

## EFEITOS DE FOTBIOMODULAÇÃO A LASER EM CÉLULAS TUMORAIS

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.028-015>

**Jéssica Lucio da Silva**

Doutora, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Pitágoras UNOPAR Anhanguera, Londrina, Paraná, Brasil.

**Ana Flávia Spadaccini Silva de Oliveira**

Doutora, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Pitágoras UNOPAR Anhanguera, Londrina, Paraná, Brasil.

**Danielle Gregório**

Doutora, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

**Ellen Greves Giovanini**

Mestre, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

**Regina Célia Poli**

Doutora, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Pitágoras UNOPAR Anhanguera, Londrina, Paraná, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

**Rodrigo Antonio Carvalho Andraus**

Doutor, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Pitágoras UNOPAR Anhanguera, Londrina, Paraná, Brasil.

**Luciana Prado Maia**

Doutora, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Anhanguera Uniderp, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil; Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Pitágoras UNOPAR Anhanguera, Londrina, Paraná, Brasil.

---

### RESUMO

Considerando os efeitos benéficos e não invasivos do laser como terapia, a possibilidade de utilização do mesmo em pacientes com câncer seria de grande interesse para área clínica. Porém, a literatura disponível ainda é escassa para a definição dos parâmetros dosimétricos ideais da fotobiomodulação (FBM) em células cancerígenas, e ao considerar o uso da terapia como tratamento bioinibitório nesse tipo celular são necessários mais estudos para elucidar os principais fatores responsáveis pelos diferentes comportamentos nessas células, visto que em parâmetros específicos essa terapia pode promover a bioestimulação ou até mesmo a inibição celular, devendo ser usada com cautela na prática clínica, evitando aumentar o tecido canceroso existente.

**Palavras-chave:** Fotobiomodulação (FBM). Câncer. Bioestimulação. Terapia bioinibitória.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública mundial, caracterizado pela proliferação descontrolada de um grupo de células dentro do corpo, sendo uma das principais causas de morbimortalidade em muitas partes do mundo. (1)

De acordo com as estimativas de Fitzmaurice et al. (2), em 2015 foram pelo menos 17,5 milhões de casos de câncer no mundo, com pelo menos 8,7 milhões de mortes e segundo a Organização Mundial de Saúde esse número chegará a 21 milhões até 2030. (3)

Essa doença apresenta múltiplas causas, podendo ser desencadeada por fatores etiológicos, tais como, idade, alterações endócrinas e genética. (4,5) e vários fatores de risco que predispõem à doença, sendo que 90% dos casos estão relacionados aos fatores ambientais.

Quando se trata do tratamento antineoplásico, novas terapias menos invasivas vem sendo investigadas e gerando grande interesse na área da saúde, buscando melhor prognóstico e menos efeitos colaterais. Uma das terapias atuais sob investigação é a Fotobiomodulação (FBM) (6). Essa terapia também vem sendo sugerida em casos de sequelas do tratamento antineoplásico, como em caso de osteonecrose associada aos bisfosfonatos. (7,8)

No entanto, há controvérsias quanto ao uso da FBM durante o processo neoplásico. Alguns estudos mostram que essa terapia pode favorecer um aumento da proliferação e diferenciação celular, já que a mesma apresenta efeitos biomoduladores significantes, sendo uma forma de terapia contraindicada em regiões com a presença de tumores (9). Contudo, é sabido que esse processo vai depender dos parâmetros que serão aplicados (10).

Apesar de os estudos não serem conclusivos, a literatura mostra que existe uma tendência de que doses mais altas levam a morte das células tumorais (11). Porém, nesse contexto, ao utilizar a FBM em doses elevadas, enquanto alguns autores demonstraram que a mesma poderá inibir o processo de reparo tecidual (4), causando efeitos agressivos a nível celular, outros estudos tem demonstrado resultados satisfatórios no processo de reparação. (9,12).

Há uma escassez de evidências sobre os efeitos da FBM em condições de malignidade, tanto com relação aos parâmetros a serem utilizados, quanto em relação aos mecanismos biológicos resultantes da irradiação a nível celular (13). Considerando os efeitos benéficos e não invasivos do laser como terapia, a possibilidade de utilização do mesmo em pacientes com câncer seria de grande interesse para área clínica, podendo ser utilizada como coadjuvante no tratamento de pacientes oncológicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

Entende-se por câncer uma doença que tem como característica a proliferação descontrolada de um grupo de células dentro do corpo, muito mais rápido que o das células normais (4,14). Essas células atacam tecidos e órgãos, dividindo-se rapidamente tendo uma tendência a serem muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. (15)

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países (1). É uma doença de causas múltiplas, podendo ser causado por fatores como idade, alterações endócrinas e genética. (18,19). Adicionalmente, vários fatores de risco, predisõem à doença, sendo que 90% dos casos estão relacionados aos fatores ambientais, aqueles que podem ser modificados por alterações de comportamento e hábitos de vida, tais como: exposição às radiações e produtos químicos, tabagismo, etilismo, dieta inadequada, obesidade e inatividade física. (5,16,17)

Quando assume a forma avançada, o câncer pode evoluir para a condição de impossibilidade de cura, com presença de sinais e sintomas pouco controláveis como dor, fadiga, náuseas, vômitos, anorexia, ansiedade, depressão, entre outros. As manifestações podem estar relacionadas à invasão tumoral, como também aos efeitos adversos do tratamento que está sendo realizado, causando intenso desconforto ao paciente e um impacto negativo na qualidade de vida. Diante disso, os cuidados prestados ao paciente com câncer deixam de ser curativos e passam a ser paliativos. (20)

Essa doença é considerada um problema de saúde pública mundial com alta de 20% de incidência na última década (21). Na maioria das vezes o diagnóstico de câncer é interpretado como uma doença de estigma negativo considerado como sinônimo de sofrimento e morte (22) e essa imagem que a doença transmite é consequência do seu impacto na vida do paciente, uma vez que há comprometimento nos aspectos físicos, psicológicos, sociais, econômicos e espirituais. (22,23)

Atualmente o câncer é a segunda principal causa de mortalidade em países desenvolvidos e, em poucas décadas, se tornará a principal causa de morbimortalidades nas regiões mais pobres do planeta (17). Destaca-se dentre as doenças crônicas não transmissíveis, alcançando patamares alarmantes, sendo considerado um problema de saúde pública mundial. (25)

Segundo pesquisas da Organização Mundial da Saúde, em 2030 o câncer vai alcançar aproximadamente, em todo o mundo, 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de óbitos e 75 milhões de pessoas com diagnóstico anual, com 50% dos casos sendo metastáticos (26). No Brasil, dados estatísticos disponibilizados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), 2020 mostraram uma incidência de cerca de 626 mil novos casos de câncer, revelando, desta forma, a magnitude do problema no país. (5,20,25)

Apesar de ser crescente o número de indivíduos diagnosticados, acredita-se que 1/3 dos casos são evitáveis. Dessa forma, há a necessidade da incorporação de novos hábitos ao estilo de vida para que as defesas orgânicas possam estar aptas para o combate contra as células mutadas e capazes de desenvolver uma massa tumoral. (27)

Nesse sentido, parece urgente a implantação de políticas públicas de saúde direcionadas às populações mais afetadas, associadas à diminuição das iniquidades sociais e de acesso à prevenção primária, ao diagnóstico precoce e a tratamentos no intuito de reduzir as disparidades na mortalidade por câncer no Brasil. (17)

### 2.1.1 Osteossarcoma

Osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno primário, origina-se de células-tronco mesenquimais, caracterizado pela alta taxa de metástase (36), alta mortalidade e alta taxa de incapacidade (29). Origina-se do tecido mesenquimal e adquire características de forte metástase precoce, que estão associadas a um mau prognóstico. (30)

Dados epidemiológicos apontam que a sua incidência é de 30% dos casos de tumor ósseo na Irlanda, enquanto nos Estados Unidos é de, aproximadamente, 1.7 casos por milhões de habitantes por ano, representando 600 a 900 novos casos anualmente. No Brasil, acredita-se que a incidência seja de, aproximadamente, 400 a 600 novos casos por ano. (31)

A doença tem uma incidência bimodal, afetando predominantemente crianças e adolescentes (osteossarcomas primários) (32) durante o período de maior crescimento, com um segundo pico de incidência em adultos com mais de 65 anos (osteossarcomas secundários), (33,34) no qual, os homens são afetados com maior frequência do que as mulheres, em proporção de 1,6:1.

Quanto a sua etiologia, estudos apontam que a origem do osteossarcoma ainda não está clara, no entanto, sabe-se que certos fatores ambientais, como irradiação e condições hereditárias, como síndrome de Li-Fraumeni, retinoblastoma familiar e síndrome de Rothmund-Thomson, estão associados a mutações germinativas nos genes TP53, RB1 e RECQL4, respectivamente, que predispõe ao osteossarcoma. (35)

O tumor pode acometer qualquer osso, mas geralmente situa-se nas regiões metafisárias dos ossos longos. A região distal do fêmur e proximal da tíbia e do úmero são as localizações comprometidas com maior frequência. Mais de 50% dos casos ocorrem perto do joelho. (36)

A apresentação típica inclui o aparecimento de dor e expansão do osso afetado e uma característica marcante da dor é que ela é suficientemente intensa para acordar o paciente do sono. Ocasionalmente, os pacientes apresentarão com o início de dor intensa ou outros sinais associados a uma fratura patológica. Aproximadamente 15% a 20% dos pacientes terão metástases clinicamente

detectáveis e mais de 85% da doença metastática ocorre no pulmão, o local mais comum de metástase. (32)

Um estudo realizado por Mirabello et al. (28) mostrou que a metástase do osteossarcoma é uma das principais causas de falha no tratamento e morte de pacientes. O mecanismo de metástase dos tumores malignos é que as células tumorais que se desprendem da lesão entram no sistema sanguíneo ou linfático e na circulação do corpo e proliferam e formam foco metastático nos órgãos metastáticos, o que é basicamente consistente com o mecanismo de osteossarcoma metastático. (29)

Tradicionalmente, o padrão ouro para malignidades ósseas primárias localizadas em extremidades tem sido a amputação (32). Nas últimas décadas, a terapia mudou para o resgate de membros com função local intacta, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. (37)

Sendo assim, o tratamento padrão atual do osteossarcoma consiste em cirurgia associada à quimioterapia (38), levando a uma sobrevida de 70% em 5 anos em pacientes com doença não metastática. No entanto, a sobrevida em 5 anos de pacientes com doença metastática é de cerca de 20%, enfatizando a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (34). No entanto, a eficácia dessas estratégias terapêuticas é limitada e algumas delas podem causar complicações graves e efeitos adversos.

Nos últimos anos, evidências científicas sobre a FBM vêm apontando uma melhor compreensão quanto aos seus efeitos, e pesquisadores e clínicos começaram a investigar seu uso em aplicações cada vez mais inovadoras. Entre essas novas abordagens clínicas estão sua aplicação para reparar o tecido ósseo danificado e seu lugar na oncologia como tratamento coadjuvante, diminuindo ou até mesmo levando a morte das células cancerígenas. (11)

### **2.1.2 Células Cancerígenas**

Acredita-se que as células cancerígenas sejam células normais alteradas, formadas por transformação celular (39) e elas se diferem das células saudáveis devido a uma infinidade de alterações moleculares (40,41), muitas das quais podem estar mecanicamente ligadas à reprogramação metabólica.

Essas células apresentam algumas características especiais, como capacidade ilimitada de proliferação, perda de resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão de apoptose (morte celular programada), capacidade de invadir outros tecidos (metástases), produção de novos vasos sanguíneos (angiogênese), (42) capacidade de produzir um número maior de espécies reativas de oxigênio e maior dependência de um sistema de defesa antioxidante. (43)

Quanto ao desenvolvimento de uma célula cancerígena, inicialmente a célula é estimulada, seja por um hormônio ou fator de crescimento, e o seu processo de divisão deixa de ser normal e passa a ser permanente. Em seguida, os "freios de segurança" que impedem a divisão excessiva das células

devem ser eliminados e esses freios são controlados por dois genes principais: RB1 e TP53, também conhecido como P53. Quando esses genes são mutados, evitam a apoptose, permitindo assim a formação de uma massa tumoral. A realização dessas mudanças é suficiente para as células se tornarem cancerígenas. (4)

A inativação do *RB1* é relatada em 20-40% dos casos esporádicos de osteossarcoma e está associada a um desfecho ruim da doença. Sua inativação também tem sido associada a anormalidades de diferenciação celular, morte celular, angiogênese, metástase e senescência (44). Os mutantes do *TP53* perdem a capacidade de inibir o crescimento das células, ganham a capacidade de proliferar e transformar e possivelmente levar a malignidade.

Nakase et al.(45) transfectaram o gene P53 em células de osteossarcoma *in vitro* e *in vivo*, o que aparentemente leva ao estabelecimento de crescimento tumoral. No entanto, as funções destes mutantes do gene P53 em diferentes linhas celulares de osteossarcoma não são completamente consistentes e é necessária uma investigação adicional.

### 2.3 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O termo Laser - *Light Amplification By Stimulated Emission of Radiation* (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação) (46) foi descrito inicialmente por Albert Einstein em 1917, de forma teórica, mas apenas em 1960 Theodore H. Maiman anunciou o seu funcionamento com fins terapêuticos (47), sendo aplicado clinicamente para a cicatrização de feridas, alívio da dor, inflamação e várias condições ortopédicas. (48)

Em 1967, o Dr. Endre Mester foi o primeiro cientista a descobrir que um laser de baixa potência tinha um efeito estimulante no crescimento de cabelos em camundongos e desde então, o laser de baixa potência tem sido aplicado em várias condições para aumentar a função fisiológica em humanos e animais. (49)

A radiação é caracterizada por ondas eletromagnéticas, visíveis ou invisíveis, no qual a energia aplicada efetua um trabalho na área tecidual a ser tratada. Apresenta como finalidade a fotoativação de mecanismos celulares que auxiliam na reabilitação de áreas lesadas. (50)

Dentre todos os tipos de laser de baixa potência existentes, os dispositivos mais comumente relatados são: laser de gás hélio-neônio (HeNe), arseneto de gálio (GaAs), granada de ítrio e alumínio (YAG), arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), laser diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo (AlGaInP). (51)

Essa radiação possui características únicas, tais como, coerência: deslocamento ordenado das ondas em relação ao tempo com as suas amplitudes iguais; colimação: os fótons caminham paralelamente, deslocando em grandes distancias; e monocromaticidade: que se caracteriza por apresentar uma cor pura, sendo uma cor única. (52)

Atualmente, o termo FBM substituiu o antigo laser de baixa potência, e FBM foi introduzido como descritor no PUBMED em 2015 (49). Essa forma de irradiação tem ganhado grande destaque mundial na ciência da saúde devido à busca por formas menos invasivas de tratamento. Uma variedade de condições patológicas utilizando a FBM é descrita na literatura, tais como, a modulação de processo inflamatório, aceleração do processo de reparo tecidual, alívio de dor e tratamento de algumas desordens neurológicas. (54,61)

A FBM tornou-se um método muito utilizado na maioria dos países e vem sendo estudada mundialmente, uma das razões da sua popularidade está relacionada à sua ação menos invasiva, atérmica, indolor, de baixo custo (66) e com tempo de aplicabilidade inferior aos demais recursos fisioterapêuticos. (67)

Sendo assim, levando em consideração a sua eficácia e sua ação não invasiva, a FBM vem sendo estudada como uma opção de tratamento coadjuvante para o câncer. (49,68)

### 2.3.1 Dosimetria

Múltiplas variáveis afetam os efeitos terapêuticos clínicos da FBM, como comprimento de onda ( $\lambda$ ), densidade de energia (dE), densidade de potência (DP) e tempo de tratamento (53), pois quando aplicados expõe as células ou tecido tanto a um efeito bioestimulatório quanto bioinibitório. (6)

O comprimento de onda é considerado um parâmetro essencial para resultados benéficos da aplicação, pois ele determina a capacidade do laser de penetrar no tecido (54) e dependendo do comprimento de onda a luz pode ser classificada em visível ou vermelho (380 a 750nm) e invisível ou infravermelho (acima de 750nm) (55), apesar de ainda haver divergência na literatura quanto a esses valores. O que vale ressaltar é que quanto maior o comprimento de onda maior a profundidade de penetração da energia no tecido (54). De acordo com Huang et al.(56), comprimentos de onda na faixa de 700-1000 nm são mais frequentemente usados para tratar tecidos profundos por causa de sua penetração profunda.

Em relação à dispersão, a mesma é inversamente proporcional ao comprimento de onda, quanto maior o comprimento de onda, menor é a dispersão. (57)

A energia irradiada em Joule (J) corresponde à quantidade de energia empregada durante o tempo de tratamento. Outro fator importante é a densidade de energia, que é definida como a quantidade total de energia (J) pela área irradiada ( $\text{cm}^2$ ) (57), dada em Joule por centímetro quadrado ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ), que irá designar o tempo de irradiação e a sua potência, apresentada em Watts (W). (58,59)

Importante destacar que a energia não pode ser confundida com dose, pois pressupõe reciprocidade (a relação inversa entre poder e tempo). É calculado como: Energia (J) = Potência (W) x Tempo (s). Já a densidade de energia ou fluência é um descritor importante de dose, que assume uma

relação de reciprocidade entre irradiância e tempo, obtida conforme a seguinte equação:  $DE = \frac{P \times T}{A}$ . (82,83)

A potência (P) pode ser calculada pela seguinte equação:  $P = \frac{E}{T}$ , onde E= energia (dose) irradiada (em J) e T = tempo de irradiação (em s). A densidade de potência (DP) ou irradiância está relacionada à potência (W) por unidade de área (A) irradiada (em W/cm<sup>2</sup>), e pode ser calculada pela seguinte equação:  $DP = \frac{P}{A}$ . (60,61)

O conhecimento destes parâmetros citados é fundamental para estabelecer doses seguras e adequadas, de acordo com as características fisiológicas e objetivos de cada indivíduo.

Sabe-se que, se forem aplicados parâmetros incorretos, o tratamento provavelmente será ineficaz. Há uma curva de resposta à dose bifásica em que quando doses muito baixas ou muito altas (fluência (J/cm<sup>2</sup>), irradiância (mW/cm<sup>2</sup>), tempo de entrega ou número de repetições podem levar a nenhum efeito significativo ou, às vezes, a entrega excessiva de luz pode levar a efeitos inibitórios indesejados (62). A subdosagem resulta em resposta celular deficiente, mas a superdosagem pode, paradoxalmente, inibir a proliferação celular ou induzir a apoptose. (63)

### 2.3.2 Mecanismos de Ação da Fotobiomodulação

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* relatam os efeitos da FBM na proliferação celular, metabolismo, angiogênese, apoptose e inflamação (9,12,63) e que a FBM está correlacionada com a cicatrização acelerada de feridas devido à estimulação de processos celulares, como migração e diferenciação celular. Também é encontrado que a cadeia respiratória nas mitocôndrias é estimulada pela FBM, o que resulta em um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP) e, portanto, no aumento da síntese de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), Ácido Ribonucleico (RNA) e proteínas.

As mitocôndrias contêm cromóforos que absorvem fótons da FBM. O cromóforo primário que absorve a luz vermelha é a enzima citocromo c oxidase, o local de ação da FBM sendo o principal receptor e transdutor de fotossinal (63), está localizada na unidade IV da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na atividade de várias moléculas, como óxido nítrico, promove a produção de ATP, íons de cálcio, espécies reativas de oxigênio, e várias outras moléculas de sinalização. (71)

Quanto a produção de ATP, são promovidas devido aos elétrons estimulantes de FBM nos cromóforos e, em seguida, os portadores de elétrons como o cromóforo citocromo C oxidase, entregam esses elétrons aos seus aceitadores de elétrons finais, enquanto um gradiente de prótons é feito, além de criar um gradiente de prótons que aumenta a produção de ATP. (71)

Em relação as alterações mitocondriais que aumentam a liberação de espécies reativas de oxigênio, essa alteração é capaz de induzir alterações transcricionais e produção do fator nuclear-κB

(NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B induz proteínas anti-apoptóticas juntamente com a proliferação e migração celular. (63)

### 2.3.3 Ação da Fotobiomodulação em Células Tumorais

Os efeitos da FBM na proliferação e diferenciação celular foram investigados *in vitro* em diferentes linhas de células malignas e geraram dados conflitantes ao explorar uma ampla diversidade de parâmetros e linhas de células tumorais. (49,51)

Werneck et al.(94) descreveram que a célula tumoral possui deficiência nutricional, devido a sua intensa atividade metabólica, e por isso é suscetível á ação da FBM.

O mecanismo da FBM é baseado diretamente na aplicação de energia luminosa bioestimulatória às células. Os fotorreceptores celulares absorvem a luz, e podem transferi-la para as mitocôndrias para produzir ATP (73). Com o aumento da vasodilatação via síntese de ATP, o uso de oxigênio é aumentado e a atividade das enzimas citoplasmáticas com os ácidos nucleicos estimula a mitose celular, que da mesma forma pode induzir a resultados negativos, proliferando células cancerosas. (4)

De fato, estudos *in vitro* mostram que, dependendo dos parâmetros de luz e do tipo de célula, a pré-exposição à FBM pode modular a resposta citotóxica das células cancerígenas expostas à irradiação. (74)

O potencial proliferativo celular da irradiação tem atraído algumas especulações negativas de que isso também poderia aumentar o crescimento do tumor em doenças neoplásicas. (13)

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a FBM apresenta resultados biomoduladores sobre diferentes tipos celulares, caracterizados pelo aumento da viabilidade, expressão gênica e proteica por células submetidas à irradiação. (10,64)

A proliferação tanto de células normais quanto tumorais pode ser estimulada, e esse processo vai depender dos parâmetros do laser e da taxa de proliferação celular no momento da irradiação. Dependendo dos parâmetros utilizados, o uso da FBM durante esse processo neoplásico pode favorecer um aumento da proliferação e diferenciação celular, já que a mesma apresenta efeitos biomoduladores significantes, e isso não é um efeito desejável em neoplasias. (9)

Com o objetivo de elucidar o mecanismo biológico da proliferação celular, Sroka et al.(75) avaliaram o efeito da FBM em células de diferentes origens e diferentes graus de malignidade, comparando-as com células normais. Foi verificado um aumento do padrão mitótico em células benignas e malignas, após irradiação com doses no intervalo de 4 a 8 J/cm<sup>2</sup>. No entanto observou-se uma redução na taxa de proliferação celular quando a dose ultrapassava esse intervalo de energia, independente do comprimento de onda.

Carnevali, e colaboradores (76), demonstraram em seu estudo que células CHO K-1 cultivadas e irradiadas com laser de baixa intensidade (830 nm e 2 J/cm<sup>2</sup>) exibiram maior síntese de ATP e capacidade mitótica se submetidas ao estresse nutricional quando comparadas com células não-irradiadas do grupo controle.

Renno, e colaboradores (77) investigaram os efeitos da irradiação laser de 670, 780 e 830 nm na proliferação de células provenientes do osteossarcoma humano e verificaram que apenas a dose 10 J/cm<sup>2</sup> a 830 nm foi capaz de aumentar a proliferação de osteoblastos, enquanto as densidades de energia de 1, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup> a 780 nm diminuíram a proliferação. As células de osteossarcoma não foram afetadas pela irradiação com laser a 830 nm, enquanto o laser a 670 nm teve um efeito proliferativo leve.

Friego, e colaboradores (13) utilizaram células de melanoma murinho B16F10 para irradiação com o laser emitindo um comprimento de onda de 660 nm, potência de 50 mW e irradiância de 2,5 W/cm<sup>2</sup> nas densidades de energia 150 J/cm<sup>2</sup> e 1050 J/cm<sup>2</sup>, fracionando a energia entregue em 3 dias consecutivos, 9 J e 63 J respectivamente. Após realizarem o teste de exclusão com azul de tripan, não identificaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

Pinheiro, e colaboradores (78) realizaram um estudo analisando o efeito da FBM em células malignas *in vitro*. Em particular, eles estudaram células cancerígenas do tipo epitelial, expondo-as a irradiação nos comprimentos de onda de 635 e 670 nm. Eles descobriram que as células irradiadas (ambos os comprimentos de onda) proliferaram mais do que o grupo controle não irradiado. O grupo exposto a 670 nm proliferou mais do que o grupo a 635 nm. Os autores concluíram, portanto, que a exposição à luz do laser poderia aumentar significativamente a proliferação de células cancerígenas.

Uma revisão sistemática publicada recentemente por da Silva et al. (11), sugeriu que a FBM pode ser utilizada em lesões cancerígenas, a fim de diminuir a proliferação das células cancerígenas, dependendo dos parâmetros utilizados; no entanto, a falta de padronização dos protocolos de irradiação a laser para investigações não permite o estabelecimento de parâmetros ideais para esse fim, portanto, a FBM deve ser usado com cautela em pacientes com câncer até que mais estudos sejam realizados.

Dessa forma, torna-se importante a procura de uma melhor abordagem terapêutica para o osteossarcoma levando em consideração a necessidade de minimizar os efeitos adversos, diminuir a incidência das metástases, aumentar o tempo de sobrevivência e proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes, tendo em vista que dependendo da densidade de energia aplicada nessas células a FBM pode estimular a metástase, sendo uma forma de terapia contraindicada, pois irá acarretar no aumento da doença, ou pode inibir a proliferação celular, sendo considerada uma terapia favorável que pode ser utilizada como coadjuvante no tratamento de pacientes oncológicos.



### 3 CONCLUSÃO

A literatura disponível ainda é escassa para a definição dos parâmetros dosimétricos ideais da fotobiomodulação em células cancerígenas e ao considerar o uso da terapia como tratamento bioinibitório nesse tipo celular são necessários mais estudos para elucidar os principais fatores responsáveis pelos diferentes comportamentos nessas células, visto que em parâmetros específicos essa terapia pode promover a bioestimulação ou até mesmo a inibição celular devendo ser usada com cautela na prática clínica, evitando aumentar o tecido canceroso existente.



## REFERÊNCIAS

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.

Fitzmaurice C, Allen C, Barber R, Barregard L, Bhutta L, Brenner H. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability- Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2018;3(4):524–48.

Kara C, Selamet H, Gökmenoğlu C, Kara N. Low level laser therapy induces increased viability and proliferation in isolated cancer cells. *Cell Prolif*. 2018;51(2):1–6.

Kara C, Selamet H, Gökmenoğlu C, Kara N. Low level laser therapy induces increased viability and proliferation in isolated cancer cells. *Cell Prolif*. 2017;(November):1–6.

De Oliveira MM, Malta DC, Guauche H, de Moura L, Azevedo e Silva G. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: Dados da pesquisa nacional de saúde, 2013. *Rev Bras Epidemiol*. 2015;18:146–57.

Crous A, Abrahamse H. Low-Intensity Laser Irradiation at 636 nm Induces Increased Viability and Proliferation in Isolated Lung Cancer Stem Cells. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(11):525–32.

Akens MK, Wise-Milestone L, Won E, Schwock J, Yee AJM, Wilson BC, et al. In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on metastatic breast cancer cells pre-treated with zoledronic acid. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2014;11(3):426–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.04.002>

Basso FG, Turrioni APS, Soares DG, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer*. 2014;22(10):2741–8.

Renno ACM, McDonnell PA, Crovace MC, Zanotto ED, Laakso L. Effect of 830 nm Laser Phototherapy on Osteoblasts Grown In Vitro on Biosilicate® Scaffolds. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):131–3.

Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. *J Biomed Opt*. 2014;19(10):108002.

da Silva JL, Silva-de-Oliveira AFS, Andraus RAC, Maia LP. Effects of low level laser therapy in cancer cells—a systematic review of the literature. *Lasers Med Sci*. 2019;

Bashardoust Tajali S, MacDermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: A meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2010;5(1):1–10.

Frigo L, Luppi JSS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2009;9:1–8.

Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009;01(02):i–iv.



Balaspoulou A, Kokkinos P, Pagoulatos D, Plotas P, Makri OE, Georgakopoulos CD, et al. Symposium Recent advances and challenges in the management of retinoblastoma Globe - saving Treatments. *BMC Ophthalmol* [Internet]. 2017;17(1):1.

Maresso KC, Tsai KY, Brown PH, Lippman S, Hawk E, Sciences P, et al. Molecular Cancer Prevention: Current Status & Future. *CA Cancer J Clin*. 2016;65(5):345–83.

Ribeiro BI, do Céu CCÍ, Milagros BPM, de Souza LB. Desigualdades socioeconômicas e mortalidade por câncer: um estudo ecológico no Brasil. *Rev Bras em promoção da Saúde*. 2016;29(3):350–6.

Brenner DR, Brockton NT, Kotsopoulos J, Cotterchio M, Boucher BA, Courneya KS, et al. Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors. *Cancer Causes Control*. 2016;27(4):459–72.

Gurgel DC, Capistrano Junior VLM, Nogueira IC, Neto PP. Atividade física e câncer: intervenções nutricionais para um melhor prognóstico. *Motricidade*. 2018;14(1):398–404.

Freire MEM, da Costa SFG, de Lima RAG, Sawada NO. Health-related quality of life of patients with cancer in palliative care. *Texto e Context Enferm*. 2018;27(2):1–13.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr*. 2016;7(2):418–9.

Şengül MCB, Kaya V, Şen CA, Kaya K. Association between suicidal ideation and behavior, and depression, anxiety, and perceived social support in cancer patients. *Med Sci Monit*. 2014;20:329–36.

Souza MGG. O Olhar que Olha o Outro ... Um Estudo com Familiares de Pessoas em Quimioterapia Antineoplásica. *Rev Bras Cancerol*. 2008;54(1):31–41.

Catarina P. Sette; Cláudio G. Capitão. Efeito moderador do suporte social em pacientes oncológicos. 2018;19(2):265–77.

Guerra MR, Bustamante-Teixeira MT, Corrêa CSL, De Abreu DMX, Curado MP, Mooney M, et al. Magnitude e variação da carga da mortalidade por câncer no Brasil e Unidades da Federação, 1990 e 2015. *Rev Bras Epidemiol*. 2017;20(25000192049):102–15.

Petrellis MC, da Fonseca GAMD, de Barros Pinto A, Rosa FO, Maria DA, Shibli JA, et al. Laser-photobiomodulation on experimental cancer pain model in Walker Tumor-256. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2020;210(July):111979. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111979>

Gray JM, Rasanayagam S, Engel C, Rizzo J. State of the evidence 2017: An update on the connection between breast cancer and the environment. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*. 2017;16(1):1–61.

Mirabello L, Yeager M, Mai PL, Gastier-Foster JM, Gorlick R, Khanna C, et al. Germline TP53 Variants and Susceptibility to Osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(7):5–8.

Chen X, Zhang Y. Bmp-2 and mir-29c in osteosarcoma tissues on proliferation and invasion of osteosarcoma cells. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5389–94.



Xie C, Chen B, Wu B, Guo J, Cao Y. LncRNA TUG1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in osteosarcoma by regulating miR-212-3p/FOXA1 axis. *Biomed Pharmacother.* 2018;97(250):1645–53.

Tanaka MH, Penna V, Chung WUTU, Lopes A. ARTIGO ORIGINAL Tumores Malignos Primários dos Ossos. *Arq Cat Med.* 1994;26:18–21.

Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: Current treatment and a collaborative pathway to success. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):3029–35.

Tempelaere C, Biau D, Babinet A, Anract P. Osteosarcoma after the age of fifty: A clinicopathological study. *Eur J Surg Oncol.* 2019;45(7):1288–92.

Geary RL, Corrigan LR, Carney DN, Higgins MJ. Osteosarcoma and second malignant neoplasms: a case series. *Ir J Med Sci.* 2019;

Negri GL, Grande BM, Delaidelli A, El-Naggar A, Cochrane D, Lau CC, et al. Integrative genomic analysis of matched primary and metastatic pediatric osteosarcoma. *J Pathol.* 2019;

Cavalcante ETM, Oliveira LLP, Andrade LC, Vieira V da F, Galloti FCM. OSTEOSSARCOMA : INTERFERÊNCIA DA. 2020;87–93.

Carina V, Costa V, Sartori M, Bellavia D, Luca A De, Raimondi L, et al. Adjuvant biophysical therapies in osteosarcoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(3).

Ma J, Gao W, Gao J. sCLU as prognostic biomarker and therapeutic target in osteosarcoma. *Bioengineered.* 2019;10(1):229–39.

Dong QL, Xing XY. Cancer cells arise from bacteria. *Cancer Cell Int [Internet].* 2018;18(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0699-4>

Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(3):319–26.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell.* 2008;13(6):472–82.

Martinez MAR, Francisco G, Cabral LS, Ruiz IRG, Neto CF. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. *An Bras Dermatol.* 2006;81(5):405–19.

Li T, Copeland C, Le A. Glutamine Metabolism in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1311:17–38.

Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(9):671–82.

Nakase M, Inui M, Okumura K, Kamei T, Nakamura S, Tagawa T. P53 Gene Therapy of Human Osteocarcinoma Using a Transferrin-Modified Cationic Liposome. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(4):625–31.

Davidovich L. Os quanta de luz e a ótica quântica. *Rev Bras Ensino Fis.* 2015;37(4).



Bayat M, Viridi A, Rezaei F, Chien S. Comparison of the in vitro effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy on bony cells and stem cells. *Prog Biophys Mol Biol* [Internet]. 2018;133:36–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.11.001>

Hamblin MR, Nelson ST, Strahan JR. Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? *Photomed Laser Surg*. 2018;36(5):241–5.

Bensadoun RJ, Epstein JB, Nair RG, Barasch A, Raber-Durlacher JE, Migliorati C, et al. Safety and efficacy of photobiomodulation therapy in oncology: A systematic review. *Cancer Med*. 2020;(May):1–22.

Baxter D. Laserterapia de baixa intensidade. *Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências*. 2003. 171–186 p.

Zecha, Judith A. E. M., Raber-Durlacher, Judith E., Nair, Raj G., Epstein, Joel B., Sonis, Stephen T. Elad, Sharon, Hamblin, Michael R., Barach, Andrei, Migliorati, Cesar A., Milstein, Dan M. J., Genot, Marie-Thérèse, Lansaat, Liset, Brink, Ron van der, A and R-JB. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *HHS Public Access*. 2016;24(6).

Moskvin SV. Low-level laser therapy in Russia: History, science and practice. *J Lasers Med Sci* [Internet]. 2017;8(2):56–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.15171/jlms.2017.11>

Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol*. 2012;24(4):363–70.

Cheng W, Yao M, Sun K, Li W. Progress in Photobiomodulation for Bone Fractures: A Narrative Review. *Photobiomodulation, Photomedicine, Laser Surg*. 2020;38(5):260–71.

Catorze MG. Laser: Fundamentos e indicações em dermatologia. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 2009;37(1):5–27.

Huang Q, Ou YS, Tao Y, Yin H, Tu PH. Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide- $\alpha$  methyl ester-mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma MG-63 cells. *Apoptosis*. 2016 Jun 1;21(6):749–60.

Cavalcanti TM, de Almeida-Barros RQ, Catão de MHC de V, Feitosa APA, Lins RDAU. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. *An Bras Dermatol*. 2011;86(5):955–60.

Loreti EH, Pascoal VLW, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of laser therapy in the healing process: A literature review. *Photomed Laser Surg*. 2015;33(2):104–16.

Heckler MCT, Barberini DJ, Amorim RM. Low level laser therapy on cell cultures. *J Bras Ciência Anim*. 2014;7(14):541–65.

Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, et al. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers Surg Med*. 2007;39(6):543–50.

Enwemeka CS. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):387–93.

de Freitas L, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3):1–37.

Tam SY, Tam VCW, Ramkumar S, Khaw ML, Law HKW, Lee SWY. Review on the Cellular Mechanisms of Low-Level Laser Therapy Use in Oncology. *Front Oncol.* 2020;10(July).

Stein C, Fernandes RO, Miozzo AP, Coronel CC, Baroni BM, Belló-Klein A, et al. Acute Effects of Low-Level Laser Therapy on Patients' Functional Capacity in the Postoperative Period of Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Randomized, Crossover, Placebo-Controlled Trial. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(3):122–9.

De Oliveira P, Fernandes KR, Sperandio EF, Pastor FAC, Nonaka KO, Parizotto NA, et al. Comparação dos efeitos do laser de baixa potência e do ULTRASSOM de baixa intensidade associado ao Biosilicato® no processo de reparo ósseo em tíbias de ratos. *Rev Bras Ortop.* 2012;47(1):102–7.

Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):849–55.

Baxter GD, Liu L, Petrich S, Gisselman AS, Chapple C, Anders JJ, et al. Low level laser therapy (Photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. *BMC Cancer.* 2017;17(1):833.

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):237–49.

Djavid GE, Bigdeli B, Goliaei B, Nikoofar A, Hamblin MR, Hospital F, et al. *HHS Public Access.* 2018;10(12):1732–42.

Gomes Henriques AC, Ginani F, Oliveira RM, Keesen TSL, Galvão Barboza CA, Oliveira Rocha HA, et al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. *Lasers Med Sci.* 2014;29(4):1385–95.

Dompe C, Moncrieff L, Matys J, Grzech-Leśniak K, Kocherova I, Bryja A, et al. Photobiomodulation—underlying mechanism and clinical applications. *J Clin Med.* 2020;9(6):1–17.

Werneck CE, Barbosa Pinheiro AL, Tavares Pacheco MT, Pacheco Soares C, Freire De Castro JL. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: A spectroscopic in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(3):300–3.

Murayama H, Sadakane K, Yamanoha B, Kogure S. Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):87–93.

Ramos Silva C, Cabral FV, de Camargo CFM, Núñez SC, Mateus Yoshimura T, de Lima Luna AC, et al. Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. *J Biophotonics.* 2016;9(11–12):1157–66.

Sroka R, Schaffer M, Fuchs C, Pongratz T, Schrader-Reichard U, Busch M, et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers Surg Med.* 1999;25(3):263–71.

Carnevali CMM, Soares CP, Zângaro RA, Pinheiro ALB, Silva NS. Laser light prevents apoptosis on CHO K-1 cell line. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21(4):193–6.

Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(4):275–80.

Pinheiro ALB, Carneiro NS, Vieira AL de B, Brugnera AJ, Zanin FA, Barros RA, et al. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(1):23–6.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2004;1644(2–3):83–94.

Wang Q, Zhang L, Yuan X, Ou Y, Zhu X, Cheng Z, et al. The relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons. *PLoS One*. 2016;11(10):1–16.

Moazami-Goudarzi M, Farshdousti-Hagh M, Hoseinpour-Feizi A, Talebi M, Movassaghpour-Akbari AA, Shams-Asanjan K, et al. The acute lymphoblastic leukemia prognostic scoring whether it is possible by BCL-2, BAX gene promoter genotyping. *Casp J Intern Med*. 2016;7(2):105–13.

Sun M, Zhou C, Zeng H, Puebla-Osorio N, Damiani E, Chen J, et al. Hiporfin-mediated photodynamic therapy in preclinical treatment of osteosarcoma. *Photochem Photobiol*. 2015 May 1;91(3):533–44.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324–37.

Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018;285(3):416–31.

O’neill KL, Huang K, Zhang J, Chen Y, Luo X. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes Dev*. 2016;30(8):973–88.

Tossounian MA, Zhang B, Gout I. The writers, readers, and erasers in redox regulation of GAPDH. *Antioxidants*. 2020;9(12):1–21.

Zhong XY, Yuan XM, Xu YY, Yin M, Yan WW, Zou SW, et al. CARM1 Methylates GAPDH to Regulate Glucose Metabolism and Is Suppressed in Liver Cancer. *Cell Rep [Internet]*. 2018;24(12):3207–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.066>

Park JB, Park H, Son J, Ha SJ, Cho HS. Structural study of monomethyl fumarate-bound human gapdh. *Mol Cells*. 2019;42(8):597–603.

Jayaguru P, Mohr S. Nuclear GAPDH: Changing the fate of Müller cells in diabetes. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2011;4(1–2):34–41.

Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med*. 2015;12(1):10–22.

Tristan C. the diverse functions of GAPDH. 2012;23(2):317–23.

Jo HY, Kim Y, Park HW, Moon HE, Bae S, Kim J, et al. The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. *Exp Neurobiol*. 2015;24(3):235.



Artilheiro PP, Barbosa JLP, Fernandes KPS, Oliveira TS de, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular. *Fisioter em Mov.* 2012;25(1):21–9.

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. *Cell Viability Assays. Assay Guid Man.* 2004;

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.

McKinnon KM. Flow Cytometry Instrumentation – An Overview. *Curr Protoc Cytom.* 2019;87(1):1–16.

Todd RT, Braverman AL, Selmecki A. Flow Cytometry Analysis of Fungal Ploidy. *Curr Protoc Microbiol.* 2018;50(1):1–32.

Dominical V, Samsel L, McCoy JP. Masks in imaging flow cytometry. *Methods.* 2017;112:9–17.

Phinney DA, Cucci TL. Flow cytometry and phytoplankton. *Cytometry.* 1989;10(5):511–21.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp.* 2011;(50):3–6.

Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11):953–7.

VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 2008;44(5):619–26.

Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, et al. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- $\beta$ 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2013;28(2):543–50.

Lorenz TC. Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp.* 2012;(63):1–15.

Novais C, Pires-Alves M, Silva F. PCR em tempo real. *Rev Biotec Cienc Mov.* 2004;11:10–4.

Zhang C, Wang YQ, Jin G, Wu S, Cui J, Wang RF. Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-green quantitative polymerase chain reaction. *Oncol Lett.* 2017;14(5):6001–11.

Steibel JP, Poletto R, Coussens PM, Rosa GJM. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics.* 2009;94(2):146–52.

Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, De Souza PRE, De Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian J Microbiol.* 2009;40(1):1–11.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.



Qu R, Miao Y, Cui Y, Cao Y, Zhou Y, Tang X, et al. Selection of reference genes for the quantitative real-time PCR normalization of gene expression in *Isatis indigotica fortune*. *BMC Mol Biol*. 2019;20(1):1–12.