



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Programa de Pós-Graduação em Biociências

Luiz Philippe da Silva Sergio

**Avaliação da indução de lesões no DNA por
lasers terapêuticos de baixa potência**

Rio de Janeiro

2016

Luiz Philippe da Silva Sergio

**Avaliação da indução de lesões no DNA por
lasers terapêuticos de baixa potência**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biociências ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S484 Sérgio, Luiz Philippe da Silva.
Avaliação da indução de lesões no DNA por *lasers* terapêuticos de baixa potência. / Luiz Philippe da Silva Sérgio. – 2016.
95 f.

Orientador: Adenilson de Souza da Fonseca.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Laser - Teses. 2. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. 3. Expressão gênica - Teses. 4. Reparo do DNA - Teses. 5. Ensaio cometa. I. Fonseca, Adenilson de Souza da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.314

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Luiz Philippe da Silva Sergio

**Avaliação da indução de lesões no DNA por
lasers terapêuticos de baixa potência**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biociências ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de janeiro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof^o Dr. Adenilson de Souza da Fonseca (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof^a Dra. Flávia de Paoli
Universidade Federal Juiz de Fora

Prof. Andre Luiz Mencialha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que muito deram de si, para que eu alcançasse o meu sonho, possibilitando mais uma etapa no meu aperfeiçoamento. A minha irmã e aos meus amigos, pelos momentos de descontração durante este curso, dedicação e incentivo nos momentos difíceis. A todos os que sonham, porque é através dos sonhos que vivemos dia após dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus pelo dom da vida, pela proteção, fé e perseverança que me concedeu para vencer os obstáculos encontrados durante a pós-graduação, a Virgem Santíssima que se faz presente em minha vida.

À Celina Padilha Sergio (*in memoriam*) e Maria de Lourdes Barbosa da Silva (*in memoriam*), minhas queridas avós que tanto me ensinaram, acompanharam e me auxiliaram e ainda fazem nas tribulações do dia a dia.

Aos meus pais, Regina Helena da Silva e Luiz Carlos Padilha Sergio, pela orientação, dedicação e incentivo nessa fase do meu curso e durante toda minha vida demonstrando imenso respeito pelas minhas escolhas e sempre aptos a me auxiliar no que viesse a ser necessário, com conselhos, carinho e amor, além da minha irmã Carolina Jasmim de Moraes, em que nos momentos de desistência de minha parte, ela encontrava-se ao meu lado dando total apoio.

Aos meus amigos e familiares, principalmente Warley Batista Trancoso, Maria Regina Pombinho, Fabiane Aguiar Pereira, Fabianne Lemos Cardoso, Philipi Freitas Amorim, Keila da Silva Canuto e Solange Vicentini que pela dedicação, pelo companheirismo e presença constante, sempre entenderam minhas ausências e estiveram dispostos a me ouvir e confortar.

Em especial a Vera Maria Campos de Araújo que muito me auxiliou no desenvolver deste trabalho, além da dedicação e companheirismo.

Ao Professor Doutor Adenilson de Souza da Fonseca por acreditar em minha capacidade para executar a proposta de trabalho de mestrado, pela paciência e dedicação nas orientações do mesmo, e principalmente por estar sempre contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e profissional, participando mais do que um orientador, e sim um amigo, assim como a Professora Dr^a. Flávia de Paoli, o fez, e a qual foi fundamental também para meu desenvolvimento.

Agradeço também ao professor André Luiz Mencialha, pela sua contribuição importantíssima, no decorrer do trabalho, e o suporte da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

A todos o meu muito obrigado!

Se eu soubesse o que eu estava fazendo, não seria chamada pesquisa.

Albert Einstein

RESUMO

SERGIO, Luiz Philippe da Silva. **Avaliação da indução de lesões no DNA por lasers terapêuticos de baixa potência.** 2016. 95f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

Na medicina regenerativa há uma crescente utilização de *lasers* de baixa intensidade em protocolos terapêuticos para tratamento de doenças em tecidos moles e no tecido ósseo. *Lasers* emitem feixes de luz com características específicas, nas quais o comprimento de onda, a frequência, potência e modo de emissão são propriedades determinantes para as respostas fotofísica, fotoquímica e fotobiológica. Entretanto, sugere-se que *lasers* de baixa potência induzem a produção de radicais livres, que podem reagir com biomoléculas importantes, como o DNA. Essas reações podem causar lesões e induzir mecanismos de reparo do DNA para preservar a integridade do código genético e homeostase celular. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar lesões no DNA de células do sangue periférico de ratos *Wistar* e a expressão dos genes ERCC1 e ERCC2 em tecidos biológicos expostos a *lasers* de baixa intensidade em comprimentos de onda, fluências, potências e modos de emissão utilizados em protocolos terapêuticos. Para tal, amostras de sangue periférico foram expostas ao *laser* vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm) em diferentes fluências, potências e modos de emissão, e a indução de lesões no DNA foi avaliada através do ensaio cometa. Em outros experimentos, lesões no DNA foram analisadas através do ensaio cometa modificado, utilizando as enzimas de reparo: formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) e endonuclease III. Pele e músculo de ratos *Wistar* foram expostos aos *lasers* e amostras desses tecidos foram retiradas para extração de RNA, síntese de cDNA e avaliação da expressão dos genes por PCR quantitativo em tempo real. Os dados obtidos neste estudo sugeriram que a exposição aos *lasers* induz lesões no DNA dependendo da fluência, potência e modo de emissão, e que essas lesões são alvos da FPG e endonuclease III. A expressão relativa do RNAm de ERCC1 e de ERCC2 foi alterada nos tecidos expostos dependendo do comprimento de onda e fluência utilizada. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que danos oxidativos no DNA poderiam ser considerados para segurança do paciente e eficácia terapêutica, bem como alterações na expressão dos genes de reparo do DNA participariam dos efeitos de bioestimulação que justificam as aplicações terapêutica de *lasers* de baixa potência.

Palavras-chave: Bioestimulação. Ensaio cometa. Expressão gênica. Reparo de DNA. Lesões oxidativas. Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

SERGIO, Luiz Philippe da Silva. **Evaluation of DNA lesions induced by therapeutic low level lasers.** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

In regenerative medicine there is an increasing use of low level lasers in therapeutic protocols for treatment of diseases in soft tissues and the bone tissue. Lasers emit light beams with special properties, in which the wavelength, frequency, power and emission mode are properties which determine their photophysical, photochemical and photobiological responses. However, it is suggested that low level lasers induced the generation of free radicals which could react with important biomolecules, such as DNA. These reactions can result in damage and induce DNA repair mechanisms preserving the genetic code integrity and cell homeostasis. Therefore, the purpose of this study was to evaluate DNA damage in peripheral blood cells from *Wistar* rats and expression of *ERCC1* and *ERCC2* genes in biological tissues exposed to low level lasers at wavelengths, fluences, powers and emission modes used in therapeutic protocols. In order to achieve the aims, peripheral blood samples were exposed to red laser (660 nm) and infrared (808 nm) at different fluences, power and emission modes, and the induction of DNA damage was evaluated by comet assay. In other experiments, DNA damage was assessed by a modified comet assay utilizing the repair enzymes: formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) and endonuclease III. Skin and muscle from *Wistar* rats were exposed to lasers and samples from tissues were collected to RNA extraction, cDNA synthesis and gene expression evaluation by real-time PCR. Data from this study showed that exposure to lasers induces DNA damage depending on the fluence, power and emission mode, and that these damages are targeted by FPG and endonuclease III. *ERCC1* and *ERCC2* RNAm relative expression in exposed tissues was changed depending on the wavelength and fluences used. Results suggest that oxidative DNA damage could be considered for patient safety and therapeutic efficacy, as well as changes in the expression of DNA repair genes participate in effects of biostimulation justifying the therapeutic applications of low level lasers.

Keywords: Biostimulation. Comet assay. Gene expression. DNA repair. Oxidative lesion.

Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação do espectro eletromagnético.....	20
Figura 2 –	Esquema ilustrativo da emissão estimulada.....	22
Figura 3 –	Esquema ilustrativo da constituição do equipamento <i>laser</i>	24
Figura 4 –	Esquema ilustrativo da interação <i>laser</i> -tecido.....	29
Figura 5 –	Esquema de agentes que podem lesionar o DNA e exemplos de lesões induzidas por esses agentes.....	33
Figura 6 –	Modelo molecular do mecanismo de reparo por excisão de bases (REB) via curta (uma base lesionadas) e longa (até oito bases lesionadas).....	37
Figura 7 –	Modelo molecular geral do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN), enfatizando o papel de XPD-ERCC2 e XPF-ERCC1.....	39
Figura 8 –	Esquema da classificação indicativa das classes do ensaio cometa sugerido por Collins em 1995.....	44
Figura 9 –	Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes fluências, com potência de 100mW e modo contínuo de emissão.....	49
Figura 10 –	Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes potências, com fluência de 100J/cm ² e modo contínuo de emissão.....	50
Figura 11 –	Índice de Dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes modos de emissão, fluência em 100J/cm ² e potência de saída de 100mW.....	51
Figura 12 –	Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, fluência de 50J/cm ² , potência de saída de 100mW e modo contínuo....	53

Figura 13 – Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente. Fluência em 100J/cm ² e modo contínuo de emissão.....	54
Figura 14 – Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, nos modos contínuo e pulsado de emissão 100PPS, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente, fluência em 50J/cm ²	55
Figura 15 – Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, fluência em 50J/cm ² , potência de saída de 100mW e modo contínuo de emissão.....	57
Figura 16 – Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente. Fluência em 100J/cm ² e modo contínuo de emissão.....	58
Figura 17 – Índice de dano em células de sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> expostas aos <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, nos modos contínuo e pulsado de emissão 100PPS, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente, fluência em 50J/cm ²	59
Figura 18 – Expressão relativa do RNAm do gene ERCC1 em pele exposta a <i>lasers</i> vermelho e infravermelho de baixa potência no modo contínuo de emissão em diferentes fluências.....	61
Figura 19 – Expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 em pele exposta a <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, em modo contínuo de emissão com diferentes fluências.....	62
Figura 20 – Expressão relativa do RNAm do gene ERCC1 em músculo exposto a <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, em modo contínuo de emissão com diferentes fluências.....	63
Figura 21 – Expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 em músculo exposto a <i>lasers</i> de baixa potência, vermelho e infravermelho, em modo contínuo de emissão com diferentes fluências.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
ERCC1 -	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i> (reparo por excisão de complementação cruzada grupo 1)
ERCC2 –	<i>Excision repair cross-complementation group 2</i> (reparo por excisão de complementação cruzada grupo 2)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FPG	<i>formamido-pyrimidine-DNA-glycosylase</i> (formamidopirimidina DNA glycosilase)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
GGR	<i>Global genomic repair</i> (Reparo global do genoma)
ID	Índice de dano
<i>Laser</i>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
<i>Maser</i>	<i>Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase por Transcrição reversa)
REB	Reparo por excisão de base
REN	Reparo por excisão de nucleotídeo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
TCR	<i>Transcription coupled repair</i> (Reparo acoplado à transcrição)
XPD	Xeroderma pigmentoso proteína D
XPF	Xeroderma pigmentoso proteína F

LISTA DE SÍMBOLOS

mW	Miliwatts
nm	Nanômetros
W	Watt
s	segundo
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
λ	lâmbda / comprimento de onda
<	menor que
β	Beta
=	igual
g	grama
%	por cento
=	igual
h	hora
\pm	mais ou menos
°C	graus Celsius
mg	miligrama
kg	quilograma
pps	pulsos por segundo
μ M	micromolar
mM	milimolar
V	Volts
mA	miliAmpére
rpm	rotação por minuto
μ L	microlitro
mL	mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	<i>Laser</i>: definição e origem	19
1.2	Princípios e propriedades	21
1.2.1	<u>Emissão estimulada</u>	21
1.2.2	<u>Constituição do equipamento <i>laser</i></u>	23
1.2.3	<u>Propriedades da radiação <i>laser</i> e diferenciação de equipamentos</u>	24
1.3	<i>Laser</i> de baixa potência e suas aplicações em saúde	26
1.3.1	<u>Terapia</u>	26
1.3.2	<u>Parâmetros Associados</u>	26
1.4	Interações da radiação <i>laser</i> com tecidos biológicos	28
1.5	Mecanismos de ação e efeitos biológicos dos <i>lasers</i> de baixa potência	29
1.5.1	<u>Fotoceptores</u>	29
1.5.2	<u>Mecanismos de ação</u>	30
1.5.3	<u>Efeitos Terapêuticos</u>	31
1.6	<i>Lasers</i> e lesões no DNA	33
1.7	Radicais livres e dano no DNA	35
1.7.1	<u>Reparo por excisão de base</u>	36
1.7.2	<u>Reparo por excisão e nucleotídeos</u>	37
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivos gerais	41
2.2	Objetivos específicos	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	<i>Lasers</i> de baixa potência	42
3.2	Avaliação da indução de lesões no DNA de células sanguíneas nucleadas pelo ensaio cometa	42
3.2.1	<u>Reagentes</u>	42
3.2.2	<u>Animais</u>	43
3.2.3	<u>Obtenção de sangue e exposição à radiação <i>laser</i></u>	43
3.2.4	<u>Ensaio cometa</u>	43

3.3	Avaliação da expressão de RNAs mensageiros.....	45
3.3.1	<u>Reagentes.....</u>	45
3.3.2	<u>Procedimento experimental e parâmetros do tratamento.....</u>	45
3.3.3	<u>Extração de RNA total</u>	45
3.3.4	<u>Síntese de cDNA.....</u>	46
3.4	Análises das imagens.....	47
3.5	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Avaliação da indução de lesões no DNA de células sanguíneas nucleadas pelo ensaio cometa.....	48
4.2	Ação de enzimas de reparo do DNA de células sanguíneas expostas aos lasers vermelho (660nm) e infravermelho (808nm) de baixa potência	52
4.3	Efeitos da exposição a lasers de baixa potência na expressão de DNA mensageiro ERCC1 e ERCC2 em tecido pele.....	60
4.4	Efeitos da exposição a lasers de baixa potência na expressão de RNA mensageiro ERCC1 e ERCC2 em tecido muscular.....	62
5	DISCUSSÃO	65
5.1	Lesões no DNA de células sanguíneas de ratos <i>Wistar</i>.....	65
5.2	Expressão de RNA mensageiro de reparo de DNA.....	69
	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICE A – DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers.....	84
	APÊNDICE B – Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue.....	92

INTRODUÇÃO

Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (*laser*) é obtida por meio de dispositivos que emitem um feixe de luz com características específicas, tais como ser colimado, monocromático, coerente e alta densidade de energia (O'SHEA et al., 1977). O equipamento *laser* é constituído por uma cavidade óptica contendo dois espelhos, sendo um semireflexivo, e internamente à cavidade, há um meio, que estimulado se torna ativo e emite radiação (YOUNG, 1998; SVELTO & HANNA, 1998). O comprimento de onda (ou frequência), potência (baixa, média a alta), fluência (poucos a muitos Joules/cm²) e o modo de emissão (contínuo ou pulsado), além de caracterizar os *lasers* (NIEMZ, 2007), também são determinantes para as respostas fotofísica, fotoquímica e fotobiológica (KARU, 2003).

Os *lasers* de baixa potência têm sido utilizados na área da saúde há mais de 4 décadas, e a observação das respostas acima mencionadas levaram à utilização destes equipamentos na área da saúde, na qual, uma série de relatos clínicos positivos estão vinculados a sua capacidade para induzir efeitos de estimulação ou modulação em tecidos biológicos (BECKMANN et al., 2014). Na chamada medicina regenerativa, *lasers* de baixa potência, com potências abaixo de 100 mW, têm sido utilizados em diferentes protocolos terapêuticos, para tratamento de doenças em tecidos moles e em tecido ósseo, como para o tratamento da hipersensibilidade dentinária (YILMAZ et al., 2011), herpes labial (EDUARDO et al., 2012), dor (SLOGASTRA, et al., 2011), processos inflamatórios (PEPLOW et al., 2010) e regeneração de tecidos (KARU, 1999; DOGAN et al., 2014; JESUS et al., 2014; BECKMANN et al., 2014).

Tais aplicações terapêuticas são explicadas pelo efeito de bioestimulação ou biomodulação (PEPLOW et al., 2011). No entanto, não há consenso sobre a fluência (ou dose), potência e frequência, nem no modo de emissão do feixe de *laser* utilizado (contínuo ou pulsado), tal que a dosimetria nos protocolos clínicos ainda não é bem estabelecida.

Para que o efeito bioestimulativo ocorra, reações bioquímicas são induzidas (ou modificadas) após a energia da radiação *laser* ser absorvida por cromóforos endógenos, tais como a citocromo c oxidase em células de mamíferos e citocromo bd em células procariontas (KARU, 1999; PEPLOW et al., 2010). Estas reações constituem vias de transdução de sinais envolvidas na transformação do fotosinal primário em uma resposta biológica, envolvendo o

aumento da produção de ATP (adenosina trifosfato), DNA (ácido desoxirribonucléico), RNA (ácido ribonucléico) e síntese de proteínas (KARU, 2003), que por sua vez constitui a base da bioestimulação induzida por *laser* em tecidos biológicos (PEPLOW et al., 2011).

Nos efeitos observados, após exposição ao *laser*, tem sido sugerido que ocorra a participação de radicais livres em vias de transdução de sinal (VLADMIROV et al., 2004; MIGLIARIO et al., 2014), que induzem a proliferação celular, por exemplo (MIGLIARIO et al., 2014). Os radicais livres foram sugeridos atuar como segundo mensageiros em processos de sinalização celular específicos, além de alterarem a expressão gênica (BARZILAI & YAMAMOTO, 2004). Contudo, os radicais livres induzidos por estes *lasers* de baixa potência podem reagir com macromoléculas intracelulares, incluindo o DNA e os lipídios de membrana (KIM, 2002; FONSECA et al., 2010; FONSECA et al., 2012a; MARCIANO et al., 2012), alterando suas funções em um nível sub-letal (MARNETT, 2000; KIM, 2002; SLUPPHAUG et al., 2003; FONSECA et al., 2010). Entretanto, a produção de radicais livres induzidos por *lasers* é ainda controversa e há poucos dados experimentais sobre os seus efeitos biológicos secundários, especialmente na molécula de DNA.

O ensaio cometa é uma técnica experimental sensível, viável e de rápida realização que permite avaliar lesões no DNA induzidas por agentes físicos e químicos (LIAO et al., 2009). Proposto pelo Ostling e Johanson (1984), esta técnica é utilizada com sucesso para quantificar e qualificar lesões no DNA em células intactas, classificando-os como cometas em 5 classes diferentes (COLLINS, 1995).

Lesões no DNA induzem mecanismos estratégicos de reparo, que preservam o código e a integridade genética, assim como a homeostase celular (FRIEDBERG et al., 2006). Essas estratégias incluem as vias de reparo por excisão de bases e de reparo por excisão de nucleotídeos.

A expressão dos genes relacionados com as vias de reparo pode ser quantificada a partir da técnica de RT-qPCR (*real time quantitative polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real), que tem sido amplamente aceita e utilizada (POSTOLLEC et al., 2011). Esta técnica é considerada de alta precisão, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade na análise dos transcritos, sendo este o método mais comum para a caracterização de padrões da expressão gênica, podendo quantificar a expressão de RNAs mensageiros até mesmo em baixo nível e permitindo a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação (GINZIGER, 2002).

O reparo por excisão de bases (REB) atua em quebras simples da fita do DNA, em bases oxidadas e alguns adutos (KLUNGLAND & BJELLAND, 2007; PATRONO et al., 2014), causados pela reação entre radicais livres (endógenos ou exógenos) e o DNA (MITRA et al., 1997). Dados prévios demonstraram que a expressão de genes relacionados ao reparo por excisão de bases é alterada em tecidos biológicos expostos ao *laser* vermelho (TRAJANO et al., 2014) e a *lasers* infravermelhos de baixa potência (FONSECA et al., 2013a; FONSECA et al., 2014a).

O reparo por excisão de bases (REB) se inicia com a detecção e a remoção de uma base danificada, geralmente desaminada, alquilada, oxidada ou ausente, através de uma proteína com ação enzimática específica, uma DNA glicosilase (SLUPPHAUG et al., 2003). Estas enzimas podem ser monofuncionais ou bifuncionais, removendo uma única base ou além de remover a base danificada, também clivam o sítio da lesão criando um sítio apurínico/apirimidínico (sítio AP) para que, na fase seguinte, outra base nitrogenada possa ser inserida. Caso a DNA glicosilase seja monofuncional, outra endonuclease fará essa incisão no sítio da base removida, como a endonuclease III (SLUPPHAUG et al., 2003). Na etapa seguinte ocorre a inserção de uma nova base nitrogenada através de uma DNA polimerase e, por fim, a fita do DNA é selada pela ação de uma DNA ligase (KLUNGLAND & BJELLAND, 2007).

Uma das lesões oxidativas mais estáveis e mutagênicas, a 8-oxoguanina, pode parear tanto com a citosina como com a adenina, resultando numa transversão, que deve ser removida pelo produto do gene FPG (formamidopirimidina DNA glicosilase, também conhecida como proteína MUTM), uma DNA glicosilase que remove a base errônea em *Escherichia coli*. Em humanos, o gene OGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilase) é funcionalmente equivalente à enzima FPG (DAVID et al., 2007).

O reparo por excisão de nucleotídeos (REN) é uma via de reparo do DNA inicialmente descrita como responsável pelo reparo de dímeros de pirimidina induzidos pela radiação ultravioleta (KLUNGLAND & BJELLAND, 2007). Mais recentemente, foi demonstrado que o REN também pode atuar em alguns danos oxidativos no DNA (MELIS et al., 2013). O REN é dependente da ação da RNA polimerase II, quando o reparo for acoplado à transcrição (MELLON et al., 1986). Este mecanismo de reparo do DNA pode ser independente da RNA polimerase II removendo lesões localizadas em qualquer parte do genoma (COSTA et al., 2003). Outras proteínas participam do REN, como o complexo ERCC1 (reparo por excisão de

trans-complementação do grupo 1) e ERCC2 (reparo por excisão de trans-complementação do grupo 2) (MAILLARD et al., 2007; SHUCK et al., 2008). O produto do gene ERCC2 está associado com o desenrolamento do DNA, quando o seu produto (proteína XPD) é expressa (BERNARD-GALLON et al., 2008). A proteína XPD atua no processo como helicase temporária lançando-se sobre a dupla hélice do DNA para encontrar lesões causadas por radicais livres (FRIEDBERG, 2001), com subsequente remoção da lesão (BOWDEN, 2014).

A remoção da lesão é realizada por um heterodímero constituído por proteínas ERCC1/XPF (MITCHEL et al., 2003). Este heterodímero executa um incisão 5' na cadeia do DNA no local da lesão, após todos os outros passos terem sido realizados, e, por conseguinte, ter sido concluída (SANCAR & READORN, 2004). Em seguida, ocorre a síntese de reparo do DNA, que é realizada por polimerases do DNA utilizando a cadeia oposta intacta como molde (FOUSTERI & MULLENDERS, 2008; BOWDEN, 2014). A ligação dos fragmentos de DNA recém-sintetizados com a cadeia de DNA é efetuada pela DNA ligase (PETRUSEVA et al., 2014).

Assim, a avaliação da participação de vias de reparo por excisão de bases e da via de reparo por excisão de nucleotídeos poderia fornecer informações importantes sobre a conservação do código genético e a estabilidade genômica em sistemas biológicos expostos a *lasers* de baixa potência. A indução de lesões no DNA poderia ser considerada quando da escolha das fluências utilizadas em protocolos terapêuticos e a estabilidade genômica poderia fazer parte do conjunto de alterações moleculares que levam à bioestimulação induzida por *lasers* de baixa potência em tecidos biológicos.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Laser: definição e origem

Desde antigas civilizações, como a Egípcia e a Grega, a luz era cultuada através do culto aos deuses Rá e Apolo, cada um conhecido como Deus Sol pela sua civilização. A luz era utilizada e considerada para tratamento e prevenção de enfermidades. Hipócrates (460a.C.–377a.C.) defendia a luz e a água como os geradores de mais saúde, já Celsus recomendava banho de sol para tratamento de doenças ósseas (BLOCH, 1990).

Bloch (1990) também cita que as primeiras investigações científicas sobre a terapia com luz foi proposta por Niels Finsen Ryberg (1860-1904), que observou que as lesões de varíolas na pele de pessoas expostas ao Sol cicatrizavam mais rapidamente e permaneciam cobertas. A partir de então os focos dos trabalhos se direcionaram para a luz ultravioleta.

Entretanto, uma nova perspectiva foi apresentada com os postulados de Albert Einstein em 1917, que abordavam os conceitos sobre emissão estimulada de luz. Seu artigo, intitulado “*Zur Quantum Theories der Strahlung*”, levou ao desenvolvimento, por Townes e colaboradores em 1952, de um equipamento que emitia radiação monocromática e coerente em feixes colimados e com alta densidade de energia.

Em 1953, Joseph Weber desenvolveu um equipamento capaz de amplificar microondas por estimulação por radiação, o *Maser* ou “*(M)icrowave (A)mplification by (S)timulated (E)mission of (R)adiation*”, que tornou possível mais tarde o desenvolvimento de um novo equipamento, chamado *Laser*.

Theodore Maiman direcionou seus estudos aos princípios estudados por Weber, o que possibilitou a construção do *laser* em 1960, que continha uma barra de cristal de rubi como meio emissor, capaz de emitir em 694,3 nm (BERTOLOTTI, 1983; PRENTICE, 2014).

O termo *laser* é um acrônimo para “*(L)ight (A)mplification by (S)timulated (E)mission of (R)adiation*”, ou seja, amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação (SVELTO & HANNA, 1998).

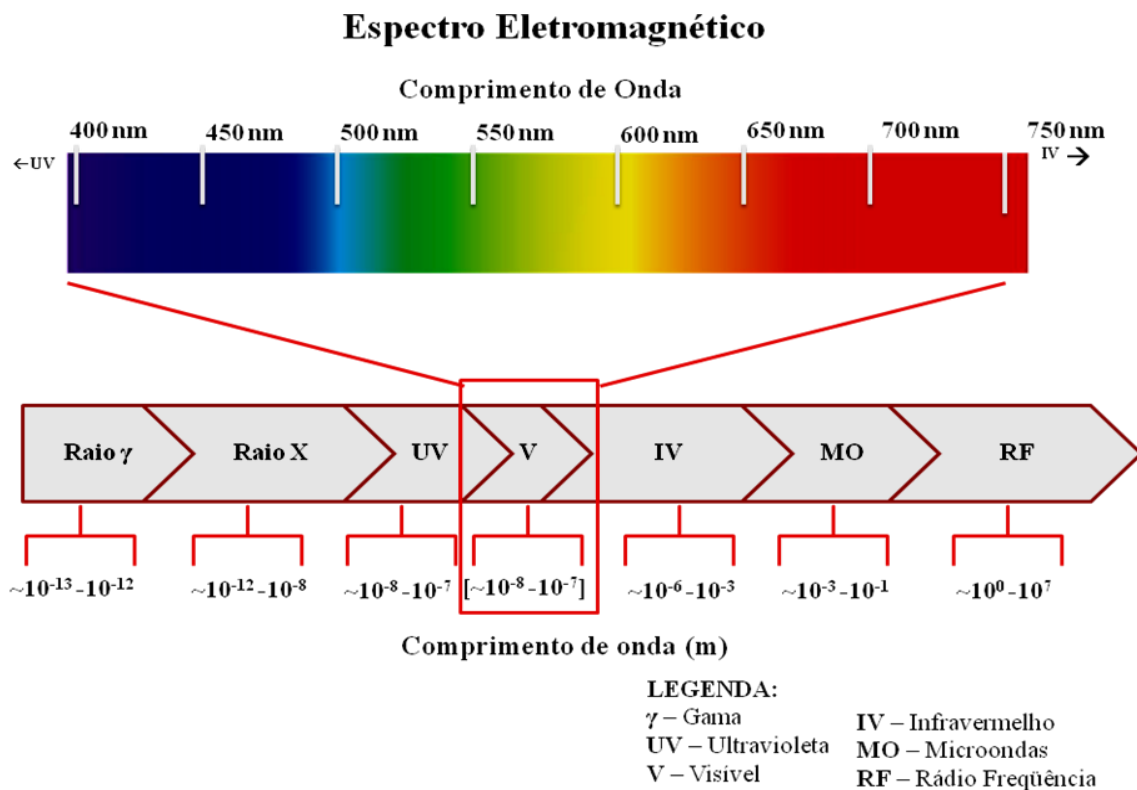
Seis anos mais tarde, Basov e Prokhorov, ambos na União Soviética, juntos de Townes receberam o prêmio Nobel de Física pelos progressos no desenvolvimento dos *lasers*, fato

esse que marca a Rússia como país de intensa pesquisa sobre esses equipamentos (ALMEIDA-LOPES, 2001).

O *laser* se enquadra em um tipo de fonte de radiação eletromagnética que apresenta características únicas por emitir feixes de radiação eletromagnética com características especiais (monocromática, coerente, colimada e de alta densidade de energia), tornando-o um instrumento de uso científico e tecnológico de grande importância.

As ondas eletromagnéticas são organizadas de acordo com a frequência e o comprimento de onda. Essa organização é conhecida como “Espectro Eletromagnético” (figura 1) (BAXTER et al., 1994), e nele as radiações emitidas pelos *lasers* terapêuticos de baixa potência estão localizadas em bandas espectrais extremamente estreitas, que se estende da radiação visível à infravermelha próxima.

Figura 1 - Representação do espectro eletromagnético



1.2 Princípios e propriedades

1.2.1 Emissão estimulada

Para descrever o fenômeno de emissão estimulada, torna-se necessário comentar resumidamente sobre a emissão espontânea e a absorção.

Um átomo no estado fundamental, tende a permanecer neste estado até que seja fornecida energia por uma fonte externa. Se uma radiação (fótons) ressonante incide sobre a matéria que contenha átomos num estado energético menor, há possibilidade que estes átomos mudem para o estado de maior energia (excitado), se a energia do fóton for transferida para os mesmos. Este é o processo de absorção da energia eletromagnética.

Átomos excitados (com excesso de energia) tendem a decair para o estado fundamental e, neste processo, emitem radiação (fótons) de forma espontânea. Na emissão espontânea, ao realizar essa transição, o excesso de energia (obtida num processo de absorção de energia) pode ser devolvida na forma de fótons. Estes fótons são emitidos em todas as direções e sem relação de fase entre si.

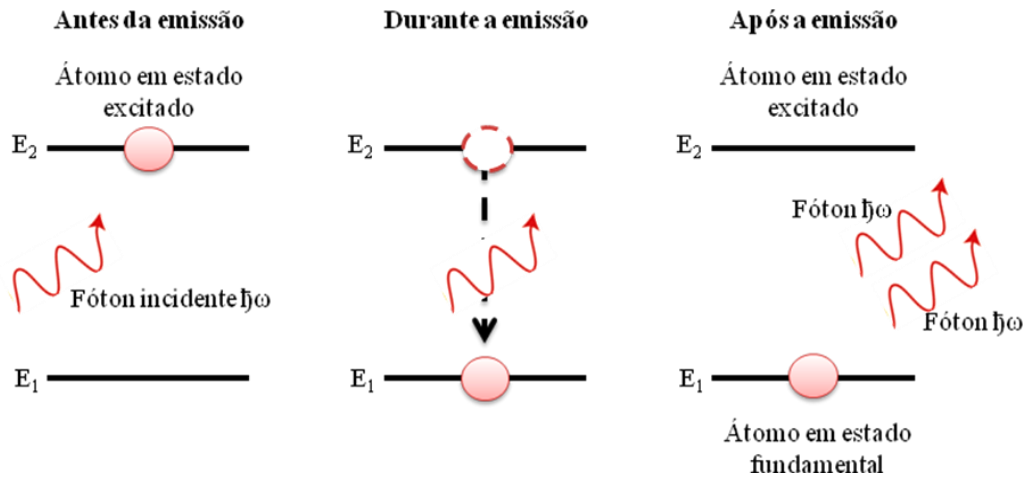
No entanto, há um terceiro processo que pode ocorrer neste sistema, além da absorção e da emissão espontânea e torna-se fundamental para o entendimento do funcionamento do *laser*, a emissão estimulada (BAGNATO, 2008).

O processo de absorção e emissão espontânea são relativamente demorados para acontecer, sendo assim, podem ser acelerados por um agente externo. O agente externo que causa seu salto para um nível energético é justamente outro fóton (KARU, 1986). Assim, um fóton externo pode estimular o decaimento do elétron e este, ao passar para o estado de menor energia, emite um fóton que emerge do sistema (meio emissor ou meio ativo) juntamente com aquele que provocou a sua emissão.

Desse modo, na emissão estimulada (figura 2), o fóton incidente e o fóton gerado, emergem do sistema juntos, com a mesma energia, propagando-se na mesma direção, podendo atingir outros átomos, de maneira sucessiva. Dizemos a partir de então, que a emissão os tornam praticamente em fase e são indistinguíveis (BAGNATO, 2008). Este tipo

de emissão de radiação se torna possível a partir de um processo conhecido como inversão de população.

Figura 2 - Esquema ilustrativo da emissão estimulada



Legenda: No processo um elétron em um estado superior de energia é estimulado em uma transição por um fóton de mesma energia. O fóton resultante estimulado pelo primeiro é emitido com a mesma frequência.

A inversão de população é obtida a partir da energia de uma fonte externa de energia, que “bombeia” alguns átomos (ou elétrons) do estado fundamental de energia para um estado de energia superior. Este processo é chamado de bombeamento. No caso do *laser* de rubi de Maiman, esta fonte de energia externa que promovia o bombeamento era uma lâmpada de *flash*. Atualmente, nos *lasers* diodos, o bombeamento é realizado a partir da energia fornecida por uma corrente elétrica.

Assim, a radiação *laser* provém da emissão que ocorre quando átomos ou elétrons decaem de seus níveis energéticos de forma estimulada, produzindo um feixe de radiação onde os fótons se comportam idênticamente. Essa é a máxima quantidade de radiação que pode ser extraída desse meio emissor. Uma porção dessa radiação emerge do sistema, constituindo o feixe de radiação *laser* (BAGNATO, 2008)

1.2.2 Constituição do equipamento laser

O equipamento emissor (ou ativo) do feixe *laser* é constituído pelo meio ativo, pela fonte de energia externa e pela cavidade ótica ou ressonador.

O meio ativo, base atômica do sistema, pode ser encontrado nos três estados físicos da matéria (sólido, líquido ou gasoso) constituído por átomos que podem ser excitados e passarem para níveis de energia superiores ao absorverem energia da fonte externa de energia (RIBEIRO, 2000). Como exemplos de meios emissores podem ser citados:

- a) sólidos (cristais): óxidos de safira (Al_2O_3) e fluoretos ($LiYF_4$), são encontrados nos *lasers* de rubi, hólmio, neomídio, érbio, entre outros;
- b) líquido (corantes): rodamina ou couramarina diluídos em solventes orgânicos, como etanol e acetona;
- c) gasoso: CO_2 , hélio-neônio, argônio e criptônio.

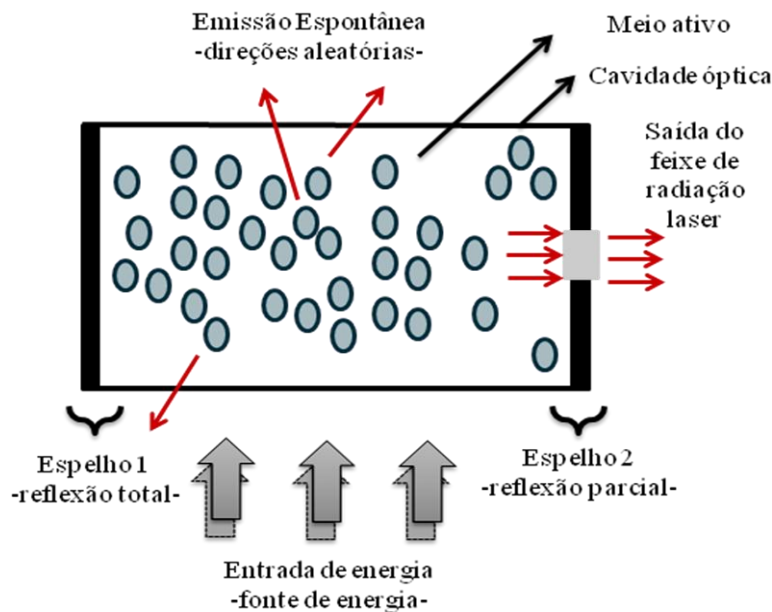
Há também os *lasers* de semicondutor, ou *lasers* de diodo, que utilizam junções semicondutoras do tipo p-n como meio *laser* ativo. Os *lasers* de semicondutor são considerados distintos dos *lasers* de estado sólido típicos, já que o meio ativo é um cristal dopado de dimensões muito pequenas como os de *GaAs*, *GaAsAl* e *InGaAs*.

A fonte de energia externa, que promove o bombeamento, possibilitará a inversão de população e transformará o meio em ativo, na forma de um amplificador. A excitação do meio ativo pode ocorrer através de diversos mecanismos de bombeamento, que pode ser até mesmo outro *laser*, como fonte externa de energia. O tipo de meio ativo determina o tipo de bombeamento necessário. O bombeamento ótico ocorre através de uma lâmpada *flash*, lâmpada de arco ou outro *laser* (RIBEIRO, 2000).

A cavidade ótica, ou cavidade de ressonância, é formada por dois espelhos paralelos posicionados nas extremidades da cavidade ótica, entre os quais fica encerrado o meio emissor. Estes espelhos refletem os fótons emitidos pelo meio ativo, permitindo múltiplas passagens de ida e volta através deste meio ativo, amplificando o campo eletromagnético na cavidade e, portanto, a radiação emitida.

Um dos espelhos, sendo semireflexivo, semitransparente ou apresentando um orifício, permite a saída da radiação do sistema, formando um feixe de radiação único (figura 3) (YOUNG, 1998).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da constituição do equipamento *laser*



Legenda: Neste o meio ativo, a fonte de energia e cavidade óptica compreendem a base para constituição do equipamento.

1.2.3 Propriedades da radiação *laser* e diferenciação de equipamentos

Diferente de uma fonte de luz branca (faixa visível do espectro eletromagnético), as ondas eletromagnéticas emitidas por um *laser* são todas de mesma frequência e comprimento de onda. Outras propriedades importantes do feixe de radiação emitido por um *laser* são: a sua alta colimação e a coerência espacial e temporal (YOUNG, 1998).

Diferente de outras fontes luminosas, resume-se (SCHAFFER et al., 2000 grifos nossos):

- a) A luz *laser* é monocromática – fótons com o mesmo comprimento de onda.
- b) Coerência – possui coerência temporal (dada por sua característica de monocromaticidade) e pela coerência espacial (presença de uma frente de onda unifásica). A coerência, portanto, ocorre quando se têm ondas de mesmo comprimento e em fase, isto é, as ondas se propagam de forma similar no espaço e no tempo.
 - b.a) Espacial: devido às múltiplas reflexões entre os espelhos paralelos na cavidade óptica;

- b.b) Temporal: relacionada com a correlação da fase da onda em um determinado ponto alcançado pela mesma em dois instantes de tempo diferentes.
- c) Colimação - o feixe resultante é constituído de ondas que se propagam na mesma direção com pouca dispersão. Tal característica leva à colimação;
- d) Alta densidade de energia – devido à pequena divergência do feixe de fótons emitido, em uma pequena área é depositada uma grande quantidade de energia;
- e) Potência - pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes convencionais de radiação. Sua potência pode atingir ordens de terawatt (10^{12} Watts). Essas grandes potências ocorrem em *lasers* pulsados, onde a energia acumulada em longo tempo é emitida toda em um intervalo de tempo muito pequeno, que pode ser da ordem de 10^{-12} s.

Os *lasers* podem ser diferenciados pelo comprimento de onda (ou frequência) emitido, pelo modo de emissão (contínuo ou pulsado) ou ainda pela sua potência, esta variando de baixa (*laser* terapêutico), média ou alta (*laser* cirúrgico) (NIEMZ, 2007).

Os *lasers* de baixa densidade de energia (*low intensity* ou *low level*, ou ainda *low power lasers*) apresentam efeitos biomoduladores e não térmicos, enquanto os de alta energia (*high intensity* ou *high level*, ou ainda *high power lasers*) são capazes de cortar, coagular e vaporizar materiais (NIEMZ, 2007).

Podem ser denominados de acordo com as substâncias que constituem o meio ativo, como o *laser* HeNe e o de CO₂, ou na forma de semicondutores diodos, arsenieto de gálio (GaAs) e arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs), por exemplo.

Podem emitir o feixe de radiação no modo contínuo ou pulsado. A emissão contínua pode ser caracterizada pela emissão constante de radiação e em alguns equipamentos comerciais pode ser interrompida, de forma a alternar sua emissão entre os modos ligado e desligado. Já no regime pulsado, é dirigido pelo modo de bombeamento e depende da duração média dos pulsos e sua frequência. *Lasers* pulsados (*free-running mode*) têm uma largura temporal (tempo de pulso) da ordem de microssegundos a milissegundos.

1.3 Lasers de baixa potência e suas aplicações em saúde

1.3.1 Terapia

Os *lasers* de baixa potência são equipamentos que emitem radiações sem potencial destrutivo e são utilizados para diversas aplicações em Odontologia, Fisioterapia, Estética, Medicina e Medicina Veterinária. Nestas áreas ocorre a exposição de um tecido ou células ao feixe de radiação *laser*. A energia contida no feixe ocasionará efeitos fotofísicos, fotoquímicos e/ou fotobiológicos nas células expostas, estimulando-as. Esses efeitos se dão pela absorção da radiação *laser* por moléculas endógenas fotoceptoras (cromóforos), e não por geração de calor, uma vez que os mesmos não apresentam efeito térmico (LOPES, 2003). Alguns trabalhos evidenciam que o efeito se torna mais visível em células debilitadas, ou seja, é dependente das condições fisiológicas dos tecidos ou das células expostas à radiação *laser* (KARU, 1989).

1.3.2 Parâmetros associados

Os seguintes parâmetros são de importância para alcançar resultados desejados com a terapia *laser*: A escolha do comprimento de onda do *laser*, densidade de energia (dose ou fluência), densidade de potência, modo de emissão do *laser* e frequência do pulso (taxa de repetição), serão determinantes para o efeito desejado. Em relação aos parâmetros associados a laserterapia, temos (KARU, 1986, LOPES, 2003, HALLIDAY et al., 2010, SILVA et al., 2012 grifos nossos):

- a) O comprimento de onda é característica importante, pois define a profundidade de penetração no tecido alvo, visto que diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido. Por regra geral, quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração, tal que um *laser* infravermelho de 808nm apresenta maior penetração comparado com

um *laser* vermelho de 660nm em tecidos biológicos. Este parâmetro é expresso em nanômetros (nm).

- b) A frequência é definida como o número de ciclos ou oscilações que passam por um ponto estacionário em um determinado tempo estabelecido e é inversamente proporcional ao comprimento de onda no vácuo. Expressa em Hertz (Hz).
- c) Período: é o intervalo de tempo necessário para uma oscilação completa. O período tem por unidade, o segundo (s).
- d) A potência tem sua importância no cálculo da dose a ser administrada. É a razão entre a energia fornecida ao sistema (ou trabalho realizado) e intervalo de tempo. No modo contínuo de emissão, a potência é constante e igual à potência média, enquanto no modo pulsado, a potência varia entre zero e um valor máximo, tal que a potência é a média entre esses valores. A potência é expressa em Watts (W).
- e) Densidade de potência (ou irradiância), definida como potência de saída da luz por unidade de área, dada em W/cm^2 .
- f) Energia do fóton: A energia do fóton é o produto entre a frequência da radiação e a constante de Plank. Elétron-volt (eV) e Joule (J) são as unidades para a energia do fóton.
- g) Um parâmetro muito utilizado para *lasers* de baixa potência é a fluência. Fluência (também chamada de dose na prática clínica), ou densidade de energia, é a quantidade de energia por unidade de área. Multiplicando a densidade de potência (em W/cm^2) pelo tempo de exposição (em segundos) obtemos a fluência (em J/cm^2).

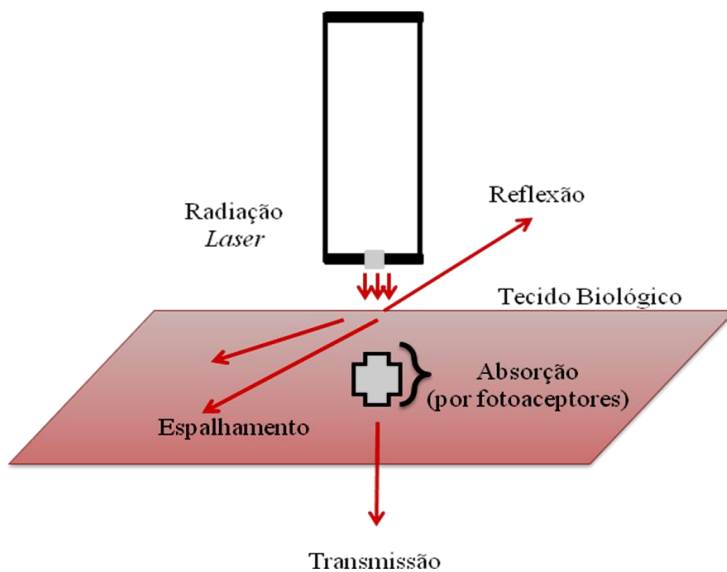
1.4 Interações da radiação *laser* com tecidos biológicos

As radiações emitidas por *lasers* de baixa potência interagem com os tecidos biológicos, pois os mesmos são meios absorvedores opticamente heterogêneos. Essa heterogeneidade se dá pela presença de diferentes moléculas ou partes de moléculas

absorvedoras de energia, denominadas de fotoceptores ou cromóforos. (NIEMZ, 2007). Seus efeitos sobre os tecidos biológicos são dependentes do comprimento de onda, da potência, quantidade de energia, da frequência e duração dos pulsos, do modo de entrega da luz, do tempo de exposição, além das características das células que serão irradiadas e das condições fisiológicas das mesmas (DAMANTE, 2007; TEIXEIRA et al., 2014).

Incidindo sobre um tecido biológico, parte da radiação é refletida, outra parte, que não foi refletida, penetrará e poderá ser absorvida por componentes dos tecidos, como a água (com alta absorção a partir de 1150nm), hemoglobina ou melanina (com alta absorção para comprimentos de onda menores que 600nm). A energia absorvida da radiação por estas moléculas (cromóforos) pode, então, ser transformada em energia química e calor (GARCEZ et al., 2008). Parte da radiação que penetra no tecido biológico, porém, diverge devido a múltiplos espalhamentos, perdendo assim sua potência. A absorção e o espalhamento são determinantes para a profundidade de penetração da radiação no tecido. E por último, a radiação que atravessa toda a espessura do tecido, sem ser absorvida ou sofrer espalhamentos é transmitida. Assim, reflexão, absorção, espalhamento e a transmissão são os fenômenos ópticos que ocorrem quando a radiação *laser* que incide em um tecido biológico (figura 4) (GARCEZ et al., 2012).

Figura 4 - Esquema ilustrativo da interação *laser*-tecido



Legenda: No processo é possível verificar as quatro principais interações existentes entre a radiação *laser* e o tecido biológico, das quais a reflexão, a absorção, o espalhamento e a transmissão fazem parte.

1.5 Mecanismos de ação e efeitos biológicos dos *lasers* de baixa potência

1.5.1 Fotoceptores

Lasers de baixa potência foram introduzidos como modalidade terapêutica na década de 60, devido as baixas densidades de energia utilizadas e a sua capacidade de penetração em tecidos biológicos. Os mecanismos de ação dos *lasers* terapêuticos de baixa potência ainda vêm sendo explorados devido sua escassez de informações.

Contudo, pesquisas indicam a existência de três mecanismos sequenciais para os *lasers* vermelho e infravermelho. Esses mecanismos estão relacionados ao conceito de biomodulação ou bioestimulação. O termo bioestimulação se refere aos efeitos estimulatórios capazes de modular processos metabólicos no interior das células (GARCEZ et al., 2008; GARCEZ et al., 2012).

Trabalhos publicados por Karu (1999) sugerem que os efeitos biológicos são gerados a partir da absorção da energia da radiação *laser* por cromóforos. Foi proposto que, ao absorver a energia, o cromóforo presente na membrana das mitocôndrias, promove o aumento da síntese de ATP (adenosina trifosfato), que levariam ao aumento da produção de radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio (ERO), que por sua vez, atuariam como sinalizadores intracelulares (LEONARDUZZI et al., 2011), este sendo o *mecanismo primário*.

Um dos principais fotoceptores propostos para estes *lasers*, é a citocromo c oxidase ou complexo IV, localizada na cadeia transportadora de elétrons, e nela atua acelerando o transporte de quatro elétrons até o oxigênio molecular. Ao realizar o transporte de elétrons, leva a um aumento a produção de adenosina trifosfato (ATP) pela ATP sintase (GARCEZ et al., 2008).

1.5.2 Mecanismos de ação

Garcez e colaboradores (2012) sugeriram o aumento da síntese de proteínas e citocinas, ocasionando o estímulo à proliferação, migração e diferenciação celular. O aumento da síntese de proteínas, por exemplo, seria induzida pela geração de radicais livres. A

transdução do fotosinal primário e amplificação da resposta na célula, iniciada por radicais livres, constituem o *mecanismo secundário*.

Como consequência do mecanismo secundário, ocorre aumento da secreção de fatores quimiotáticos dos mastócitos, que contribuirá para a melhora da cicatrização tecidual, associada a uma melhora da microcirculação, regeneração do tecido e imunomodulação. Estes efeitos constituem o *mecanismo terciário* de ação dos *lasers* de baixa potência.

No entanto, não somente a *citocromo c oxidase* é um cromóforo para a radiação *laser*, outras moléculas, como melanina, porfirinas e flavinas, também poderiam ser estimuladas pela radiação vermelha e infravermelha de baixa potência (KARU, 2010).

Quanto aos efeitos dos *lasers* de baixa potência, alguns autores os dividem em dois, os primário (ou diretos) e os secundário (ou indiretos). Segundo Genovese (2007), os efeitos diretos incluem o aumento da produção de ATP, causando aceleração da mitose e degranulação de mastócitos, que favorecem alterações circulatórias locais e ação fibrinolítica.

Também, a modulação da produção de substâncias liberadas na dor e na inflamação, como as histaminas, serotoninas, bradicinas, prostaciclina, leucotrienos e prostaglandinas. Os efeitos diretos também incluiriam alterações na condutância iônica através da membrana plasmática, que poderia explicar os efeitos sobre a dor, aumentando o limiar para a dor e diminuindo a transmissão dos estímulos dolorosos para centros superiores do sistema nervoso central relacionados com a nocicepção.

Para o mesmo autor, como efeitos indiretos, tem-se, o estímulo à microcirculação através de mediadores químicos, como a histamina, que promove o relaxamento de esfíncteres pré-capilares. Outro efeito indireto seria o estímulo ao tropismo celular, devido ao aumento da síntese de ATP e da velocidade da taxa de mitose, acelerando processos de reparação tecidual e indução de neoangiogênese.

1.5.3. Efeitos terapêuticos

Os efeitos terapêuticos têm sido perceptíveis na clínica, como o efeito analgésico, antiinflamatório e antiedematoso, como cita Huang & Hamblin (2012).

O efeito analgésico estaria relacionado ao aumento da concentração de β -endorfina no líquido cefalorraquidiano. Esse peptídeo endógeno é um fator analgésico fisiológico que modula a dor no sistema nervoso central.

O aumento significativo de mastócitos de granulação, elevando a quantidade de histamina, gerando assim alterações circulatórias locais como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, é a base para o efeitos antiinflamatório. Já o efeito antiedematoso ocorre devido ao estímulo à microcirculação, proporcionando melhores condições de drenagem do plasma extravasado e a ação fibrinolítica, que proporciona resolução efetiva do coágulo (GENOVESE, 2007).

São encontrados na literatura vários estudos sobre os efeitos biológicos dos *lasers* de baixa potência em culturas de células (HUANG et al., 2011), animais (ROSA et al., 2012) e humanos (ESLAMIAN et al., 2012). Entretanto, a relação dose-resposta não foi ainda esclarecida e os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos observados nas doses terapêuticas não são totalmente compreendidos.

Apesar do significativo número de estudos encontrados na literatura, as informações sobre os efeitos dos *lasers* de baixa potência em sistemas biológicos não são conclusivas, sendo em sua maioria relatos de casos clínicos ou observações com pouco embasamento científico. A maioria dos protocolos é desenvolvida empiricamente, resultando em doses que variam de poucos a muitos J/cm^2 . Mesmo em estudos científicos, os diferentes comprimentos de onda e a grande diversidade de protocolos e condições de irradiação utilizadas, dificultam a comparação dos resultados.

Em relação à aplicação do *laser* na cicatrização, foi sugerido que a radiação *laser* poderia aumentar o metabolismo celular na fase proliferativa das células (DYSON, 2000), estimulando as células fundamentais para o desenvolvimento do processo de reparação (RODRIGUES, 2001) e a síntese de colágeno (SAPERIA et al., 1986) com grande importância para cicatrização de feridas (PEPLOW et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram aceleração no processo de re-epitelização em epiderme de ratos *Wistar*, após lesões e aplicações consecutivas durante 7 dias, utilizando *laser* de baixa potência.

Também apresentam bons resultados para resolução de processos inflamatórios (PEJCIC et al., 2010) e tratamento da dor (CHOW et al., 2009) e de lesões na cavidade oral em pacientes sob radioterapia contra o câncer (ROSENTHAL e TROTTI, 2009).

Apesar dos *lasers* de baixa potência terem um potencial de aplicações clínicas (REDDY, 2004), alternativas para tratamentos como a aceleração de cicatrização de feridas em tecidos moles (AMARILLAS-ESCOBAR et al., 2010) ou de fraturas ósseas (KAZEM SHAKOURI et al., 2009), no tratamento de lesões na cavidade oral (ANTUNES et al., 2007)

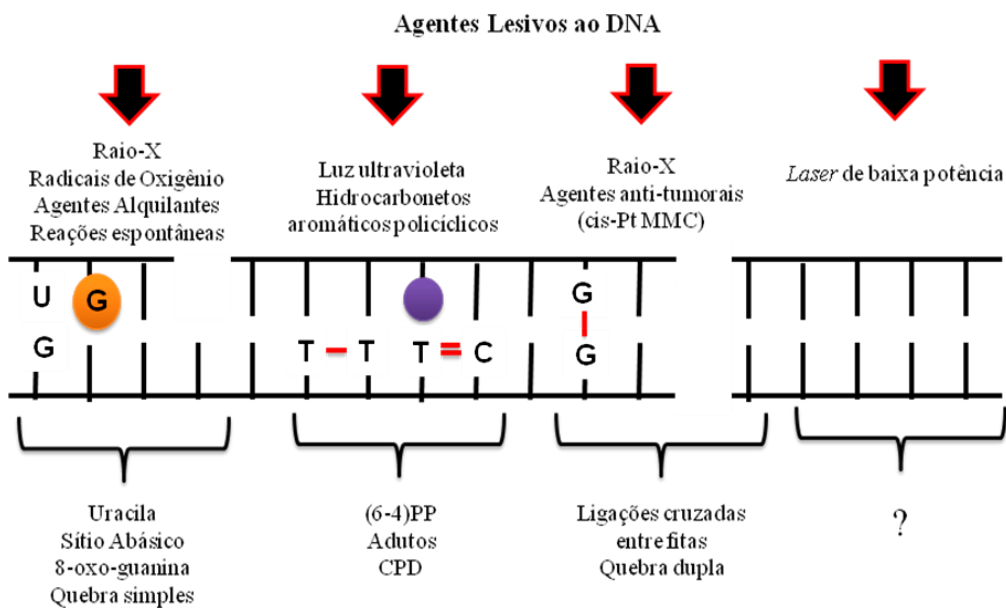
e para reduzir a sensação álgica (CRAWFORD & THOMSON, 2010; ORHAN et al., 2010), seus efeitos biológicos necessitam ainda de estudos para que sejam melhor compreendidos e que suas aplicações clínicas possam ser mais eficazes e seguras.

Em grande parte, os protocolos terapêuticos se baseiam no conhecimento empírico ou em estudos clínicos e experimentais não conclusivos, como citado anteriormente.

1.6 Lasers e lesões no DNA

Para que possa ocorrer a transmissão correta das características dos indivíduos de geração à geração, é importante que haja integridade do material genético. Entretanto há uma série de fatores que podem ocasionar, direta ou indiretamente, lesões na molécula de DNA e comprometer a integridade do material genético, como visto na figura 5. Entre estes fatores, substâncias químicas endógenas (produtos do próprio metabolismo celular) e exógenas, radiações (ultravioleta e radiações ionizantes), bem como alguns agentes biológicos, como os vírus, por exemplo.

Figura 5 - Esquema de agentes que podem lesionar o DNA e exemplos de lesões induzidas por esses agentes



.Legenda: A questão apresentada na figura arremete se *lasers* de baixa potência podem gerar lesões na molécula de DNA.

Essas lesões no DNA podem influenciar os processos intracelulares essenciais, como a replicação do DNA e sua transcrição em RNAm (ácido ribonucléico mensageiro). Como consequências, podem ocorrer efeitos genotóxicos (mutagênese) ou citotóxico (morte celular) e, dependendo da natureza dessas lesões, os mecanismos de reparo do DNA podem ser ativados, ou ainda levar à transformação celular (DE BOER & HOEIJMAKERS, 2000).

Uma série de estudos comprovam os efeitos da radiação ionizante e ultravioleta sobre o DNA (ESCHENBRENNER et al., 2009; JIANG et al., 2007). Em geral, nestes estudos, as fontes utilizadas foram de baixa densidade de energia, bem como a radiação emitida foi de fluxo contínuo, não monoenergética e não coerente.

Os efeitos de radiações monoenergéticas e no modo pulsado ainda não foram totalmente descritos. Por outro lado, apesar da radiação infravermelha, emitida por fontes policromáticas (lâmpadas), quase monocromáticas (LED, light emission diode) e monocromáticas (lasers), serem utilizadas com objetivos terapêuticos, poucos dados estão disponíveis sobre os efeitos desta radiação sobre o DNA (Tirlapur & König, 2014). Por outro lado, poucos dados estão disponíveis sobre os mecanismos envolvidos na reparação dos possíveis danos no DNA causados por estas radiações.

Entretanto, com relação a fluências utilizadas em protocolos terapêuticos, alguns resultados importantes sugerem que: (i) a pré-exposição a laser vermelho (658 nm) aumenta a sobrevivência de culturas de *Escherichia coli* ao peróxido de hidrogênio (Fonseca et al., 2010); (ii) laser infravermelho (830 nm) e laser vermelho (660 nm) alteram a capacidade de transformação bacteriana por plasmídios e induz lesões álcali-lábeis no DNA (Fonseca et al., 2012a; Sergio et al., 2013); (iii) induz filamentação em culturas de *E. coli* proficientes e deficientes em mecanismos de reparo do DNA (Fonseca et al., 2011; Marciano et al., 2012; Canuto et al., 2013; Sergio et al., 2012); (iv) reduz a sobrevivência de *E. coli* deficiente em endonuclease III (Fonseca et al., 2012c); (v) altera a expressão de genes de reparo do DNA e da α -actina na pele e tecido muscular de ratos Wistar (Fonseca et al., 2013b; Fonseca et al., 2013a).

Estes resultados sugeriram que lasers de baixa potência, em fluências utilizadas para fins terapêuticos, poderiam causar lesões no DNA através da geração de radicais livres. Esta hipótese foi reforçada por outros estudos, onde ficou demonstrada a alteração da concentração de marcadores de estresse oxidativo em amostras de sangue expostas ao laser infravermelho (FONSECA et al., 2012b). Portanto, a avaliação da expressão de RNAm envolvidos no reparo

de lesões no DNA induzidas por mecanismos oxidativos pode trazer importantes informações sobre os efeitos da exposição a lasers terapêuticos sobre o DNA.

1.7 Radicais livres e dano no DNA

Os danos celulares causados pelo estresse oxidativo levam a alterações na estrutura do DNA mitocondrial, nas proteínas e nas membranas celulares, como a plasmática pela peroxidação lipídica, nas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Radicais livres referem-se a a átomo ou molécula altamente reativos, que contêm elétrons não emparelhados em sua última camada eletrônica. Entre estes, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS, da sigla em inglês: reactive oxygen species), que são geradas nas células constantemente pelo próprio metabolismo do oxigênio molecular ou produzidos pela ação de agentes externos (como substâncias químicas e radiações). ROS envolve tanto agentes oxidantes, como redutores, como o radical hidroxila (OH^\cdot), o superóxido (O_2^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o ozônio (O_3) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A maior fonte das ROS dentro das células é a mitocôndria, que durante a respiração celular, com o transporte de elétrons pela cadeia e sua reação com o oxigênio molecular leva à geração constante de O_2^\cdot (TURRENS, 2003). O excesso de ROS leva a um estado de estresse oxidativo. Este estado pode ser re-equilibrado através de mecanismos de defesa antioxidante, como vitaminas e enzimas.

Os radicais livres reagem com o DNA, causando alterações nas bases nitrogenadas, o que leva a formação de bases oxidadas. Podem causar também lesões em duas bases adjacentes, ocasionando ligação cruzada (Cadet et al., 2000).

Contudo, após ser alterado, este DNA pode ser reparado por mecanismos enzimáticos (Costa et al., 2003), que são fundamentais para a manutenção da integridade do genoma. Há uma série de vias de reparo do DNA, porém uma delas está principalmente relacionada com danos oxidativos. O reparo por excisão, também conhecido como “reparo no escuro”, foi descrito na década de 60 por Setlow e Carrier, quando observaram que reparos no DNA poderiam ser independentes de luz. O reparo por excisão ocorre quando a base lesionada é

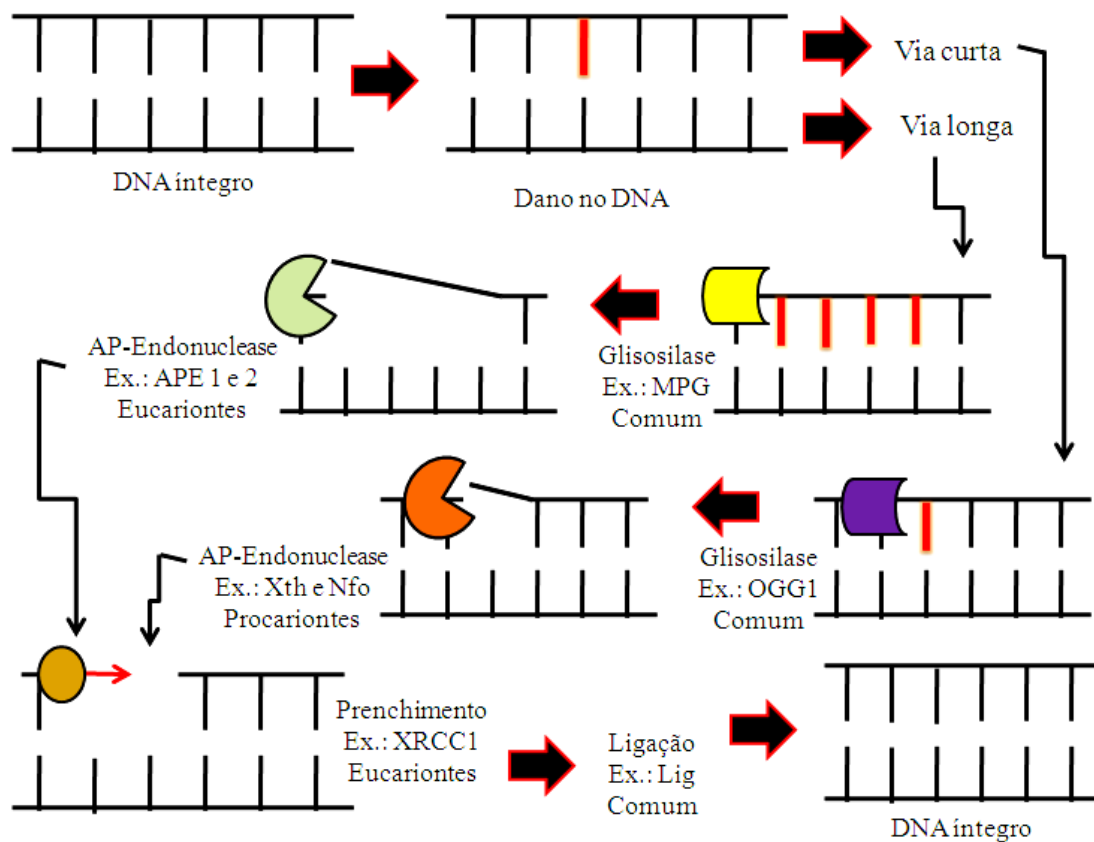
retirada e substituída por uma normal, após sua remoção do genoma. O reparo por excisão pode ser dividido em dois: reparo por excisão de base (REB) e reparo por excisão de nucleotídeos (REN).

1.7.1 Reparo por excisão de base

Reparo por excisão de base (REB), visto na figura 6, é responsável por reparar danos no DNA causados por radicais livres gerados por fontes endógenas (metabolismo) ou exógenas (radiações e agentes químicos). Esta via é conservada evolutivamente, com alto grau de homologia de sequência funcional de bactérias aos mamíferos. Dividida em duas vias: a via curta (short-patch REB), que repara uma única base, e a via longa (long-patch REB), capaz de remover de duas a oito bases (Robertson et al., 2009). É caracterizada pela excisão da base lesionada. Uma série de enzimas, denominadas DNA glicosilases, como a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1), reconhece a lesão e promovem a hidrólise da ligação N-glicosil que liga a base ao esqueleto de fosfato-açúcar do DNA. Como consequência, há formação de um sítio abásico, que é reconhecido por uma endonuclease apurínica/apirimidínica (APE), capaz de produzir quebras na ligação fosfodiéster 5' ou 3' no sítio abásico (Sato & Lindahl, 1994). A lacuna formada é, então, preenchida pela polimerização de um novo nucleotídeo pela ação da DNA polimerase β e posterior ligação do novo nucleotídeo à sequência do DNA em questão, pela DNA ligase III (CADET et al., 2000; ROBERTSON et al., 2009).

O reparo por excisão de base não é um sistema flexível para o reconhecimento de lesões no DNA, uma vez que seria inviável para a célula manter diferentes enzimas para os diferentes tipos de lesões encontradas no DNA. A decisão de escolher entre via curta e longa pode estar atrelado a disponibilidade de ATP na proximidade do sítio AP (PETERMANN e al, 2003). Neste contexto, o reparo por excisão de nucleotídeo é mais geral e flexível, sendo capaz de reconhecer e reparar um grande número de lesões, não necessariamente aquelas relacionadas estruturalmente.

Figura 6 - Modelo molecular do mecanismo de reparo por excisão de bases (REB) via curta (uma base lesionada) e longa (até oito bases lesionadas)



1.7.2 Reparo por excisão de nucleotídeos – importância dos genes ERCC1 e ERCC2

O reconhecimento de lesões no DNA pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN) ocorre não pela sua natureza química, mas pelo grau de distorção promovido na hélice de DNA. Lesões do tipo CPDs (dímeros de pirimidinas cis-sin-ciclobutano), 6-4 pirimidina-pirimidona, adutos químicos e certos tipos de ligações cruzadas entre as duas cadeias de DNA (“*crosslinks*”) são reparadas por este sistema (WOOD, 1996). Dependendo do grau de distorção da hélice, as lesões são reparadas mais eficientemente ou não, porém, geralmente ocorrem de forma homogênea no genoma (WOOD, 2010).

Para Curtin (2012), o REN pode estar envolvido no reparo de em alguns tipos de lesões, como base oxidadas, que deformam a fita dupla, apesar da participação deste mecanismo no reparo de lesões oxidativas pelo REN não estar completamente elucidado.

Este reparo (figura 7) é constituído por um complexo de mais de 30 proteínas diferentes e é dividido em Reparo Global do Genoma (“*Global Genomic Repair*” – GGR), que remove as lesões em regiões não transcritas, e Reparo Acoplado a Transcrição (“*Transcription Coupled Repair*” – TCR), que remove lesões presente na fita transcrita de genes ativos (COSTA et al., 2003).

Após o reconhecimento primário de uma grande variedade de lesões na estrutura do DNA pelo complexo XPC/HR23B, para o GGR haverá o recrutamento dos fatores seguintes, enquanto que para o TCR, o complexo supracitado é indispensável para o reconhecimento de lesões. Entretanto, o bloqueio da RNA polimerase II (RNAPII) por uma lesão no DNA, como aquelas induzidas por radicais livres, é considerado como sinal de indução dos mecanismos de reparo do DNA. Com a lesão identificada, a RNAPII é removida pelas proteínas CSA e CSB (“*Cockayne Syndrome*” A e B), e assim o reparo do DNA inicia (PETRUSEVA et al., 2014).

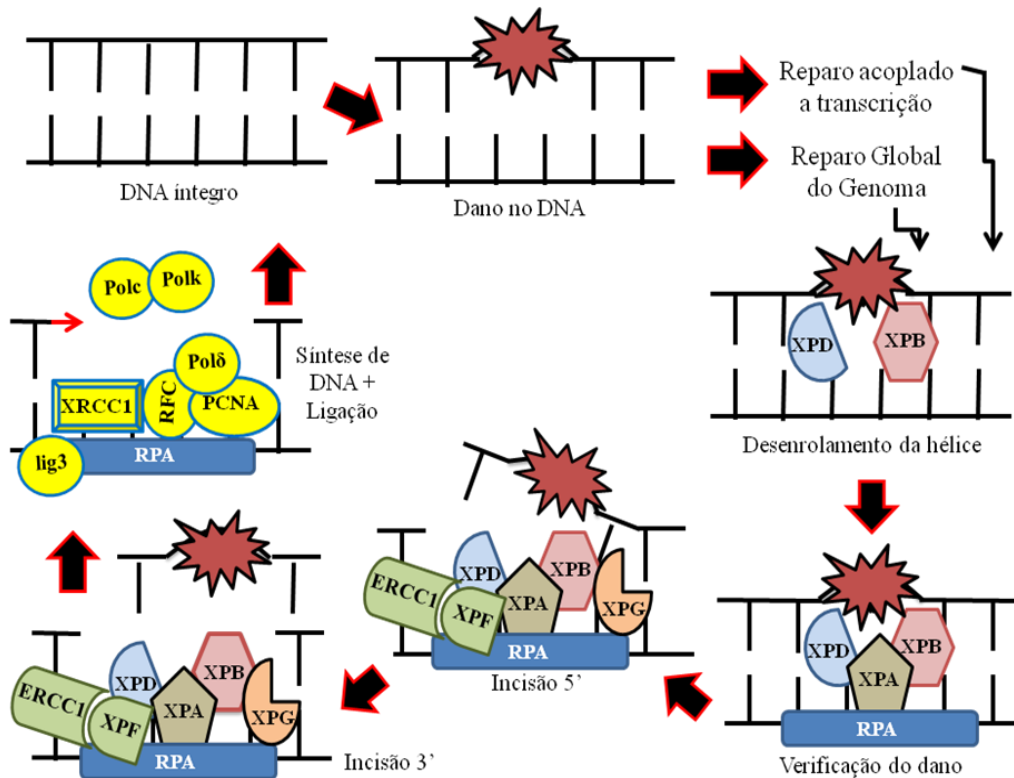
O complexo XPE, cujas subunidades são p127/DDB1 e p48/DDB2, reconhecem as lesões não identificadas pelo complexo XPC (SUGASAWA et al., 1997).

Tanto para GGR, quanto para TCR, com a lesão detectada, os reparos convergem para a via comum de clivagem da fita dupla. Nesta via o fator de transcrição da RNA polimerase II (TFIIH – “*Transcription Factor IIH*”) é recrutado para o local da lesão.

TFIIH é composto por 9 subunidades dependentes de ATP. Dentre elas p62, p52, p44, p34, cdk7, ciclina H e MAT 1. Além dessas, 2 helicases, XPB e o produto do gene ERCC2, a proteína XPD. O papel da proteína XPD está na abertura e no desenovelamento da dupla hélice do DNA no local da lesão, permitindo assim a entrada dos fatores do REN que se sucederão (SARASIN et al., 2007).

O gene ERCC2 está localizado em 19q13.32 e codifica uma proteína de 760 aminoácidos e 86,9 kDa de peso molecular, está localizada no núcleo e com capacidade de se ligar ao DNA (GENECARDS – ERCC2, 2015).

Figura 7 - Modelo molecular geral do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN), enfatizando o papel de XPD-ERCC2 e XPF-ERCC1



O complexo formado pelas enzimas RPA (“*Replication protein*” A), XPA e XPG irão realizar a pré-incisão, assim como realizar a síntese do reparo. A incisão da fita de DNA é realizada por um heterodímero, produto dos genes ERCC1 e XPF, além da enzima XPG. O heterodímero ERCC1-XPF é recrutado para o local da lesão através da proteína XPA para gerar incisão que ocorrerá na sequência de nucleotídeos a cerca de 15-24 nucleotídeos no lado 5’ e cerca de 2-8 nucleotídeos, no lado 3’ da lesão. A síntese do reparo é realizada pelas enzimas RPA, RFC, PCNA e polimerases σ/ϵ , e o fechamento da fita, pela DNA ligase I (COSTA et al., 2003).

O gene ERCC1 está localizado em 19q13.2-q13.3 e tem 10 exons dispersos em 15kb do genoma. Codifica uma proteína de 297 aminoácidos e tem 32,5 kDa de peso molecular, está localizada no núcleo e com capacidade de se ligar ao DNA (GENECARDS – ERCC1, 2015). Durante a clivagem 3’ da fita pelo complexo endonuclease ERCC1-XPF, já inicia a síntese do novo fragmento de DNA antes de ocorrer a incisão 5’ na fita do DNA pela XPG (REARDON & SANCAR, 2003).

O complexo XPF-ERCC1 participa não só da via de REN, mas também de outros processos de reparo, como o reparo de quebras duplas, ligações cruzadas, além de ser essencial para o desenvolvimento nos seres humanos (AHMAD et al.,2010).

A helicase 5'-3' dependente de ATP (XPD/ERCC2) é necessária para REN (COIN et al.,1998), diferentemente da XPB, que pode ser dispensável. A função de helicase XPD/ERCC2, também é importante para a manutenção da estabilidade do complexo como um todo, através da interação de sua porção C-terminal com outra subunidade do complexo p44. Reardon e Sancar (2003) propõem que XPD participa do reparo do DNA após o reconhecimento da distorção da dupla hélice pelo complexo XPC/HR23B, verificando se há de fato a presença da lesão.

Logo, torna-se importante a análise de RNA mensageiros de genes compreendidos no reparo de lesões oxidativas na molécula de DNA, possibilitando assim, compreender melhor os reparos que levam a uma estabilidade genômica, por exemplo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Como há dúvidas sobre os efeitos desses *lasers* sobre o DNA e uma dosimetria adequada pode melhorar a segurança e eficácia das aplicações clínicas destes equipamentos, este trabalho teve como objetivo avaliar as lesões no DNA em células de sangue periférico de ratos *Wistar* e avaliar a alteração da expressão de RNAm dos genes ERCC1 e ERCC2 em tecidos biológicos induzidos por *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, utilizando diferente fluências, potências e formas de emissão de acordo com protocolos terapêuticos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da exposição aos *lasers* vermelho ($\lambda = 660 \text{ nm}$) e infravermelho ($\lambda = 808 \text{ nm}$) na:

- a) Indução de lesões no DNA de células sanguíneas de ratos *Wistar*;
- b) Expressão de RNAs mensageiros de genes relacionados ao reparo do DNA em células da pele e do músculo esquelético de ratos *Wistar*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Laser* de baixa potência

Foram utilizados *lasers* terapêuticos (Photon *Laser* III) vermelho - InGaAlP (660nm) e infravermelho - AsGaAl (808nm) com potência de 30mW, 50mW e 100mW em modos contínuo e pulsado de emissão, nas fluências de 25, 50 e 100J/cm² (D.M.C. Equipamento Ltda, São Paulo, Brasil).

3.2 Avaliação da indução de lesões no DNA de células sanguíneas nucleadas pelo ensaio cometa

3.2.1 Reagentes

Para o ensaio cometa foram utilizados os seguintes reagentes: NaCl (cloreto de sódio), Na₂EDTA (sal dissódico de ácido etilenodiaminetetraacético), tris [(hidroximetil)amino-metano], triton X-100 [polietileno glicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter], DMSO (dimetil sulfóxido), NaOH (hidróxido de sódio), CCl₃OOH (ácido tricloroacético), ZnSO₄.7H₂O (sulfato de zinco heptahidratado), C₃H₈O₃ (glicerol), Na₂CO₃ (carbonato de sódio), NH₄NO₃ (nitrato de amônio), AgNO₃ (nitrato de prata), CH₂O (formaldeído), CH₃COOH (ácido acético) foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Enzimas de reparo do DNA endonuclease III e formamidopirimidina DNA glicosilase foram adquiridos do England Biolabs (Nova Jersey, Estados Unidos da América).

3.2.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Ratus norvegicus)* machos (250-350g, 3-4 meses), mantidos em ambiente com 6 animais por caixa, livre acesso a água e comida, com controle de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz (12h luz/12h escuridão; luz às 6:00 da manhã), provenientes do biotério da Plataforma Multiusuária de Radiobiologia-DBB-IBRAG. Os protocolos experimentais foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) da Universidade Estadual do Estado do Rio de Janeiro, protocolo CEUA/038/2012.

3.2.3 Obtenção de sangue e exposição à radiação laser

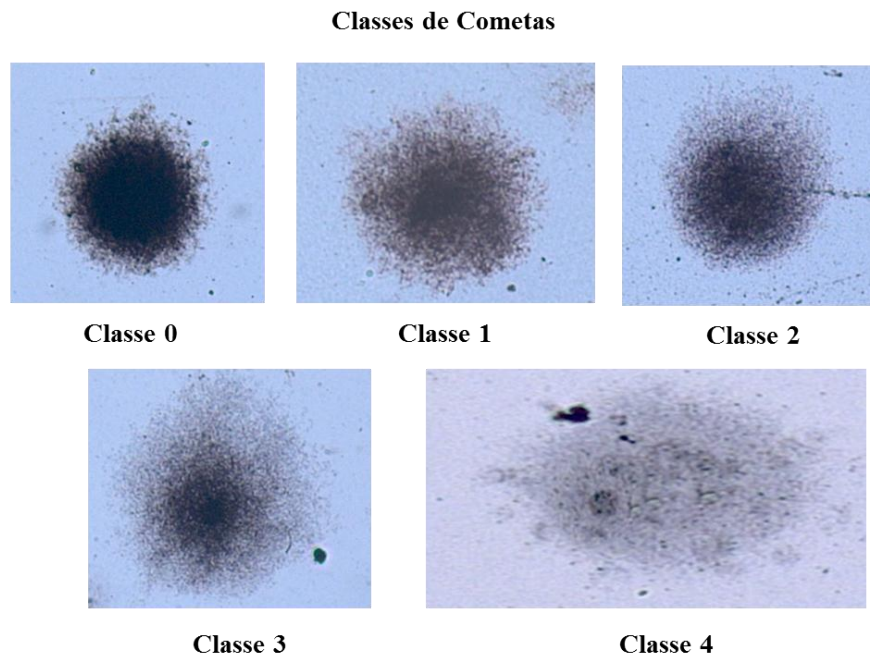
Amostras de sangue foram obtidas por punção em dedos das patas traseiras dos animais, após administração intraperitoneal de tiopental sódico (65 mg/kg). Amostras de sangue foram retiradas em pipetas com anticoagulante (heparina) e expostas aos *lasers* em diferentes fluências (25, 50 e 100J/cm²), potências (30, 50 e 100mW) e frequências (modo contínuo, 10, 50 e 100 pulsos por minuto - PPS). Controles negativos foram amostras de sangue não irradiadas, e controles positivos foram amostras de sangue não irradiadas porém incubadas com peróxido de hidrogênio (5.000μM, 10 minutos, 37°C).

3.2.4 Ensaio Cometa

A indução de lesões no DNA foram avaliados pelo ensaio cometa (OSTLING & JOHANSON, 1984). Brevemente, amostras de sangue expostas aos *lasers* (item 4.2.3) foram incluídas em agarose de baixo ponto de fusão (Sigma, USA, 1%), em tampão fosfato, espalhadas em lâminas de microscópio e incubas em solução de lise alcalina (NaCl 2,5M; Na₂EDTA 100 mM; Tris 10 mM; Triton X-100 1%; DMSO 10%, pH 13, 5 °C; 18 horas). As

lâminas foram lavadas com solução alcalina (NaOH 300 mM; EDTA 1mM, 5 °C, 10 minutos), realizadas eletroforeses (35V, 400mA), imersas em solução neutralizadora (Tris 0,4 M; pH 7,5), lavadas com água destilada. Outras lâminas foram incubadas com fpg (formamidopirimidina DNA glicosilase) ou endonuclease III para avaliação de lesões oxidativas no DNA. O DNA foi corado (5% de carbonato, 01% nitrato de amônio, 0,1% nitrato de prata, 0,25% ácido tungstosilícico e 0,15% de formaldeído) e visualizadas as lâminas em microscopias. O índice de dano (ID) foi calculado pela soma dos produtos do cometa multiplicado pelas suas respectivas classes, onde o índice de dano total = $0 \times$ (número de cometas da classe 0) + $1 \times$ (número de cometas da classe 1) + $2 \times$ (número de cometas da classe 2) + $3 \times$ (número de cometas da classe 3) + $4 \times$ (número de cometas da classe 4).

Figura 8 - Esquema da classificação indicativa das classes do ensaio cometa sugerido por Collins em 1995



3.3 Avaliação da expressão de RNAs mensageiros

3.3.1 Reagentes

Para o estudo da expressão gênica: Reagente TRIzol® foi obtido pela Invitrogen (USA), pela Merck (Alemanha) foram obtidos C₃H₈O (isopropanol), CHCl₃ (clorofórmio), C₂H₅OH (etanol) e DEPC (deitol pirocarbonato).

3.3.2 Procedimento experimental e parâmetros do tratamento

Inicialmente, os animais (n=2, para cada controle e tratamento; total = 14) foram anestesiados (item 4.2.3), realizada tricotomia e delimitada uma área de 4 cm² da pele dos membros posteriores, destes 1 cm² para irradiação com os *lasers* vermelho (660nm) e infravermelho (808nm) nas diferentes fluências (25, 50 e 100J/cm²) em modo contínuo de emissão e potência de saída de 100mW, por varredura sobre a pele tricotomizada. Após 24 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e retirados fragmentos da pele e de músculo da região irradiada, cerca de 50 a 100mg dos tecidos, pele e músculo. Os tecidos coletados foram transferidos para microtubos com reagente TRIzol® para posteriormente efetuar a extração de RNA total.

3.3.3 Extração de RNA total

Os fragmentos de tecidos armazenados nos microtubos com reagente TRIzol® foram macerados, centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos). Sobrenadante foi transferido para outros tubos, adicionado clorofórmio, misturados e centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), a fase aquosa foi transferida para outros tubos, e adicionado isopropanol. Após

incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, as amostras foram misturadas e centrifugadas (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com solução de etanol-DEPC (80% etanol, DEPC 0,1%) e centrifugado novamente nas mesmas condições. Sobrenadantes foram retirados e o RNA total foi reconstituído em solução de água-DEPC (0,1%) e armazenados em freezer -80 °C.

3.3.4 Síntese de cDNA

A concentração de RNA e a pureza foram determinadas num espectrofotômetro pelo cálculo da relação da densidade óptica a um comprimento de onda proporção de 260nm/280nm. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizou-se o kit de síntese de cDNA *two-step* (Promega, EUA). Quatro microgramas de RNA foi transcrito de modo reverso em cDNA usando a transcriptase reversa GoScript™ (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando um total de 20 µl de reação. A reação quantitativa da cadeia de polimerase em tempo real (qPCR-RT) foi realizada utilizando 5 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega) para um volume final de 10 µL contendo 50 ng de cDNA. Para a determinação da quantidade relativa inicial de cDNA, as amostras foram amplificadas com *primers* dos genes: reparo por excisão de complementação cruzada grupo 1 (ERCC1), reparo por excisão de complementação cruzada grupo 2 (ERCC2) e desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH). As reações correram no equipamento da Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA).

As misturas foram inicialmente desnaturadas a 94°C durante 10 min. A PCR consistia de 40 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 94°C durante 30s, emparelhamento a 60°C durante 30s, e um período de extensão a 72°C durante 30s. As análises das curvas de *melt* foram realizadas para todos os genes e especificidade, bem como integridade, dos produtos de PCR foram confirmados pela presença de um único pico. A expressão relativa foi normalizada pela níveis do gene de referência (GAPDH), e utilizando ratos não expostos como grupo de controle. Os valores duplicados de CT foram analisados no Microsoft Excel (Microsoft), utilizando o método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) método (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

3.4 Análise das imagens

Para análise das imagens obtidas no ensaio cometa foi utilizado microscópio Carl Zeiss (Oberkochen/Munchen, Alemanha), equipado com objetiva A-plan 40/0.65, condensador 0.90 e lâmpada halógena 100W. As imagens capturadas com a câmera Sony 12M, foram analisadas com software AxioVision. Este software permite realizar análises quantitativas, como área nuclear, parâmetros geométricos, densitometria e densidade óptica por exemplo.

3.5 Análise estatística

Os dados obtidos pelo ensaio cometa apresentados na forma: média \pm desvio padrão e para a expressão de RNAm foram apresentados na forma: média \pm desvio padrão da expressão relativa. A comparação entre os grupos foi feita através da análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. Foi utilizado o software InStat Graphpad (GraphPad InStat for Windows, versão 5.0, GraphPad Prism Software, San Diego California, USA).

4 RESULTADOS

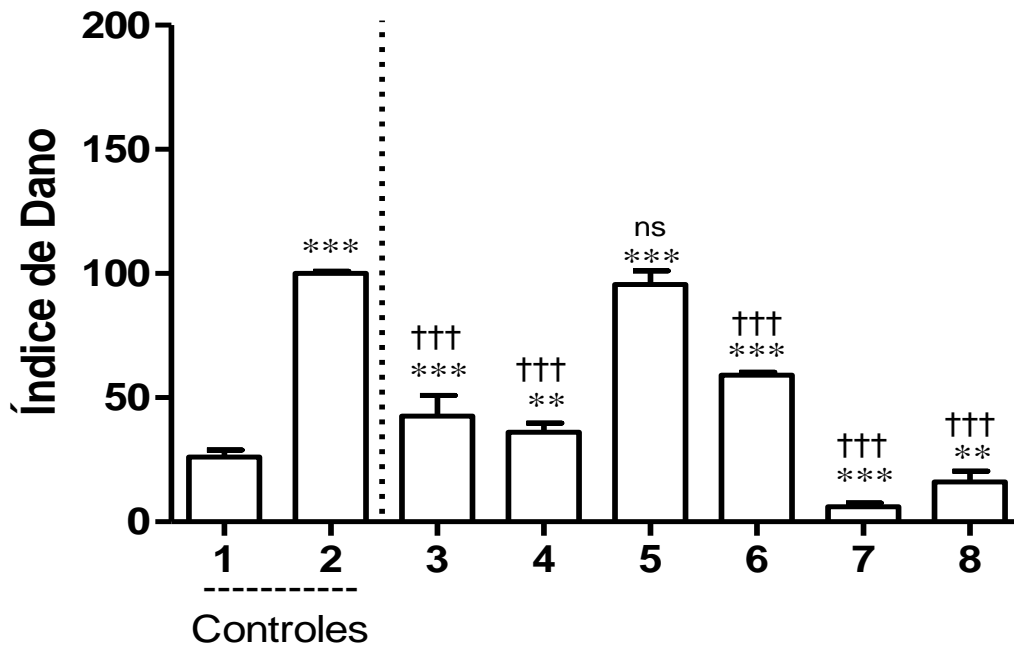
4.1 Avaliação da indução de lesões no DNA de células sanguíneas nucleadas pelo ensaio cometa

Na figura 9 estão apresentados valores do índice de dano (ID) em amostras de células sanguíneas coletadas de sangue periférico exposto aos *lasers* de baixa potência em diferentes fluências, com potência de 100mW e modo contínuo de emissão.

Os dados nesta figura sugerem que a exposição ao *laser* vermelho aumenta significativamente ($p < 0,001$) o ID nas fluências de 25 e 50J/cm², assim como para a fluência de 50J/cm² para o *laser* infravermelho, quando comparado com o controle negativo (amostras de sangue não irradiadas).

Todos os valores do ID também apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle positivo (amostras de sangue incubadas com peróxido de hidrogênio), exceto os valores do ID da amostra de sangue exposta ao *laser* vermelho na fluência de 50J/cm².

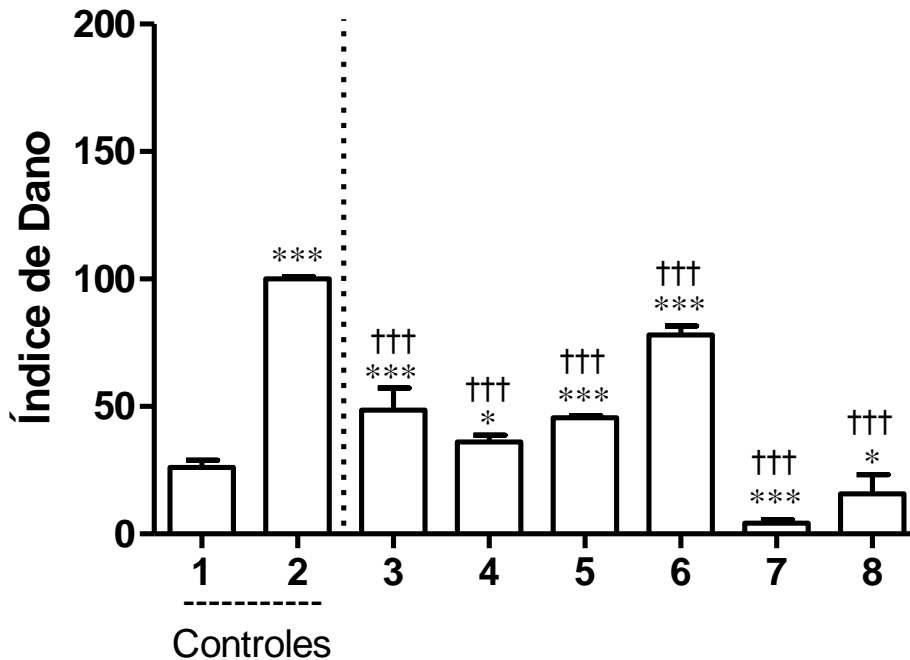
Figura 9 - Índice de dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes fluências, com potência de 100mW e modo contínuo de emissão



Legenda: Colunas: (1) Controle negativo, (2) controle positivo (5mM peróxido de hidrogênio), (3) 25J/cm² *laser* vermelho, (4) 25J/cm² *laser* infravermelho, (5) 50J/cm² *laser* vermelho (6) 50J/cm² *laser* infravermelho, (7) 100J/cm² *laser* vermelho, (8) 100J/cm² *laser* infravermelho. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (**) p<0,01 quando comparado ao controle negativo, (***) p<0,001 quando comparado ao controle positivo (peróxido de hidrogênio) e (†††) p<0,001 quando comparado ao controle positivo (peróxido de hidrogênio).

Lesões no DNA em células de sangue periférico foram avaliadas após exposição aos *lasers* com diferentes potências, na fluência de 100J/cm² e no modo contínuo de emissão (figura 10). Os resultados sugerem aumento significativo (p<0,05) do ID quando comparado com o grupo controle negativo, contudo, na maior potência utilizada (100mW) a exposição ao *laser* diminuiu os valores do ID. Igualmente, os resultados nesta figura sugerem que os valores do ID nas células expostas aos *lasers* foram menos significativos (p<0,001) quando comparados com os valores do ID do controle positivo.

Figura 10 - Índice de Dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes potências, com fluência de 100J/cm² e modo contínuo de emissão



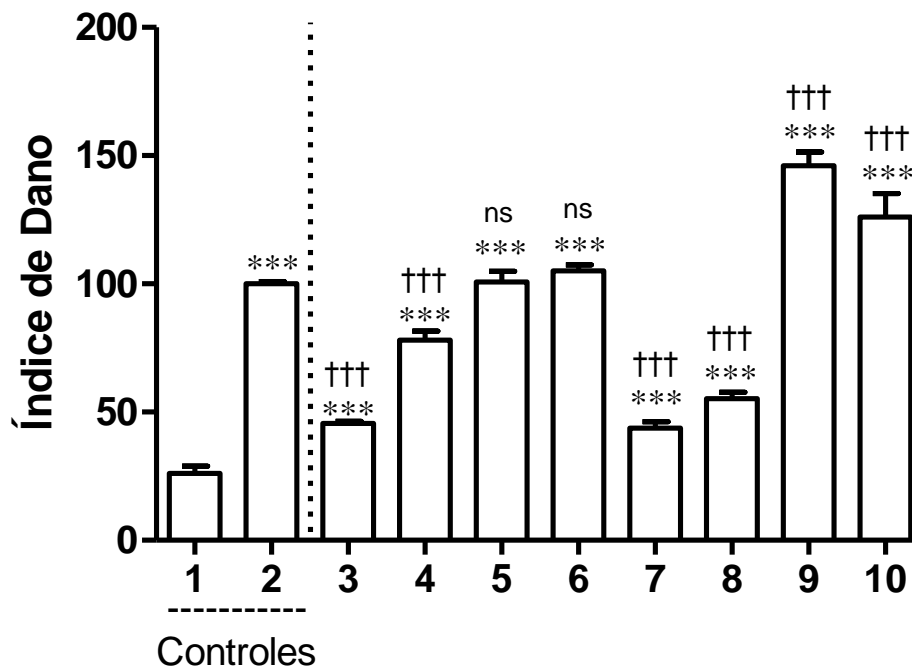
Legenda: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (3) 30mW cm² *laser* vermelho, (4) 30mW *laser* infravermelho, (5) 50mW *laser* vermelho (6) 50mW *laser* infravermelho, (7) 100mW *laser* vermelho, (8) 100mW *laser* infravermelho. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (*) p<0.05 quando comparado ao controle negativo, (***) p<0.001 quando comparado ao controle negativo (não irradiado) e (†††) p<0.001 quando comparado ao controle positivo (peróxido de hidrogênio).

Na figura 11 estão apresentados os valores do ID em células nucleadas de sangue periférico exposto aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência em modo contínuo e pulsado de emissão em diferentes frequências, com fluência de 100J/cm² e potência de 50mW. Os resultados nesta figura sugerem que a exposição aos *lasers* aumentam de forma significativa (p<0,001) os valores do índice de dano (ID) quando comparado com o grupo controle negativo.

Comparado ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), os valores do ID foram significativos (p<0,001) em células sanguíneas nucleadas expostas aos *lasers* no modo contínuo de emissão. De forma semelhante, na frequência de 50PPS, a exposição aos *lasers* induziram baixos valores do índice de dano. Entretanto, os valores do ID obtidos na frequência de 10PPS foram semelhantes ao do grupo controle, enquanto que, para o grupo

exposto aos *lasers* na frequência de 100 PPS, os obtidos valores do ID foram similares as do controle positivo.

Figura 11 - Índice de Dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes modos de emissão, fluência em 100J/cm² e potência de saída de 100mW



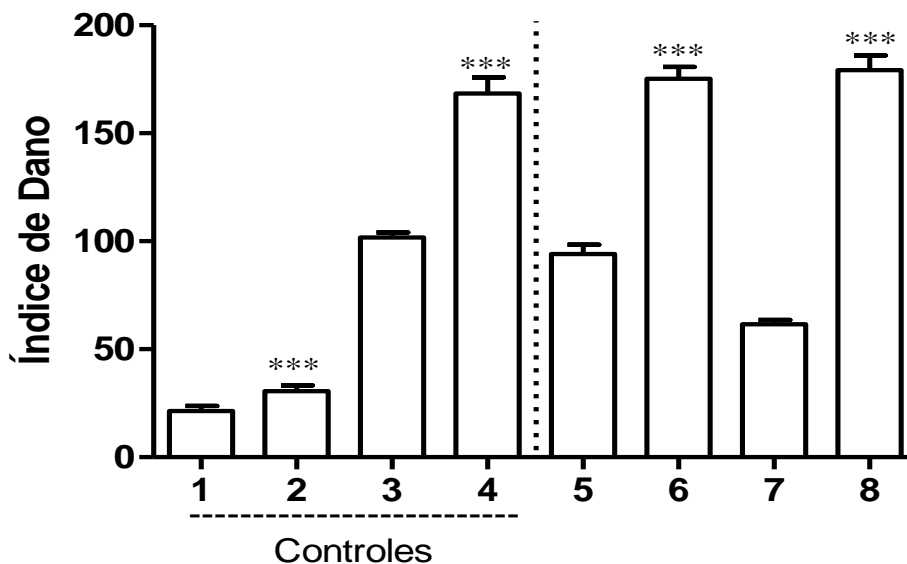
Legendas: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (3) Modo Contínuo *laser* vermelho, (4) Modo Contínuo *laser* infravermelho, (5) 10PPS *laser* vermelho (6) 10PPS *laser* infravermelho, (7) 50PPS *laser* vermelho, (8) 50PPS *laser* infravermelho, (9) 100PPS *laser* vermelho, (10) 100PPS *laser* infravermelho. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) $p < 0.001$ quando comparado ao controle negativo (não irradiado), (ns) não significativo quando comparado com o controle positivo (peróxido de hidrogênio) e (†††) $p < 0.001$ quando comparado ao controle positivo (peróxido de hidrogênio).

4.2 Ação de enzimas de reparo no DNA de células sanguíneas expostas aos lasers, vermelho (660nm) e infravermelho (808nm), de baixa potência

Após a avaliação de lesões no DNA induzidas por *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em diferentes fluências, potências e os modos de emissão, em que foi sugerido um aumento significativamente do ID em células nucleadas do sangue de ratos *Wistar*, foram analisados se essas lesões eram alvos de enzimas envolvidas no reparo de lesões oxidativas no DNA. Para isso, as enzimas formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) e endonuclease III foram usadas no ensaio cometa modificado.

Os valores do ID em células do sangue periférico expostas aos *lasers*, vermelho e infravermelho, com fluência de 50J/cm² e potência de 100 mW em modo contínuo de emissão, obtidos pelo ensaio cometa com incubação com FPG, são apresentados na figura 12.

Figura 12 - Índice de Dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, fluência de 50J/cm² potência de saída de 100mW e modo contínuo de emissão



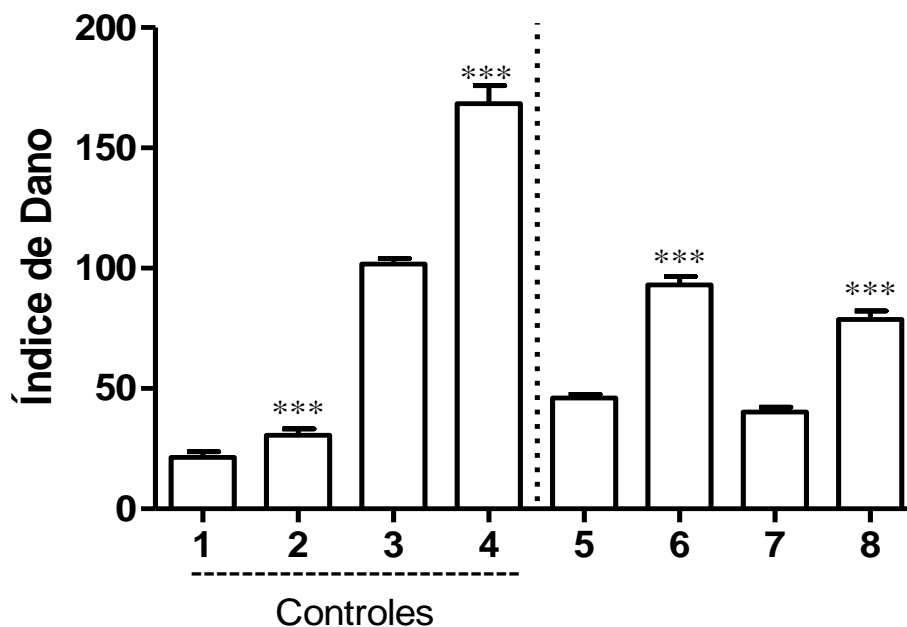
Legenda : Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Negativo + FPG, (3) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (4) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio) + FPG, (5) 50J/cm² *laser* vermelho (6) 50J/cm² *laser* vermelho + FPG, (7) 50J/cm² *laser* infravermelho, (8) 50J/cm² *laser* infravermelho + FPG. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) p<0.001 quando comparado ao controle não incubado com FPG.

As condições de exposição aos *lasers* nesta etapa, foram as mesmas que induziram os maiores valores significativos do ID em diferentes fluências (figura 9). Os dados apresentados nesta figura sugerem que os valores do ID foram significativamente maiores ($p < 0,001$) em amostras de sangue expostas aos *lasers* e incubados com a enzima FPG, quando comparadas com os valores do ID em amostras de sangue não incubadas com esta enzima.

Os controles negativo (não irradiado) e positivos (peróxido de hidrogênio) apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) do ID. Os valores do ID em células nucleadas expostas aos *lasers* e incubadas com FPG foram semelhantes a estes nos controles negativos e positivos.

Além disso, o ID foi avaliado em células de sangue periférico expostas a ambos os *lasers* com potência de 50mW e fluência de 100J/cm², em modo contínuo de emissão, e incubados com a enzima de FPG (figura 13).

Figura 13 - Índice de Dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente. Fluência em 100J/cm² e modo contínuo de emissão



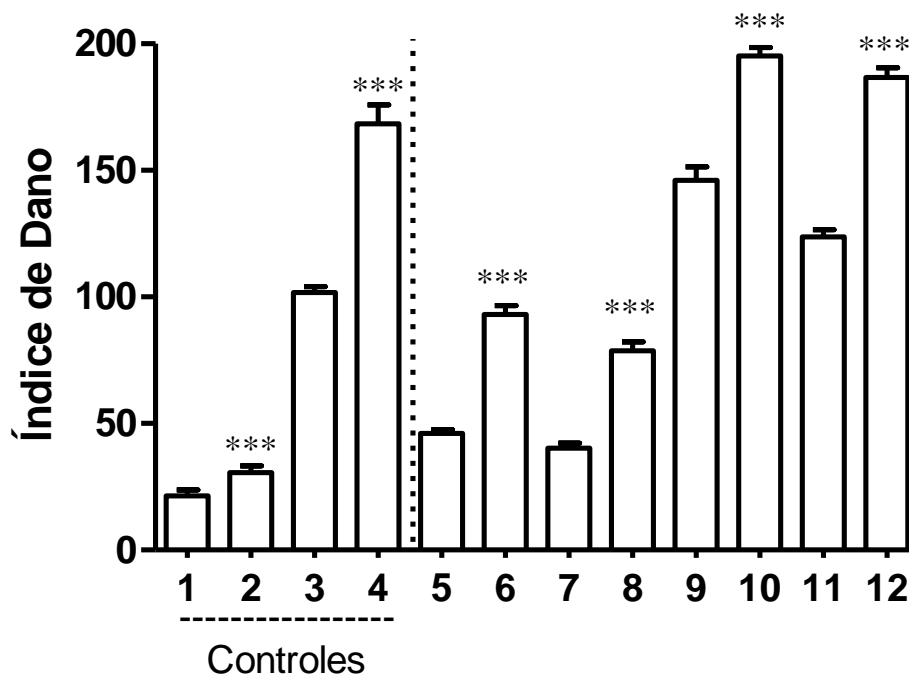
Legendas: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Negativo + FPG, (3) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (4) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio) + FPG, (5) 30mW *laser* vermelho (6) 30mW *laser* vermelho + FPG, (7) 50mW *laser* infravermelho, (8) 50mW *laser* infravermelho + FPG. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) $p < 0,001$ quando comparado ao controle não incubado com FPG.

As condições de exposição aos *lasers* foram as mesmas que apresentaram significativamente os maiores índices de dano (ID) em diferentes potências (figura 10). Os dados na figura 13 sugerem que a incubação com a enzima FPG aumentou significativamente ($p < 0,001$), os valores do ID nas células do sangue periférico expostas aos *lasers* de baixa potência, tanto o vermelho quanto para o infravermelho.

Os valores do ID em células do sangue expostas aos *lasers* e incubadas com FPG foram maiores do que os apresentados no grupo controle negativo, porém menores do que os valores do ID no controle positivo.

A figura 14 mostra os valores do índice de dano (ID) em células nucleadas do sangue periférico expostas aos *lasers* no modo contínuo e pulsado de emissão, com fluência de $50\text{J}/\text{cm}^2$ e 100mW de potência, e incubadas com a enzima FPG.

Figura 14 - Índice de Dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, nos modos contínuo e pulsado de emissão 100PPS, potência de saída de 30mW e 50mW , respectivamente, fluência em $50\text{J}/\text{cm}^2$



Legendas: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Negativo + FPG, (3) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (4) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio) + FPG, (5) Modo Contínuo *laser* vermelho (6) Modo Contínuo *laser* vermelho + FPG, (7) Modo Contínuo *laser* infravermelho, (8) Modo Contínuo *laser* infravermelho + FPG, (9) 100PPS *laser* vermelho, (10) 100PPS *laser* vermelho + FPG, (11) 100PPS *laser* infravermelho, (12) 100PPS *laser* infravermelho + FPG. As

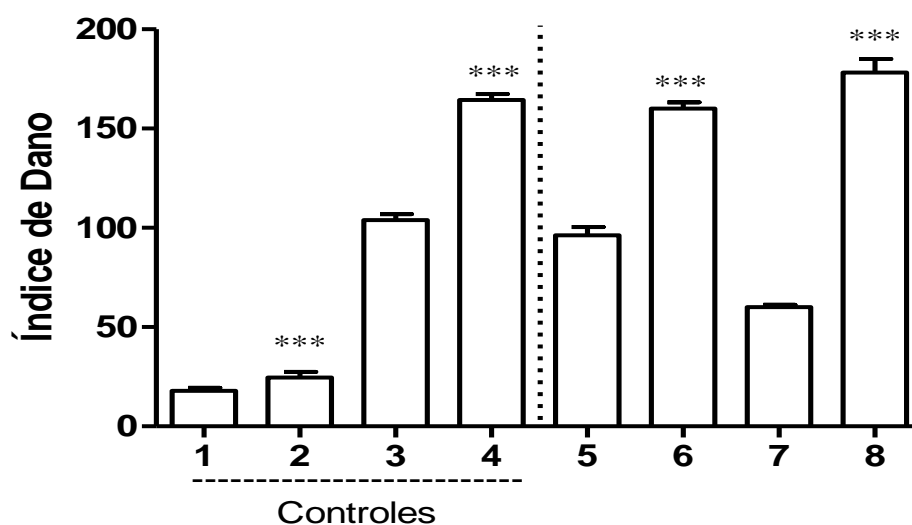
barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) $p < 0,001$ quando comparado ao controle não incubado com FPG.

As condições de exposição aos *lasers* foram as mesmas que induziram os maiores valores do índice de dano (ID) em diferentes modos de emissão (figura 11). Os resultados na figura acima sugerem que a incubação com a enzima FPG apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) do ID em células nucleadas do sangue periférico exposto aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência. Os valores do ID das células expostas aos *lasers* no modo pulsado de emissão e incubadas com a enzima FPG foram similares aos encontrados nos controle positivos e negativos.

Para confirmar que as lesões induzidas pela radiação *laser* no DNA foram ocasionadas por mecanismos oxidativos, os ID's em células nucleadas do sangue periférico expostas aos *lasers* foram obtidos pelo ensaio cometa modificado por incubação com a enzima endonuclease III.

Pode ser verificado na figura 15 os valores do ID de células sanguíneas expostas aos *lasers*, vermelho e infravermelho, com fluência de $50\text{J}/\text{cm}^2$, potência de 100mW e modo contínuo de emissão, e incubadas com a enzima endonuclease III.

Figura 15 - Índice de dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, fluência em $50\text{J}/\text{cm}^2$, potência de saída de 100mW e modo contínuo de emissão



Legendas: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Negativo + endonuclease III, (3) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (4) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio) + endonuclease

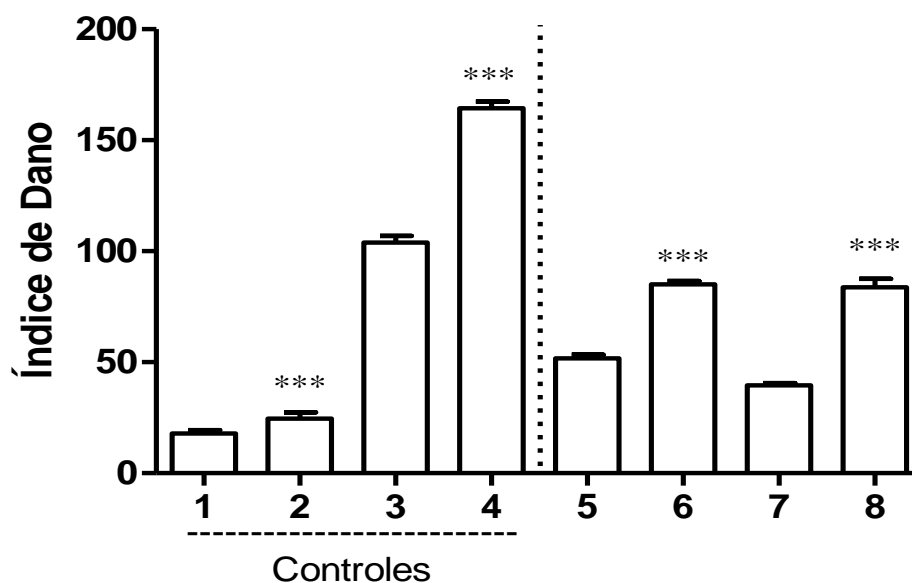
III, (5) 50J/cm² laser vermelho (6) 50J/cm² laser vermelho + endonuclease III, (7) 50J/cm² laser infravermelho, (8) 50J/cm² laser infravermelho + endonuclease III. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) p<0.001 quando comparado ao controle não incubado com endonuclease III.

As condições de exposição aos *lasers* foram as que induziram de forma significativa os maiores valores do ID em diferentes fluências (figura 9). Semelhante ao obtido pelo ensaio cometa com a enzima FPG, a incubação com endonuclease III promoveu um aumento significativo (p<0,001) dos valores do ID em células do sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência quando comparado com as amostras expostas, porém, não incubadas com a enzima em questão.

Os valores do índice de dano (ID) em células sanguíneas expostas aos *lasers* e incubadas com a endonuclease III foram similares ao controle positivo (peróxido de hidrogênio).

Na figura 16 são apresentados os valores do ID em amostras de células sanguíneas expostas aos *lasers*, vermelho e infravermelho, com potência de 50mW e fluência de 100J/cm² em modo contínuo de emissão e incubadas com endonuclease III.

Figura 16 - Índice de dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente. Fluência em 100J/cm² e modo contínuo de emissão



Legendas: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Negativo + endonuclease III, (3) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (4) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio) + endonuclease

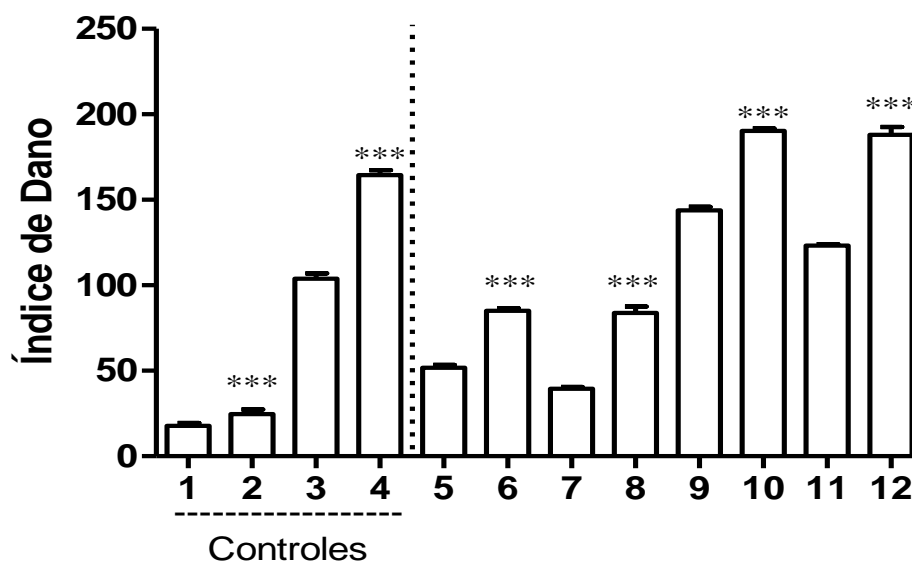
III, (5) 30mW *laser* vermelho (6) 30mW *laser* vermelho + endonuclease III, (7) 50mW *laser* infravermelho, (8) 50mW *laser* infravermelho + endonuclease III. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) $p < 0.001$ quando comparado ao controle não incubado com endonuclease III.

Para os dados apresentados na figura acima, como nas demais, as condições de exposição aos *lasers* de baixa potência foram as mesmas que apresentaram significativamente os maiores valores do ID em diferentes potências (figura 10). Os resultados acima sugerem que a incubação com endonuclease III aumentaram significativamente ($p < 0,001$) o ID em células do sangue periférico expostas aos *lasers*.

Os valores do ID em células sanguíneas nucleadas expostas aos *lasers* e incubadas com endonuclease III foram maiores que os valores encontrados no controle negativo e menores que no controle positivo.

O ID em células do sangue exposto aos *lasers* em diferentes modos de emissão, com fluência de 50J/cm² e potência de 100mW, foi também avaliado após incubação com a endonuclease III (figura 17). As condições de exposição aos *lasers* foram aquelas que apresentaram os valores do ID mais significativos em diferentes modos de emissão como sugere a figura 11.

Figura 17 - Índice de dano em células de sangue periférico de ratos *Wistar* expostas aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, nos modos contínuo e pulsado de emissão 100PPS, potência de saída de 30mW e 50mW, respectivamente, fluência em 50J/cm²



Legendas: Colunas: (1) Controle Negativo, (2) Controle Negativo + endonuclease III, (3) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio), (4) Controle Positivo (5mM Peróxido de Hidrogênio) + endonuclease III, (5) Modo Contínuo *laser* vermelho (6) Modo Contínuo *laser* vermelho + endonuclease III, (7) Modo Contínuo *laser* infravermelho, (8) Modo Contínuo *laser* infravermelho + endonuclease III, (9) 100PPS *laser* vermelho, (10) 100PPS *laser* vermelho + endonuclease III, (11) 100PPS *laser* infravermelho, (12) 100PPS *laser* infravermelho + endonuclease III. As barras de erro indicam o desvio padrão da média. (***) $p < 0.001$ quando comparado ao controle não incubado com endonuclease III.

Mais uma vez, os valores do ID em células sanguíneas nucleadas expostas aos *lasers* e incubadas com endonuclease III foram significativamente ($p < 0,001$) maiores quando comparado com os valores do ID em células do sangue periférico expostas aos *lasers*, mas não incubadas com esta enzima. Os valores do ID em células expostas aos *lasers* no modo pulsado de emissão e incubadas com endonuclease III foram maiores do que os encontrados nos controles negativo e positivo.

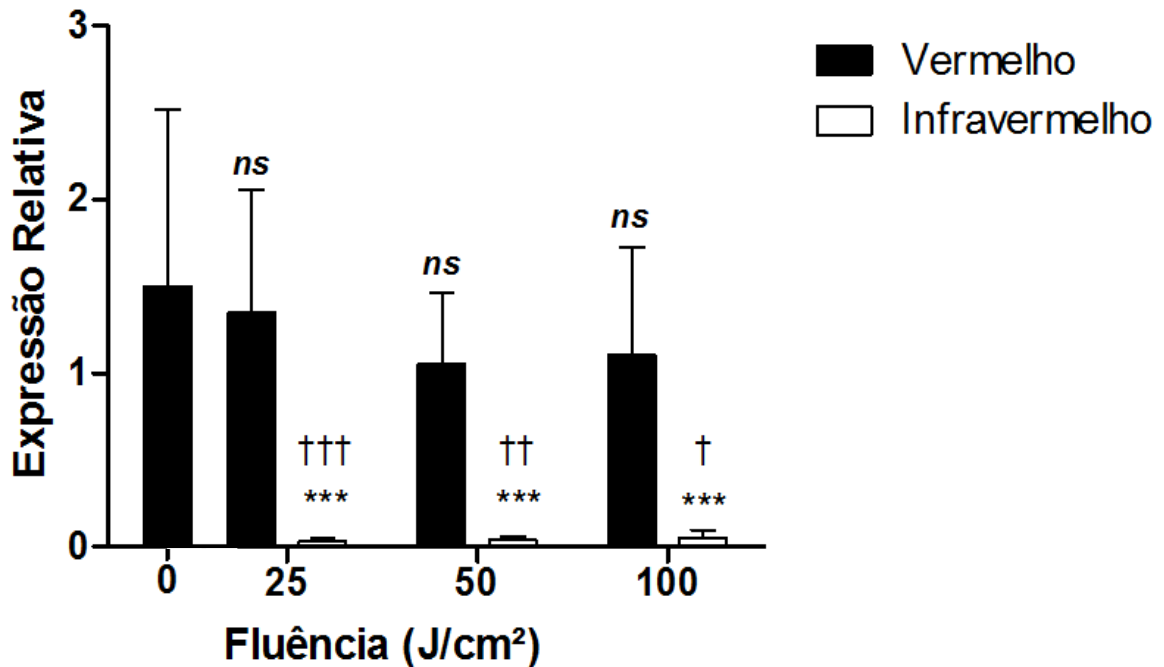
4.3 Efeitos da exposição a lasers de baixa potência na expressão de RNA mensageiro, ERCC1 e ERCC2, na pele

A figura 18 apresenta a expressão relativa do RNAm do gene ERCC1 na pele exposta aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência, em diferentes densidades de energia (25, 50 e 100J/cm²). Os dados apresentados nesta figura não indicam ($p > 0,05$) alteração significativa na expressão deste RNAm em pele exposta ao *laser* vermelho.

No entanto, observa-se uma redução significativa ($p < 0,001$) na expressão do RNAm do gene ERCC1 em pele exposta ao *laser* infravermelho em todas as densidades de energia avaliadas, quando comparada com a expressão do RNAm do gene ERCC1 em pele não exposta ao *laser* (grupo de controle).

Além disso, a exposição ao *laser* infravermelho reduz de forma significativa ($p < 0,001$) a expressão do RNAm do gene ERCC1, quando comparada com aquelas obtidas na pele exposta ao *laser* vermelho em todas as densidades de energia avaliadas.

Figura 18 - Expressão relativa do RNAm do gene ERCC1 em pele exposta a *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência no modo contínuo de emissão em diferentes fluências



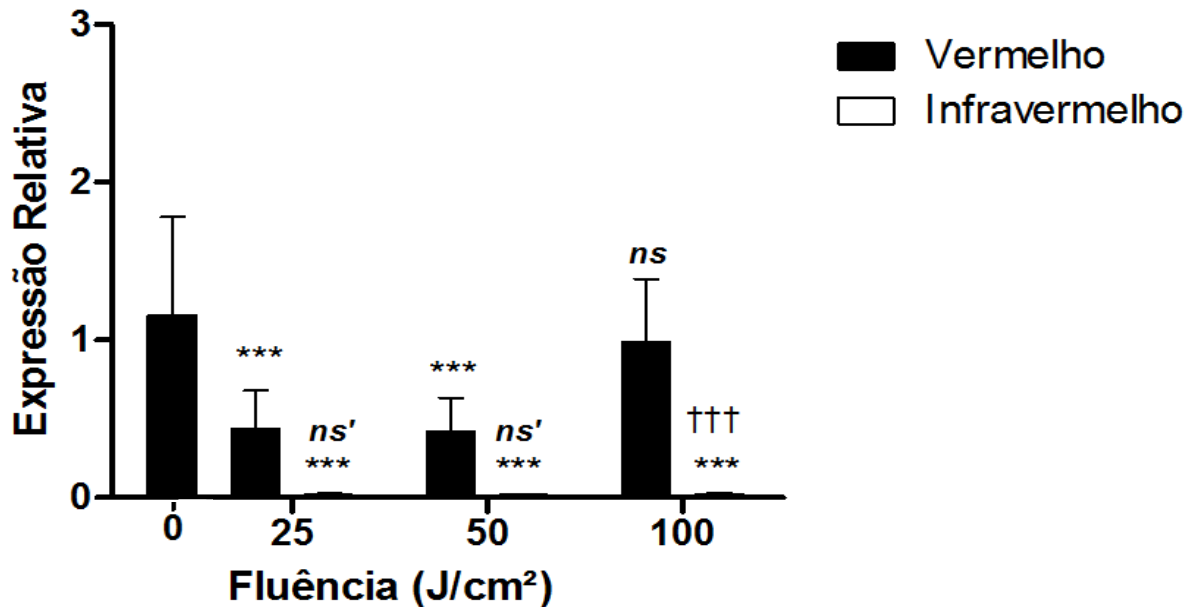
Legenda: GAPDH foi utilizado como padrão de normalização. (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle, (†††) $p < 0,001$ quando comparando *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência, e (ns) não significativo quando se compara *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência.

Na figura 19 estão apresentadas os valores das expressões relativas do RNAm do gene ERCC2 com intuito de confirmar as alterações induzidas pela exposição aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência na expressão de RNAm de genes relacionados com a via de reparo por excisão de nucleotídeos.

Diferente do obtido para ERCC1, a expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 sugere uma redução significativa ($p < 0,05$) na expressão no tecido pele exposta ao *laser* vermelho de baixa potência, exceto para fluência de 100 J/cm^2 , quando comparado ao grupo controle. Semelhante ao obtido para ERCC1, a exposição ao *laser* infravermelho reduz de forma significativa ($p < 0,001$) a expressão do RNAm do gene ERCC2 na pele exposta aos *lasers* em todas as densidades de energia avaliadas.

Diferenças significativas ($p < 0,001$) na expressão do RNAm do gene ERCC2 ocorreram na pele exposta aos *lasers*, vermelho e infravermelho, no maior fluência avaliadas (100 J/cm^2).

Figura 19 - Expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 em pele exposta a *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em modo contínuo de emissão com diferentes fluências

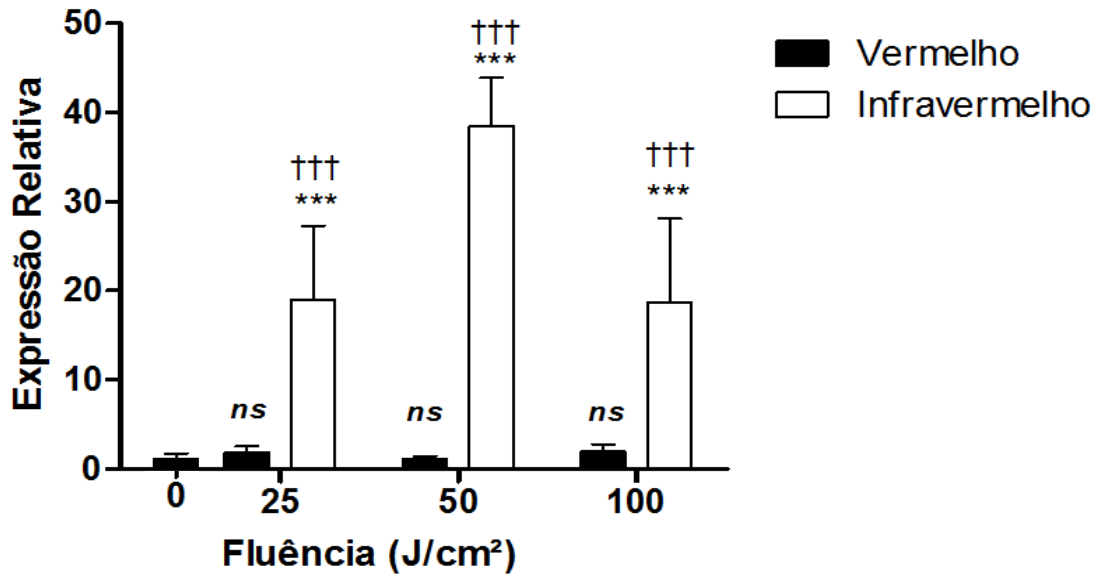


Legenda: GAPDH foi utilizado como padrão de normalização. (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle, (†††) $p < 0,001$ quando compara-se *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência, (ns') não significativo quando compara-se com o grupo controle, e (ns) não significativo quando se compara *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência.

4.4 Efeitos da exposição a lasers de baixa potência na expressão de ERCC1 e ERCC2 em tecido muscular

Na figura 20 estão apresentados os dados da expressão relativa do RNAm do gene ERCC1 em músculo exposto aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência em diferentes densidades de energia. Semelhante ao obtido na pele, os dados nesta figura não indicam alteração significativa ($p > 0,05$) na expressão do RNAm do gene ERCC1 em músculo exposto ao *laser* vermelho. No entanto, a exposição ao *laser* infravermelho aumentou significativamente ($p < 0,001$) a expressão do RNAm do gene ERCC1 no tecido muscular esquelético, tanto em comparação com o grupo de controle, quanto em comparação com o grupo do *laser* vermelho.

Figura 20 - Expressão relativa do RNAm do gene ERCC1 em músculo exposto a *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em modo contínuo de emissão com diferentes fluências

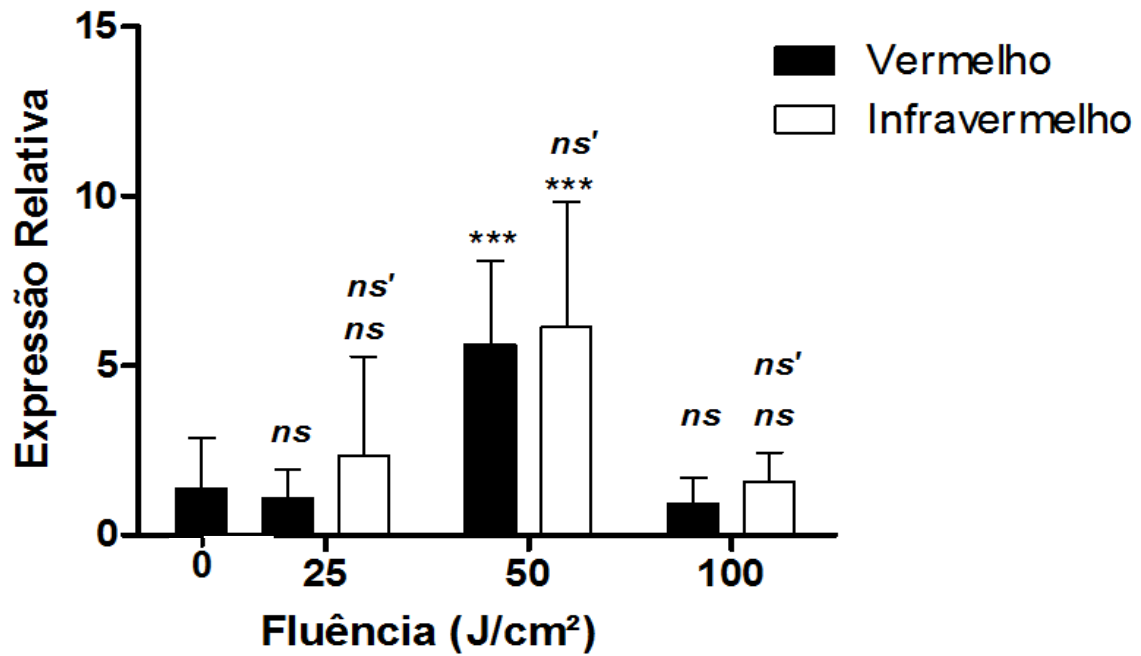


Legenda: GAPDH foi utilizado como padrão de normalização. (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle, (†††) $p < 0,001$ quando compara-se *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência, e (ns) não significativo quando compara-se *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência.

A expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 também foi avaliada para confirmar a alteração da expressão deste gene relacionado com a via de reparo por excisão de nucleotídeos em músculo exposto a *lasers* de baixa potência (figura 21).

Diferente do obtido para ERCC1, os valores obtidos sugerem aumento significativo ($p < 0,001$) da expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 no músculo exposto aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência na fluência intermediária (50J/cm²).

Figura 21 - Expressão relativa do RNAm do gene ERCC2 em músculo exposto a *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, em modo contínuo de emissão com diferentes fluências



Legenda: GAPDH foi utilizado como padrão de normalização. (***) quando comparado com o grupo controle, (ns') não significativo quando compara-se com o grupo controle, e (ns) não significativo quando compara-se *laser* vermelho de baixa potência com *laser* infravermelho de baixa potência.

5 DISCUSSÃO

Os equipamentos *lasers* de baixa potência são fontes viáveis de radiação para serem usadas em protocolos terapêuticos aplicados na prática clínica e vêm sendo utilizados por profissionais em Biologia, Biomedicina, Enfermagem, Fisioterapia, Medicina e Odontologia. Isso ocorre devido a serem fontes de radiação não ionizante, de baixo custo e aplicadas para tratamentos de diversas doenças. A possibilidade de diferentes comprimentos de onda, do vermelho ao infravermelho próximo apresentadas no espectro eletromagnético, dentro da chamada janela terapêutica (600 a 1000nm), diferentes fluências (de poucos a muitos J/cm²) e potências de 1 a 100mW, são características físicas que também contribuem para crescente utilização.

Por outro lado, as variações nos parâmetros de irradiação levaram à necessidade de estabelecer os limites entre efeitos benéficos e adversos. Estes limites podem muitas vezes serem estreitos, dependentes das condições de irradiação, das condições fisiológicas e do tipo de tecido biológico exposto a radiação *laser*.

5.1 Lesões no DNA de células sanguíneas de ratos Wistar

Nossos resultados indicam que a exposição aos *lasers* de baixa potência, vermelho e infravermelho, induziram lesões no DNA em leucócitos do sangue periférico de ratos *Wistar* e é dependente da fluência, potência e modo de emissão (figuras 9, 10 e 11). As análises das fluências testadas para ambos os *lasers*, vermelho e infravermelho, sugerem que as lesões no DNA não apresentam fluência-dependência, isso porque os *lasers*, com fluência intermediária de 50J/cm², induziram os mais elevados níveis de lesões no DNA nas células sanguíneas.

Com fluência de 100J/cm², estes *lasers* induziram poucas lesões no DNA. Tal fato pode ser possível, uma vez que ambos os *lasers*, em altas densidades de energia poderiam induzir mecanismos de proteção contra as lesões no DNA, como os mecanismos de reparo de lesões no DNA.

De fato, esses *lasers* apresentam efeitos letais e induzem resposta SOS em células de (procariotas) *Escherichia coli* deficientes em mecanismos de reparo do DNA (FONSECA et al., 2011; SERGIO et al., 2013) e lesões no DNA em células eucariotas (HOURELD & ABRAHAMSE, 2007; MBENE ET AL., 2009). Além disso, foi relatada a ocorrência de lesões no DNA de forma dose-dependente e efeitos inibitórios em culturas de células em altas fluências (HOURELD & ABRAHAMSE, 2007; MBENE et al., 2009; HAWKINS & ABRAHAMSE, 2007). Estes resultados discrepantes podem estar relacionadas ao tipo de célula irradiada e as condições de irradiação (fluência, potência e comprimento de onda).

Além disso, nossos dados foram obtidos a partir de células em um contexto tecidual, com todo conteúdo extracelular; desta forma poderia interferir nas respostas das células à exposição aos *lasers*. Representando condições mais próximas daquelas encontradas na prática. As lesões no DNA foram identificadas mais proeminentes em células expostas ao *laser* infravermelho, sugerindo que diferentes cromóforos ou diferentes vias de sinalizações intracelulares podem estar envolvidas nos efeitos biológicos dos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência.

Poucos estudos avaliaram os efeitos dos *lasers* de baixa potência no DNA em diferentes potências ou densidades de potências (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006; KOHLI et al., 2001; KHOLI & GUPTA, 2003). No entanto, existe um consenso de que os efeitos biológicos destes *lasers* são dependentes do tempo de irradiação (KARU, 1982). De fato, os resultados na figura 10 demonstram que as lesões no DNA são maiores nas menores potências utilizadas na irradiação *laser* (30 mW e 50 mW) do que em comparação com a maior potência (100 mW).

Nossos resultados sugerem que as lesões no DNA induzidas pelos *lasers* podem ser dependentes do tempo de irradiação, visto que na potência de 50 mW, o número de lesões se apresentaram maiores. Isso poderia distinguir entre as *lesões* no DNA causadas pelos *lasers* daquelas induzidas pelas radiações ionizantes, onde quanto maior a taxa de dose, maior é o número de lesões no DNA.

Na verdade, partes das lesões no DNA gerados pelas radiações ionizantes acontecem através da formação de radicais livres (lesões indiretas) e outros de interação direta com a molécula de DNA. Para *lasers* de baixa potência, as lesões no DNA poderiam ser induzidas pelos radicais livres resultantes de mecanismos mais complexos do que estes relativos às lesões no DNA causadas pelas radiações ionizantes.

Alguns protocolos clínicos são baseados em *lasers* de baixa potência no modo pulsado de emissão, que são sugeridos pelos próprios equipamentos. No entanto, poucos estudos compararam os efeitos biológicos dos *lasers* no modo contínuo com os efeitos biológicos no modo pulsado de emissão (FONSECA et al., 2010; FONSECA et al., 2011).

A análise dos resultados na figura 11 sugere que as lesões no DNA dependem da frequência do *laser* no modo pulsado. As lesões no DNA no modo contínuo são similares a estas em células sanguíneas expostas com 50PPS (pulsos por segundo), porém em menor número do que em 10 e 100PPS. O número de lesões no DNA foi similar para ambos os *lasers*, exceto para o modo contínuo. Além disso, *lasers* no modo pulsado de emissão, nas maiores frequências, induzem lesões no DNA em número semelhante aquele induzido pelo peróxido de hidrogênio (controle positivo).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que *lasers*, vermelho e infravermelho, no modo contínuo e no modo pulsado de emissão induzem filamentação bacteriana (MARCIANO et al., 2012; FONSECA et al., 2011), lesões em DNA plasmidial (MARCIANO et al., 2012; FONSECA et al., 2012b) e expressão de genes de reparo de DNA (FONSECA et al., 2013b). É possível que *lasers* de baixa potência no modo pulsado de emissão e em altas frequências sejam capazes de induzir a produção de radicais livres em maiores níveis, quando comparado com o modo contínuo de emissão. De fato, a pré-exposição ao *laser* vermelho de baixa potência no modo pulsado de emissão induz uma maior proteção contra o peróxido de hidrogênio em comparação com modo contínuo de emissão (FONSECA et al., 2010), e o *laser* no modo pulsado induz maior peroxidação lipídica em células sanguíneas do que no modo contínuo de emissão (FONSECA et al., 2012a).

Apesar dos importantes resultados obtidos através do método ensaio cometa convencional, esta técnica não permite identificar os tipos de lesões no DNA, nem descrever os mecanismos relacionados às lesões no DNA.

Logo, o ensaio cometa modificado foi realizado com enzimas específicas de reparo no DNA, relacionados à reparação de lesões oxidativas. A enzima formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) participa na detecção da lesão e apresenta atividade AP-liase, que cliva sucessivamente os sítios abásicos (AP) pela betadelta-eliminação de purinas oxidadas, resultantes de reações de radicais livres, em particular a lesão mutagênica 8-oxoguanina (GILBOA et al., 2002; MARTÍNEZ-ALFARO et al., 2006; PRAKASH et al., 2012). A atividade N-glicosilase retira as purinas danificadas de quebras duplas no DNA, gerando um

sítio AP. A atividade AP-liase cliva tanto 3' quanto 5', removendo-os e assim produzem uma diferença de base em relação a fita complementar (SPEIT et al., 2004).

O ensaio cometa realizado com esta enzima vem sendo utilizado com sucesso para avaliar a indução de lesões oxidativas no DNA, por agentes físicos e químicos (COLLINS, 2014). Lesões no DNA de células sanguíneas avaliadas pelo ensaio cometa modificado com a enzima FPG indicam que os efeitos de *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência no DNA estão relacionados com mecanismos oxidativos, uma vez que o índice de dano foi maior quando obtido pelo ensaio cometa modificado (figuras 12, 13 e 14).

De fato, o número de lesões obtido pelo ensaio cometa modificado em células sanguíneas expostas ao *laser* infravermelho é semelhante ao obtido com as células sanguíneas incubadas com peróxido de hidrogênio (figura 12 e 14). Estes resultados estão de acordo com outros estudos, nos quais foi sugerido que o *laser* de baixa potência induz dano no DNA por mecanismos oxidativos (TEIXEIRA et al., 2014; KUJAWA et al., 2014). Além disso, foi sugerido que radicais livres participam indiretamente (FUJIMOTO et al., 2012; BIASIBETTI et al., 2014), ou como um segundo mensageiro (ZHANG et al., 2008), na proliferação celular (MIGLIARIO et al., 2014) e migração celular (GAO & XING, 2009) induzidas por *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência.

Para confirmar a participação de mecanismos oxidativos, lesões no DNA foram avaliadas em células sanguíneas expostas aos *lasers*, vermelho e infravermelho, através do ensaio cometa modificado, utilizando outra enzima envolvida no reparo de bases oxidadas. A endonuclease III percorre o genoma para identificar lesões oxidativas no DNA, e assim apresenta também ambas as atividades de N-glicosilase e AP-liase, mas a sua atividade N-glicosilase atua sobre bases pirimidinas oxidada no DNA, dessa forma, gerando um sítio AP (WANG et al., 2002).

O índice de lesões obtidas pelo ensaio cometa modificado com a endonuclease III confirma que os *lasers* de baixa potência induzem lesões no DNA por mecanismos oxidativos (figuras 15, 16 e 17).

Similar ao obtido com a FPG, lesões no DNA foram maiores nas células sanguíneas expostas ao *laser* infravermelho quando comparado ao *laser* vermelho, sugerindo que os mecanismos oxidativos relacionados a ambos os *lasers* induzem lesões no DNA, mas envolvem diferentes cromóforos ou que, estes cromóforos sejam estimulados diferentemente.

Além disso, o índice de danos foi maior por ambas enzimas FPG e endonuclease III, e

as lesões no DNA induzidas pelos *lasers* não são específicas para bases purinas ou pirimidinas. Visto que há lesões no DNA causadas pela exposição aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência, e como os resultados apresentados indicam que as lesões no DNA são alvos das enzimas FPG e endonuclease III, foi avaliado se esses danos podem ou não levar ao aumento da expressão de RNAm de genes relacionados com o reparo por excisão de nucleotídeos.

5.2 Expressão de RNA mensageiro de reparo de DNA

Para verificar a expressão de genes de reparo do DNA, foi utilizada a técnica de RT-qPCR, que tem sido amplamente aceita e utilizada na detecção e quantificação de RNAm como um indicativo da expressão de genes em células procariotas (POSTOLLEC et al., 2011) e células eucariotas (LOBERT et al., 2010; MITCHEL et al., 2003), assim como em tecidos (LOBERT et al., 2010), após diferentes tratamentos e condições fisiológicas. Esta técnica é considerada padrão ouro na quantificação da expressão de RNAm relativa a um RNAm de um gene de referência (GAPDH, por exemplo) (BARBER et al., 2005).

O reparo por excisão de nucleotídeos (REN) é uma via envolvida na remoção de lesões induzidas pela radiação ultravioleta, principalmente os chamados dímeros de pirimidina (SHUCK et al., 2008). REN atua sobre lesões oxidativas não específicas, enquanto o reparo por excisão de bases (REB) atua sobre lesões específicas induzidas por reação da molécula de DNA com agentes oxidantes, tais como os radicais livres (SLUPPHAUG et al., 2003; DE LAAT et al., 1999; MARCIANO et al., 2012).

A radiação *laser*, vermelha e infravermelha, de baixa potência tem sido sugerida como produtora de radicais livres com potencial para indução de lesões na molécula de DNA (KOHLI et al., 2001; MARCIANO et al., 2012; SERGIO et al., 2012).

Os produtos dos genes de ERCC2 e ERCC1 estão envolvidos, respectivamente, no desenrolamento do DNA e incisão da fita contendo um produto oxidado na molécula do DNA. Dessa forma, ambas participam do mecanismo de reparo do DNA (COSTA et al., 2003). ERCC1 e ERCC2 estão envolvidos no reparo de lesões oxidativas e dímeros de

pirimidinas, que devem ser removidas da molécula de DNA para preservar a estabilidade genômica.

Os resultados obtidos sugerem que a expressão dos RNAm dos genes ERCC1 e ERCC2 é alterada em tecidos expostos aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência. A expressão relativa do RNAm de ERCC1 na pele exposta ao *laser* infravermelho de baixa potência (808 nm) é reduzida, porém a expressão de RNAm do gene ERCC1 não é alterada após a exposição ao *laser* vermelho (660nm) (figura 18).

A análise da figura 19 sugere que há também a redução na expressão do RNAm de ERCC2 na pele exposta ao *laser* infravermelho de baixa potência. No entanto, a expressão do RNAm do gene ERCC2 é diminuída na pele exposta ao *laser* vermelho nas menores fluências utilizadas (25 e 50 J/cm²).

Dados anteriores demonstraram que a expressão de outros RNAm relacionados com REB, XPA (*xeroderma pigmentosum* proteína A) e XPC (*xeroderma pigmentosum* proteína C) são aumentadas na pele uma hora após a exposição aos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência (FONSECA et al., 2014b). Isso confirma que a exposição ao *laser* altera a expressão de genes relacionados com reparo de lesões no DNA. Além disso, os dados em outro estudo, demonstraram a diminuição da expressão de RNAm XPC na pele queimada e exposta ao *laser* vermelho por cinco dias (TRAJANO et al., 2014).

No tecido muscular, a expressão do RNAm de ERCC1 é fortemente aumentada, após exposição ao *laser* infravermelho, mas não após a exposição ao *laser* vermelho (figura 20).

A expressão do RNAm de ERCC2 também é aumentada após exposição ao *laser*, mas apenas com fluência intermediária (figura 21). Neste tecido, a expressão dos RNAm de XPA e de XPC é diminuída após a exposição ao *laser* vermelho e ao infravermelho (FONSECA et al., 2014a), enfatizando que esses *lasers* afetam de forma diferente a expressão de genes relacionados com o reparo do DNA, pelo menos, aqueles envolvidos com o REN.

Além disso, o *laser* vermelho não apresenta nenhum efeito na expressão de XPA em pele queimada (TRAJANO et al., 2014). Outros autores verificaram que a exposição aos *lasers* induzem alterações na expressão de outros genes, como colágeno do tipo I (MARTIGNAGO et al., 2014), actina (FONSECA et al., 2013a), miogenina e VEGF (RODRIGUES et al., 2013), COX-2 (RODRIGUES et al., 2014), bem como a expressão de outros genes relacionados à via de reparo por excisão de bases no DNA (FONSECA et al., 2013a; FONSECA et al., 2014a).

Nossos resultados reforçam também que a expressão de RNAm relacionada ao sistema de reparo do DNA pode ser diferentemente induzida na pele e no músculo após a exposição ao *laser* de baixa potência (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Existem poucos estudos que comparam os efeitos de *lasers* na expressão de RNAm relacionados ao reparo de lesões no DNA em diferentes tecidos.

Dados anteriores demonstram que a exposição à radiação *laser* infravermelha afeta de forma diferente a expressão de RNAm que codificam enzimas envolvidas com o REB, como APE1, OGG1, APEX1 e APEX2 (FONSECA et al., 2013a; FONSECA et al., 2013b; FONSECA et al., 2014a) e no reparo do DNA mitocondrial (γ -polimerase) (FONSECA et al., 2014a) na pele e no músculo expostos ao *laser* infravermelho. A expressão de RNAm XPA e XPC também é alterada de forma diferente na pele e no músculo expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência (FONSECA et al., 2014a).

Esses achados podem ser explicados devido à presença de diferentes cromóforos ou na concentração de diferentes cromóforos em células da pele e do músculo. Alternativamente, é possível que as diferenças de microambiente em torno da célula da pele e do músculo tornem a resposta celular diferente a *lasers* de baixa potência, tal como a geração de radicais livres induzidos pelos *lasers*. De fato, autores relataram que os efeitos induzidos por *lasers* são detectáveis em culturas de células em baixas concentrações de soro, mas não em concentrações fisiológicas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Por outro lado, os resultados apresentados neste estudo sugerem que o efeito induzido pelo *laser* na expressão, tanto do RNAm de ERCC1, quanto no RNAm de ERCC2, na pele e no músculo depende do comprimento de onda.

As hipóteses para explicar esses resultados podem estar na diferença da absorção do feixe do *laser* infravermelho no tecido biológico, que é menor quando comparado com a radiação vermelha (NIEMZ, 2007), apesar dos efeitos do *laser* infravermelho, que parecem ser maiores na expressão do RNAm de ERCC2 quando comparado com a expressão do RNAm de ERCC1 na pele (figura 17 e 19).

Outra hipótese é a alteração no metabolismo induzido pela exposição aos *lasers*, isso devido ao fato de que a exposição ao *laser* infravermelho atua de forma diferente na pele e no músculo. Assim, a expressão do RNAm de GAPDH pode ser alterada de forma diferente e poderia explicar os efeitos induzidos pelos *lasers* nestes tecidos.

A citocromo c oxidase, o principal cromóforo para a radiação *laser* vermelha e infravermelha, tem sua função aumentada após a exposição, aumentando o metabolismo celular (efeito bioestimulativo), como Karu (2003) sugeriu. Como consequência do aumento do metabolismo, a produção de radicais livres é aumentada e isto poderia induzir lesões no DNA, que por sua vez induz a expressão de RNAm relacionados com reparo do DNA.

No entanto, mais estudos são necessários para avaliar se os efeitos dos *lasers*, vermelho e infravermelho, de baixa potência sobre a citocromo c oxidase são diferentes em células da pele e do músculo, e assim correlacionar a atividade da citocromo c oxidase com a expressão de RNAm de reparo do DNA.

Além disso, a avaliação dos níveis de proteínas de ERCC1 e ERCC2, bem como de outras proteínas de reparo REB ou REN, são necessárias para verificar se estes níveis estão correlacionados com a expressão relativa de RNAm e o significado funcional para reparo de lesões de DNA em tecidos biológicos expostos a *lasers* de baixa potência.

Por outro lado, é possível que as diferenças na expressão relativa de ERCC1 e ERCC2 na pele e no tecido muscular está relacionada com diferentes quantidades de energia absorvida (dose de radiação) nestes tecidos devido à dispersão da luz. De fato, a quantidade real de energia fornecida por um feixe *laser* em um meio turvo, como a pele e o tecido muscular esquelético, não é bem determinada, havendo dificuldades técnicas para avaliá-la (NIEMZ, 2007). São necessários avanços nas aferições da dose de radiação para a compreensão dos efeitos induzidos pelos *lasers* sobre os tecidos biológicos.

Além disso, o cálculo da dose de radiação por simulação computacional (Monte Carlo, por exemplo) poderia trazer importantes contribuições para este ponto.

A alteração na expressão de genes relacionados ao reparo por excisão de nucleotídeos foi induzida pelos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência. Estas alterações poderiam contribuir para conservação do código do DNA e da estabilidade genômica, conduzindo à homeostase celular em tecidos biológicos doentes. Em consequência, as células podem se tornar capazes de sofrer mais divisões celulares e sintetizar substâncias, o chamado efeito de bioestimulação, explicando parte dos efeitos benéficos da laserterapia.

CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que a exposição aos *lasers* induzem danos no DNA em células de sangue periférico de ratos *Wistar*, dependente da fluência, potência e dos modos de emissão, e que essas lesões são alvos da formamidopirimidina DNA glicosilase e da endonuclease III. Lesões oxidativas no DNA devem ser consideradas para a eficácia terapêutica e a segurança do paciente em aplicações clínicas baseadas em *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência.

Além disso, os resultados da expressão de genes de reparo por excisão de nucleotídeos indicam que a dosimetria deve ser ajustada para obter os efeitos dependentes da expressão de genes específicos em tecidos biológicos expostos aos *lasers* de baixa potência, em comprimentos de onda, potências e densidades de energia utilizadas em protocolos clínicos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. Mislocalization of XPF-ERCC1 Nuclease Contributes to Reduced DNA Repair in XP-F Patients. **Plos Genetics**, v. 6, n. 3, p.1000871-1000871. 2010.
- ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers In Surgery And Medicine**, , v. 29, n. 2, p.179-184. 2001.
- AMARILLAS-ESCOBAR, E. D. et al. Use of Therapeutic Laser After Surgical Removal of Impacted Lower Third Molars. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**. , p. 319-324. fev. 2010.
- ANTUNES, H. S. et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. **Blood Journal**, , v. 109, n. 5, p.2250-2255. 2007.
- BAGNATO, V. S.. **Laser: e suas Aplicações em Ciências e Tecnologia**. São Paulo: Livraria da Física, 2008. 88 p.
- BARBER, Robert D. et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH RNAm expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological Genomics**, , v. 21, n. 3, p.389-395, 01 jan. 2005.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.. DNA damage responses to oxidative stress. **Dna Repair**, v. 3, n. 8-9, p.1109-1115. 2004.
- BAXTER, G D. **Therapeutic Lasers: Theory and PRactice**. New York: Churchill Livingstone, 1994. 259 p.
- BECKMANN, K. H.; MEYER-HAMME, G.; SCHRÖDER, S. Low Level Laser Therapy for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: A Critical Survey. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2014, p.1-9, 16 mar. 2014.
- BERNARD-GALLON, D. et al. DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk. **Molecular Cancer**, , v. 36, n. 7, p.1-7. 2008.
- BERTOLOTTI, R. L. Alternative casting alloy for today's crown and bridge restorations: Part II: metal-ceramic restorations. **Journal of The California Dental Association**. Sacramento, v. 11, n. 9, p. 63-69. set. 1983.
- BIASIBETTI, M. et al. The influence of low-level laser therapy on parameters of oxidative stress and DNA damage on muscle and plasma in rats with heart failure. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 6, p.1895-1906, 07 jun. 2014.

BLOCH, H. Solartheology, heliotherapy, phototherapy, and biologic effects: a historical overview. **Journal of the National Medical Association**, Silver Spring, v. 82, n. 7, p.517-521, jul. 1990.

BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: Why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy?. **Cancer Letters**, v. 346, n. 2, p.163-171. 2014.

CADET, J. et al. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, v. 462, n. 2-3, p.121-128, abr. 2000.

CANUTO, K. S. et al. DNA repair in bacteria cultures and plasmid DNA exposed to infrared laser for treatment of pain. **Laser Physics Letters**, v. 10, n. 6, p.1-9. 2013.

CHOW, R. T et al. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **The Lancet**, v. 374, n. 9705, p.1897-1908. 2009.

COIN, F. et al. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. **Nature Genetics**, v. 20, n. 2, p.184-188, 1 out. 1998.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p.249-261. 2004.

_____. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1840, n. 2, p.794-800. 2014.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/dna Repair**, v. 336, n. 1, p.69-77, jan. 1995.

COSTA, R. M. A. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie**, [s.l.], v. 85, n. 11, p.1083-1099. 2003.

CRAWFORD, F.; THOMSON, C. E. Interventions for treating plantar heel pain. **The Cochrane Database Of Systematic Review**, v. 0, n. 3, p.1-57. 2003.

CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p.801-817. 2012.

ROSA, A. S. da et al. Effects of Low-level Laser Therapy at Wavelengths of 660 and 808 nm in Experimental Model of Osteoarthritis. **Photochemistry And Photobiology**, v. 88, n. 1, p.161-166. 2011.

DAMANTE, C. A. **Efeito da terapia com Laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos**. 2007. 90 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p.941-950. 2007.

DE BOER, J.; HOEIJMAKERS, J. H J. Nucleotide excision repair and human syndrome. **Carcinogenesis**, , v. 21, n. 3, p.453-460, 2000.

DE-LAAT, W. L; JASPERS, N. G J; HOEIJMAKERS, J. H J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Gene & Development**, v. 13, n. 7, p.768-785, 1 abr. 1999.

DOĞAN, G. E.; DEMIR, T.; ORBAK, R.. Effect of Low-Level Laser on Guided Tissue Regeneration Performed with Equine Bone and Membrane in the Treatment of Intraductal Defects: A Clinical Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 4, p.226-231, abr. 2014.

DYSON, M. Laser therapy in wound management, the new era. In Third World Congress of World Association for laser therapy, may 10-13, 2000, Athens. Proceedings of Third World Congress of World association of laser therapy. Athens: 2000 p. 20.

EDUARDO, C. P. et al. Prevention of recurrent herpes labialis outbreaks through low-intensity laser therapy: a clinical protocol with 3-year follow-up. **Lasers In Medical Science**, v. 27, n. 5, p.1077-1083, 2012.

ELAVARASU, S.; NAVEEN, D.; THANGAVELU, A.. Lasers in periodontics. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 4, n. 6, p.260-263, 2012

ESCHENBRENNER, A et al. Strand breaks induced in plasmid DNA by ultrasoft X-rays: Influence of hydration and packing. **International Journal Of Radiation Biology**, v. 83, n. 10, p.687-697, jul. 2009.

ESLAMIAN, F. et al. Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendonitis. **Lasers In Medical Science**, v. 27, n. 5, p.951-958, set. 2012.

FONSECA, A. S. et al. Effect of laser therapy on DNA damage. **Laser in surgery and medicine**, v. 6, n. 42, p.481-488, ago. 2010.

_____. Low intensity infrared laser induces filamentation in *Escherichia coli* cells. **Laser Physics**, v. 21, n. 10, p.1829-1837, 2011.

_____. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induced oxidative stress in vitro. **Laser in Medical Science**, v. 1, n. 27, p. 221-217, jan. 2012a.

_____. Low-level infrared laser effect on plasmid DNA. **Lasers In Medical Science**, v. 27, n. 1, p.121-130, jan. 2012b.

_____. Low intensity infrared laser effects on *Escherichia coli* cultures and plasmid DNA. **Laser Physics**, v. 22, n. 10, p. 1635-1641, 2012c.

_____. Low-intensity infrared lasers alter actin gene expression in skin and muscle tissue. **Laser Physics**, v. 23, n. 2, dez. 2013a

_____. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. **Lasers In Medical Science**, v. 28, n. 4, p.1077-1084, jul. 2013b.

_____. Low intensity infrared laser affects expression of oxidative DNA repair genes in mitochondria and nucleus. **Laser Physics**, v. 24, n. 11, set. 2014a.

_____. Low-intensity red and infrared lasers on XPA and XPC gene expression. **Laser Physics Letters**, v. 11, n. 9, set. 2014b.

FOUSTERI, M.; MULLENDERS, L. H F. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. **Cell Research**, v. 18, p.73-84, jan. 2008.

FRIEDBERG, E. C.. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p.22-33, out. 2001.

FRIEDBERG, E.I C et al. **DNA repair and mutagenesis**. 2. ed. Washington: American Society For Microbiology, 2006. 1118 p.

FUJIMOTO, T. et al. Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene. **Laser In Surgery And Medicine**, , v. 44, n. 8, p.685-694. 2012.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **Journal Of Biomedical Science**, v. 16, n. 1, p.4-20, jan. 2009.

GARCEZ, A. S., NUNES, S. C., RIBEIRO, M. S. Aplicações clínicas do laser em baixa intensidade para a biomodulação e terapia fotodinâmica. In: **Atualização clínica em Odontologia**. São Paulo: Artes Médicas. 2008. p. 576-91.

_____. In **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. São Paulo: Artes Médicas. 2012. p. 14-27.

GENECARDS – ERCC1: **Human Gene Database. Human Gene Database**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERCC1>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

GENECARDS – ERCC2: **Human Gene Database. Human Gene Database**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERCC2>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

GENOVESE, W J. **Efeitos terapêuticos do laser de baixa intensidade: Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Livraria Santos. 2000. 130 p.

GILBOA, R et al. Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p.19811-19816, maio 2002.

GINZINGER, D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p.503-512, jun. 2002.

GRIGORENKO, E V. **DNA arrays: Technologies and experimental strategies.** Flórida: Boca Raton, 2001. 184 p.

HALLIDAY, D; RESNICK, R; VALKER, J. **Fundamentals of Physics.** 9. ed. : John Wiley & Sons, 2010. 1136 p.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4. ed.: Oxford University Press, 2007. 888 p.

HAWKINS, D H.; ABRAHAMSE, H. Changes in Cell Viability of Wounded Fibroblasts following Laser Irradiation in Broad-Spectrum or Infrared Light. **Laser Chemistry**, v. 2007, p.1-10, 2007.

_____. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, n. 1, p.74-83. 2006.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p.366-74, 2001

HOURELD, N; ABRAHAMSE, H. In Vitro Exposure of Wounded Diabetic Fibroblast Cells to a Helium-Neon Laser at 5 and 16 J/cm². **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 25, n. 2, p.78-84. 2007.

HUANG, T. H; LU, Y. C.; KAO, C. T. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. **Lasers In Medical Science**, v. 27, n. 3, p.621-627, 16 out. 2011.

HUANG, Y. Y. HAMBLIN, M. R. Mecanismos da terapia laser de baixa potência. In: Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012. P27-43.

JESUS, J. F. et al. Low-Level Laser Therapy on Tissue Repair of Partially Injured Achilles Tendon in Rats. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 32, n. 6, p.345-350, jun. 2014.

JIANG, Y. et al. Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Atomic Force Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 5, p.1758-1767, set. 2007.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p.1-17, mar. 1999.

KARU, T et AL. Biostimulation of He-La cells by low intensity visible light. **Nuovo Cimento D**, v. 1, 1982, p828-840.

KARU, T. 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, 28 jul. 2010.

KARU, T. **Low power laser therapy.** In: Biomedical Photonics Handbook. Vo-Dinh (ed.). CRC Press, Boca Raton, 2003.

KARU, T. Molecular mechanism of therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. **Doklady Akademii Nauk Sssr**, Sssr, v. 291, n. 5, p.1245-1249, 1986.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p.691-704, maio 1989.

KAZEM SHAKOURI, S et al. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers In Medical Science**, v. 25, n. 1, p.73-77, 28 abr. 2009.

KIM, Y G. Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species; implications for therapy. **Free Radical Research**, v. 36, n. 12, p.1243-1250, dez. 2002.

KLUNGLAND, A.; BJELLAND, S. Oxidative damage to purines in DNA: Role of mammalian Ogg1. **Dna Repair (Amst)**, v. 6, n. 4, p.481-488, 1 abr. 2007.

KOHLI, R.; BOSE, B.; GUPTA, P. K. Induction of pbr gene expression in E. coli strain KY706/pPL-1 by He-Ne laser (632.8 nm) irradiation. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 60, n. 2-3, p.136-142, jul. 2001.

KOHLI, R.; GUPTA, P. K. Irradiance dependence of the He-Ne laser-induced protection against UVC radiation in E. coli strains. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 69, n. 3, p.161-167, mar. 2003.

KUJAWA, J. et al. The effect of near-infrared MLS laser radiation on cell membrane structure and radical generation. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 5, p.1663-1668, 10 abr. 2014.

LEONARDUZZI, G. et al. New insight into redox-modulated cell signaling. **Current Pharmaceutical Desing**, Seattle, v. 17, n. 36, p.3994-4006, dez. 2011.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W.. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p.46-53, maio 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, dez. 2001.

LOBERT, S.; HISER, L.; CORREIA, J. J.. Expression Profiling of Tubulin Isoforms and Microtubule-Interacting Proteins Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Methods In Cell Biology**, p.47-58, 2010.

LOPES, L. A. Laserterapia na odontologia. **Biodonto Clínica Odontológica Integrada**, Bauru, n. 1, p. 10-50, nov/dez. 2003.

MAILLARD, O.; SOLYOM, S.; NAEGELI, H. An Aromatic Sensor with Aversion to Damaged Strands Confers Versatility to DNA Repair. **Plos Biology**, v. 5, n. 4, p.79-91, 13 mar. 2007.

MARCIANO, R. S. et al. Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 11, n. 9, p.1476-1483, 2012.

MARNETT, L. J.. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.361-370, 1 mar. 2000. Oxford University Press (OUP).

MARTIGNAGO, C.. C.. S.. et al. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. **Lasers In Medical Science**, v. 30, n. 1, p.203-208, 30 ago. 2014.

MARTÍNEZ-ALFARO, M. et al. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 163, n. 3, p.198-205. 2006.

MBENE, A. B.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16J/cm². **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 2, p.131-137. 2009.

MELIS, J. P.; VAN STEEG, H.; LUIJTEN, M. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 18, p.2409-2419, 20 jun. 2013.

MELLON, I. et al. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. **Proceeding Of The National Academy Of Science Of The United States Of America**, v. 83, n. 23, p.8878-8882, dez. 1986.

MIGLIARIO, M. et al. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. **Lasers In Medical Science**, v. 29, n. 4, p.1463-1467, 5 mar. 2014.

MITCHELL, J. R; HOEIJMAKERS, J. H; NIEDERNHOFER, L.a J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Current Opinion In Cell Biology**, v. 15, n. 2, p.232-240, abr. 2003.

MITRA, S. et al. Complexities of DNA Base Excision Repair in Mammalian Cells. **Molecules And Cells**, v. 7, n. 3, p.305-312, 1997.

NIEMZ, M. H.. **Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and applications**. 3. ed. New York: Springer, 2007. 308 p.

O'SHEA, D. C.; CALLEN, W. R.; RHODES, W. T. **Introduction to lasers and their applications**. California: Addison-Wesley Publishing Company, 1977. 276 p.

ORHAN, K. et al. Low-level laser therapy of dentin hypersensitivity: a short-term clinical trial. **Lasers In Medical Science**, v. 26, n. 5, p.591-598, 30 jun. 2010.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p.291-298, ago. 1984.

PATRONO, C. Polymorphisms in base excision repair genes: Breast cancer risk and individual radiosensitivity. **World Journal Of Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p.874-882, 2014.

PEJČIĆ, A. et al. The Effects of Low Level Laser Irradiation on Gingival Inflammation. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 28, n. 1, p.69-74, fev. 2010.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T.; BAXTER, G. D.. Laser Photobiomodulation of Wound Healing: A Review of Experimental Studies in Mouse and Rat Animal Models. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 28, n. 3, p.291-325, jun. 2010.

PEPLOW, P. V. et al. Laser Photobiomodulation of Gene Expression and Release of Growth Factors and Cytokines from Cells in Culture: A Review of Human and Animal Studies. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 29, n. 5, p.285-304, maio 2011.

PETERMANN, E. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. **Dna Repair**, v. 2, n. 10, p.1101-1114. 2003.

PETRUSEVA, I. O.; EVDIKIMOV, A. N.; LAVRIK, O. I. Molecular Mechanism of Global Genome Nucleotide Excision Repair. **Acta Naturae**, v. 6, n. 1, p.23-34. 2014.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p.848-861. 2011.

PRAKASH, A.; DOUBLIÉ, S.; WALLACE, S. S.. The Fpg/Nei Family of DNA Glycosylases. **Progress In Molecular Biology And Translational Science**, p.71-91, 2012.

PRENTICE, W. E. **Modalidades Terapêuticas Para Fisioterapeutas**. 4. ed. : Mcgraw Hill, 2014. 624 p.

REARDON, J. T.; SANCAR, A. Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. **Genes & Development**, v. 17, n. 20, p.2539-2551, 15 out. 2003.

REDDY, G. K. Photobiological Basis and Clinical Role of Low-Intensity Lasers in Biology and Medicine. **J Clin Laser Med Surg**, v. 22, n. 2, p.141-150, abr. 2004.

RIBEIRO, M. S. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele. 2000. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Comissão Nacional de Energia Nuclear, São Paulo, 2000.

ROBERTSON, A. B. et al. DNA Repair in Mammalian Cells. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 66, n. 6, p.981-993. 2009.

RODRIGUES M. T. J. Efeito terapeutico da irradiação com laser de arseneto de gálio alumínio (830 nm) em lesões provocadas pelo aparelho ortodontico fixo na cavidade oral. 2001. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas e Nucleares, São Paulo.

RODRIGUES, N. C. et al. Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. **Braz. J. Phys. Ther.**, v. 18, n. 5, p.395-401, 2014.

RODRIGUES, Na C. et al. Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 120, p.29-35. 2013.

ROSENTHAL, D. I.; TROTTI, A. Strategies for Managing Radiation-Induced Mucositis in Head and Neck Cancer. **Seminars In Radiation Oncology**, v. 19, n. 1, p.29-34. 2009.

SANCAR, A; REARDON, J T. Nucleotide Excision Repair in E. Coli and Man. **Advances In Protein Chemistry**, p.43-71, 2004.

SAPERIA, D. et al. Demonstration of elevated type I and type III procollagen RNAm levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 138, n. 3, p.1123-1128, ago. 1986.

SARASIN, A.; STARY, A. New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. **Dna Repair (Amst)**, v. 6, n. 2, p.265-269, fev. 2007.

SATOH, M. S.; LINDAHL, T.. Enzymatic repair of oxidative DNA damage. **Cancer Research**, v. 7, n. 54, p.1899-1901, abr. 1994.

SCHAFFER, M et al. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, v. 54, n. 1, p.55-60. 2000.

SERGIO, L. P. S. Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red Laser. **Journal Ofclinical & Experimental Dermatology Research**, v. 4, n. 1, p.1-8, jan. 2012.

SERGIO, L. P. S. et al. Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 12, n. 5, p.930-935, 2013.

SHUCK, S. C; A SHORT, E.; TURCHI, J. J. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p.64-72. 2008.

SILVA, D. F. T., ALMEIDA-LOPES, L., RIBEIRO, M. S. Interação Laser-tecido biológico e princípios de dosimetria. In: **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012. p14-26.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p.184-191, mar. 1988.

SGOLASTRA, F. et al. Effectiveness of Laser in Dentinal Hypersensitivity Treatment: A Systematic Review. **Journal Of Endodontics**, v. 37, n. 3, p.297-303. 2011.

SLUPPHAUG, G. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 531, n. 1-2, p.231-251, 29 out. 2003.

- SPEIT, G. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. **Toxicology Letters**, v. 146, n. 2, p.151-158, 15 jan. 2004.
- SUGASAWA, K. et al. Two Human Homologs of Rad23 Are Functionally Interchangeable in Complex Formation and Stimulation of XPC Repair Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 12, p.6924-6931. 1997.
- SVELTO O., HANNA D. D. **Principles of laser**. Plenum Press, Nova York, EUA, 1998.
- TEIXEIRA, G. R. et al. Infrared laser effects at fluences used for treatment of dentin hypersensitivity on DNA repair in Escherichia coli and plasmids. **Optics & Laser Technology**, v. 64, p.46-52. 2014.
- TIRLAPUR, U. K.; KONIG, K.. Femtosecond near-infrared laser pulse induced strand breaks in mammalian cells. **Cellular And Molecular Biology: (Noisy-le-Grand, France)**, v. 47, n. 0, p.131-134, 2014.
- TRAJANO, E. T. L. et al. Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red laser. **Lasers In Medical Science**, v. 29, n. 6, p.1953-1957. 2014.
- WANG, T. et al. Endonuclease III, Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase, and Proteinase K Additively Enhance Arsenic-Induced DNA Strand Breaks in Human Cells. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, n. 10, p.1254-1258. 2002.
- TURRENS, J. F.. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal Of Physiology**, v. 552, n. 2, p.335-344, 15 out. 2003. Wiley-Blackwell.
- VLADIMIROV, u A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I.. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry: (Mosc) Biokhimiia**, , v. 69, n. 1, p.81-90. 2004.
- WOOD, R. D. DNA Repair in Eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, n. 1, p.135-167. 1996.
- YILMAZ, H. G. et al. Clinical evaluation of Er,Cr: YSGG and GaAlAs laser therapy for treating dentine hypersensitivity. **Journal Of Dentistry**, v. 39, n. 3, p.249-254. 2011.
- YOUNG, M. **Óptica e Lasers**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- ZHANG, J.; XING, D.; GAO, X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. **J. Cell. Physiol.**, v. 217, n. 2, p.518-528. 2008.
- ZHANG, L.; YANG, H.; XU, J. Gene Expression Significance in Personalized Medicine of Non-small Cell Lung Cancer and Gene Expression Analyzing Platforms. **Current Drug Metabolism**, , v. 12, n. 5, p.455-459, jun. 2011.

APENDICE A – DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers

Lasers in Surgery and Medicine

DNA Damage in Blood Cells Exposed to Low-Level Lasers

Luiz Philippe da Silva Sergio,¹ Ana Paula Almeida da Silva,² Philipi Freitas Amorim,¹ Vera Maria Araújo Campos,¹ Luis Alexandre Gonçalves Magalhães,¹ Flavia de Paoli,³ and Adenilson de Souza da Fonseca^{1,4*}

¹Laboratório de Ciências, Radiológicas, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, Rio de Janeiro 20550900, Brazil

²Laboratório de Biologia Molecular de Tumores, Departamento de Biologia Celular e Genética, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, Rio de Janeiro 20550900, Brazil

³Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036900, Brazil

⁴Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca, 94, Rio de Janeiro 20211040, Brazil

Background and Objective: In regenerative medicine, there are increasing applications of low-level lasers in therapeutic protocols for treatment of diseases in soft and in bone tissues. However, there are doubts about effects on DNA, and an adequate dosimetry could improve the safety of clinical applications of these lasers. This work aimed to evaluate DNA damage in peripheral blood cells of *Wistar* rats induced by low-level red and infrared lasers at different fluences, powers, and emission modes according to therapeutic protocols.

Material and Methods: Peripheral blood samples were exposed to lasers and DNA damage was accessed by comet assay. In other experiments, DNA damage was accessed in blood cells by modified comet assay using formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III enzymes.

Results: Data show that exposure to low-level red and infrared lasers induce DNA damage depending on fluence, power and emission mode, which are targeted by Fpg and endonuclease III.

Conclusion: Oxidative DNA damage should be considered for therapeutic efficacy and patient safety in clinical applications based on low-level red and infrared lasers. Lasers Surg. Med. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: comet assay; oxidative lesion; *Wistar* rats

INTRODUCTION

Low-level lasers have been used in healthcare for more than 4 decades, and these devices are distinguished by the wavelength (or frequency), emission mode (continuous wave or pulsed) or power, ranging from low, medium up to high power [1].

In regenerative medicine, there are increasing applications of therapeutic protocols for treatment of diseases in soft tissues, as well as in bone tissue [2,3], such as dentin hypersensitivity [4], herpes labialis [5], treatment of

pain [6], as well as inflammatory processes [7] and tissue regeneration [8–10]. Improving of tissue injury by low-level lasers is explained by biostimulation or biomodulation effect [7]. However, in some protocols, there is no consensus about fluence (or dose), power, and frequency in pulsed emission mode of the laser beam used, as well as dosimetry is not accurate.

Irradiation with low-level red and infrared lasers promote a number of biochemical reactions resulting from the absorption of photon laser by an endogenous molecule (chromophore), such as cytochromes b and c, in bacterial cells, and in mammalian cells, respectively [10]. The laser radiation energy is transformed in a primary photosignal and in sequence it is transduced and amplified into cells [11]. It is thought that, in this transduction process, there is production of free radicals [12,13], and these reactive species could react with intracellular molecules, including DNA and membrane lipids [14–17].

Moreover, laser-induced free radical production is still controversial, and there is little experimental data about their biological side-effects, especially on the DNA molecule. DNA damage is not desired as laser-induced effect on cells because low-level lasers benefits are based on

Conflicts of interest: All authors have completed and submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest and none were reported.

Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Contract grant sponsor: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

*Correspondence to: Adenilson de Souza da Fonseca, PhD, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, Rio de Janeiro, 20550900 Brazil. E-mail: adnfonseca@ig.com.br

Accepted 8 January 2015

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/lsm.22344

biostimulative effect, but a genotoxic effect could occur in case unsuitable doses are used. Comet assay is a sensitive, available and rapid experimental procedure to evaluate DNA damage induced by physical and chemical agents [18]. Also, despite comet assay being an *in vitro* assay, data obtained from this assay are used to predict what occur in cells of multicellular organisms exposed to genotoxic agents [18–20]. Proposed by Ostling and Johanson (1984) [19], this technique is successfully used to quantify DNA damages in intact cells, classifying them as comets in 5 different classes, as proposed by Collins (1995) [20].

As there are doubts about effects on DNA and an adequate dosimetry could improve the safety and efficacy of clinical applications of these lasers, this work aimed to evaluate DNA damage in peripheral blood cells from *Wistar* rats induced by low-level red and infrared lasers. Different laser fluences, powers, and emission modes were used according therapeutic protocols.

METHODS

Low-Level Lasers

Therapeutic low-level red (660 nm) and infrared (808 nm) lasers (Photon Lase III, AlGalnP), purchased from D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brazil), with emission in continuous wave and pulsed mode was used in this study.

Chemical Reagents

NaCl (sodium chloride), Na₂EDTA (disodium salt dihydrate), tris [(hydroxymethyl)amino-methane], Triton X-100 [polyethylene glycol *p*-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether], DMSO (dimethyl sulfoxide), NaOH (sodium hydroxide), CCl₃OOH (trichloroacetic acid), ZnSO₄·7H₂O (zinc sulfate heptahydrate), C₃H₈O₃ (glycerol), Na₂CO₃ (sodium carbonate), NH₄NO₃ (ammonium nitrate), AgNO₃ (silver nitrate), CH₂O (formaldehyde), and CH₃COOH (acetic acid) were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). DNA repair enzymes Endonuclease III and formamidopyrimidine DNA glycolylase were from New England Biolabs (Ipswich, MA).

Animals

Adult male *Wistar* rats (body weight 250–300g and 3–4 months of age) were maintained in a controlled environment with six per cage, normal light/dark cycle conditions (12-hour light/12-hour dark; lights on at 6:00 a.m.). The animals had free access to water and food and ambient temperature was kept at 25 ± 2°C. Experiments were conducted in accordance with the Institutional Committee of Animal Care (Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro), protocol CEUA/038/2012.

Obtaining Blood Samples and Lasers Exposure

Blood was obtained by finger puncture in the hind paws of the animals after intraperitoneal administration of

sodium pentobarbital (65 mg/kg). Blood samples were collected with anticoagulant (heparin) and lasers were applied directly on blood samples at different fluences (25, 50, and 100 J/cm²), powers (30, 50, and 100 mW) and frequencies (continuous wave, 10, 50, and 100 pulses per second, 50% duty cycle). Light doses, powers and frequencies were those indicated by laser device for clinical practice or protocols. Negative controls were non-irradiated blood samples and positive controls were blood samples incubated with hydrogen peroxide (5 mM, 10 minutes, 37 °C).

Comet Assay

DNA damage was evaluated by used the comet assay [19]. Briefly, after laser exposure, blood samples were included in agarose low melting (0.75%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in phosphate buffer, spread on microscope slides and incubated in alkaline lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA; tris 10 mM, Triton X-100 1%, and 10% DMSO, pH 13, 5 °C, 18 hours). Microscope slides were washed with alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, 5 °C, 10 minutes), held electrophoresis (35 V, 400 mA) immersed in neutralizing solution (0.4 M tris, pH 7.5), washed with water distilled, dried and washed again with fixative solution (CCl₃COOH, ZnSO₄·7H₂O, C₃H₈(OH)₃). Other slides were incubated with Fpg/mut M protein or endonuclease III for evaluation of oxidative DNA damage according to manufacturer protocols. DNA was stained (5% carbonate, 01% ammonium nitrate, 0.1% silver nitrate, 0.25% tungstosilicic acid and 0.15% formaldehyde) and visualized by light microscopy (100x magnification). Damage index (DI) was calculated by the sum of the product of comet multiplied by their respective classes, where the full DI = 0 × (number Class 0) + 1 × (number class 1) + 2 × (number class 2) + 3 × (number class 3) + 4 × (number class 4).

Statistical Analysis

Data are reported as means ± standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed to verify possible statistical differences followed by Tukey post-test with *P* < 0.05 as the least significant level. InStat Graphpad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA).

RESULTS

Evaluation of Laser-Induced DNA Damage in Nucleated Blood Cells by Comet Assay

Figure 1 shows the damage index (DI) in samples of peripheral blood cells exposed to low-level red and infrared lasers at different fluences, at 100 mW in continuous emission mode. Data in this figure shows that red laser exposure significantly (*P* < 0.001) increased the DI values at 25 and 50 J/cm, and at 50 J/cm for the infrared laser when compared to negative control (non-irradiated blood samples). All DI values were significantly lower than positive control (blood samples incubated with hydrogen

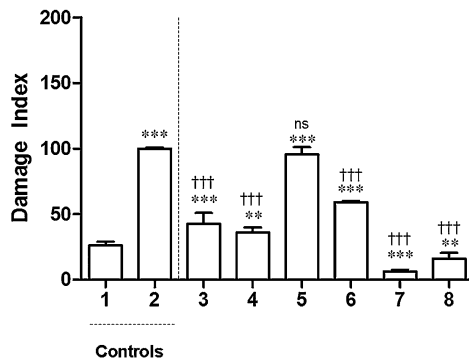


Fig. 1. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers at different fluences (at 100 mW in continuous emission mode). Columns: (1) Negative control, (2) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (3) 25 J/cm red laser, (4) 25 J/cm infrared laser, (5) 50 J/cm red laser (6) 50 J/cm infrared laser, (7) 100 J/cm red laser, (8) 100 J/cm infrared laser. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.01$ when compared with negative control, (***) $P < 0.001$ when compared with negative control, (ns) No significant when compared with positive control (non-irradiated) and (†††) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide).

peroxide), except DI values from blood samples exposed to red laser at 50 J/cm².

DNA damage in peripheral blood cells was also evaluated after laser exposure at different powers, at

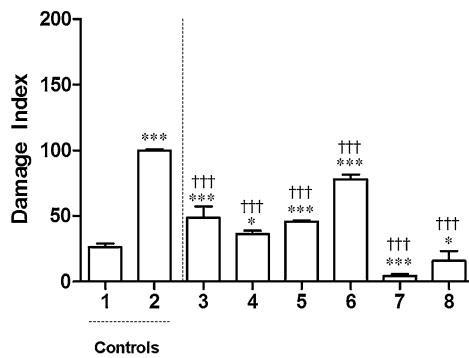


Fig. 2. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers at different powers (at 100 J/cm in continuous emission mode). Columns: (1) Negative control, (2) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (3) 30 mW red laser, (4) 30 mW infrared laser, (5) 50 mW red laser (6) 50 mW infrared laser, (7) 100 mW red laser, (8) 100 mW infrared laser. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (*) $P < 0.05$ when compared with negative control, (***) $P < 0.001$ when compared with negative control (non-irradiated) and (†††) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide).

100 J/cm² in continuous wave emission mode (Fig. 2). Data from these cells show that laser exposure at lowest powers significantly ($P < 0.05$) increased DI when compared to negative control, but at the higher power (100 mW), laser exposure decreased DI values. Also, data in this figure show that DI values from cells exposed to lasers were significantly ($P < 0.001$) lower than DI values of positive control.

Figure 3 presents DI values from peripheral blood cells exposed to low-level red and infrared lasers in continuous wave and in pulsed emission mode at different frequencies, at 100 J/cm², 30 and 50 mW, respectively. Data in this figure shows that exposure to lasers significantly ($P < 0.001$) increased DI when compared with negative control. Significant ($P < 0.001$) low DI values were obtained in blood cells exposed to lasers in continuous wave emission mode. At 50 PPS, laser exposure induced a low DI, but similar DI values were obtained at 10 PPS, as well as increased DI values were obtained at 100 PPS when compared to positive control.

DNA Repair Enzyme Action on DNA Exposed to Low-Level Red and Infrared Lasers

After evaluation of DNA damage induced by low-level red and infrared lasers at different fluences, powers and emission modes, which significantly increased DI in red blood cells from *Wistar* rats, we analyzed, thereafter, whether these lesions were targets of enzymes involved in repair of oxidative lesions in DNA molecule. For this,

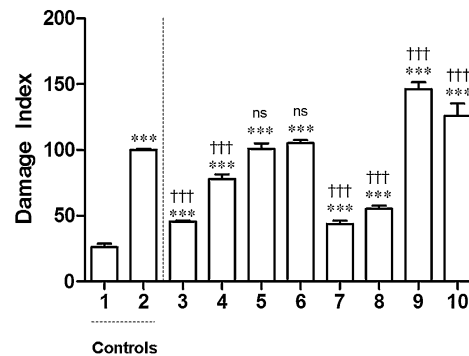


Fig. 3. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers at different emission modes (at 100 J/cm and 100 mW). Columns: (1) Negative control, (2) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (3) Continuous mode red laser, (4) Continuous mode infrared laser, (5) 10 PPS red laser, (6) 10 PPS infrared laser, (7) 50 PPS red laser (8) 50 PPS infrared laser, (9) 100 PPS red laser, (10) 100 PPS infrared laser. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with negative control (non-irradiated), (ns) No significant when compared with positive control (hydrogen peroxide) and (†††) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide). PPS: pulses per second.

specifically formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III were used in modified comet assay.

DI values in peripheral blood cells exposed to red and infrared lasers at 50 J/cm^2 and 100 mW in continuous wave emission mode, and incubated with Fpg are shown in Figure 4. Laser irradiation conditions were those inducing more significant DI values at different fluences (Fig. 1). Data in this figure show that DI values were significantly ($P < 0.001$) increased in blood samples exposed to lasers and incubated with Fpg enzyme when compared to blood samples not incubated with this enzyme. Negative and positive controls presented significant ($P < 0.001$) increase of DI values. DI values of blood cells exposed to lasers and incubated with Fpg were similar to those of negative and positive controls.

Also, DI was evaluated in blood cells exposed to lasers at 100 J/cm^2 and 30 mW (red laser) or 50 mW (infrared laser) in continuous wave emission mode, and incubated with Fpg enzyme (Fig. 5). Laser irradiation conditions were those inducing more significant DI values at different powers (Fig. 2). Data in Figure 5 show that incubation with Fpg enzyme increased significantly ($P < 0.001$) the DI values in blood cells exposed to low-level red and infrared lasers. DI values of blood cells exposed to lasers and incubated with Fpg were higher than those of negative control but lower than DI values of positive control.

Figure 6 shows DI values of blood cells exposed to lasers in continuous wave and pulsed emission mode, at 50 J/cm^2 and 100 mW , and incubated with Fpg enzyme. Laser irradiation conditions were those inducing more significant DI values in different laser emission modes (Fig. 3). Data demonstrates that Fpg incubation significantly ($P < 0.001$) increased DI in blood cells exposed to red and infrared lasers. DI values of blood cells exposed to lasers in

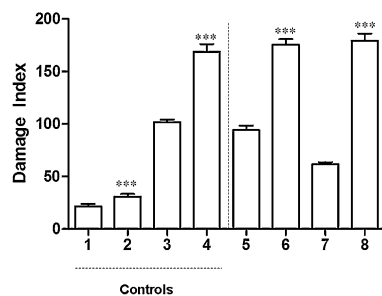


Fig. 4. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers (at 50 J/cm^2 and 100 mW in continuous emission mode) and incubated with FPG. Columns: (1) Negative control, (2) Negative control + FPG, (3) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (4) Positive control (5 mM hydrogen peroxide) + FPG, (5) 50 J/cm^2 red laser (6) 50 J/cm^2 red laser + FPG, (7) 50 J/cm^2 infrared laser, (8) 50 J/cm^2 infrared laser + FPG. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide). FPG: formamidopyrimidine DNA glycosylase.

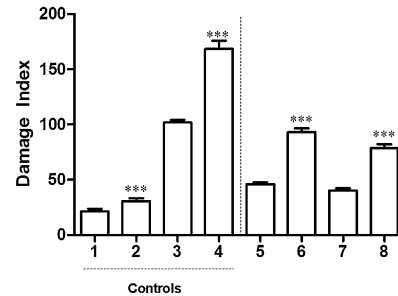


Fig. 5. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to red lasers (at 100 J/cm^2 in continuous emission mode) and incubated with FPG. Columns: (1) Negative control, (2) Negative control + FPG, (3) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (4) Positive control (5 mM hydrogen peroxide) + FPG, (5) 50 mW red laser (6) 50 mW red laser + FPG, (7) 30 mW infrared laser, (8) 30 mW infrared laser + FPG. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide). FPG: formamidopyrimidine DNA glycosylase.

pulsed emission mode and incubated with Fpg were similar to these of negative and positive controls.

To confirm whether laser-induced DNA lesions were caused by oxidative mechanisms, DI of blood cells exposed to lasers was accessed by comet assay incubated with

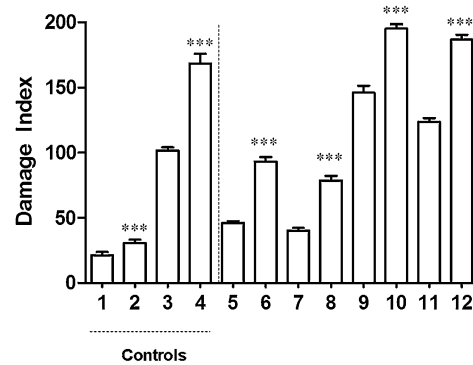


Fig. 6. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers at different emission modes (at 50 mW and 50 J/cm^2) and incubated with FPG. Columns: (1) Negative control, (2) Negative control + FPG, (3) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (4) Positive control (5 mM hydrogen peroxide) + FPG, (5) Continuous red laser (6) Continuous red laser + FPG, (7) Continuous infrared laser, (8) Continuous infrared laser + FPG, (9) 100 PPS red laser, (10) 100 PPS red laser + FPG, (11) 100 PPS infrared laser, (12) 100 PPS infrared laser + FPG. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide). FPG: formamidopyrimidine DNA glycosylase. PPS: pulses per second.

DNA DAMAGE IN BLOOD CELLS

5

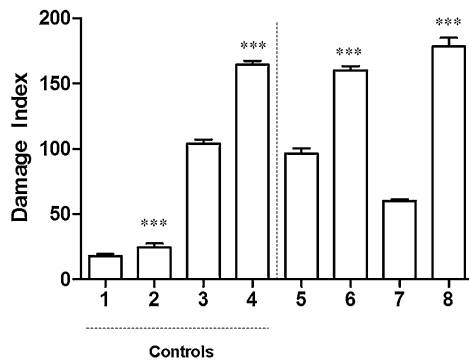


Fig. 7. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers (at 50 J/cm², at 100 mW in continuous emission mode) and incubated with endonuclease III. Columns: (1) Negative control, (2) Negative control + endonuclease III, (3) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (4) Positive control (5 mM hydrogen peroxide) + endonuclease III, (5) 50 J/cm² red laser (6) 50 J/cm² red laser + endonuclease III, (7) 50 J/cm² infrared laser, (8) 50 J/cm² infrared laser + endonuclease III. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide).

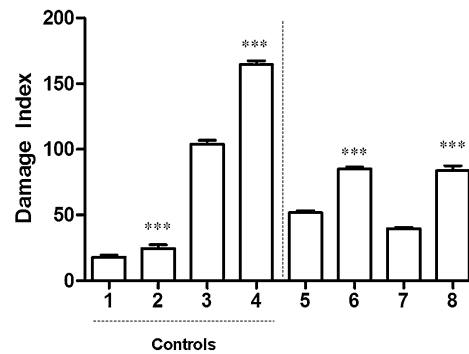


Fig. 8. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers (at 100 J/cm² in continuous emission mode) and incubated with endonuclease III. Columns: (1) Negative control, (2) Negative control + endonuclease III, (3) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (4) Positive control (5 mM hydrogen peroxide) + endonuclease III, (5) 50 mW red laser, (6) 50 mW red laser + endonuclease III, (7) 30 mW infrared laser, (8) 30 mW infrared laser + endonuclease III. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide).

endonuclease III. Figure 7 presents DI values of blood cells exposed to low-level red and infrared lasers at 50 J/cm² and 100 mW in continuous wave emission mode, and incubated with endonuclease III. Laser irradiation conditions were those inducing more significant DI values at different fluences (Fig. 1). Similar to that obtained by comet assay with Fpg enzyme, incubation with endonuclease III caused a significant ($P < 0.001$) increase of DI values of blood cells exposed to low-level red and infrared lasers when compared to blood cells exposed to laser but not incubated with this enzyme. DI values of blood cells exposed to lasers and incubated with endonuclease III were similar to positive control.

Figure 8 shows DI values of blood cells exposed to lasers at 100 J/cm² and 30 mW (red laser) or 50 mW (infrared laser) in continuous wave emission mode, and incubated with endonuclease III. Also, laser irradiation conditions were those inducing more significant DI values at different powers (Fig. 2). Data in Figure 8 show that incubation with endonuclease III significantly ($P < 0.001$) increased DI values of blood cells exposed to lasers. DI values of blood cells exposed to lasers and incubated with endonuclease III were higher than those of negative control but lower than DI values of positive control.

DI of blood cells exposed to lasers in different emission modes, at 50 J/cm² and 100 mW, was also evaluated after incubation with endonuclease III (Fig. 9). Laser irradiation conditions were those inducing more significant DI values in different emission modes (Fig. 3). Again, DI values of blood cells exposed to lasers and incubated with endonuclease III were significantly ($P < 0.001$) increased when compared with DI values of blood cells exposed to lasers but

not incubated with this enzyme. DI values of blood cells exposed to lasers in pulsed emission mode and incubated with endonuclease III were higher than those of negative and positive controls.

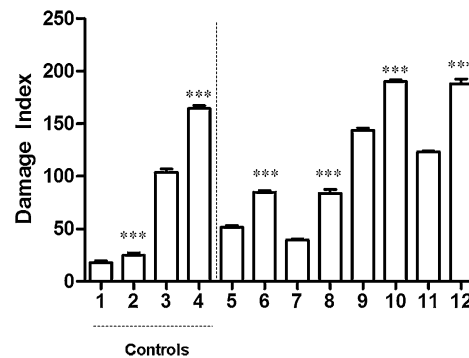


Fig. 9. Damage index of blood cells from *Wistar* rats exposed to lasers at different emission modes (at 100 J/cm² and 50 mW for red laser or 30 mW for infrared laser) and incubated with endonuclease III. Columns: (1) Negative control, (2) Negative control + endonuclease III, (3) Positive control (5 mM hydrogen peroxide), (4) Positive control (5 mM hydrogen peroxide) + endonuclease III, (5) Continuous red laser (6) Continuous red laser + endonuclease III, (7) Continuous infrared laser, (8) Continuous infrared laser + endonuclease III, (9) 100 PPS red laser, (10) 100 PPS red laser + endonuclease III, (11) 100 PPS infrared laser, (12) 100 PPS infrared laser + endonuclease III. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) $P < 0.001$ when compared with positive control (hydrogen peroxide). PPS: pulses per second.

DISCUSSION

Low-level lasers are versatile radiation sources to be used in therapeutic protocols due to their wide possibility of fluences, powers and frequencies in pulsed emission mode, as well as commercially-available laser devices emitting in different wavelengths. This brings the need to establish the limits between beneficial and adverse effects. Also, these limits could often be very close and depend on the irradiation and physiological conditions of the irradiated cells or cell type exposed to laser. Our findings indicate that exposure to red and infrared lasers induce DNA damage in *Wistar* rat peripheral blood cells depending on fluence, power and emission mode (Figs. 1, 2 and 3).

Fluence-response curves for both red and infrared lasers show that DNA damage is not fluence-dependent because red and infrared lasers at 50 J/cm^2 induces the higher DNA damage levels in blood cells, and at 100 J/cm^2 little DNA damage is induced. It is possible that red and infrared laser at highest fluences could induce protective mechanisms against DNA damage, as DNA damage repair mechanisms. In fact, these lasers present lethal effects and induce SOS response in *Escherichia coli* cells deficient in DNA repair mechanisms [21,22] and DNA lesions in mammalian cells [23,24]. Also, dose-dependent DNA damage and inhibitory effects on cell cultures at highest fluences were reported [23-25]. These discrepancies could be related to irradiated cell type and laser irradiation conditions (fluence, power and wavelength). Moreover, our data stems from cells into their tissue environment with all extracellular content, which could interfere with cell responses to laser exposure. Also, DNA damage is larger to infrared laser suggesting that different intracellular chromophores or signaling pathways could be involved in low-level red and infrared lasers.

Few studies have evaluated effects of low-level lasers on DNA at different powers or power densities [25,27,28]. However, there is consensus that biological effects of these lasers are dependent on irradiation time [29]. In fact, results in Figure 2 demonstrate that DNA damage is larger at the lowest laser powers used (30 and 50 mW) than at the higher laser power (100 mW). Our results suggest that laser-induced DNA damage could be dependent on time irradiation up to time irradiation relative to 50 mW. This could distinguish laser-induced DNA damages from those induced by ionizing radiation, which DNA damages are greater to highest dose rates. In fact, part of DNA damage induced by ionizing radiation is from free radicals and other from direct interaction with DNA molecules. For low-level lasers, DNA damages could be induced by free radicals resulting from more complex mechanisms than these related to DNA damages by ionizing radiation.

Some clinical protocols are based on low-level lasers in pulsed emission mode indicated by the devices themselves. However, few studies compared biological effects of these lasers in continuous wave with pulsed emission mode [15,21]. Analysis of results in Figure 3 shows that DNA damage depends on laser frequency in pulsed emission mode. DNA damage at continuous wave is similar

to these in blood cells at 50 PPS but lower than at 10 and 100 PPS. DNA damage was similar for red and infrared lasers, except for continuous wave. Also, lasers in pulsed emission mode at the higher frequency induces DNA damage similar or greater than this induced by hydrogen peroxide (positive control). In previous studies, we have demonstrated that red and infrared lasers in continuous wave and pulsed emission mode differently induce bacterial filamentation [17,21], damage in DNA plasmid [17,26] and expression of DNA repair gene [30]. It is possible that low-level lasers in pulsed emission mode at high frequencies are capable of inducing free radical production at greater levels than in continuous wave. In fact, pre-exposure to low-level red laser in pulsed emission mode induces larger protection against hydrogen peroxide than continuous wave [15] and laser-induced lipid peroxidation in blood cells is larger in pulsed emission mode than in continuous wave [16].

Despite important results having been obtained by conventional comet assay, this technique does not permit one to identify the DNA damage type and describe the DNA-damage related-mechanism. Then, modified comet assay was carried out with specific DNA repair enzymes related to repair of oxidative DNA damages (formamidopyrimidine DNA glycosylase and endonuclease III). Formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) participates in detection and AP lyase activity, which successively cleaves the abasic (AP) sites by beta-delta-elimination of oxidized purines resulting from free radical attacks, in particular the mutagenic 8-oxoguanine [31-33]. N-glycosylase activity releases damaged purines from double-stranded DNA, generating an AP site. Its AP-lyase activity cleaves both 3' and 5' to the AP sites, thereby removing them and producing one base gap with 5' and 3' phosphate [34]. Comet assay performed with this enzyme is successfully used to evaluate induction of oxidative DNA damage by physical and chemical agents [35]. DNA damage in blood cells evaluated by modified comet assay with Fpg enzyme indicates that effects of low-level red and infrared lasers on DNA are related to oxidative mechanisms because damage index (DI) is larger when accessed by modified comet assay (Figs. 4, 5 and 6). In these experiments, red laser at 50 mW and infrared laser at 30 mW induced the highest DI values (Fig. 2). Modified comet assays with Fpg enzyme were carried out in blood samples exposed to lasers at these powers to confirm the data obtained in experiments with different powers (Fig. 2), and to compare with positive control (hydrogen peroxide). In fact, DI by modified comet assay in blood cells exposed to infrared laser at 50 mW is similar to those obtained with blood cells incubated with hydrogen peroxide (Figs. 4 and 6). These results agree with other studies, in which it was suggested that low-level lasers induce DNA damage by oxidative mechanisms [36,37]. Moreover, free radicals are suggested to participate indirectly [38,39], or as a second messenger [40], in red and infrared laser-induced cell proliferation [13] and cell migration [41].

To confirm participation of oxidative mechanisms, DNA damage was evaluated in blood cells exposed to red and infrared lasers by modified comet assay using another

enzyme involved in repair of oxidative bases. Endonuclease III scan the genome for DNA oxidative lesions presenting also both the N-glycosylase and AP-lyase activity, but its N-glycosylase activity is on oxidized pyrimidine bases in double-stranded DNA, and it generates an AP site [42]. Damage index obtained by comet assay with endonuclease III confirmed that low-level lasers induce DNA damage by oxidative mechanisms (Figs. 7, 8 and 9). Similar to that obtained with Fpg, DI index in blood cells incubated with endonuclease III is larger than that in blood cells not incubated with endonuclease III, suggesting that oxidative mechanisms relative to the red and infrared laser-induced DNA damages involve different chromophores, or the chromophores are differently stimulated. Also, as DI was increased by both Fpg and endonuclease III, laser-induced DNA damage is non-specific to purine or pyrimidine bases.

CONCLUSION

Taken together, our findings show that laser exposure induces DNA damage in blood cells from *Wistar* rats, depending on fluence, power and emission mode, and that these lesions are targeted by formamidopyrimidine DNA glycosylase and endonuclease III. Oxidative DNA damage should be considered for therapeutic efficacy and patient safety in clinical applications based on low-level red and infrared lasers. Studies are ongoing to evaluate laser-induced DNA damage in specific blood cell types.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

REFERENCES

- Niemz MH. *Laser—Tissue Interactions: Fundamentals and Applications*. New York:Springer;2007.
- Amarillas-Escobar ED, Toranzo-Fernández JM, Martínez-Rider R, Noyola-Frías MA, Hidalgo-Hurtado JA, Serna VM, Gordillo-Moscoso A, Pozos-Guillén AJ. Use of therapeutic laser after surgical removal of impacted lower third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:319–324.
- Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskui MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci* 2010;25:73–77.
- Yilmaz HG, Kurtulmus-Yilmaz S, Cengiz E, Bayindir H, Aykac Y. Clinical evaluation of Er,Cr:YSGG and GaAlAs laser therapy for treating dentine hypersensitivity: A randomized controlled clinical trial. *J Dent* 2011;39:249–254.
- Eduardo PC, Bezinelli ML, Eduardo PF, da Graça Lopes RM, Ramalho KM, Bello-Silva MS, Esteves-Oliveira M. Prevention of recurrent herpes labialis outbreaks through low-intensity laser therapy: A clinical protocol with 3-year follow-up. *Lasers Med Sci* 2012;27:1077–1083.
- Slogastra F, Petrucci A, Gatto G, Monaco A. Effectiveness of laser in dentinal hypersensitivity treatment: a systematic review. *J Endod* 2010;37:297–303.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: A review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg* 2010;28:291–325.
- Dogan GE, Demir T, Orbak R. Effect of low-level laser on guided tissue regeneration performed with equine bone and membrane in the treatment of intrabony defects: A clinical study. *Photomed Laser Surg* 2014;4:226–231.
- Jesus JF, Spadacci-Morena DD, Rabelo NDA, Pinfield CE, Fukuda TY, Plapler H. Low-level laser therapy on tissue repair of partially injured achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg* 2014;32:342–350.
- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999;49:1–17.
- Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994;65:691–697.
- Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry* 2004;69:103–113.
- Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renó F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci* 2014;29:1463–1467.
- Kim YG. Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species; implications for therapy. *Free Radic Res* 2002;36:1243–1250.
- Fonseca AS, Moreira TO, Paixão DL, Farias FM, Guimarães OR, Paoli S, Gueller M, Paoli F. Effect of laser therapy on DNA damage. *Laser Surg Med* 2010;42:481–488.
- Fonseca AS, Teixeira AF, Presta GA, Geller M, Valença SS, Paoli F. Low intensity infrared laser effects on *Escherichia coli* cultures and plasmid DNA. *Laser Phys* 2012;22:1635–1641.
- Marciano RS, Sergio LPS, Polignano GAC, Guimarães OR, Geller M, Paoli S, Paoli F, Fonseca AS. Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11:1476–1483.
- Liao W, McNutt MA, Zhu Wei-Guo. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009;48:46–53.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291–298.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995;336:69–77.
- Fonseca AS, Presta GA, Geller M, Paoli F. Low intensity infrared laser induces filamentation in *Escherichia coli* cells. *Laser Phys* 2011;21:1–9.
- Sergio LPS, Marciano RS, Teixeira GR, Canuto KS, Polignano GAC, Guimarães OR, Gueller M, Paoli F, Fonseca AS. Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. *Photochem Photobiol Sci* 2013;12:930–935.
- Hourelid N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16J/cm². *Photomed Laser Surg* 2007;2:78–84.
- Mbene AB, Hourelid NN, Abrahamse H. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16J/cm². *J Photochem Photobiol B* 2009;94:131–137.
- Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Laser Surg Med* 2006;38:74–83.
- Fonseca AS, Presta GA, Geller M, Paoli F, Valença SS. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. *Lasers Med Sci* 2012;27:211–217.
- Kohli R, Bose B, Gupta PK. Induction of pfr gene expression in *E. coli* strain KY706/pPL-1 by He-Ne laser (632.8nm) irradiation. *J Photochem Photobiol B* 2001;60:136–142.
- Kohli R, Gupta PK. Irradiance dependence of the He-Ne laser-induced protection against UVC radiation in *E. coli* strains. *J Photochem Photobiol B* 2003;69:161–167.
- Karu T, Kalendo GS, Letokhov VS, Lobko VV. Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. *Nuovo Cimento D* 1982;1:828–840.
- de Souza da Fonseca A, Mencialha AL, Araújo de Campos VM, Ferreira Machado SC, de Freitas Peregrino AA, Geller M. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. *Lasers Med Sci* 2013;28:1077–1084.
- Gilboa R, Zharkov DO, Golan G, Fernandes AS, Gerchamann SE, Matz E, Kycia JH, Grollman AP, Shoham G. Structure of

- formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA. *J Biol Chem* 2002;22:19811–19816.
32. Alfaro MM, Tirado LP, Zapata FS, Trejo AC. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. *Toxicol Lett* 2006;163:198–205.
 33. Prakash A, Doublé S, Wallace SS. The Fpg/Nei family of DNA glycosylases: Substrates, structures, and search for damage. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012;110:71–91.
 34. Speit G, Schutz P, Bonzheim I, Trenz K, Hoffmann H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 2004;146:151–158.
 35. Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:794–800.
 36. Teixeira GR, Marciano RS, Sergio LPS, Polignano GAC, Guimaraes OR, Gueller M, Paoli F, Fonseca AS. Infrared laser effects at fluences used for treatment of dentin hypersensitivity on DNA repair in *Escherichia coli* and plasmids. *Opt Laser Technol* 2014;64:46–52.
 37. Kujawa J, Pasternak K, Zawodnik I, Irzmanski R, Wróbel D, Bryszewska M. The effect of near-infrared MLS laser radiation on cell membrane structure and radical generation. *Lasers Med Sci* 2014; in press.
 38. Fujimoto T, Ito S, Ito M, Kanazawa H, Yamaguchi S. Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene. *Laser Surg Med* 2012;44:685–694.
 39. Biasibetti M, Rojas DB, Hentschke VS, Moura DJ, Karsten M, Wannmacher CMD, Saffi J, Dal Lago P. The influence of low-level laser therapy on parameter stress and DNA damage on muscle and plasma in rats failure. *Lasers Med Sci* 2014; in press.
 40. Zhang J, Xing D, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src Tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediate. *J Cell Physiol* 2008;217:518–528.
 41. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci* 2009;16:4.
 42. Wang Tsu-Shing, Chung Chiao-Hui, Wang ASS, Bau Da-Tian, Samikkannu T, Cheng Yang-Ming, Lee Te-Chang. Endonuclease III, Formamidopyrimidine-DNA glycosylase, and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. *Chem Res Toxicol* 2002;15:1254–1258.

APÊNDICE B – Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue

Author's personal copy

Lasers Med Sci
DOI 10.1007/s10103-016-1870-6



ORIGINAL ARTICLE

Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue

Luiz Philippe S. Sergio¹ · Vera Maria A. Campos¹ · Solange C. Vicentini³ · Andre Luiz Mencialha¹ · Flavia de Paoli² · Adenilson S. Fonseca^{1,3}

Received: 23 January 2015 / Accepted: 4 January 2016
© Springer-Verlag London 2016

Abstract Lasers emit light beams with specific characteristics, in which wavelength, frequency, power, fluence, and emission mode properties determine the photophysical, photochemical, and photobiological responses. Low-intensity lasers could induce free radical generation in biological tissues and cause alterations in macromolecules, such as DNA. Thus, the aim of this work was to evaluate excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1) and excision repair cross-complementing group 2 (ERCC2) messenger RNA (mRNA) expression in biological tissues exposed to low-intensity lasers. Wistar rat ($n=28$, 4 for each group) skin and muscle were exposed to low-intensity red (660 nm) and near-infrared (880 nm) lasers at different fluences (25, 50, and 100 J/cm²), and samples of these tissues were withdrawn for RNA extraction, cDNA synthesis, and gene expression evaluation by quantitative polymerase chain reaction. Laser exposure was in continuous wave and power of 100 mW. Data show that ERCC1 and ERCC2 mRNA expressions decrease in skin ($p<0.001$) exposed to near-infrared laser, but increase in muscle tissue ($p<0.001$). ERCC1 mRNA expression does

not alter ($p>0.05$), but ERCC2 mRNA expression decreases in skin ($p<0.001$) and increases in muscle tissue ($p<0.001$) exposed to red laser. Our results show that ERCC1 and ERCC2 mRNA expression is differently altered in skin and muscle tissue exposed to low-intensity lasers depending on wavelengths and fluences used in therapeutic protocols.

Keywords Biostimulation · DNA repair · Oxidative lesion · Wistar rats

Introduction

Light amplification by stimulated emission of radiation (laser) is obtained by devices emitting lights from an active medium in an optical resonant cavity [1]. The emitted light beam bears specific characteristics, such as being collimated, monochromatic, coherent, and high light density [2]. Wavelength, frequency, power, fluence, and emission mode properties determine the photophysical, photochemical, and photobiological responses [3]. For low-intensity lasers, the aforementioned responses have caused an increase in use of these lasers in health care with positive clinical outcome reports due to their ability to induce stimulation or modulation effects on biological tissues [4]. Low-intensity lasers with output power below 100 mW are used for treating injuries in soft tissue, inflammatory processes [5], and tissue regeneration [6]. Understanding their biological effects can bring other clinical applications and more accurate dosimetry.

Biochemical reactions occur after laser energy is absorbed by endogenous chromophores, such as cytochrome c oxidase in mammalian cells and cytochrome bd in prokaryotes cells [7]. These reactions initiate transduction signal pathways involved in primary photosignal transformation in amplified signals [3] increasing ATP, DNA, RNA, and protein synthesis,

✉ Adenilson S. Fonseca
adnfonseca@ig.com.br

¹ Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, Rio de Janeiro 20550900, Brazil

² Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036900, Brazil

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca 94, Rio de Janeiro 20211040, Brazil

which, in turn, constitute the basis of laser-induced stimulation effect on biological tissues [5].

Free radicals could be involved in laser-induced effects participating in these transduction signal pathways inducing cellular proliferation [8]. Free radicals act as second messengers in specific cell signaling processes and alter gene expression [9]. However, laser-induced free radicals could react with a number of intracellular macromolecules (DNA, for example) altering their functions at sub-lethal level [10–13].

Strategic repair mechanisms are induced following DNA lesions preserving genetic code integrity and cellular homeostasis [14]. These strategies include the base excision and nucleotide excision DNA repair pathways. Base excision repair acts on single strand breaks, oxidized bases, and few bulky adducts [15, 16], induced by endogenous free radicals or from exogenous exposure to genotoxic agents [17]. Previous data demonstrated that the expression of messenger RNA (mRNA) related to base excision repair is altered in biological tissues exposed to low-intensity red [18] and infrared [19, 20] lasers. Also, exposure to low-intensity lasers alters the expression of mRNA related to nucleotide excision repair [18, 20]. Nucleotide excision repair (NER) is a DNA repair pathway initially described in the repair of pyrimidine dimers induced by ultraviolet radiation [15]. This DNA repair pathway is involved in finding and removing DNA lesions which cause distortions in DNA double helix [21]. Recently, NER was also demonstrated as acting on oxidative damages in DNA [14]. NER is dependent on RNA polymerase II action when repair is coupled to transcription, carrying out rapid repair of actively transcribed genes [22]. This DNA repair mechanism can be independent of RNA polymerase II action by removing the lesions located anywhere in the genome [23]. NER operates in the presence of other enzymes, as the complex ERCC1 (excision repair cross-complementing group 1) and ERCC2 (excision repair cross-complementing group 2) [24, 25]. ERCC2 gene product is associated with DNA unwinding when its product (protein XPD) is expressed [26]. XPD proteins act in the process as temporary helicase rolling out double helix to find DNA lesions caused by free radicals [27] with subsequent lesion removal [28]. Lesion removal is carried out by a heterodimer constituted by ERCC1/XPF proteins [29]. This heterodimer executes a 5' incision on the DNA strand at the DNA lesion site after all other excision steps have been performed and, therefore, have been completed [30]. After that, DNA repair synthesis is performed by DNA polymerase using the opposite undamaged DNA strand as template [28, 31], and connection with the DNA strand is carried out by DNA ligase [32].

Thus, the evaluation of mRNA expression of genes participating in nucleotide excision repair pathway could provide important information about the effects of low-intensity laser exposure on DNA coding conservation and genomic stability. Thus, the aim of this work was to evaluate the alteration of

ERCC1 and ERCC2 mRNA expression in biological tissues exposed to low-intensity lasers. Different fluences were used according to laser therapy protocols.

Experimental

Low-intensity lasers

Therapeutic low-intensity red (660 nm) and infrared (808 nm) lasers (Photon Laser III, AlGaInP), purchased from D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brazil), with emission in continuous-wave mode were used in this study.

Animals

Experiments were conducted in accordance with the Institutional Committee of Animal Care (Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro), protocol CEUA/038/2012. Adult male Wistar rats (body weight 250–300 g and 3–4 months of age) were maintained in a controlled environment with six per cage, normal light/dark cycle conditions (12-h light/12-h dark; lights on at 6:00 am). The animals had free access to water and food, and ambient temperature was kept at 24 ± 2 °C.

Reagents

TRIzol® reagent was obtained from Invitrogen (USA); isopropanol, chloroform, and ethanol from Merck (Germany); and diethyl pyrocarbonate (DEPC) from Sigma (USA).

Experimental procedure and treatment parameters

Initially, the animals ($n=28$, 4 animals for each control and experimental group) were anesthetized (sodium pentobarbital 65 mg/kg body weight), and trichotomy was carried out on 4 cm² area of skin. One hind leg from each animal was used. After that, a 1-cm² area on each hind leg was exposed to low-intensity red (660 nm) and near-infrared laser (808 nm) at different fluences: three experimental groups were exposed to laser 660 nm at different fluences (25, 50, and 100 J/cm²), and each group (4 animals) was exposed to one laser fluence only. Other three experimental groups were exposed to laser 808 nm at different fluences (25, 50, and 100 J/cm²), and each group (4 animals) was exposed to one laser fluence only. Laser exposure was in continuous wave and power of 100 mW, with the laser source on the surface of skin. Control group were 4 animals not exposed to red or near-infrared laser. Exposure times were 7, 14, and 28 s for 25, 50, and 100 J/cm², respectively, for both wavelengths. After 24 h, the animals were

sacrificed; skin area (1 cm²) exposed to laser was collected (50 to 100 mg), and muscle tissue samples (50 to 100 mg) were those collected below the skin exposed to laser. Tissue samples were transferred to microcentrifuge flex tubes with TRIzol® reagent for total RNA extraction by standard procedure. Period of time after laser exposure (24 h) was chosen based on previous studies performed in our laboratory [18].

Total RNA extraction

Tissue samples were crushed into microcentrifuge flex tubes with TRIzol® reagent and centrifuged (12,000×g, 4 °C, 10 min). Supernatants were transferred to other tubes, chloroform was added, mixtures were centrifuged (12,000×g, 4 °C, 15 min), aqueous phases were transferred to other tubes, and isopropanol was added. After incubation (room temperature, 15 min), mixtures were centrifuged (12,000×g, 4 °C, 10 min), supernatants were discarded, and precipitate was washed with ethanol-DEPC (80 % ethanol, DEPC 0.1 %) solution added and centrifuged. Supernatants were withdrawn, and total RNA was reconstituted in water-DEPC (0.1 %) solution and stored (-80 °C).

Complementary DNA synthesis

RNA concentration and purity were determined on a spectrophotometer by calculating the optical density ratio at a 260 nm/280 nm wavelength ratio. Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using a two-step cDNA synthesis kit (Promega, USA). Four micrograms of RNA was reverse transcribed into cDNA using GoScript™ reverse transcriptase (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol, using a total 20 µl reaction. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using 5 µl of GoTaq qPCR Master Mix (Promega) for a final volume of 10 µl volume containing 50 ng of cDNA. To determine the initial relative of cDNA quantity, samples were amplified with excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1), excision repair cross-complementation group 2 (ERCC2), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers. Reactions, in duplicate for each sample, were run on an Applied Biosystems 7500 RT-qPCR machine (Applied Biosystems, USA). The mixtures were initially denatured at 94 °C for 10 min. The PCR consisted of 40 cycles at the following conditions: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and an extension period at 72 °C for 30 s. Melt curve analyses were performed for all genes, and PCR product specificity, as well as integrity, was confirmed by the presence of a single peak. Relative expression was normalized by reference gene levels (GAPDH), using non-exposed rats as control group. Duplicate CT values were analyzed in Microsoft Excel (Microsoft) using the comparative CT (2 - ΔΔCT) method [33].

Statistical analysis

Data are reported as means ± standard deviation of mRNA relative expression. The one-way analysis variance (ANOVA) test was performed to determine possible statistical differences followed by Tukey post-test with $p < 0.05$ as the less significant level for both ANOVA and post-test. InStat Graphpad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

Results

Effects of low-intensity laser exposure on ERCC1 and ERCC2 mRNA expression in skin

Figure 1 shows ERCC1 mRNA relative expression in skin exposed to low-intensity red and infrared lasers at different fluences (25, 50, and 100 J/cm²). Data in this figure indicate no significant ($p > 0.05$) alteration of this mRNA in skin exposed to red laser. However, a significant reduction ($p < 0.001$) of ERCC1 mRNA expression was obtained in skin tissue exposed to all fluences for the infrared laser when compared to ERCC1 mRNA expression in skin not exposed to laser (control group). Also, exposure to infrared laser significantly ($p < 0.001$) reduces ERCC1 mRNA expression when compared to red laser at all fluences evaluated.

Relative expression of ERCC2 mRNA was evaluated to confirm the alteration of mRNA expression related to excision nucleotide repair pathway (Fig. 2). Different from that obtained for ERCC1, ERCC2 mRNA relative expression shows significant ($p < 0.05$) decrease in skin exposed to low-intensity red laser, except for 100 J/cm² fluence, when

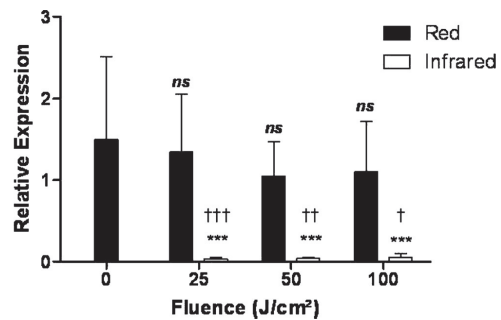


Fig. 1 ERCC1 mRNA relative expression in skin after exposure to low-intensity red and infrared lasers in continuous wave emission mode at different fluences. GAPDH was used as internal standard for normalization. (*) when compared with control group, (†) when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser, and (ns) not significant when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser. *** $p < 0.001$, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$

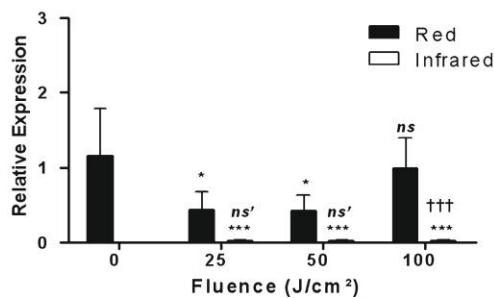


Fig. 2 ERCC2 mRNA relative expression in skin after exposure to low-intensity red and infrared lasers in continuous wave emission mode at different fluences. GAPDH was used as internal standard for normalization. (*) when compared with control group, (†) when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser, (ns) not significant when compared with control group, and (ns) not significant when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ††† $p < 0.001$

compared to control group. Similar to the ERCC1, exposure to infrared laser significantly ($p < 0.001$) reduces ERCC2 mRNA expression in skin at all fluences evaluated. Significant ($p < 0.001$) differences in the expression of ERCC2 mRNA occur in skin exposed to red and infrared laser at the higher fluence evaluated (100 J/cm²).

Effects of low-intensity laser exposure on ERCC1 and ERCC2 mRNA expression in muscle

Figure 3 shows ERCC1 mRNA relative expression in muscle exposed to low-intensity red and infrared lasers at different fluences. Similarly obtained in skin, data in this figure indicate not significant ($p > 0.05$) alteration of ERCC1 mRNA

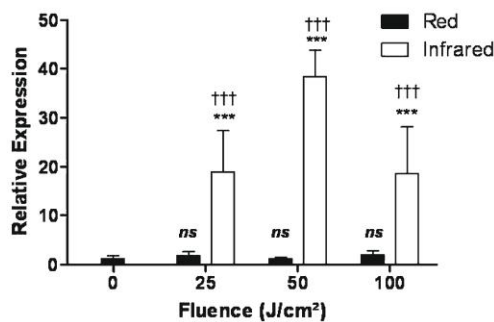


Fig. 3 ERCC1 mRNA relative expression in muscle tissue after exposure to low-intensity red and infrared lasers in continuous wave emission mode at different fluences. GAPDH was used as internal standard for normalization. (*) when compared with control group, (†) when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser, and (ns) not significant when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser. *** $p < 0.001$, ††† $p < 0.001$

expression in muscle exposed to red laser. However, infrared laser exposure significantly ($p < 0.001$) increases the ERCC1 mRNA expression in muscle tissue, both compared to control group and compared to red laser group.

ERCC2 mRNA relative expression was also evaluated to confirm the alteration of gene expression related to excision nucleotide repair pathway in muscle tissue (Fig. 4). Different from that obtained for ERCC1, ERCC2 mRNA relative expression shows significant ($p < 0.001$) increase in muscle exposed to low-intensity red and infrared lasers at the middle fluence (50 J/cm²).

Discussion

RT-qPCR technique has been widely accepted and used for the detection and quantification of mRNA as indicative of gene expression in prokaryotes [34] and eukaryotic cells [29], as well as in tissues [35] after different treatments or physiological conditions. This technique is considered the gold standard for the measurement of mRNA expression relative to a reference mRNA (from GAPDH gene, for example) [36].

NER is a DNA repair pathway involved in the removal of bulky DNA adducts induced by ultraviolet radiation, which leads to the formation of pyrimidine dimers [25]. NER acts on non-specific oxidative lesions while BER acts on specific lesions induced by DNA molecule reaction with oxidative agents, such as free radicals [12, 37]. Red and infrared laser radiations at low fluences have been suggested as producing free radicals with potential lesion induction in DNA molecule [37, 38]. ERCC2 and ERCC1 gene products are involved in DNA unwinding and incision, respectively, of an oxidation

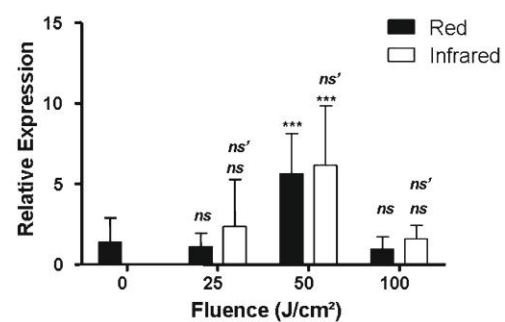


Fig. 4 ERCC2 mRNA relative expression in muscle tissue after exposure to low-intensity red and infrared lasers in continuous wave emission mode at different fluences. GAPDH was used as internal standard for normalization. (*) when compared with control group, (ns) not significant when compared with control group, and (ns) not significant when comparing low-intensity red laser with low-intensity infrared laser. *** $p < 0.001$

product in DNA molecule, being part of NER mechanism [23]. Thus, ERCC1 and ERCC2 are involved in oxidative damage and bulky lesion repair, which must be removed from DNA molecule by repair mechanisms to preserve DNA coding stability.

Our research shows that ERCC1 and ERCC2 mRNA expression is altered in tissues exposed to low-intensity red and infrared lasers. ERCC1 mRNA relative expression in skin exposed to low-intensity infrared laser (808 nm) is decreased, but ERCC1 mRNA expression is not changed after exposure to red laser (660 nm) (Fig. 1). Analysis of Fig. 2 suggests that there also occurs a reduction in ERCC2 mRNA expression in skin tissue exposed to infrared laser for all fluences. However, ERCC2 mRNA expression is decreased in skin tissue exposed to red laser at the lowest fluences used (25 and 50 J/cm²). Previous data demonstrated that the expression of other mRNAs from genes related to NER, XPA (xeroderma pigmentosum A protein), and XPC (xeroderma pigmentosum C protein) is increased in skin 1 h after exposure to red and infrared lasers [18, 20, 39]. This could suggest that laser exposure differently alters the expression of mRNA from genes related to DNA lesion repair. Moreover, data in another study demonstrated decreasing of XPC mRNA expression in burned skin exposed to red laser for 5 days [18]. In muscle tissue, ERCC1 mRNA expression is strongly increased after infrared laser exposure, but not after red laser exposure (Fig. 3). ERCC2 mRNA expression is also increased after laser exposure, but only at middle fluence (Fig. 4). In this tissue, XPA and XPC mRNA expression is decreased after exposure to red and infrared lasers [20], emphasizing that these lasers differently affect the mRNA expression from genes related to DNA repair, at least those involved in NER pathway. Also, red laser has no effect on XPA mRNA expression in burned skin [18]. In addition, laser-induced alteration on gene expression has been reported to alter the expression of other genes, as type 1 collagen [40], actin [19], myogenin and VEGF [41], Cox-2 [42], as well as mRNA from genes related to BER pathway of DNA repair [19, 20].

Our results also emphasizing that mRNA expression from genes related to DNA repair systems can be differentially induced in skin and muscle tissues after exposure to low-intensity lasers [43]. There are few studies comparing laser effects on mRNA expression from genes related to DNA lesion repair in different tissues. Previous data demonstrated that infrared laser exposure differently affects mRNA expression from genes coding enzymes involved in BER pathway of nuclear (APE1, OGG1, APEX1, and APEX2) [19, 20, 39] and mitochondrial (γ -polimerase) [20] DNA repair in skin and muscle tissue after infrared laser exposure. XPA and XPC mRNA expression is also differently altered in skin and muscle tissue after low-intensity infrared laser [43]. These findings could be explained due to different chromophores or different chromophore concentrations in skin and muscle cells.

Alternatively, it is possible that microenvironment differences around cells in skin and muscle tissue cause these cells to respond differently to low-intensity lasers, as laser-induced free radical generation. Authors have reported that laser-induced effects are detectable in cell cultures in low serum concentrations but not in normal (physiological) serum concentrations [44].

On the other hand, our research suggests a wavelength-dependent laser-induced effect on ERCC1 and ERCC2 mRNA expressions in skin and muscle tissue. A hypothesis to explain these results could be different infrared laser beam absorption in biological tissues, which is lower to infrared radiation when compared with red radiation, despite the effect of infrared laser seeming to be stronger on ERCC2 mRNA expression than that on ERCC1 mRNA expression in skin (Figs. 1 and 3). Another hypothesis is metabolism alteration induced by laser exposure because whether infrared laser exposure acts differently on skin and muscle metabolisms, the GAPDH mRNA expression could be differently alter, thereby explaining the laser-induced effects obtained in these tissues. Cytochrome c oxidase, the major chromophore to red and infrared laser radiation, has its function increased after laser exposure, increasing cellular metabolism (biostimulative effect), as Karu [3] has suggested. As a consequence of increased metabolism, production of free radicals is increased, which could induce DNA lesions, and which in turn induces mRNA expression from genes related to DNA repair. However, additional studies are needed to evaluate whether red and infrared low-intensity laser effects on cytochrome c oxidase are different in skin and muscle cells, as well as correlate with cytochrome c oxidase activity with mRNA expression from genes related to DNA repair genes. Moreover, the evaluation of ERCC1 and ERCC2 protein levels, as well as other NER or BER repair proteins, is necessary to verify whether these levels correlate with mRNA relative expressions and functional significance to the repair of DNA lesions in biological tissues exposed to low-intensity lasers.

On the other hand, it is possible that the differences in ERCC1 and ERCC2 mRNA relative expression in skin and muscle tissue are related to the different amounts of energy absorbed (radiation dose) in these tissues due to light scattering. In fact, despite output beam being in a laser device guide, the real amount of energy delivered by a laser beam in a turbid media, such as skin and muscle tissue, is less known, and there being technical difficulties to evaluate it [45]. Advances in radiation dose measurements are necessary to understanding laser-induced effects on biological tissues. Also, radiation dose calculations by computing simulation (by Monte Carlo, for example) could bring important inputs to this topic.

Taken together, low-intensity red and infrared lasers induce alterations on mRNA expression from genes related to nucleotide excision repair. These alterations could contribute to DNA coding and genomic stability conservation, leading to

cell homeostasis in biological tissues affected by diseases. As a consequence, cells can be rendered more capable of undergoing division and synthesizing a number of substances, the so-called biostimulation effect, explaining part of the beneficial effects of laser therapy.

Conclusions

Our research shows that ERCC1 and ERCC2 mRNA expression is differently altered in skin and muscle tissue exposed to low-intensity red and infrared lasers depending on wavelength and fluences used in therapeutic protocols.

Acknowledgments This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Compliance with ethical standards Experiments were conducted in accordance with the Institutional Committee of Animal Care (Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro), protocol CEUA/038/2012.

References

- Svelto O, Hanna DC (1998) Principles of laser. Plenum Press, New York
- O'Shea DC, Callen WR, Rhodes WT (1978) Introduction to lasers and their applications, edition 1. Addison-Wesley Publishing Company, Menlo Park, California
- Karu T (2003) Low power laser therapy. In: Biomedical Photonics Handbook. Vo-Dinh (ed). CRC Press, Boca Raton: USA
- Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schröder S (2014) Low level laser therapy for treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Base Complement Alternat Med* 2014:626127. doi:10.1155/2014/626127
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD (2010) Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg* 28:291–325. doi:10.1089/pho.2008.2446
- Doğan GE, Demir T, Orbak R (2014) Effect of low-level laser on guided tissue regeneration performed with equine bone and membrane in the treatment of intrabony defects: a clinical study. *Photomed Laser Surg* 32:226–231. doi:10.1089/pho.2013.3664
- Karu T (1999) Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 49: 1–17. doi:10.1016/S1011-1344(98)00219-X
- Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F (2014) Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci* 29:1463–1467. doi:10.1007/s10103-014-1556-x
- Barzilai A, Yamamoto K (2004) DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 3:1109–1115. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.002
- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361–370. doi:10.1093/carcin/21.3.361
- Kim YG (2002) Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species: implications for therapy. *Free Radic Res* 36:1243–1250. doi:10.1080/1071576021000028389
- Slupphaug G, Kavli B, Kroka HE (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531:231–251. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002
- Fonseca AS, Teixeira AF, Presta GA, Geller M, Valença SS, Paoli F (2012) Low intensity infrared laser effects on *Escherichia coli* cultures and plasmid DNA. *Laser Phys* 22:1635–1641. doi:10.1134/S1054660X12100076
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberg T (2006) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington
- Klungland A, Bjelland S (2007) Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)* 6:481–488. doi:10.1016/j.dnarep.2006.10.012
- Patrono C, Sterpone S, Testa A, Cozzi R (2014) Polymorphisms in base excision repair genes: breast cancer risk and individual radiosensitivity. *World J Clin Oncol* 5:874–882. doi:10.5306/wjco.v5.i5.874
- Mitra S, Hazra TK, Roy R, Ikeda S, Biswas T, Lock J, Boldogh I, Izumi T (1997) Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. *Mol Cells* 7:305–312
- Trajano ET, Mencialha AL, Monte-Alto-Costa A, Pôrto LC, de Souza da Fonseca A (2014) Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red laser. *Lasers Med Sci* 29: 1953–1957. doi:10.1007/s10103-014-1612-6
- Fonseca AS, Mencialha AL, Campos VMA, Ferreira-Machado SC, Peregrino AAF, Magalhães LAG, Geller M, Paoli F (2013) Low-intensity infrared lasers alter actin gene expression in skin and muscle tissue. *Laser Phys* 23:025602. doi:10.1088/1054-660X/23/2/025602
- Fonseca AS, Magalhães LAG, Mencialha AL, Geller M, Paoli F (2014) Low intensity infrared laser affects expression of oxidative DNA repair genes in mitochondria and nucleus. *Laser Phys* 24: 115605. doi:10.1088/1054-660X/24/11/115605
- Marteijn JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ (2014) Understanding nucleotide excision repair and its role in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:465–481. doi:10.1038/nrm3822
- Mellon I, Bohr VA, Smith CA, Hanawalt PC (1986) Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8878–8882
- Costa RM, Chigaças V, Galhardo RDAS, Carvalho H, Menck CF (2003) The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85:1083–1099. doi:10.1016/j.biochi.2003.10.017
- Maillard O, Solyom S, Naegeli H (2007) An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol* 5, e79. doi:10.1371/journal.pbio.0050079
- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18:64–72. doi:10.1038/cr.2008.2
- Bernard-Gallon D, Bosviel R, Delort L, Fontana L, Chamoux A, Rabiau N, Kwiatkowski F, Chalabi N, Satih S, Bignon YJ (2008) DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk. *Mol Cancer* 7:36. doi:10.1186/1476-4598-7-36
- Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1:22–33. doi:10.1038/35094000
- Bowden NA (2014) Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett* 346:163–171. doi:10.1016/j.canlet.2014.01.005
- Mitchel JR, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ (2003) Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol* 15:232–240. doi:10.1016/j.canlet.2014.01.005
- Sancar A, Reardon JT (2004) Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Adv Protein Chem* 69:43–71. doi:10.1016/S0300-9084(99)80034-0

31. Foustieri M, Mullenders LHF (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18:73–84. doi:10.1038/cr.2008.6
32. Petrusheva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI (2014) Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Nat* 6:23–34
33. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
34. Postollec F, Falentin H, Pavan S, Combrisson J, Sohler D (2011) Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol* 28:848–861. doi:10.1016/j.fm.2011.02.008
35. Lobert S, Hiser L, Correia JJ (2010) Expression profiling of tubulin isotypes and microtubule-interacting proteins using real-time polymerase chain reaction. *Methods Cell Biol* 95:547–558. doi:10.1016/S0091-679X(10)95004-8
36. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21:389–395. doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005
37. da Silva Marciano R, da Silva Sergio LP, Polignano GA, Presta GA, Guimarães OR, Geller M, de Paoli S, de Paoli F, da Fonseca Ade S (2012) Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. *Photochem Photobiol Sci* 11:1476–1483. doi:10.1039/c2pp25027f
38. Sergio LP, Marciano Rda S, Teixeira GR, Canuto Kda S, Polignano GA, Guimarães OR, Geller M, de Paoli F, da Fonseca Ade S (2013) Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. *Photochem Photobiol Sci* 12:930–935. doi:10.1039/c3pp25394e
39. Fonseca AS, Mencalha AL, Campos VMA, Machado SCF, Peregrino AAF, Geller M, Paoli F (2013) DNA repair gene expression on biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. *Laser Med Sci* 28:1077–1084. doi:10.1007/s10103-012-1191-3
40. Martignago CC, Oliveira RF, Pires-Oliveira DA, Oliveira PD, Pacheco Soares C, Monzani PS, Poli-Frederico RC (2014) Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci* 30:203–208. doi:10.1007/s10103-014-1644-y
41. Rodrigues NC, Brunelli R, de Araújo HS, Parizotto NA, Renno AC (2013) Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. *J Photochem Photobiol B* 120:29–35. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.002
42. Rodrigues NC, Brunelli R, Abreu DC, Fernandes K, Parizotto NA, Renno ACM (2014) Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. *Braz J Phys Ther* 18:395–401. doi:10.1590/bjpt-rbf.2014.0057
43. Fonseca AS, Magalhães LAG, Mencalha AL, Ferreira-Machado SC, Geller M, Paoli F (2014) Low-intensity red and infrared lasers on XPA and XPC gene expression. *Laser Phys Lett* 11:095601. doi:10.1088/1612-2011/11/9/095601
44. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 29:179–184. doi:10.1002/lsm.1107
45. Niemi MH (2007) *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. Springer, New York