chamado de complexo IV) e localizado na mitocôndria[89,90]. O LBP é capaz de aumentar a atividade do complexo IV e da enzima succinato desidrogenase, pertencentes à cadeia transportadora de elétrons, ambos localizados na mitocôndria[89], onde ocorre parte da redução do sal tetrazólio.

Portanto, testes de viabilidade baseados na redução do sal tetrazólio, como é o caso do MTT, podem apresentar valores superestimados quando possuem como objetivo avaliar os efeitos do LBP e, consequentemente, os resultados obtidos podem não remeter à viabilidade real[91]. Dessa forma, é importante a utilização de mais de um teste que avalie a proliferação e viabilidade celular.

Nesse trabalho, o ensaio de captação de vermelho neutro através de lisossomos viáveis foi utilizado, uma vez que o mesmo é considerado mais sensível que o MTT. A absorção do corante se baseia na capacidade da célula de manter gradientes de pH, através da produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta uma carga próxima de 0 e penetra nas membranas celulares. Os lisossomos possuem um gradiente de prótons, mantendo o pH menor que o do citoplasma permitindo que o corante seja retido no interior dos mesmos[84].

Os ensaios de viabilidade são importantes para investigar o crescimento celular associado ao LBP, uma vez que este é capaz de modular a produção de ROS, levando à ativação de fatores de transcrição responsáveis pela superregulação de genes relacionados, por exemplo, à proliferação celular[68]. No entanto, a irradiação laser em células tumorais ainda possui efeitos controversos, podendo levar à estimulação, inibição ou mesmo não influenciar na viabilidade celular dessas linhagens[13].

Nesse estudo, foram adotadas 3 densidades de energia diferentes a fim de verificar se energias mais altas ou mais baixas poderiam influenciar a

viabilidade celular das linhagens celulares trabalhadas. Os resultados obtidos demonstraram que o laser de emissão infravermelha (λ=780nm) entregando diferentes energias, não foi capaz de estimular ou inibir significantemente nenhuma das linhagens celulares de melanoma trabalhadas, independentemente da condição nutricional a qual as mesmas foram submetidas.

Analisando-se as curvas de crescimento de ambas as linhagens celulares e o tempo de duplicação das mesmas, é possível notar que o comportamento das células B16F10 e SKMEL 37 é muito semelhante. O ensaio de captação do vermelho neutro demonstrou que ambas as linhagens, ao serem cultivadas em condições nutricionais ideais, apresentaram uma viabilidade similar 24 horas após à exposição ao laser, não havendo diferenças significantes entre ambas, apesar das células de melanoma murino apresentarem uma viabilidade levemente maior em comparação às células de melanoma humano.

Comparando-se os valores da atividade mitocondrial e da viabilidade celular obtidos para ambas as linhagens celulares cultivadas sob déficit nutricional, é possível observar que apesar da diminuição na atividade metabólica (em relação às células cultivadas em condições ideais), a viabilidade das células de melanoma manteve-se elevada quando comparadas às células mantidas em condições nutricionais ideais.

O comportamento observado pode ser explicado pelo fato de tumores possuírem adaptações metabólicas para sobreviver ao estresse, sendo a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) responsável pela regulação da homeostase energética celular e preservando a energia e viabilidade celular. A AMPK é ativada em condições de estresse energético, como a privação de nutrientes, desencadeando múltiplas adaptações biológicas para preservar a energia e se adaptar ao estresse metabólico e, assim, desempenhando um papel chave na resistência ao estresse[92].

Portanto, as células de melanoma murino e humano cultivadas sob condições de déficit nutricional, foram capazes de manter sua viabilidade celular elevada, independente da diminuição na atividade mitocondrial, uma vez que possivelmente a AMPK foi ativada devido às condições nutricionais não ideais sob as quais as células foram submetidas, desencadeando adaptações

biológicas que permitiram a preservação da energia e adaptação da célula tumoral ao estresse metabólico e, consequentemente, mantendo a viabilidade celular.

Esses resultados corroboram com Powell et al[75], no entanto discordam de Kara e colaboradores[78], em que foi detectado um aumento na proliferação das células tumorais e Murayama et al.[76], que descreveram uma diminuição significativa na viabilidade de células cancerígenas. Todos esses trabalhos utilizaram um laser de emissão infravermelha.

Os resultados controversos reportados acima podem ser justificados através de diversos fatores, como a especificidade da linhagem celular, fisiologia celular e os parâmetros adotados para o laser[93]. Em relação aos parâmetros de luz, a resposta ao LBP varia de acordo com o comprimento de onda, densidade de energia, irradiância e tempo de exposição, sendo a dosimetria altamente relevante[68,69]. Apesar de não serem detectadas diferenças na viabilidade celular, o melanoma é uma célula de alto poder metastático. Assim, foram realizados experimentos para dosagem de VEGF e avaliação da invasão tumoral.

O LBP, ao modular a produção de ROS e, assim, induzir fatores de transcrição que ativam a síntese proteica responsável por diversos efeitos a níveis celulares, pode levar à super-regulação de genes também relacionados à modulação dos níveis de fatores de crescimento, como é o caso do VEGF[68].

A função do VEGF não se limita à angiogênese, isto é, formação de novos vasos a partir de pré-existentes. Em células tumorais, a sinalização autócrina do VEGF pode promover o crescimento, a sobrevivência, a migração e a invasão de células tumorais. Dessa forma, tal sinalização possui um papel chave na formação tumoral[45,94]. Tendo em vista as possíveis funções do VEGF em células neoplásicas, considerou-se importante a realização de ensaios que avaliam a expressão de VEGF presente em uma amostra e o potencial de invasão de uma linhagem celular, visto que essa molécula também está relacionada à metástase e, portanto, poderia indicar a agressividade de um tumor.

Há vários sinais que ativam moléculas pró-angiogênicas, como estresse metabólico, estresse mecânico, resposta imune/inflamatória e mutações genéticas[55]. Dessa forma, as células submetidas ao ensaio ELISA para dosagem da concentração de VEGF foram cultivadas sob condições de déficit nutricional

(5% SFB), como descrito em trabalho anterior[95], afim de ativar moléculas pró-angiogênicas.

De acordo com trabalhos anteriores[96,97], os sobrenadantes das amostras de VEGF eram retirados apenas em um dado momento após o tratamento aplicado. Dessa forma, os sobrenadantes foram coletados e estocados 24 horas após a exposição das células à luz.

Nesse trabalho, as células de melanoma foram irradiadas com 3 diferentes densidades de energia e as amostras dos sobrenadantes analisadas demonstraram que, assim como nos experimentos referentes à viabilidade, o LBP não influenciou significantemente a dosagem de VEGF para ambas as linhagens celulares utilizadas.

Há trabalhos envolvendo a aplicação do LBP em células normais, como queratinócitos[97] e células endoteliais[96], aumentando ou não promovendo alterações significantes na concentração do VEGF. No entanto, para células neoplásicas ainda há escassez de trabalhos.

Trabalhos no grupo[82] utilizando um laser de emissão vermelha (λ = 660 nm), células de melanoma murino B16F10 e 5 densidades de energia diferentes (3 correspondentes às utilizadas nesse trabalho) detectaram uma redução significativa na expressão de VEGF ao receberem a maior densidade de energia utilizada (150 $J.cm^{-2}$).

Esses dados sugerem que o comprimento de onda utilizado pode afetar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular em células de melanoma, uma vez que parâmetros como as densidades de energia, potência, tempo de exposição e densidade de potência, além de uma das linhagens celulares trabalhadas, foram mantidos, variando apenas o comprimento de onda utilizado entre os estudos.

De acordo com Karu[98], as funções celulares podem ser influenciadas pela radiação em um mesmo comprimento de onda. No entanto quando uma dessas funções celulares é alterada pela irradiação, as outras permanecem inalteradas, o que indica a existência de um mecanismo regulador que estabelece prioridades em uma célula. Por isso, independentemente dos resultados de viabilidade celular e da dosagem de VEGF, em que não foram encontradas diferenças significativas, realizou-se o experimento de invasão tumoral.

As linhagens celulares de melanoma são altamente tumorigênicas e propensas a metástase, sendo as células de melanoma murino B16F10 as que possuem maior habilidade em formar metástases dentre suas sublinhagens[15] e, ao analisarmos o controle de ambas as linhagens, foi possível verificar uma maior invasão pelas células murinas em comparação às humanas. Assim, considera-se importante a avaliação da influência da irradiação no comportamento de invasão das células neoplásicas de melanoma, uma vez que o LBP também é capaz de aumentar o comportamento de migração das células[68].

Ao irradiarmos o pellet das células trabalhadas com um laser de emissão infravermelha e diferentes energias, os dados mostraram que a menor energia entregue foi capaz de promover um aumento, considerado estatisticamente significante, no número de células capazes de invadir a simulação de membrana basal para as células de melanoma murino. Já as células de melanoma humano não sofreram influência do laser em nenhuma das densidades de energia adotadas.

A evolução do melanoma, assim como outros processos tumorigênicos, depende de fenômenos relacionados ao metabolismo lipídico, sendo os fosfolipídeos importantes na diferenciação de linhagens de melanoma com diferentes potenciais de agressividade. Estudos com diferentes tipos de melanoma de origem humana não demonstraram diferença significativa entre os níveis de fosfolipídeos e colesterol. Por outro lado, um trabalho utilizando células de melanoma murino B16F10 (mais agressivas), as mesmas utilizadas nesse estudo, demonstrou que as mesmas possuem menor razão entre fosfolipídeos e colesterol quando comparadas com células menos agressivas[99], o que sugere que tal linhagem seja mais propensa a metástases, possuindo uma maior capacidade de invasão com relação a outras linhagens.

Trabalhos que envolvem os efeitos do LBP em ensaios de invasão tumoral são escassos. Santos[82] utilizou um laser de emissão vermelha (λ = 660 nm) entregando 5 diferentes energias, avaliou o efeito da irradiação no comportamento de invasão de células de melanoma murino B16F10. Diferentemente desse estudo, o laser não influenciou em nenhuma das energias entregues na invasão tumoral, demonstrando, mais uma vez, que o comprimento

de onda utilizado promoveu respostas diferentes, uma vez que os demais parâmetros do laser utilizados foram mantidos iguais.

Um trabalho com células da linhagem SCC25[100] utilizando um laser de emissão vermelha (λ = 660 nm, 30 mW) foi capaz de aumentar o potencial de invasão das mesmas, diferentemente do observado em um trabalho do grupo[82]. Por outro lado, SCHALCH et al.[91] irradiaram a linhagem celular SCC9 com dois comprimentos de onda diferentes (660 nm, 40 mW e 780 nm, 40 e 70 mW), observando um aumento na migração de células com o laser de emissão vermelha e uma diminuição na migração das mesmas com o laser de emissão infravermelha, diferentemente do observado nesse trabalho.

Esses dados mostram a complexidade na dosimetria do equipamento laser, visto que culturas celulares podem ser irradiadas com um mesmo comprimento de onda e apresentarem respostas diferentes à exposição à luz, pois outros parâmetros como densidade de energia, tempo de exposição, irradiância, além da própria linhagem celular são importantes para o efeito do LBP[68,69,93].

Ao analisarmos o efeito do laser no número de células que foram capazes de invadir a simulação da membrana basal, observa-se que para a linhagem B16F10, a menor energia entregue foi capaz de aumentar significantemente esse número, enquanto as células que receberam a maior energia apresentaram um comportamento semelhante ao grupo não irradiado, o que remete ao comportamento de dose bifásica do laser[68].

Um trabalho utilizando células de melanoma pertencentes à linhagem B16F10 e radiação ionizante[101] demonstrou que a radiação foi capaz de inibir a habilidade de invasão dessas células, porém esse tipo de radiação promove inúmeros efeitos deletérios[102]. Nosso trabalho utilizou o LBP, sendo este considerado uma forma menos invasiva de tratamento e podendo melhorar a qualidade de vida de pacientes[82], mostrando que as densidades de energia mais altas adotadas, sobretudo 150 $J.cm^{-2}$, não estimularam a invasão das células de nenhuma das linhagens adotadas.

Os resultados demonstram que o LBP pode influenciar o comportamento de invasão celular em doses mais baixas, sendo o comprimento de onda, densidade de energia e densidade de potência relevantes na invasão tumoral.

Dentro das limitações impostas nesse estudo, não foi verificado aumento na expressão de VEGF para o grupo G30 em nenhuma das linhagens celulares utilizadas, apesar do mesmo grupo ter apresentado um aumento no seu comportamento de invasão tumoral para a linhagem de melanoma murino. No entanto, a realização de uma cinética para a dosagem de VEGF poderia fornecer outros resultados, uma vez que esse fator de crescimento também está relacionado à metástase.

7 CONCLUSÕES

A irradiação com laser de baixa potência no comprimento de onda correspondente ao infravermelho (λ = 780 nm), nas condições experimentais adotadas nesse estudo, não promoveu efeitos estimulatórios ou inibitórios na atividade mitocondrial de ambas as linhagens celulares de melanoma utilizadas. Esses dados foram observados para ambas as condições nutricionais sob as quais as células foram submetidas.

No ensaio de captação do corante vermelho neutro através dos lisossomos presentes em células viáveis, o LBP não exerceu influência em ambas as linhagens trabalhadas, em nenhuma das densidades de energia utilizadas e condições nutricionais sob as quais as células foram submetidas.

A expressão de VEGF presente nos sobrenadantes das linhagens celulares de melanoma também não sofreu influência do LBP no período experimental de 24 h, em nenhuma das densidades de energia aplicadas.

Os dados apresentados pelo ensaio de invasão *transwell*, por outro lado, demonstraram que o LBP foi capaz de promover a invasão das células de melanoma murino, 24 h após a exposição à menor densidade de energia utilizada pelo laser, ou seja, 30 $J.cm^{-2}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K AND WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre, BR.: 2004.

2 Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

3 INSTITUTO ONCOGUIA. **Tipos de Câncer**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer/83/1/>. Acesso em: 11 abr 2016.

4 INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Pele não melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melanoma>. Acesso em: 20 fev 2018.

5 WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Skin Cancers**. Disponível em: < http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. Acesso em: 18 abril 2018.

6 INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**. Pele melanoma**. Disponível em: < https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma >. Acesso em: 20 fev 2018.

7 CALDAS, C. Câncer sequencing unravels clonal evolution. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 408-410, 2012.

8 INSTITUTO ONCOGUIA. **Sobre o Câncer de Pele Melanoma**. 2015. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/551/138/>. Acesso em: 28 mar 2016.

9 SBCD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA DERMATOLÓGICA. **Saúde da pele: 10 questões sobre melanoma**. 2011. Disponível em: <https://www.sbcd.org.br/pagina/1624>. Acesso em: 28 mar 2016.

10 NÚÑEZ, 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, 2013.

11 STEIN, S. et al. Pain reduced by low-level laser therapy during use of orthodontic separators in early mixed dentition. **J Orofac Orthop**, 2015.

12 SELLA, V. R. et al. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. **Lasers Med Sci,** v. 30, n. 3, p. 1061-8, 2015.

13 HAMBLIN, M. R.; NELSON, S. T.; STRAHAN, J. R. Photobiomodulation and Cancer: What is the truth?. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 20, n. 20, p. 1-5, 2018.

14 FRIGO, L.; LUPPI, J. S. S.; FAVERO, G. M.; MARIA, D. A.; PENNA, S. C.; BJORDAL, J. M.; BENSADOUN, R. J.; MARTINS, R. A. B. L. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma *in vitro* and *in vivo*. **BioMed Central**, v. 9, n. 404, p. 1-8, 2009.

15 MENDES, R. L. **Morfologia e regimes de crescimento das linhagens celulares derivadas de melanoma murino B16F10, primário e metastático, em camundongos BALB/c**. 2011. 134f. Tese (Doutor em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

16 YOHEM, K. H. et al. Radiation survival of murine and human melanoma cells utilizing two assay systems: monolayer and soft agar. **Br. J. Cancer**, v. 57, n. 1, p. 64-69, 1988.

17 ANDRADE, L. N. S.; LIMA, T. M.; CURI, R.; CASTRUCCI, A. M. L. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 553-560, 2005.

18 A C CAMARGO. **Pele Melanoma**. Disponível em: < http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/pele-melanoma/31/>. Acesso em: 14 Maio 2018.

19 GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851 -857, 2007.

20 SOUZA, R. C. **Efeitos da irradiação com laser infravermelho (780 nm) em células de melanoma murino B16-F10 com melanogênese estimulada ou inibida e em melanócitos murino melan-a**. 2010. 102f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

21 TADOKORO, T. et al. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin and photosensitivity. **FASEB J.**, v. 17, p. 1177-1179, 2003.

22 BOISSY, R. E.; NORDLUND, J. J. Molecular basis of congenital hypopigmentary disorders in humans: a review. **Pigment Cell Res**., v. 10, p. 12-24, 1997.

23 NAPPI, A. J.; VASS, E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Melanoma Res**, v. 6, p. 341–349, 1996.

24 SETLOW, R. B. *et al.* Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 90, p. 6666-6670, 1993.

25 KYRGIDIS, A.; TZELLOS, T. G.; TRIARIDIS, S.; Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. **J. Carcinog.**, v. 9, p. 1-17, 2010.

26 KADEKARO, A. L. et al. Review-Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the Sun: Who Will Win the Final Round? **Pigment cell res**, v. 16, p. 434–447, 2003.

27 TOMESCU, D. et al. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 4038, 2001.

28 WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n. 3, p. 204-214, 2004.

29 GARBE, C.; PERIS, K. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinar guideline – Update 2012. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 15, p. 2375-2390, 2012.

30 GOVINDARAJAN, B. et al. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **J Clin Invest.**, v. 117, n. 3, p. 719-729, 2007.

31 MIRANDA, A. F. S. **Avaliação dos efeitos da terapia fotodinâmica utilizando compostos fenotiazínicos sobre melanoma *in vitro***. 2015. 44f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Medicina Investigativa) – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador.

32 VAN DEN OORD, J. J.; SARASIN, A.; WINNEPENNINCKX, V.; SPATZ, A. Expression profiling of melanoma cell lines: in search of a progressionrelated molecular signature. **Future Oncoly**, v. 3, p. 609-611, 2007.

33 CERTA FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO. **Você faz parte do grupo de risco para câncer de pele melanoma? Descubra agora**. Disponível em: <http://www.certafarmacia.com.br/noticia/voce-faz-parte-do-grupo-de-risco-para-cancer-de-pele-melanoma-descubra-agora>. Acesso em: 01 Ago. 2018.

34 MERCER, K. E.; PRITCHARD, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1653, p. 25– 40, 2003.

35 SBCD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA DERMATOLÓGICA. **Biópsia incisional e excisional**. Disponível em: <https://www.sbcd.org.br/procedimentos/oncologicos/biopsia-incisional-e-excisional/>. Acesso em: 1 Ago. 2018.

36 VASCONCELOS, Z. S. **Avaliação do potencial anticâncer do derivado benzotiazólico (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazo-2 ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em células de melanoma humano**. 2013. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

37 INSTITUTO ONCOGUIA. **Tratamento do Câncer de Pele Melanoma por Estágio**. 2015. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-do-cancer-de-pele-melanoma-por-estagio/7068/188/>. Acesso em: 03 Ago. 2018.

38 AMERICAN CANCER SOCIETY. **Melanoma Skin Cancer Stages**. 2017. Disponível em: < https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

39 INSTITUTO ONCOGUIA. **O que é metástase?**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/o-que-e-metastase/7478/889/>. Acesso em: 04 Ago. 2018.

40 MASSAGUÉ, J.; BATLLE, E.; GOMIS, R.R. Understanding the molecular mechanisms driving metastasis. **Molecular Oncology**, v. 11, p. 3-4, 2017.

41 TURNER, N.; WARE, O.; BOSENBERG, M. Genetics of metastasis:melanoma and other cancers. **Clinical & Experimental Metastasis**, p. 1-13, 2018.

42 FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer.,** v.3, p.453-458, 2003.

43 OBENAUF, A. C.; MASSAGUÉ, J. Surviving at a distance: organ specific metastasis. **Trends Cancer**, v. 1, p. 76–91, 2015.

44 JOYCE, J.; POLLAR, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev.Cancer**., v. 9, p. 247-252, 2009.

45 FERREIRA, M. A. N. D. **Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptorespara o PAF (PAFR-KO)**. 2006. 164f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

46 RISAU, W., FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 11, p. 73-91, 1995.

47 OLIVEIRA, L. B. O.; GOMES, C. F.; BAMPI, V.; RHEINGANTZ, M. G.; SOUZA, M. A. L. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapia. **Vittalle**, v. 22, n. 2, p. 11-22, 2010.

48 YAMASHITA, J.; ITOH, H.; HIRASHIMA, M.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; YURUGI, T.; NAITO, M.; NAKAO, K.; NISHIKAWA, S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 92-96, 2000.

49 BENJAMIN, L. E.; HEMO, I.; KESHET, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. **Development.**, v. 125, n. 9, p. 1591-1598, 1998.

50 PEREIRA, A. F. F.; MACHADO, M. A. A. M.; SILVA, T. C. Laser em baixa intensidade pode estimular o processo de angiogênese. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 21, n. 4, p. 15-21, 2014.

51 CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 389-395, 2000.

52 CONWAY, E. M.; COLLEN, D. & CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovasc Res**., v. 49, n. 3, p. 507-521, 2001.

53 KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran: Bases Patológicas das Doenças. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

54 YOU, W. K.; STALLCUP, W. B. Localization of VEGF to vascular ECM is an important aspect of tumor angiogenesis. **Cancers**, v. 9, n. 97, p. 1-14, 2017.

55 SEMENZA, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. **Biochemical pharmacology**, v. 64, p. 993-998, 2002.

56 BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-410, 2003.

57 CARMELIET, P.; JALN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249-257, 2000.

58 HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M. S.; WILDIERS, H.; OOSTEROM, A. T.; DE BRUIJN, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev.**, v. 56, n. 4, p. 549-580, 2004.

59 ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLA-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 12, p. 2879-2887, 2006.

60 RINI, B. I.; SMALL, E. J. Biology and clinical development of vascular endotelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. **Journal of clinical oncology**, v. 23, n. 5, p. 1028-1043, 2005.

61 MCCOURT, M.; WANG, J. H.; SOOKHAI, S.; REDMOND, H. P. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. **Arch Surg**, v. 134, n. 12, p. 1325-1331, 1999.

62 BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth fator (VEGF). **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 777-794, 2005.

63 DVORAK, H. F. Vascular permeability factor vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**., v. 20, p. 4368-4380, 2002.

64 MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, 1960.

65 CAVALCANTI, T. M.; CATÃO, M. H. C. V.; LINS, R. D. A. U.; ALMEIDA-BARROS, R. Q.; FEITOSA, A. P. A. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. **An Bras Dermatol.**, v. 86. N. 5, p. 955-960, 2011.

66 MESTER, E.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of Laser on hair growth of mice. **Jiserl Orvostud**, v. 19, p. 628-631, 1967.

67 ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, v. 27, p. 237-249, 2012.

68 CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed. Eng.**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012.

69 HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROLL,l J. D.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p. 358-383, 2009.

70 CHEN, A. C-H. et al. Low-Level Laser Therapy Activates NF-kB via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-8, 2011.

71 KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed. Laser Surger.**, v. 23, n. 4, p. 355-361, 2005.

72 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: Elsevier (Ed.). **Laser de baixa potência - Princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**, 2012, cap. 2, p. 14-26.

73 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. 300-303, 2005.

74 HENRIQUES, A. C. G; CAZAL, C.; CASTRO, J. F. L. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

75 POWELL, K. et al. The effect of laser irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p. 115-123, 2010.

76 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, p. 87-93, 2012.

77 SCHARTINGER, V.H.; GALVAN, O.; RIECHELMANN, H.; DUDÁS, J. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. **Support Care Cancer**, v. 20, p. 523-529, 2012.

78 KARA, C. et al. Low level laser therapy induces increased viability and proliferation in isolated cancer cells. **Cell Proliferation**, e12417, p. 1-6, 2017.

79 BAMPS, M.; DOK, R.; NUYTS, S. Low-Level Laser Therapy Stimulates Proliferation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 343, p. 1-6, 2018.

80 FRANÇA, F. D. **Avaliação das linhagens VERO e MDCK na sinalização celular e como alternativas para estudo da nefrotoxicidade utilizando anfotericina B**. 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

81 Zhong, X., et al. Comparison of the multi-drug resistant human hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402/ADM model established by three methods. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, n. 1, 2010.

82 SANTOS, A. J. S. **Efeitos da terapia com laser de baixa potência em melanoma: ensaios in vitro.** 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

83 GASQUE, K. C. S.; AL-AHJ, L. P.; OLIVEIRA, R. C.; MAGALHÃES, A. C. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 57 n. 3, p. 381-385, 2014.

84 REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008.

85 CASTRO, J. F. L. et al. Effect of laser therapy on laryngeal carcinoma cell proliferation (H.Ep-2). **Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic**, v. 14, n. 4, p. 275-282, 2014.

86 BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 127–152, 2005.

87 MIZRAHI, A.; LAZAR, A. Media for cultivation of animal cells: an overview. **Cytotechnology**,v. 1, p. 199-214, 1988.

88 STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V.V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, p. 193-203, 2015.

89 FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v. 22, n. 3, p. 1-37, 2016.

90 KARU, T. I. Multiple Roles of Cytochrome c Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. **IUBMB Life**, v. 62, n. 8, p. 607-610, 2010.

91 SCHALCH, T. D. et al. Photobiomodulation is associated with a decrease in cell viability and migration in oral squamous cell carcinoma. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 3, p. 629-636, 2018.

92 JONES, R. G.; THOMPSON, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes & Development**, v. 23, p. 537-548, 2009.

93 RENNO, A. C. M. et al. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation *in Vitro*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 4, p. 275-280, 2007.

94 GOEL, H. L.; MERCURIO, A. M. VEGF targets the tumour cell. **Nat. Ver. Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871-882, 2013.

95 ESPOSITO, E. et al. Evaluation of nicotinamide as an anti-inflammatory and anti-angiogenic agent in uveal melanoma cell lines. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 80, n. 2, p. 74-77, 2017.

96 KIPSHIDZE, N. et al. Low-Power Helium:Neon Laser Irradiation Enhances Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Growth of Endothelial Cells In Vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 28, p. 355-364, 2001.

97 BASSO, F. G. et al. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers Med. Sci.**, v. 28, n. 2, p. 367-374, 2013.

98 KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 49, p. 1-17, 1999.

99 FILHO, A. P. S. **Análise metabolômica de linahgens de melanócitos e melanomas de origem humana e murina**. 2013. 111 f. Tese (Doutor em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

100 HENRIQUES, A. C. G. et al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. **Lasers Med Sci.**, v. 29, p. 1385-1395, 2014.

101 GAO, Y. et al. Migration and invasion in B16-F10 mouse melanoma cells are regulated by Nrf2 inhibition during treatment with ionizing radiation. **Oncol Lett.**, v. 16, n. 2, p. 1959-1966, 2018.

102 SILVA, C.R. **Efeitos do laser de baixa potência em células de linhagem tumoral e fibroblastos submetidos à radiação ionizante**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.