



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Luiz Philippe da Silva Sergio

**Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e efeitos de *laser*
infravermelho de baixa potência em modelo experimental de lesão
pulmonar aguda**

Rio de Janeiro

2020

Luiz Philippe da Silva Sergio

Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e efeitos de *laser* infravermelho de baixa potência em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, 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

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S484 Sergio, Luiz Philippe da Silva.
Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e efeitos de *laser* infravermelho de baixa potência em modelo experimental de lesão pulmonar aguda / Luiz Philippe da Silva Sergio – 2020.
136 f.

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

1. Terapia com luz de baixa intensidade - Teses. 2. Radiação infravermelha - Teses. 3. Lesão pulmonar aguda – Terapia - Teses. 4. Reparo de DNA - Teses. 5. Apoptose - Teses. 6. Estresse oxidativo – Teses. 7. Ratos como animais de laboratório – Teses. I. Fonseca, Adenilson de Souza da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.24-002

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Luiz Philippe da Silva Sergio

Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e efeitos de *laser* infravermelho de baixa potência em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2020.

Banca Examinadora:

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

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

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

Prof. Dr. Eduardo Tavares Lima Trajano
Universidade de Vassouras

Rio de Janeiro

2020

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, namorado 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

A proteção, fé e perseverança concedidas por Deus para exceder obstáculos deparados durante a pós-graduação, e a Virgem Santíssima, sempre presente em minha vida.

Ao Professor Dr. Adenilson de Souza da Fonseca, pelos anos incansáveis de orientação, por acreditar em minha capacidade desde a iniciação científica para executar uma proposta de trabalho, pela imensa paciência e dedicação nas orientações, e principalmente por estar sempre contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e profissional, participando mais do que um orientador, e sim um amigo.

À Professora Dra. Flávia de Paoli, que desempenhou um papel fundamental para meu desenvolvimento pessoal e profissional em suas orientações, suas falas amigas, sua extrema paciência em orientações e conselhos construtivos.

Ao Professor Dr. André Luiz Mencialha, pela sua contribuição importantíssima, dando suporte intelectual e financeiro no decorrer do trabalho, incentivando sempre à experimentação.

Também, a 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). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Celina Padilha Sergio (*in memoriam*) e Maria de Lourdes Barbosa da Silva (*in memoriam*), minhas queridas avós que tanto me ensinaram e me preparam para a vida. Aos meus pais, Regina Helena da Silva e Luiz Carlos Padilha Sergio, pela orientação, dedicação e incentivo durante toda minha vida demonstrando imenso respeito pelas minhas escolhas, estando aptos a me auxiliar no que viesse a ser necessário, com conselhos, carinho e amor. Como também o fez, minha irmã Carolina Jasmim de Moraes, em que nos momentos de desistência de minha parte, encontrava-se ao meu lado apoiando-me integralmente.

A Warley Batista Trancoso, meu marido, que incansavelmente esteve ao meu lado em toda tribulação, me incentivando a continuar caminhando e fortalecendo minhas escolhas profissionais e pessoais, contribuindo para meu desenvolvimento com ternura e sabedoria.

Aos meus amigos e familiares, principalmente, Maria Regina Pombinho, Fabiane Aguiar Pereira, Roberta da Silva Marciano, 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 Andrezza Maria Côrtes Thomé e Larissa Aleksandra da Silva Neto Trajano que muito me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, além de toda dedicação e companheirismo, os sorrisos, broncas e brincadeiras que tiravam os pesos do dia-a-dia e nos fortaleciam para a próxima etapa.

A todos o meu muitíssimo obrigado!

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

Albert Einstein

RESUMO

SERGIO, Luiz Philippe da Silva. **Avaliação dos mecanismos de reparo do DNA e efeitos de laser infravermelho de baixa potência em modelo experimental de lesão pulmonar aguda.** 2020. 136. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Um quadro infeccioso (sepsis), pode culminar na indução da lesão pulmonar aguda (LPA). A LPA é caracterizada pela resposta hiperinflamatória e hipoxêmica, com aumento da permeabilidade da barreira alveolar. Devido ao perfil da lesão, não há um tratamento específico. *Lasers* infravermelhos de baixa potência (*LIBP*) têm sido utilizados na resolução do processo inflamatório, apesar dos efeitos fotobioestimuladores não serem totalmente compreendidos. Poucos estudos correlacionam doenças pulmonares com *laser*terapia e estratégias terapêuticas atuais são consideradas paliativas. Logo, uma nova terapia é necessária. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do *LIBP* em modelo de LPA em ratos nas alterações morfológicas, nas células do infiltrado, na indução de fragmentação do DNA e nos níveis de RNAm de genes das vias apoptóticas e reparo do DNA. Ratos *Wistar* machos foram divididos em seis grupos: Controle, LPA, L10, L20, LPA-L10 e LPA-L20 e expostos ao *LIBP* (AsGaAl, 808nm, 100mW, 4 pontos por pulmão em 1 sessão). A LPA foi induzida administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Amostras de tecido pulmonar foram encaminhadas para as técnicas histológicas rotineiras, TUNEL e RT-qPCR. Os dados experimentais obtidos nesse estudo mostraram alteração no perfil morfológico de septos e alvéolos em animais afetados pela LPA após exposição ao *LIBP*, bem como modulação dos níveis de RNAm de genes de apoptose e reparo do DNA, e aumento da fragmentação do DNA em células do infiltrado inflamatório e redução nas células do epitélio alveolar. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a exposição ao *LIBP* melhora o parênquima pulmonar, sugere que o reparo do DNA é parte da resposta celular à sepsis e que a exposição ao *LIBP* altera os níveis de RNAm de genes do processo apoptótico e induz fragmentação do DNA em células inflamatórias e alveolares, com ação seletiva, que pode ser parte do efeito anti-inflamatório induzido por *lasers* infravermelho de baixa potência.

Palavras-chave: *Laser* infravermelho de baixa potência. Lesão pulmonar aguda. Reparo de DNA. Apoptose. Lesões oxidativas. Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

SERGIO, Luiz Philippe da Silva. **Evaluation of DNA repair mechanism and effects of low power infrared *laser* in experimental model of acute lung injury**. 2020. 136f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

An infectious condition (sepsis) may culminate in the induction of acute lung injury (ALI). ALI is characterized by a hyperinflammatory and hypoxemic response, with increased alveolar barrier permeability. Due to the lesion profile, there is no specific treatment. Low power infrared *lasers* (LPIL) have been used in the resolution of the inflammatory process, however photobiostimulatory effects are not fully understood. Few studies correlate lung diseases with *laser* therapy and current therapeutic strategies are considered palliative. Therefore, a new therapy is needed. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of LPIL in a Wistar rats ALI model regarding morphological alterations, infiltrate cell analysis, induction of DNA fragmentation and apoptotic pathway gene mRNA levels and DNA repair. Male Wistar rats were divided into six groups: Control, ALI, L10, L20, ALI-L10 and ALI-L20 and exposed to LPIL (AsGaAl, 808nm, 100mW, 4 points per lung in 1 session). ALI was induced intraperitoneal administration of *E. coli* lipopolysaccharide. Samples of lung tissue were collected for histological processing and staining for stereological analysis and evaluation of mRNA levels by RT-qPCR. Experimental data obtained in this study showed alterations in the morphological profile of septa and alveoli in animals affected by ALI after exposure to LPIL, as well as modulation of apoptosis and DNA repair gene mRNA levels, and increased DNA fragmentation in cells of the ALI. inflammatory infiltrate and reduction in alveolar epithelium. The results obtained in this study suggest that LPIL exposure improves lung parenchyma, suggests that DNA repair is part of the cellular response to sepsis and that LPIL exposure alters mRNA levels of apoptotic genes and induces DNA fragmentation. in inflammatory and alveolar cells, with selective action, which may be part of the anti-inflammatory effect induced by low power infrared *lasers*.

Keywords: Low power infrared *laser*. Acute lung injury. DNA repair. Apoptosis. Oxidative lesions. Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema ilustrativo resumido da progressão da LPA.....	24
Figura 2 –	Esquema ilustrativo do estresse oxidativo na inflamação: Lesões no DNA?.....	29
Figura 3 –	Representação esquemática para o mecanismo de reparo por excisão de base (REB).....	35
Figura 4 –	Representação esquemática para o mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN).....	37
Figura 5 –	Representação esquemática para o <i>Mismatch repair (MMR)</i>	39
Figura 6 –	Representação esquemática para o desempenho de proteínas envolvidas na regulação telomérica e nos mecanismos de estabilidade genômica.....	43
Figura 7 –	Representação esquemática da terapêutica no reparo do DNA como tratamento alternativo para lesão pulmonar aguda.....	47
Figura 8 –	Representação cronológica dos estudos sobre a luz até o desenvolvimento do <i>laser</i>	49
Figura 9 –	Representação do espectro eletromagnético enfocando a janela terapêutica.....	50
Figura 10 –	Esquema ilustrativo da emissão estimulada.....	51
Figura 11 –	Esquema ilustrativo da constituição do equipamento <i>laser</i> e seu feixe.....	53
Figura 12 –	Resumo esquemático das características dos equipamentos e protocolos terapêuticos.....	58
Figura 13 –	Esquema ilustrativo da interação <i>laser</i> -tecido e as diversas camadas até o tecido pulmonar lesionado.....	59
Figura 14 –	Esquema ilustrativo simplificado da cadeia transportadora de elétrons.....	61
Figura 15 –	Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da bioestimulação.....	62
Figura 16 –	Representação esquemática para REB após exposição ao LBP.....	67
Figura 17 –	Representação esquemática para REN após exposição ao LBP.....	68
Figura 18 –	Representação esquemática para o <i>laser</i> na estabilidade genômica.....	70
Figura 19 –	Representação esquemática para o <i>laser</i> na regulação de telômeros.....	71
Figura 20 –	Distribuição dos animais entre os grupos experimentais	75

Figura 21 –	Representação esquemática da exposição do tórax de ratos <i>Wistar</i> ao <i>laser</i> infravermelho de baixa potência, ilustrando os 4 pontos de irradiação em cada pulmão.....	76
Figura 22 -	Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após a indução da LPA por administração de LPS.....	85
Figura 23 -	Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após a indução da LPA por administração de LPS.....	85
Figura 24 -	A área do infiltrado inflamatório (em μm^2) na parede do septo interalveolar de ratos <i>Wistar</i> após a indução da LPA por administração de LPS, seguida de exposição ao laser infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	86
Figura 25 -	Número de células no infiltrado inflamatório na parede de septos interalveolares de ratos <i>Wistar</i> após a indução da LPA por administração de LPS, seguida de exposição ao laser infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	87
Figura 26 -	Densidade volumétrica da parede do septo interalveolar de ratos <i>Wistar</i> em relação ao parênquima pulmonar após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	88
Figura 27 -	Densidade volumétrica do espaço aéreo alveolar de ratos <i>Wistar</i> em relação ao parênquima pulmonar após administração de LPS e exposição ao laser infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	89
Figura 28 -	Densidade superficial do alvéolo em relação ao parênquima pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao laser infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	90
Figura 29 -	Comprimento médio de intercepção linear nos espaços aéreos do parênquima pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	91
Figura 30 -	Níveis relativos de RNAm de genes de reparo do DNA no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após indução da LPA por administração de LPS.	94
Figura 31 -	Níveis relativos de RNAm de <i>OGG1</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	95

Figura 32 - Níveis relativos de RNAm de <i>APEX1</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	96
Figura 33 - Níveis relativos de RNAm de <i>ERCC2</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	97
Figura 34 - Níveis relativos do RNAm de <i>ERCC1</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	98
Figura 35 - Níveis relativos do RNAm de <i>Caspase 3</i> e <i>Bcl-2</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS.....	103
Figura 36 - Níveis relativos de RNAm de <i>Caspase 3</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	104
Figura 37 - Níveis relativos do RNAm de <i>Bcl-2</i> no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho (808 nm) de baixa potência.....	105
Figura 38 - Fotomicrografia representativa da fragmentação do DNA pelo método TUNEL de células do parênquima pulmonar após indução da LPA pela administração de LPS.....	106
Figura 39 - Porcentagem de fragmentação do DNA pela quantificação da marcação positiva de TUNEL POD em células alveolares de ratos <i>Wistar</i> expostos ao <i>laser</i> infravermelho.....	107
Figura 40 - Porcentagem de fragmentação do DNA pela quantificação da marcação positiva de TUNEL POD no infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar de ratos <i>Wistar</i> após indução da LPA pela administração de LPS e exposição ao <i>laser</i> infravermelho de baixa potência.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Definição de Berlim: categorias da lesão pulmonar aguda.....	21
Tabela 2 –	Resumo dos estudos sobre a relação entre lesão pulmonar aguda e danos ao DNA / Mecanismos de reparo do DNA.....	30
Tabela 3 –	Resumo de três modelos de indução de lesão pulmonar aguda.....	33
Tabela 4 –	Parâmetros do <i>laser</i> de baixa potência.....	74
Tabela 5 -	Parâmetros estereológicos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>ERCC1</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
<i>ERCC2</i>	<i>Excision repair cross-complementation group 2</i>
ERO/ROS	Espécies reativas de oxigênio
FPG	<i>Formamido-pyrimidine-DNA-glycosylase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GGR	<i>Global genomic repair</i>
<i>Laser</i>	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
<i>LPA</i>	Lesão pulmonar aguda
<i>LPS</i>	Lipopolissacarídeo
<i>Maser</i>	<i>Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mtDNA	<i>DNA mitochondrial</i>
OGG1	<i>8-Oxoguanina DNA glicosilase</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
REB	Reparo por excisão de base
REN	Reparo por excisão de nucleotídeo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TCR	<i>Transcription coupled repair</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biontin-dUTP nick end labeling</i>
XPD	Xeroderma pigmentoso proteína D
XPF	Xeroderma pigmentoso proteína F

LISTA DE SÍMBOLOS

mW	Miliwatts
nm	Nanômetros
W	Watt
W	Watt por centímetro quadrado
s	segundo
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
λ	lâmbda / comprimento de onda
<	menor que
>	maior 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	miliAmpère
rpm	rotação por minuto
μ L	microlitro
mL	mililitro
cm	centímetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1	Lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo.....	21
1.2	Patofisiologia da lesão pulmonar aguda.....	22
1.3	Estresse oxidativo na inflamação: Lesões no DNA.....	26
1.4	Modelos animais.....	31
1.5	Manutenção do genoma após dano no DNA.....	33
1.5.1	<u>Reparo por excisão de bases.....</u>	33
1.5.2	<u>Reparo por excisão de nucleotídeos.....</u>	36
1.5.3	<u>Reparo de pareamento errôneo ou <i>Mismatch repair</i>.....</u>	38
1.5.4	<u>Estabilidade genômica e regulação dos telômeros em resposta a danos e estresse.....</u>	41
1.6	Alvos terapêuticos.....	46
1.7	Origem e desenvolvimento dos <i>lasers</i>.....	47
1.7.1	<u>Princípios e propriedades.....</u>	50
1.7.2	<u>Constituição do equipamento.....</u>	52
1.7.3	<u>Propriedades da radiação <i>laser</i> e diferenciação de equipamentos.....</u>	54
1.7.4	<u>Aplicações em saúde.....</u>	55
1.7.4.1	Parâmetros associados.....	56
1.7.4.2	Interações da radiação emitida por <i>lasers</i> de baixa potência com tecidos biológicos.....	58
1.7.4.3	O papel dos fotoceptores.....	60
1.7.4.4	Mecanismos de ação.....	61
1.7.4.5	Efeitos terapêuticos.....	62
1.8	Ação do <i>laser</i> nos mecanismos de reparo do DNA e integridade genômica.	64
1.8.1	<u>LBP e reparo por excisão de base.....</u>	64
1.8.2	<u>LBP e reparo por excisão de nucleotídeo.....</u>	67
1.8.3	<u><i>Laser</i>: integridade genômica e regulação de telômeros.....</u>	68
2	OBJETIVOS.....	72
2.1	Objetivo geral.....	72
2.2	Objetivos específicos.....	72

3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
3.1	Desenvolvimento da lesão pulmonar aguda e exposição ao <i>laser</i> infravermelho de baixa potência.....	73
3.1.1	<u>Reagentes.....</u>	73
3.1.2	<u>Animais.....</u>	73
3.1.3	<u>Parâmetros de irradiação.....</u>	74
3.1.4	<u>Procedimento experimental.....</u>	74
3.2	Coleta do material biológico.....	76
3.3	Avaliação morfológica.....	77
3.4	Avaliação da expressão dos níveis de RNAs mensageiros	79
3.4.1	<u>Reagentes.....</u>	79
3.4.2	<u>Extração de RNA total</u>	79
3.4.3	<u>Síntese de cDNA.....</u>	80
3.5	Análises de fragmentação do DNA.....	81
3.6	Análise estatística.....	81
3.6.1	<u>Análises morfológicas.....</u>	82
3.6.2	<u>Análises da expressão de RNAm de genes de reparo do DNA.....</u>	82
3.6.3	<u>Análises da fragmentação do DNA.....</u>	82
3.6.4	<u>Análises dos níveis de RNAm de genes relacionados à apoptose.....</u>	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.1	Estudo 1: Avaliação de efeitos de <i>laser</i> infravermelho de baixa potência na modificação da morfologia do tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> afetados pela LPA induzida pela administração de LPS.....	84
4.1.1	<u>Resultados.....</u>	84
4.1.2	<u>Discussão.....</u>	91
4.2	Estudo 2: Avaliação de efeitos do <i>laser</i> infravermelho de baixa potência na alteração dos níveis relativos de RNA mensageiro de genes de reparo do DNA no tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> afetados pela LPA induzida pela administração de LPS.....	93
4.2.1	<u>Resultados.....</u>	93
4.2.2	<u>Discussão.....</u>	98
4.3	Estudo 3: Avaliação da fragmentação do DNA e da expressão de genes anti e pró-apoptóticos após exposição ao <i>laser</i> infravermelho de baixa	

	potência do tecido pulmonar de ratos <i>Wistar</i> afetados pela LPA induzida pela administração de LPS.....	103
4.3.1	<u>Resultados</u>	103
4.3.2	<u>Discussão</u>	108
	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICE A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Juíz de Fora - UFJF, protocolo CEUA/012/2016.....	134
	APÊNDICE B – Artigos publicados correspondentes aos estudos apresentados nessa tese.....	135
	APÊNDICE C – Artigos publicados correspondentes aos demais estudos realizados durante o período de curso.....	136

INTRODUÇÃO

Em condições de sepse, um quadro de exacerbação para doenças crônicas pulmonares como a bronquite crônica e asma, há alterações patológicas agudas complexas, clinicamente manifestadas como lesão pulmonar aguda (LPA) ou síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA) (WARE; MATTHAY, 2000). Pacientes com LPA/SDRA podem apresentar estresse oxidativo exacerbados em células pulmonares que, por sua vez, pode contribuir para lesões no DNA nestas e nas células adjacentes (VALAVANIDIS et al., 2013).

A LPA é uma doença potencialmente fatal caracterizada por respostas hiperinflamatórias não controladas nos pulmões (SUN et al., 2014), por consequência de um quadro de sepse, choque séptico e/ou pancreatite (RAGALLER; RITCHER, 2010), ocasionando lesões no endotélio microvascular, a partir da infecção extrapulmonar (ROCCO; ZIN, 2005). A LPA representa 10% das internações em unidades de terapia intensiva, afetando cerca de 200 mil pessoas por ano nos Estados Unidos (RUBENFELD et al., 2005), com alta incidência em pessoas de 70 anos e atingindo até 45% de mortalidade (RUBENFELD et al., 2005). No Brasil, estudos epidemiológicos da LPA não estão disponíveis.

Defini-se LPA como uma síndrome de insuficiência respiratória aguda (ARTIGAS et al., 1998; GBD, 2015), cujos critérios diagnósticos radiográficos e clínicos, confirmam a presença de infiltrado pulmonar bilateral compatível com edema, presença de hipoxemia, em que a relação de oxigênio arterial com fração de oxigênio inspirado (PaO_2/FiO_2) é ≤ 300 mmHg (GBD, 2015).

Como alguns estudos sugerem, LPA/SDRA é dividida em três fases de lesões sequenciais (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). A primeira fase, denominada fase exsudativa, tem duração cerca de uma semana e caracteriza-se histopatologicamente por edema intersticial e intra-alveolar, hemorragia intra-alveolar, acúmulo de neutrófilos e membranas hialinas, além de surfactante intracelular reduzido (KNUDSEN et al., 2011). Na segunda fase, denominada fase proliferativa, há lesões crônicas provenientes do infiltrado inflamatório e na última fase, fibroproliferativa, há remodelamento fibrótico (MÜHFELD; OCHS, 2013).

O aumento da permeabilidade da barreira alveolar, causando edema e inflamação do espaço aéreo de lesões no epitélio alveolar e endotélio capilar, que difere significativamente de outras doenças pulmonares agudas, estão presentes na LPA/SDRA (ELICKER et al.,

2016). No entanto, devido a essas especificações e com prognóstico diferencial nos pacientes, não há tratamentos específicos.

Os leucócitos, assim como as células do tecido pulmonar, devido as suas intensas atividades metabólicas durante a patogênese das doenças inflamatórias, passam a apresentar um desequilíbrio redox, culminando no aumento de radicais livres. Estes além de ocasionar lesões na molécula de DNA podem atuar como segundos mensageiros em caminhos específicos de sinalização celular, alterando a expressão gênica (NEWTON; BOOTMAN; SCOTT, 2016). Apesar das variadas lesões no DNA ocasionadas por reações de radicais livres, a integridade genômica pode ser obtida por um conjunto de mecanismos enzimáticos de reparo do DNA, que reconhecem e reparam as lesões (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

O reconhecimento de antígenos do agente infeccioso por receptores específicos na superfície de macrófagos, tais como *Toll like receptor 2 e 4* (TLR 2 e TLR 4), dá início a uma via de sinalização que culmina com o lançamento de citocinas que orquestram a inflamação (REMICK, 2007). Nos pulmões, a inflamação sistêmica resultante da sepse pode lesar a membrana alvéolo-capilar e resultar em edema pulmonar com insuficiência respiratória aguda hipoxêmica grave, configurando a SDRA (WARE; MATTHAY, 2000). Um dos modelos experimentais de LPA/SDRA é mediante indução de um quadro séptico pela administração de lipopolissacárideo (LPS), uma glicoproteína presente na membrana celular externa de bactérias gram negativas que possui propriedades altamente pró-inflamatórias, funcionando como um potente ativador do sistema imune e que tem sido empregada para induzir sepse e, conseqüentemente, a lesão pulmonar em diversas espécies (RAETZ et al., 1991).

Um possível tratamento para LPA/SDRA é o uso de *lasers* de baixa potência na faixa infravermelha do espectro eletromagnético, que ao interagir com o tecido, algumas funções celulares podem ser estimuladas, como produção de citocinas, síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e síntese proteica, estes culminam na proliferação de alguns tipos celulares, promovendo a resolução de processos inflamatórios (SUN et al., 2014). Atribui-se o controle do processo inflamatório à modulação de mediadores inflamatórios, redução da dor, do edema e a promoção do reparo de tecidos lesionados (ALBERTINI et al., 2007) Os feixes *lasers* apresentam características únicas como colimação e altas densidades de energia, assim como são feixes monocromáticos, apresentando um único comprimento de onda (da SILVA et al., 2015). Os efeitos biológicos associados à exposição aos *lasers* de baixa potência são dependentes de alguns parâmetros físicos, como o tempo de exposição, comprimento de onda, frequência, potência, fluência e modo de emissão (O'SHEA et al., 1978; KARU, 2003).

Estudos vêm demonstrando que a penetração do feixe longo e estreito do *laser* infravermelho de baixa potência pode penetrar mais profundamente nos tecidos (KARU, 2003; HENDERSON; MORRIES, 2015). Hudson et al. (2013) mostraram que uma radiação de comprimento de onda 808nm penetra até 54% mais do que 980nm. Byrnes et al. (2005) reforçaram que a luz infravermelha próxima, na faixa de 770-850nm, penetra mais profundamente através de tecidos de ratos que a luz vermelha ou radiações infravermelhas de comprimentos de onda mais longos, até 1200 nm. Através destes modelos foi demonstrado que a penetração em qualquer tecido biológico, quando aplicado percutaneamente, atinge entre 2 e 5 cm, dependendo das camadas de tecido e do estado metabólico do paciente (JOENSEN et al., 2012; GIACOMO et al., 2013).

A ação dos *lasers* de baixa potência se baseia na absorção do feixe pelas células, na qual modulam reações bioquímicas e estimulam a respiração mitocondrial (da SILVA et al., 2015). Essas ações poderiam acelerar a síntese de DNA, RNA e proteínas reguladoras do ciclo celular, promovendo a proliferação (O'SHEA et al., 1978), além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Esses radicais livres poderiam participar como segundos mensageiros nas vias de sinalização celular (SHINGYOCHI et al., 2017). Por outro lado, os radicais livres gerados pela exposição aos *lasers* de baixa potência podem reagir com o DNA causando lesões em nível subletal e modular os níveis de RNA mensageiros de genes de reparo do DNA (FONSECA et al., 2010).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Lesão pulmonar aguda e/ou síndrome do desconforto respiratório agudo

Cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo estão expostas a algum componente tóxico no ar, como partículas, produtos químicos e microorganismos infecciosos, tornando os pulmões vulneráveis às lesões, causando incapacidade respiratória e/ou morte (GBD, 2015).

A lesão pulmonar aguda (LPA), descrita em 1967 por David R. Ashbaugh como uma síndrome complexa, apresenta pequenas variações de gravidade quando comparada àquelas da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (BERNARD et al., 1994). A LPA causa insuficiência respiratória não totalmente explicada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga de líquidos e também opacidades bilaterais não totalmente explicadas por derramamentos, colapso pulmonar ou nódulos (RANIERI, 2012). Essa síndrome é caracterizada pelo aumento da permeabilidade, como refletido no edema alveolar, devido a danos nas células epiteliais e endoteliais e à infiltração de neutrófilos (RANIERI, 2012).

Após a conferência de Berlim em 2012, que constituiu uma única definição para LPA e SDRA, tornando-as espectros de uma mesma doença, apresentou consigo a taxa de mortalidade, como mostrada na Tabela 1, de acordo com sua classificação.

Tabela 1 - Definição de Berlim: categorias da lesão pulmonar aguda

Categorias	Oxigenação	Mortalidade (%)
Leve	200 mmHg < PaO ₂ /FIO ₂ ≤ 300 mmHg with PEEP ou CPAP ≥ 5 cm H ₂ O	27
Moderada	100 mmHg < PaO ₂ /FIO ₂ ≤ 200 mmHg with PEEP ou CPAP ≥ 5 cm H ₂ O	32
Severa	PaO ₂ /FIO ₂ ≤ 100 mmHg with PEEP ≥ 5 cm H ₂ O	45

Legenda: Positive end-expiratory pressure (PEEP; Pressão expiratória final positiva); Continuous positive airway pressure (CPAP; Pressão positiva contínua das vias aéreas); Pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂); Fração do oxigênio inspirado (FIO₂).

Fonte: adaptado de RANIERI, 2012.

Por esta definição, LPA/SDRA apresentam-se com insuficiência respiratória não totalmente explicada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga de fluido, opacidades bilaterais não totalmente explicadas por derrames, colapso pulmonar ou nódulos.

Bem caracterizada pelo aumento da permeabilidade como refletido no edema alveolar devido ao dano das células epiteliais e endoteliais e à infiltração de neutrófilos. O termo

“lesão pulmonar aguda” foi mantido para modelos animais experimentais (RANIERI, 2012). Desta forma, entende-se LPA/SDRA ou SDRA como LPA unicamente, neste trabalho.

A epidemiologia da LPA apresenta variações considerando a dificuldade em obter um diagnóstico preciso, omissão na notificação de casos e regiões em que estes ocorrem em diferentes países (McNICHOLASA et al., 2018). No entanto, nos Estados Unidos, há uma média de 79 casos a cada 100.000 habitantes por ano (RUBENFELD et al., 2005; McNICHOLASA et al., 2018) com claras variações sazonais e principalmente no inverno. O aumento da idade, na faixa de 75 a 84 anos, gera maiores incidências, atingindo cerca de 300 indivíduos por 100.000/ano (RUBENFELD et al., 2005), hospitalizando 190 mil pacientes anualmente, o que causa altos custos para o sistema de saúde nos EUA (RUBENFELD; HERRIDGE, 2007; VALAVANIDIS et al., 2013).

1.2 Patofisiologia da lesão pulmonar aguda

LPA e SDRA como espectros da mesma doença potencialmente fatal caracteriza-se por respostas hiperinflamatórias não controladas nos pulmões (SUN et al., 2014), conforme definido pela Conferência de Berlim em 2012. Alguns parâmetros utilizados para a definição desta doença foram descritos pela *American-European Consensus Conference* como uma síndrome de insuficiência respiratória aguda.

Esses parâmetros foram caracterizados por infiltrado pulmonar bilateral na radiografia de tórax, compatível com edema pulmonar, ocorrência de hipoxemia grave, mesmo como proporção de oxigênio arterial à fração inspirada de oxigênio ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ≤ 300 mmHg, independentemente da pressão expiratória final positiva (PEEP), pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg e ausência de sinais clínicos ou ecocardiográficos de hipertensão atrial esquerda (BERNARD et al., 1994; RANIERI et al., 2012).

Os fatores de risco para LPA foram classificados como diretos e indiretos. Os fatores de risco direto, ou lesão pulmonar direta, incluem pneumonia, aspiração de conteúdo, lesão por inalação, contusão pulmonar, vasculite pulmonar, sepse não pulmonar, trauma múltiplo, pancreatite, choque não cardiogênico, overdose de drogas. Já o fator de risco para lesão pulmonar indireta está associado à transfusão de sangue (FANELLI et al., 2013).

A patogênese em níveis celular e molecular pode ocorrer no epitélio alveolar ou no endotélio microvascular (ROCCO; ZIN, 2005), o primeiro caracterizando LPA alveolar e o

segundo extrapulmonar, sendo o mais comum, o que pode ocorrer após um quadro de sepse, pancreatite e/ou choque séptico (RAGALLER; RICHTER, 2010). No entanto, o desenvolvimento da doença é relativamente uniforme com inflamação difusa no tecido pulmonar (ROCCO; ZIN, 2005).

O processo inflamatório leva à formação de edema alveolar e intersticial, que pode progredir para fibrose pulmonar (ROCCO; ZIN, 2005; RAGALLER; RICHTER, 2010). As células inflamatórias, principalmente os neutrófilos, persistem com a secreção de mediadores, o que impede a resolução da inflamação (WARE; MATTHAY, 2000). A continuidade do processo inflamatório é tida como principal fator de morte em pacientes com LPA (WARE; MATTHAY, 2000; WHEELER; BERNARD, 2007).

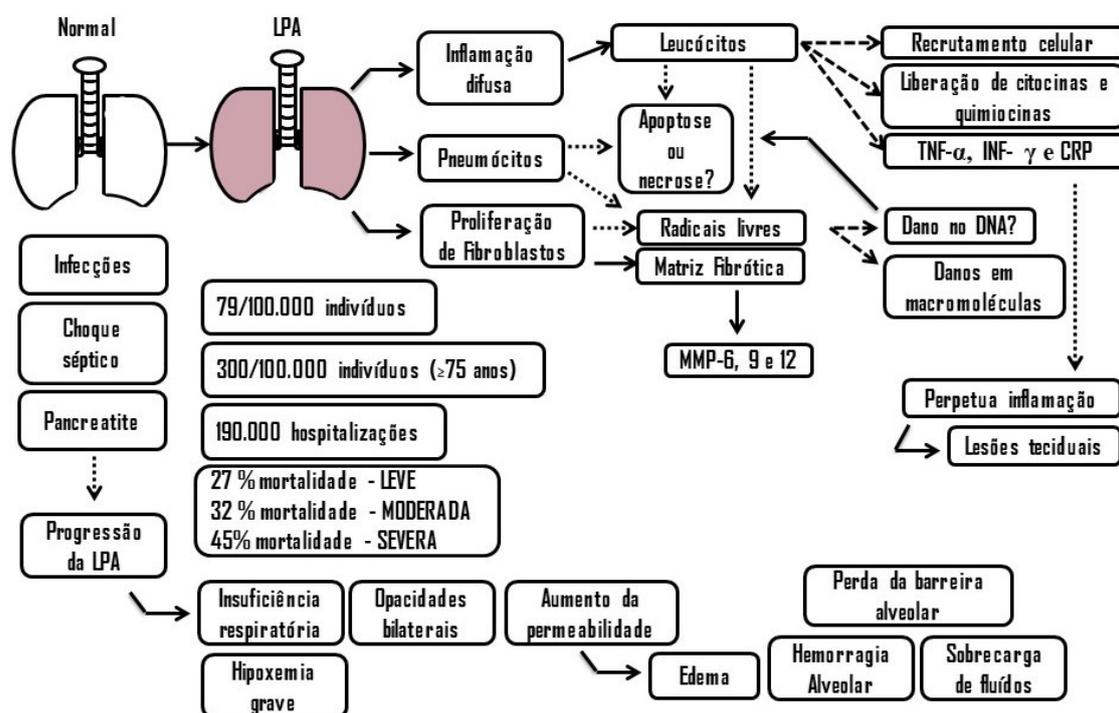
Em condições de sepse, a resposta inflamatória é iniciada pelo reconhecimento de antígenos microbianos por receptores específicos localizados na superfície dos macrófagos, como os receptores *toll-like receptor dos tipos 2 e 4* (TLR2 e TLR4, respectivamente) (BANNERED; GERONDAKIS, 2007). Dentre os antígenos microbianos, estão os componentes da parede celular bacteriana, como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas (CHOI et al., 2009). As células endoteliais de capilares alveolares e pneumócitos tipo I (células epiteliais alveolares) são lesadas (WARE; MATTHAY, 2000) e, com perda da barreira alveolar normalmente rígida, ficam expostas a fluidos e macromoléculas, ao epitélio alveolar, ao endotélio capilar, à matriz extracelular (MEC) e a outras células, como macrófagos alveolares e fibroblastos (DUNSMORE; RANNELS, 1996).

A MEC engloba a membrana basal (composta de colágeno tipo IV, laminina, colágeno tipo V e proteoglicanos) e tecido conjuntivo intersticial, e compõe-se de colágeno tipo I e III, elastina e proteoglicanos (DUNSMORE; RANNELS, 1996).

Uma variedade de processos, como a sobrevivência celular, a proliferação e a migração, é influenciada pelas interações célula-matriz e pela renovação da matriz (DUNSMORE; RANNELS, 1996; BERRIER; YAMADA, 2008).

As citocinas IL-1 (Interleucina 1), IL-8 (Interleucina 8) e TNF- α (tumor necrosis factor alpha), bem como mediadores lipídicos (leucotrieno B₄, por exemplo), estão presentes no pulmão no início da progressão da doença (MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005). Essas proteínas e mediadores pró-inflamatórios fazem com que os leucócitos, principalmente os neutrófilos, migrem para o interstício e para os alvéolos pulmonares (TSUSHIMA et al., 2009) (Figura 1). Logo, no espaço intersticial e alveolar, ocorre acúmulo de líquido rico em proteínas.

Figura 1 - Esquema ilustrativo resumido da progressão da LPA



Legenda: Lesão pulmonar aguda (LPA).

Nota: Pela exposição a microrganismos, o processo inflamatório instaura-se, os macrófagos identificam o lipopolissacarídeo e inicia a fagocitose, ativam-se os neutrófilos, que migram dos vasos para os alvéolos. A matriz é remodelada, e há extravasamento de hemáceas. No interior dos alvéolos, intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de radicais livres e proteases. Fibroblastos produzem MMP (metaloproteinasas) degradando a matriz, e os pneumócitos I e II começam a sofrer apoptose, estes associados a produção e liberação pelos leucócitos de fator de necrose tumoral (TNF- α), Interferon- γ (Interferon), Proteína c reativa (CRP). Com a matriz remodelada, há redução do espaço aéreo alveolar. As linhas pontuadas conotam uma tendência à, enquanto as linhas tracejadas conotam uma consequência.

Fonte: O autor, 2020.

A matriz extracelular é remodelada e há extravasamento de glóbulos vermelhos. Dentro dos alvéolos ocorre intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de radicais livres e proteases. Os fibroblastos produzem metaloproteinasas degradando a matriz extracelular e os pneumócitos começam a sofrer apoptose. Esse processo de remodelação da matriz causa redução do espaço aéreo alveolar.

As proteínas plasmáticas condensadas agregam-se nos espaços aéreos com detritos celulares e surfactante pulmonar disfuncional para formar espirais de membrana hialina (MATTHAY; ZEMANS, 2011). Além disso, a lesão vascular pulmonar ocorre no início da LPA, causando obstrução vascular (TSUSHIMA et al., 2009).

Não obstante, como a resposta inflamatória ainda é intensa, há aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), inclusive nas células endoteliais e epiteliais (VICTOR

et al., 2009). A lesão vascular pulmonar também ocorre no início da LPA, com obstrução vascular por microtrombos e proliferação fibrocelular (TSUSHIMA et al., 2009).

O edema alveolar envolve partes do pulmão, levando à diminuição da ventilação pulmonar e atelectasia (MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005; MATTHAY; ZEMANS, 2011). Conseqüentemente, a hipoxemia se desenvolve e a dificuldade respiratória aumenta, levando à dispnéia e à exacerbação de alterações fisiopatológicas nos espaços alveolares. Essas alterações são causadas pela oclusão microvascular, reduzindo o fluxo sanguíneo pulmonar e, além da hipoxemia grave, a hipercapnia secundária ao aumento do espaço pulmonar também se tornam proeminente na LPA (MERCAT et al., 2008).

A progressão da LPA é caracterizada em três fases sequenciais: exsudativa, proliferativa e fibrótica. Na fase exsudativa, que ocorre entre o primeiro e o sétimo dia após a exposição a um fator de risco, os indivíduos apresentam sintomas respiratórios, como dispnéia (MATTHAY; ZEMANS, 2011). As imagens de radiografia de tórax geralmente revelam opacidade alveolar e intersticial (MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005). No diagnóstico diferencial da LPA, os distúrbios mais comuns são: edema pulmonar cardiogênico, pneumonia difusa e hemorragia alveolar (MATTHAY; ZEMANS, 2011).

Na fase proliferativa, compreendendo o sétimo até o vigésimo primeiro dia, a maioria dos indivíduos se recupera e a ventilação mecânica é interrompida, apesar de muitos indivíduos ainda apresentarem dispnéia e hipoxemia (WARE; MATTHAY, 2000). De fato, alguns deles podem desenvolver lesão pulmonar progressiva e alterações precoces na fibrose pulmonar durante esta fase (TSUSHIMA et al., 2009). Histologicamente, o reparo do tecido pulmonar começa e há uma composição de exsudatos alveolares e a mudança do infiltrado pulmonar de neutrófilos para o infiltrado linfocitário (MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005).

Há proliferação de pneumócitos tipo II e síntese de novos surfactantes pulmonares (MATTHAY; ZIMMERMAN, 2005). Além disso, há presença do peptídeo alveolar pro-colágeno tipo III, um marcador de fibrose pulmonar, associado a um curso clínico prolongado e aumento da mortalidade (WARE; MATTHAY, 2000).

Enquanto alguns indivíduos apresentam recuperação da função pulmonar dentro de um período de três a quatro semanas após a lesão pulmonar inicial, outros entram na terceira fase, a fibrótica, necessitando de suporte por ventilação mecânica e/ou oxigênio suplementar (TSUSHIMA et al., 2009; MATTHAY; ZEMANS, 2011). A presença de ductos alveolares extensos e fibrose intersticial são características dessa fase fibroproliferativa, bem como alterações na arquitetura acinar dos ductos alveolares, levando a alterações semelhantes às observadas no enfisema com bolhas grandes (MATTHAY; ZEMANS, 2011). Há oclusão

vascular progressiva e hipertensão pulmonar, incluindo risco de pneumotórax e alterações no espaço pulmonar com consequência em doenças e aumento da mortalidade (MATTHAY; ZEMANS, 2011).

Embora existam tratamentos paliativos, como ventilação mecânica e uso de antibióticos, vários fatores do paciente podem influenciar a patogênese da LPA, como imunodeficiências, suscetibilidade genética, infecções subsequentes e fatores ambientais (SETHI; MURPHY, 2008).

1.3 Estresse oxidativo na inflamação: lesões no DNA

A inflamação é um mecanismo de defesa natural, em resposta a injúrias teciduais, como aquelas causadas por infecções, resultando em reparo tecidual (ADBULKHALEQ et al., 2018). A LPA e outras doenças agudas estão relacionadas ao aumento da produção de radicais livres, o que poderia culminar na oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e estes são reconhecidos como sinais inflamatórios (SALZANO et al., 2014).

Átomos e moléculas contendo elétrons não emparelhados em sua última camada de elétrons são altamente reativos e denominados radicais livres (BARAN et al., 2004). São produzidos como subprodutos durante o metabolismo, exposição à luz solar (radiação ultravioleta), radiação ionizante e produtos químicos tóxicos (BARAN et al., 2004).

Entre os radicais livres, existem as espécies reativas de oxigênio (*ROS*) e de nitrogênio (*RNS*) (BARAN et al., 2004).

O radical hidroxil (OH^{\cdot}), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) são exemplos de *ROS* (BARAN et al., 2004). Já as *RNS*, estas produzidas *in vivo* a partir de arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), desempenham importante função no relaxamento vascular, defesa biológica, modulação de neurotransmissão e no sistema imunológico, o óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$) são exemplos de *RNS* (BARAN et al., 2004).

É sugerido que a inflamação pode piorar a condição clínica de um indivíduo devido ao aumento do estresse oxidativo pela liberação de proteínas oxidadas de macrófagos, como a peroxiredoxina 2 (PRDX2), que desencadeia a produção de TNF- α em ambiente extracelular, indicando que esses mecanismos dependem do estado redox em cascatas oxidativas e pode

induzir inflamação (SALZANO et al., 2014), tornando o estresse oxidativo e a inflamação um círculo vicioso.

Condições infecciosas que causam lesão pulmonar devido ao estabelecimento de um quadro de sepse, que poderá manifestar a LPA, aumentam os níveis de radicais livres nas células pulmonares (WARE; MATTHAY, 2000; CHOW et al., 2003). Esses radicais livres causam estresse oxidativo alterando o DNA mitocondrial (mtDNA), pela geração de adutos volumosos e bases oxidadas, a estrutura de proteínas (GUO et al., 2013) e peroxidação de lipídios de membranas celulares, como na membrana plasmática, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (CAO; KAUFMAN, 2014).

ROS e *RNS* atuam na ativação de *Fator nuclear kappa B* (NF- κ B) e *Activator protein 1* (AP-1) promovendo a proliferação e sobrevivência celular (KABE et al., 2005; PANTANO et al., 2006) e estão relacionados à estabilização do *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), culminando na transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo, sobrevivência e morte celular, angiogênese, invasão e metástase (SCHAUR, 2003) e na regulação da *AMP-activated protein kinase* ou *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), que participa do metabolismo energético (IRRCHEER, LJUBIC ; HOOD, 2009).

Em condições de aumento da resposta inflamatória, como as que ocorrem na LPA, neutrófilos e macrófagos são as células com maior produção de *ROS* (BRIGHAM, 1986; RINALDO, 1986).

No entanto, também há aumento da produção de *ROS* nas células endoteliais e epiteliais do tecido pulmonar (VICTOR et al., 2009; VALAVANIDIS et al., 2013). Além disso, há altos níveis de *ROS* na hipercapnia, acidose e hipertensão pulmonar, que aumenta o estresse oxidativo e o risco de morte celular em pacientes com septicemia (SUN et al., 2014), levando à redução do volume plasmático e da capacidade antioxidante total (ALONSO DE VEGA et al., 2002).

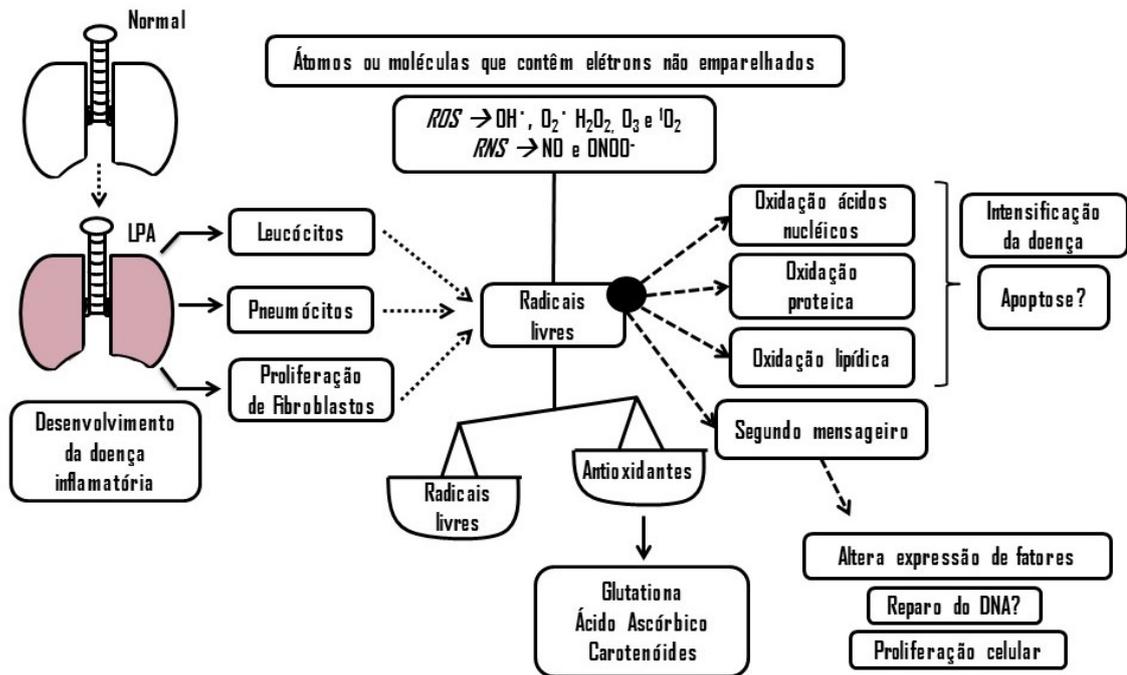
Outros estudos também indicam que a glutatona peroxidase (GPx) é um importante marcador do estresse oxidativo no LPA, correlaciona-se com a PaO₂/FiO₂ e o índice de oxidação, inicialmente, e na progressão da doença, correlaciona-se com a pressão expiratória positiva final (PEEP), esta utilizada no tratamento de doenças pulmonares inflamatórias (SARKELE et al., 2013). Sarkele et al. (2014) relataram que pacientes com LPA apresentam concentrações mais altas de GSSG (a forma oxidada da glutatona) em comparação ao grupo controle, apesar dos altos níveis de F2-isoprostano (um marcador da peroxidação lipídica), que indica estresse oxidativo em pacientes com LPA (SARKELE et al., 2014).

Lee et al. (2017) sugeriram que existem evidências apontando para danos mitocondriais oxidativos em modelos de lesão pulmonar e isso pode ser considerado um marcador molecular no contexto do estresse oxidativo. Esses autores mostraram que existe associação entre dano no mtDNA e morte celular por *ROS*. Em outro estudo, foi relatado que padrões moleculares associados a danos mitocondriais pró-inflamatórios (DTMs), incluindo fragmentos do mtDNA e proteínas associadas ao mtDNA, são liberados na circulação de pacientes com doenças inflamatórias graves, que podem ocorrer em lesão pulmonar aguda (SIMMONS et al., 2013).

Além disso, foi demonstrado que um grande número de padrões moleculares associados a danos no mtDNA (DAMPs) em transfusões de sangue poderia prever o desenvolvimento de LPA (LEE et al., 2017). Outros autores demonstraram através de estudos em cultura células animais, órgãos e animais que os DAMPs de mtDNA causam lesão endotelial e edema pulmonar (ZHANG et al., 2010; SUN et al., 2013). Ruchko et al. (2005) demonstraram que a extensão do dano no mtDNA determina se as células endoteliais da artéria pulmonar sobrevivem ou ativam uma via de morte apoptótica, e isso se refere ao mecanismo pelo qual o dano ao mtDNA inicia uma cascata apoptótica.

Sob condições de estresse oxidativo, os radicais livres poderiam atuar como segundos mensageiros em vias específicas de sinalização celular, função imune e transdução de sinal, afetando a homeostase celular (LANDER, 1997). Por outro lado, esses radicais livres podem reagir diretamente com a molécula de DNA, causando alterações nas bases nitrogenadas, oxidando-as (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) como mostra a Figura 2.

Figura 2 - Esquema ilustrativo do estresse oxidativo na inflamação: lesões no DNA?



Legenda: Lesão pulmonar aguda (LPA), *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS).

Nota: O desenvolvimento da doença pulmonar pode ocorrer pela instauração do processo inflamatório com neutrófilos migrando dos capilares para os alvéolos, remodelamento de matriz extracelular, extravasamento de hemáceas. Os pneumócitos I e II e as células do infiltrado inflamatório podem entrar em apoptose, bem como pode ocorrer a liberação de fatores pelas células inflamatórias e intensa produção de radicais livres, que podem causar oxidação lipídica, proteica e de ácidos nucleicos. Estes mesmos radicais livres podem atuar como segundos mensageiros e desencadear o reparo do DNA lesionado.

Fonte: O autor, 2020.

No entanto, após o dano, a molécula de DNA pode ser reparada por mecanismos enzimáticos (CADET et al., 2000), que são cruciais para a manutenção da integridade do genoma (FRIEDBERG et al., 2006). A Tabela 2 resume alguns estudos que relacionam LPA, danos ao DNA e mecanismos de reparo do DNA.

Tabela 2 - Resumo dos estudos sobre a relação entre lesão pulmonar aguda e danos ao DNA /
Mecanismos de reparo do DNA (continua)

1º autor Ano	Título (Original)	Referência	Observações e conclusão
Fu H 2017	Calcitonin gene-related peptide protects type II alveolar epithelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and cell death	Exp Ther Med 13 (4) 1279-1284	A exposição a 60% de oxigênio por 24 horas predis põe a danos oxidativos nas células do epitélio alveolar, incluindo danos ao DNA e apoptose; no entanto, o peptídeo relacionado ao gene exógeno de calcitonina atenuou a lesão hiperóxica e exerceu um efeito citoprotetor, sugerindo que a regulação positiva da expressão pode representar uma alternativa para a prevenção de lesão pulmonar induzida por hiperóxica.
Barker 2006	DNA damage induced by hyperoxia: quantitation and correlation with lung injury	Am J Respir Cell Mol Biol 35 (3) 277-288	A exposição ao oxigênio causou danos à bases nitrogenadas do DNA nas células pulmonares como efeito primário do ataque ROS ao DNA, o que implica na capacidade dos oxidantes inalados de alterar o genoma do pulmão. A exposição prolongada levou a quebras de fita de DNA, sugerindo que um efeito colateral das nucleases ativadas durante a morte celular é provável e correlacionado com a progressão da doença pulmonar, sugerindo que a lesão celular desempenha um papel fundamental na toxicidade pulmonar do oxigênio.
Wan R 2017	Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice	Part Fibre Toxicol 14 (1) 38	A exposição às nanopartículas de cobalto causou estresse oxidativo, inflamação e lesão pulmonar e proliferação celular, o que resultou em danos e mutações no DNA com grande frequência, principalmente na transversão G:C à T:A, o que pode ser explicado pela maior formação de 8 -OHdG induzido pelas nanopartículas.
Simmons 2017	Potential contribution of mitochondrial DNA damage associated molecular patterns in transfusion products to the development of acute respiratory distress syndrome after multiple transfusions	J Trauma Acute Care Surg 82 (6) 1023-1029	Plasmas e plaquetas congeladas frescas contêm grandes quantidades de DNA mitocondrial extracelular (mtDNA) de que a quantidade de mAMDs associada ao mtDNA administrada durante a transfusão pode contribuir para os níveis séricos de mtDNA DAMP, e que os níveis séricos de mtDNA DAMPs após múltiplas transfusões podem prever o desenvolvimento de SDRA. Portanto, as medidas séricas do mtDNA DAMP podem ser biomarcadores preditivos para a evolução da SDRA.
Lee YL 2017	Mitochondrial DNA Damage Initiates Acute Lung Injury and Multi-Organ System Failure Evoked in Rats by Intra-Tracheal Pseudomonas Aeruginosa	Shock 48 (1) 54-60	Ogg1 direcionado ao genoma mitocondrial suprime os danos no DNA do tecido pulmonar induzido por bactérias e LPA, acompanhado pela atenuação da falência e letalidade de múltiplos órgãos. É uma forte evidência de que a integridade genômica mitocondrial é uma etapa crítica na propagação de lesões.

Tabela 2 - Resumo dos estudos sobre a relação entre lesão pulmonar aguda e danos ao DNA / Mecanismos de reparo do DNA (conclusão)

1º autor Ano	Título (Original)	Referência	Observações e conclusão
Sergio 2019	Low-power <i>laser</i> alters mRNA levels from DNA repair genes in acute lung injury induced by sepsis in Wistar rats.	<i>Lasers Med Sci.</i> 34 (1) 157-168	A lesão pulmonar aguda altera os níveis do RNAm dos genes de reparo do DNA, entendendo que isso seria parte da resposta celular à sepse e, após o tratamento com <i>laser</i> infravermelho de baixa potência, os níveis de RNAm dos genes de reparo do DNA são modulados na lesão pulmonar aguda.

Fonte: O autor, 2020.

1.4 Modelos animais

A lesão do parênquima pulmonar induzida por um insulto, como a sepse, pode causar insuficiência respiratória e levar à morte (BASTARACHE; BLACKWELL, 2009). A patogênese da LPA é complexa e leva dias ou semanas para ser resolvida. Apesar de muita pesquisa, existe apenas uma terapia atual baseada na ventilação pulmonar com baixo volume respiratório corrente (BELONCLE et al., 2014).

Modelos animais podem ser usados para simular pacientes com desenvolvimento da LPA. No entanto, as características da LPA em modelos experimentais não são totalmente iguais a todas aquelas da LPA em seres humanos. (AEFFNER et al., 2012; TRAYLOR, AEFFNER; DAVIS, 2013).

Os modelos experimentais baseados em primatas são mais próximos da complexidade da LPA, mas requerem instalações especializadas e onerosas (BASTARACHE; BLACKWELL, 2009); portanto, os principais modelos experimentais ainda são roedores, como camundongos e ratos. Os roedores são acessíveis, podem ser geneticamente manipulados e a LPA pode ser induzida por técnicas diretas ou indiretas (MATUTE-BELLO, FREVERT; MARTIN, 2008).

Em humanos, a LPA pode se desenvolver a partir de pneumonia e sepse, por exemplo. Essas condições são usadas em modelos de camundongos e ratos por inoculação de endotoxina bacteriana gram-negativa ou lipopolissacarídeo (LPS) (RAETZ et al., 1991).

Esta endotoxina pode ser administrada diretamente nos pulmões por injeção intratraqueal ou inalação (LIU et al., 2013) ou ainda por via intraperitoneal (RABELO et al.,

2018), para simular uma inflamação sistêmica, como a induzida por sepse. Dejager et al. (2011) relataram que a administração de LPS é considerada um modelo experimental altamente controlável e simples que induz uma resposta aguda. No entanto, a sinalização induzida por LPS é estritamente dependente de TLR4, o que poderia não refletir todas as respostas inflamatórias humanas complexas.

Outro modelo experimental proposto é baseado em lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica (WOLTHUIS et al., 2009). Este modelo experimental se correlaciona com a lesão pulmonar induzida em humanos submetidos à ventilação mecânica, por um estímulo adicional, ou volumes correntes extremamente altos, mas esse modelo não induz uma lesão pulmonar substancial em camundongos (WILSON et al., 2003).

Um modelo experimental amplamente usado para simular a condição de sepse que culmina em lesão pulmonar aguda é baseado na ligadura cecal e punção (RITTIRSCH et al., 2009). É considerado um procedimento simples, com presença de foco infeccioso contínuo, por se tratar de sepse polimicrobiana, que recria a sepse humana com fases hemodinâmica e metabólica (DEJAGER et al., 2011).

Wan et al. (2017) demonstraram que a lesão pulmonar causada por nanopartículas de cobalto gera estresse oxidativo, resultando em danos e mutações na molécula de DNA. Há discussões acerca de vários modelos animais de LPA com o objetivo de auxiliar na escolha do modelo experimental mais adequado para questões científicas específicas, conforme relatado por Matute-Bello et al. (2008).

No entanto, não existe um modelo experimental que apresente todas as características da LPA humana. De fato, essa doença não se baseia em um único evento (WARE, 2008) e diferenças entre a humana e os modelos experimentais podem surgir da variabilidade da imunidade inespecífica entre espécies (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

A Tabela 3 mostra as vantagens e desvantagens de três desses modelos experimentais para indução da LPA, de acordo com Ballard-Croft et al. (2012) e Sipahi e Ataly (2015). Apesar das limitações, modelos experimentais são essenciais para o estudo de doenças humanas, pois não há substituto para testar intervenções terapêuticas em indivíduos afetados por essas doenças.

Tabela 3 - Resumo de três modelos de indução de lesão pulmonar aguda

Modelo	Vantagens	Desvantagens
LPS	Bom modelo de sepse	A lesão pulmonar não imita plenamente a LPA humana (infiltrados neutrofilicos intra-alveolares mínimos e edema alveolar rico em proteínas)
Hiperóxia	Bom modelo de lesão hemorrágica	Menos infiltrados neutrofilicos intra-alveolares do que na SDRA humana
Isquemia mesentérica e reperfusão	Bom modelo de sepse	A lesão está localizada principalmente nos compartimentos vascular e intersticial do pulmão.

Fonte: O autor, 2020.

1.5 Manutenção do genoma após dano no DNA

A presença de danos na molécula de DNA ativa diferentes vias de reparo. Há via específica para danos oxidativos, contudo, outras também podem atuar sobre esse tipo específico de lesão. Descrito na década de 1960, o reparo por excisão pode ser dividido em dois: reparo por excisão de bases e reparo por excisão de nucleotídeos (SETLOW; CARRIER, 1964; COSTA et al., 2003).

A via de reparo por excisão de bases tem forte relação com a via de reparo de pareamento errôneo do DNA ou *Mismatch repair*, uma vez que podem atuar em bases oxidadas, além do reconhecimento e reparo de alterações numéricas da base (BRIDGE, RASHID; MARTIN, 2014). Não obstante, há outros mecanismos de reparo de danos no DNA que também contribuem para a integridade do genoma e estabilidade telomérica.

1.5.1 Reparo por excisão de bases

As espécies reativas de oxigênio (*ROS*) reagem com a molécula de DNA causando quebras simples da fita (SSB – *single strand break*), especialmente nas ligações com a pentose (LINDAHL, 1993). A 8-oxo-guanina (8-oxoG) e a 5-hidroxicitosina, que pareiam com adenina e timina, respectivamente, são as bases comumente oxidadas (van LOON,

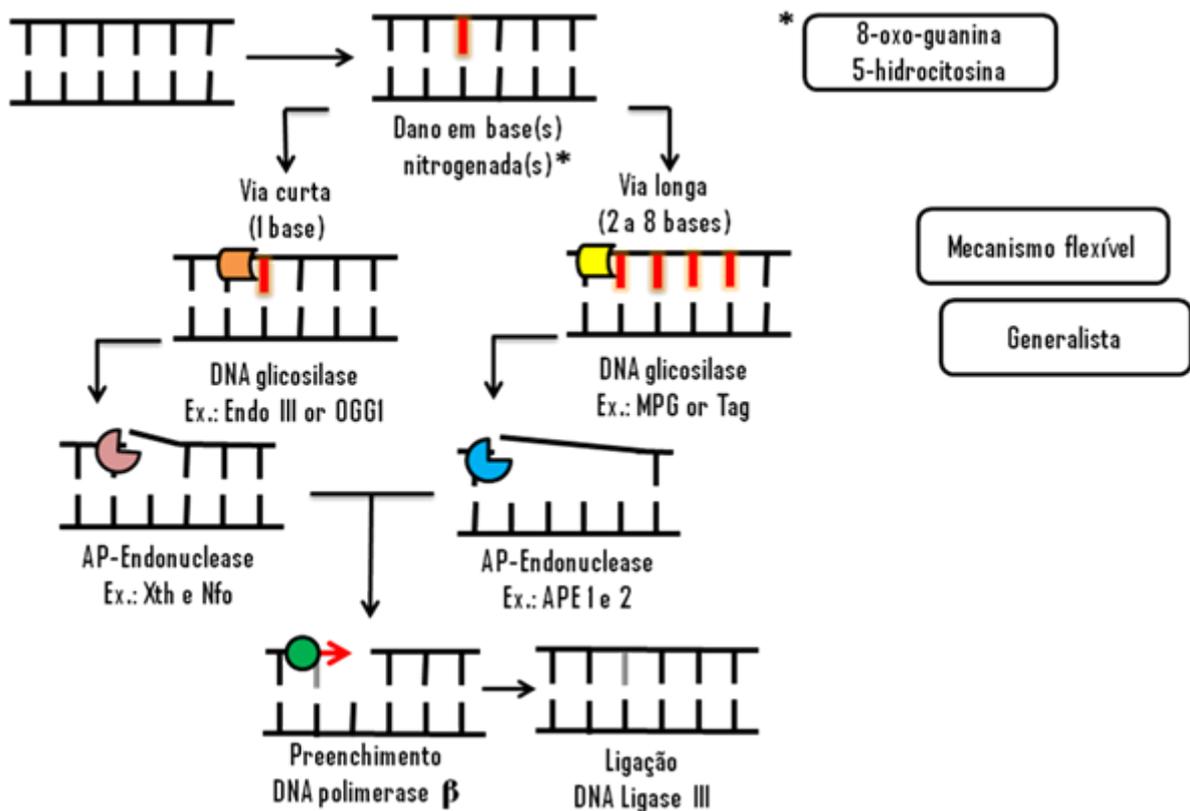
MARKKANEN; HUÜBSCHER, 2010). O aumento no nível basal de danos oxidativos no DNA está associado a várias doenças relacionadas à idade, incluindo doenças cardiovasculares (COLLINS et al., 1998), câncer (MALINS et al., 2001) e doenças neurodegenerativas (MÓROCZ et al., 2002). Como descrito anteriormente, a LPA contribui para o aumento de radicais livres, causando estresse oxidativo, que por sua vez pode danificar a molécula de DNA (van LOON; MARKKANEN; HUÜBSCHER, 2010) e, conseqüentemente, ativar o mecanismo de reparo por excisão de bases (REB) (DIANOV; HUÜBSCHER, 2013) que atua em quebras de fita simples, bases oxidadas e adutos relativamente volumosos (KLUNGLAND; BJELLAND, 2007).

O aumento do metabolismo também pode levar a danos oxidativos, e é comumente aumentado em tumores, de modo a alterar a sinalização oncogênica e causando disfunção mitocondrial (WISEMAN; HALLIWELL, 1996). Este aumento do metabolismo resulta no aumento em 100 vezes a quantidade de 8-oxoG nos tecidos neoplásicos, quando comparado aos tecidos normais (WISEMAN; HALLIWELL, 1996).

Conservado evolutivamente, o REB possui alta homologia de sequência funcional, de bactérias a mamíferos, apresentando duas vias: via curta de REB para reparar uma única base danificada e via longa de REB, capaz de remover de duas a oito bases danificadas (KLUNGLAND; BJELLAND, 2007) (Figura 3).

A excisão de uma base danificada é realizada por uma DNA glicosilase, que marca o início desse mecanismo de reparo do DNA (KROKAN; BJORAS, 2013). Uma dessas glicosilases ativas é a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1 - *8-Oxoguanine DNA glycosylase*), que é capaz de reconhecer os danos, promover a hidrólise da ligação N-glicosil e possui atividade liase (KROKAN; BJORAS, 2013).

Figura 3 – Representação esquemática para o mecanismo de reparo por excisão de bases (REB)



Legenda: Endonuclease III (Endo III), 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) 3-methyladenine-DNA glycosylase (MPG), Xyloglucan endo-transglycosylase/hydrolase (Xth), X-ray repair cross-complementation group 1 (XRCC1), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) e ligase (Lig).

Nota: Via curta (para uma base danificada) e via longa (para até oito bases danificadas).

Fonte: Adaptado de KANEHISA LABORATORIES, 2020.

Poli [ADP-ribose] polimerase 1 (PARP1) modifica a polaridade da fita de DNA para o recrutamento de outras proteínas necessárias para o reparo do DNA (AHEL et al., 2008). A Rapamicina, a Torina 1, além da PARP1 interagem com o *excision repair cross-complementation group 1* (XRCC1), a fim de estimular APE1 para a clivagem do esqueleto de fosfato, de modo que a DNA polimerase β (POL β) possa inserir um novo nucleotídeo (EL-KHAMISY et al., 2003).

Além disso, a POL β exibe atividade da fosfodiesterase, que hidrolisa as extremidades não modificadas na extremidade 5' (PODLUTSKY et al., 2001), permitindo a conexão subsequente do novo nucleotídeo à sequência de DNA pela ação da DNA ligase III, que finaliza o reparo do DNA (CALDECOTT, 2003).

Esse mecanismo é considerado genérico e flexível, capaz de reconhecer e reparar um grande número de danos, contudo atua com poucas enzimas, mas torna-se fundamental para

as células (EL-KHAMISY et al., 2003). Além disso, a escolha da via longa ou curta é atribuída ao número de danos e à disponibilidade de ATP no local do sítio abásico (PETERMANN; ZIELER; OEI, 2003).

Lee et al. (2017) mostraram que a associação entre danos no DNA mitocondrial e morte celular induzida por ROS é inversamente relacionada à eficiência do reparo do DNA mitocondrial mediado por OGG1. Eles também reforçaram que a superexpressão de OGG1 pode ter efeitos no reparo nuclear de DNA, reduzindo assim a sensibilidade a danos oxidativos e a citotoxicidade. Em ratos *knockout*, há danos persistentes no genoma mitocondrial, culminando em aumento de apoptose.

1.5.2 Reparo por excisão de nucleotídeos

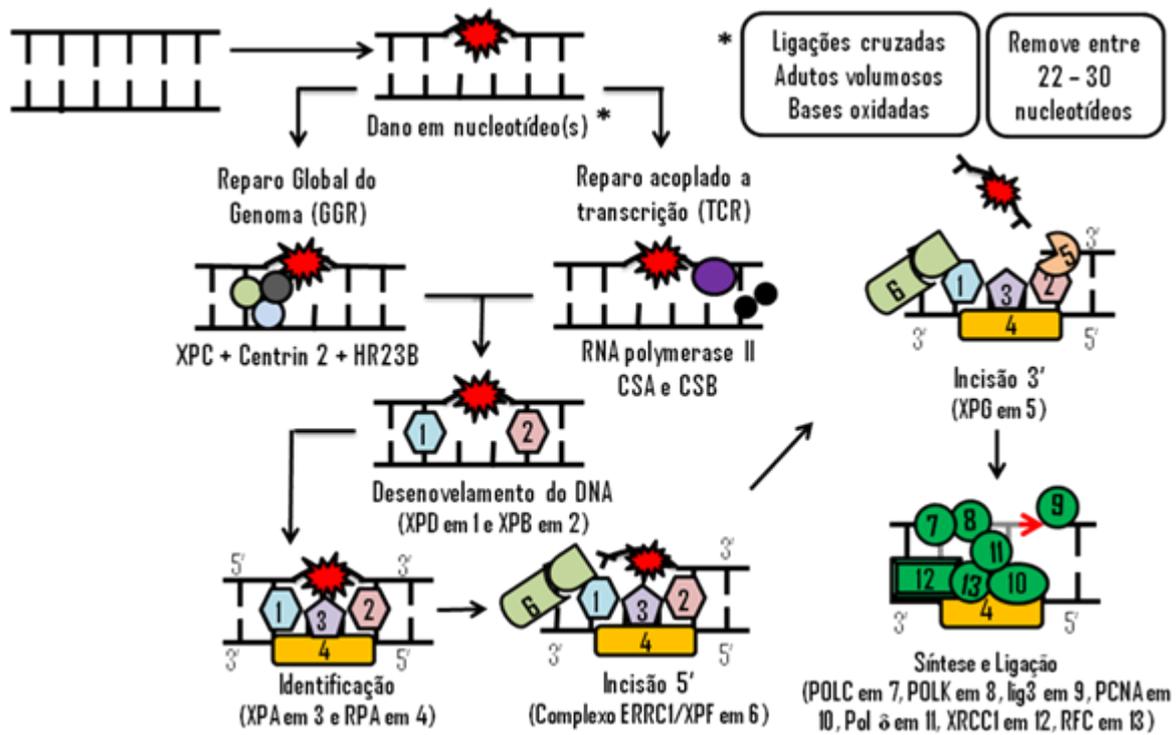
O REB atua sobre danos oxidativos específicos, mas no desenvolvimento da LPA, o estresse oxidativo pode danificar a molécula de DNA das células pulmonares e imunológicas e, conseqüentemente, ativar o REB e o REN, o que contribuem efetivamente para o reparo da macromolécula (CLANCY, 2008).

O REN reconhece danos por distorção de fita dupla, como dímeros do tipo ciclobutano-pirimidina, adutos do tipo 6-4 pirimidina-pirimidona e certos tipos de ligações cruzadas entre as duas fitas do DNA (ZHU; WANI, 2016), removendo de 22 a 30 nucleotídeos (SCHARER, 2013). No entanto, Melis et al. (2013) relataram que o REN poderia atuar em bases oxidadas, e os resultados apresentados por Berra et al. (2013) mostraram a interação das proteínas do REN com outras vias de reparo do DNA que atuam nos danos no DNA induzidos pelo estresse oxidativo.

Esse mecanismo envolve mais de 30 enzimas em duas vias, reparo do genoma global (GGR – *global genome repair*) e reparo acoplado à transcrição (TCR – *transcription coupled repair*) (COSTA et al., 2003) (Figura 4).

A Figura 4 representa uma representação esquemática do REN, onde estão representadas as principais proteínas envolvidas. O GGR remove o dano em regiões não transcritas, enquanto TCR atua em regiões transcritas. Outra diferença entre GGR e TCR são as proteínas que iniciam o processo de reparo pela identificação de lesões.

Figura 4 – Representação esquemática para o mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN)



Legenda: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), ligase (Lig), xeroderma pigmentosum (XP), excision repair cross-complementing 1 (ERCC1), replication protein A (RPA) e ligase III (lig3), DNA polymerase Kappa (POLK), DNA polymerase III (POLC), DNA polymerase δ (POL δ) e replication factor c (RFC).

Nota: Reparo global do genoma e Reparo acoplado a transcrição.

Fonte: Adaptado de KANEHISA LABORATORIES, 2020.

O complexo XPC/HR23B realiza o reconhecimento primário de danos e recruta outras proteínas (KRASIKOVA et al., 2008), como *Cockayne Syndrome A* e *B* (CSA e CSB, respectivamente), que atuam na remoção de *RNA polimerase II* (RNAPII) no DNA danificado, permitindo o reparo do DNA (PETRUSEVA et al., 2014).

O complexo *xeroderma pigmentosum E* (XPE), cujas subunidades são P127/DDB1 e p48/DDB2, reconhece outros danos não identificados pelo complexo *Xeroderma pigmentosum C* (XPC) (BERRA et al., 2013). *Transcription factor of RNA polymerase II* (TFIIH) é composto por subunidades dependentes de ATP (p62, p52, p44, p34, cdk7, ciclina H e MAT1), além dessas subunidades, 2 helicases, chamadas *xeroderma pigmentosum B* e *D* (XPB e XPD, respectivamente).

TFIIH é recrutado para o local do dano afim de reconhecer e realizar a varredura 5' a 3' por uma curta distância antes de ancorar nos danos no DNA em cooperação com outros

componentes proteicos, por atividade catalítica, desenovela a molécula de DNA, permitindo a ancoragem de outras proteínas (SUGASAWA et al., 2009).

A helicase 5'-3' dependente de ATP (XPD/ERCC2 - *xeroderma pigmentosum D* e *Excision repair cross-complementation group E*) é essencial para o REN manter a estabilidade de todo o complexo formado através da interação da porção C-terminal com a subunidade p44 (AHMAD et al., 2010). Após proteína de replicação A (RPA), (*xeroderma pigmentosum A* e *G* (XPA e XPG, respectivamente) realizam a síntese pré-incisão e reparo. A incisão é realizada por um heterodímero entre *xeroderma pigmentosum F* (XPF), *Excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) e XPG, ocorrendo em sequências de nucleotídeos com cerca de 15-24 nucleotídeos na extremidade 5' e cerca de 2 a 8 nucleotídeos na extremidade 3' do dano (FAN; LUO, 2010)

Durante a clivagem 3', a síntese do novo fragmento de DNA é iniciada antes da incisão 5' por XPG (PETRUSEVA et al., 2014), enquanto isso, SIRT1 (*sirtuin nuclear protein 1*) desempenha um papel duplo na promoção de REN, estimulando o reconhecimento de danos, promovendo a expressão de Proteína *xeroderma pigmentosum C* (XPC) (SCHARER, 2013). Além disso, o SIRT1 estimula a excisão de danos, promovendo a montagem da endonuclease em locais danificados pela desacetilação da proteína XPA (SCHARER, 2013). *Replication protein a* (RPA), *replication factor c* (RFC), *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) e polimerases σ/ϵ realizam a síntese de DNA e as ligases de DNA (LIG1 ou LIG3) ligam o novo fragmento à cadeia de DNA (COSTA et al., 2003).

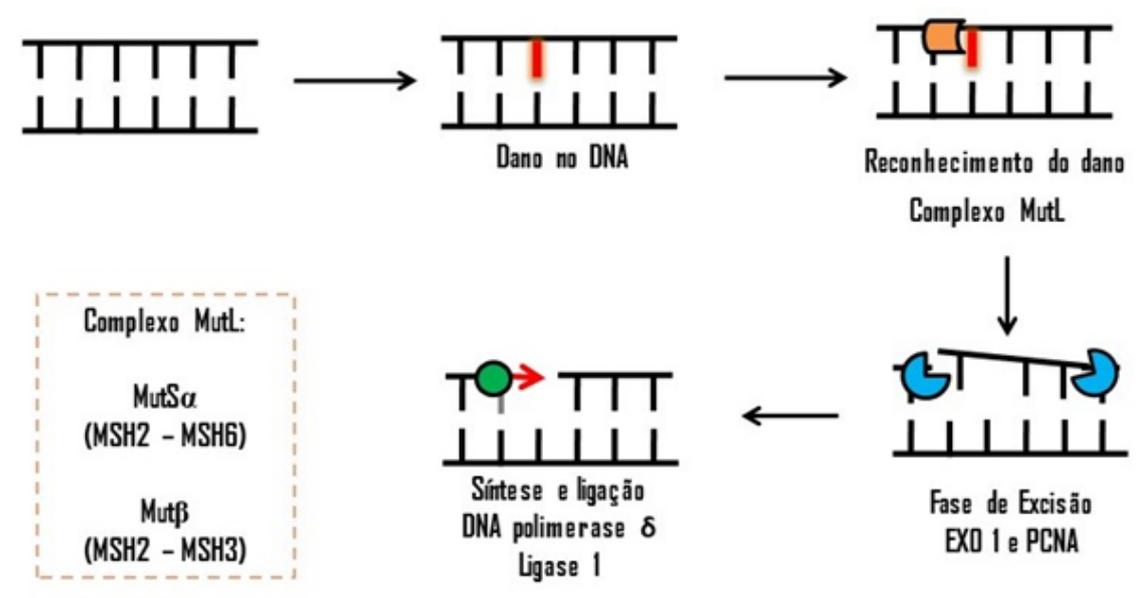
1.5.3 Reparo de pareamento errôneo ou *Mismatch repair*

A via de reparo de pareamento errôneo do DNA ou *Mismatch repair* (MMR) foi inicialmente descrita em *Escherichia coli* (LAHUE; MODRICH, 1989) como um sistema para reconhecer e reparar inserções erradas, exclusões de bases e/ou incorporações incorretas delas, bem como distorções na fita que podem ocorrer durante o processo de duplicação (HSIEH ; YAMANE, 2009), sendo dividido em três estágios: reconhecimento, excisão e síntese do DNA de complementação da falha.

O MMR nas células eucarióticas é mais complexo do que nas células procarióticas, mas os passos são altamente conservados evolutivamente (KUNKEL; ERIE, 2005). O reconhecimento da distorção da hélice ocorre pelas proteínas MutS α ou MutS β , que em

seguida, se complexando com MutL (heterodímero de MLH1 e PMS2) que é recrutado e forma um complexo tetramético nos sítios de danos do DNA (Figura 5).

Figura 5 – Representação esquemática para o *Mismatch repair* (MMR)



Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) e *Replication factor C* (RFC) são recrutados e o DNA é clivado. PCNA auxilia na localização de MSH2 e MLH1 e desempenha um papel fundamental na iniciação e ressíntese do DNA no MMR (GUO et al., 2006). Além disso, PCNA auxilia na localização de MutSα ou MutSβ na replicação de erros do DNA por interação com MSH6 e MSH3 (SHELL; PUTMAN; KOLODNER, 2007). A excisão ocorre no momento em que o PCNA é direcionado na direção 3', enquanto a *exonuclease 1* (EXO1) é direcionada na direção 5', devido seu papel como exonuclease, onde esse complexo realiza a excisão da base incompatível (DZANTIEV et al., 2004).

Depois disso, a molécula de DNA precisa ser refeita, portanto a terceira fase do MMR (síntese de DNA) deve ser precisa. A RPA é fosforilada após o recrutamento da POL δ no substrato de sítio do DNA. A RPA fosforilada facilita a ressíntese de DNA com mais eficiência do que a RPA não fosforilada (LINDSEY-BOLTZ et al., 2012). Esses resultados são consistentes com o fato de que o complexo RPA-DNA pode ser necessário para proteger o DNA de fita simples nascente e substituir o complexo MutSα/MutLα (GUO et al., 2006),

enquanto uma menor afinidade do complexo RPA-DNA pode facilitar a ressíntese de DNA pela POL δ , completando a terceira fase dessa via de reparo do DNA (LINDSEY-BOLTZ et al., 2012).

Além disso, a RPA possui ações diferentes no MMR: ligação à dupla heterohélice do DNA antes de MutS α e MutL α , estimulação da excisão provocada por incompatibilidade, proteção das regiões com desenovelamento do DNA de fita simples durante a excisão, facilitação da ressíntese do DNA e fosforilação após POL δ (GUO et al., 2006).

O pareamento errôneo de DNA, e muitos outros pares de bases de DNA não canônicas, tendem a causar variações na conformação das cadeias do DNA (YUAN e tal, 2004), essas alterações estão sujeitas a reparo pela proteína MutS, que influencia negativamente a eficiência do reparo do DNA (MAZUREK et al., 2009).

Foi sugerido que a MutS α coopera ou sobrepõe levemente a funcionalidade com o BER (GU et al., 2002). De fato, células-tronco embrionárias murinas deficientes em MSH2 apresentam eficiência de reparo de 8-oxodG marcadamente mais baixa do que em células controle selvagens (DeWEESE et al., 1998).

Além disso, foi demonstrado que a MutS α reduz a frequência de transversões G:C para A:T resultantes do pareamento entre adenina e 8-oxodG em leveduras (NI; MARSISCHKY; KOLODNER, 1999).

No entanto, Repmann et al (2015) relataram que as proteínas do MMR não estimulam o reparo de 8-oxoG no DNA recém-sintetizado.

Em *E. coli*, os defeitos nas proteínas MutS ou MutL conferem sensibilidade à radiação ultravioleta e inibem especificamente o reparo por excisão de nucleotídeos acoplados à transcrição (REN) (BERTRAND et al., 1998). Bertrand et al. (1998) relataram que a MSH2 interage com as proteínas do REN, e que as alterações no MMR aumentam a sensibilidade ao ultravioleta nas células com deficiência de REN, como o MMR, podendo desempenhar um papel secundário no REN (ROCHETTE et al., 2002).

Além disso, a deficiência de MSH2 leva à hipersensibilidade à ligação cruzada entre bases nitrogenadas por agentes sensibilizantes (WU et al., 2005), e muitas proteínas que participam do reparo desses danos no DNA desempenham papéis importantes no REN e em outras vias de reparo do DNA (NOLL; MASON; MILLER, 2006). De fato, a presença de danos na fita do DNA foi reconhecida pelo REN (NOLL; MASON; MILLER, 2006). Zhao et al. (2009) relataram que a MutS β interage diretamente com os complexos XPA-RPA e XPC-RAD23B, formando um complexo de ordem superior que pode participar do reparo de ligações cruzadas entre fitas do DNA.

Embora as evidências sugiram que o MMR possa estar ativo durante o desenvolvimento da LPA associada ao estresse oxidativo, não há estudos correlacionando a LPA/SDRA com essa via de reparo do DNA. No entanto, é possível que essa via de reparo do DNA tenha um papel importante na correção de danos no DNA nas células pulmonares de pacientes com LPA/SDRA.

1.5.4 Estabilidade genômica e regulação dos telômeros em resposta a danos e estresse

Contribuições de estudos genômicos, proteômicos, metabolômicos e de expressão gênica têm melhorado o entendimento sobre a LPA (MEYER, 2014). Embora não existam estudos que demonstrem que os danos no DNA causem instabilidade genômica e encurtamento de telômeros, tanto em seres humanos com LPA quanto em modelos experimentais, é necessário entender o perfil da doença em relação à estabilidade genômica e dos telômeros.

Um telômero é uma sequência de repetições TTAGGG, como T-loop, seguido por uma extremidade 3' (DONATE; BLASCO, 2011). Na divisão celular normal, as telomerasas agem encurtando os telômeros (SHAMMAS, 2011), de modo que os mesmos estão relacionados à proteção do genoma e à longevidade celular (DONATE; BLASCO, 2011).

Há aumento do encurtamento de telômeros no estresse oxidativo exacerbado (von ZGLINICKI, 2002), o que sugere que na LPA, os telômeros mais curtos poderiam ser identificados. De fato, foi verificado que ocorre encurtamento dos telômeros em pacientes com doenças pulmonares inflamatórias crônicas (AMSELLEM et al., 2011). O encurtamento dos telômeros nesse caso estaria relacionado à redução da atividade da telomerase, e a esta sugere estar associado à redução da função pulmonar (RODE et al., 2016).

Um complexo de seis proteínas, ou *Shelterin*, ligadas ao DNA atua em conjunto com as telomerasas para garantir a integridade dos telômeros, o complexo inclui *Telomeric Repeat Factor 1* (TRF1), *Telomeric Repeat Factor 2* (TRF2), *TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear Protein 2* (TIN2), *Repressor / Activator Protein 1* (Rap1), *Adrenocortical dysplasia protein homolog* (TPP1) e *Protection of Telomere 1* (POT1) (GIRAUD-PANIS et al., 2013). No *shelterin*, TRF1 e TRF2 se ligam diretamente a telômeros, POT1 se liga diretamente a extremidade 3' da fita e os outros três componentes se conectam a esses componentes de ligação de telômeros (HANAOKA; NAGADOI; NISHIMURA, 2005). A interação entre

TRF1 e TRF2, que é mediada por TIN2, contribui para a estabilização da TRF2 em telômeros, protegendo o DNA da degradação (O'CONNOR et al., 2006).

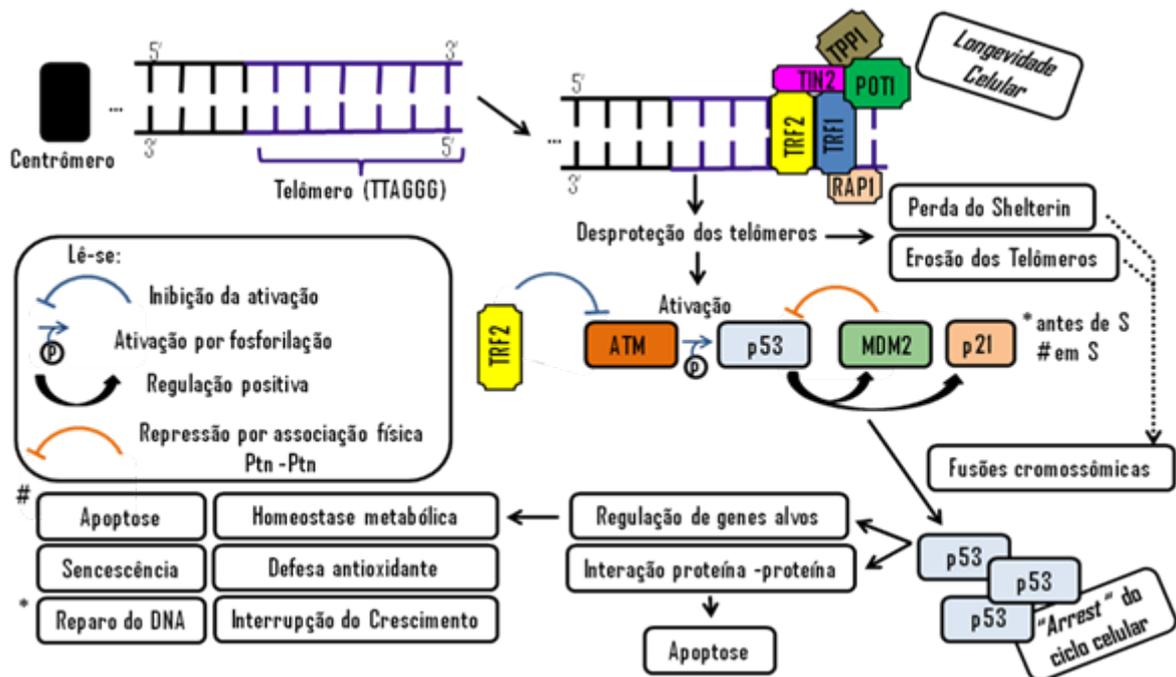
O encurtamento dos telômeros ou a perda da *shelterin* leva à indução da proteína *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) e consequente inativação da *Tumor protein 53* (Tp53), o que pode resultar em apoptose ou fusão de cromossomos (GALATI et al., 2015). Esses fatores não apenas regulam a proteção e o comprimento dos telômeros, mas também interagem com as proteínas de reparo do DNA (DE LANGE, 2005).

A inativação da proteína p53 interrompe a regulação do *feedback* do complexo TRF2-ATM-p53, promovendo o câncer de pulmão, por exemplo (HORIKAWA; FUJITA; HARRIS, 2011). A proteína p53, como supressor de tumor, participa da regulação do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA (VOUSDEN; LANE, 2007). No câncer, telômeros disfuncionais com grandes quantidades de TRF2 são suscetíveis à instabilidade cromossômica e o ponto de verificação para senescência é prejudicado (MUÑOZ; BLANCO; BLASCO, 2006).

De fato, a incidência e mortalidade da LPA são altas em pacientes onco-hematológicos (CARDOSO et al., 2018) e o aumento do risco de tumores sugere que ele é mediado pelo aumento da gravidade da doença e também pela idade (SOUBANI et al., 2014). Embora o envelhecimento contribua para o aumento da mortalidade pela LPA, o encurtamento do telômero está associado ao aumento do risco de prevalência da LPA (DEXHEIMER, 2013).

Os níveis de *TRF2* e a proteção dos telômeros estão sujeitos a modulações pela sinalização da MAP quinase, de tal forma que o crescimento celular pode requerer acoplamento a funções teloméricas dependentes de *TRF2* para assegurar uma divisão celular adequada (PICCO et al., 2016). A perda de *TRF2*, por exemplo, causa a ativação da resposta à lesão no DNA dependente de ATM, resultando no *arrest* do ciclo celular entre as fases G1/S mediada por p21 e baixa regulação pela ativação de p53 (DE LANGE, 2005), como visto na Figura 6.

Figura 6 – Representação esquemática para o desempenho de proteínas envolvidas na regulação telomérica e nos mecanismos de estabilidade genômica



Legenda: Estabilidade genômica e telomérica atuando interligadamente.

Nota: fase de síntese (S); telomeric repeat-binding factor (TRF), TRF1-interacting factor-2 (TIN2), protection of telômeros 1 (POT1), tripeptidyl-peptidase 1 (TPP1), ataxia telangiectasia mutated (ATM), tumor protein 53 (Tp53), protein 21 (p21), mouse double minute 2 homolog (MDM2), Repressor/activator protein 1 (RAP1).

Fonte: O autor, 2020.

O ciclo celular é dividido em intérfase e mitose, sendo o primeiro subdividido em *gap* zero (G0), *gap one* (G1), síntese (S) e *gap two* (G2) (GOLLOSHI et al., 2017). As células na sub-fase G1 apresentam intenso metabolismo, produzindo proteínas que controlam o ciclo celular (ciclina), bem como cinases dependentes de ciclina (CDK). As células nesta fase permanecem em estado de repouso temporário (G0) ou progridem para o ciclo celular (SATYANARAYANA; KADIS, 2009).

Na subfase S, há duplicação do material genético, aumento da produção de ATP, bem como aumento da expressão da ciclina, que são necessários para a progressão para a próxima fase (BESSON et al., 2008). Na subfase G2, existem pontos de verificação para preparar as células para a divisão e para que elas mantenham sua integridade genômica (KASTAN; BARTEK, 2004). Para minimizar as falhas ao longo das fases do ciclo celular, as células possuem os chamados pontos de controle (*checkpoints*), nos quais os eventos intracelulares são monitorados.

Esses checkpoints são inspecionados por proteínas que regulam e controlam o ciclo celular, determinando o momento para a divisão celular ou interrompendo a divisão

(MALUMBRES; BARBACID, 2009). Foi demonstrado que o controle dos *checkpoints* está associado à ativação de mecanismos de reparo de DNA (BRANZEI; FOIANI, 2008), controle de transcrição de genes (BARNUM; O'CONNEL, 2014), comprimento de telômeros (GOBBINI et al., 2014) e, em alguns casos, indução de morte celular por apoptose (PUCCI et al., 2000). Portanto, os *checkpoints* compreendem não apenas respostas ao dano celular, mas também à sobrevivência celular e à estabilidade genômica (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

O “*arrest*”, ou interrupção do ciclo celular mencionado anteriormente em resposta a lesões no DNA é um evento onde os *checkpoints* estão associados ao aumento da expressão do gene *Tp53* (TAYLOR; STARK, 2001). O *Tp53* foi inicialmente identificado como um gene supressor de tumores (LANE, 1992), no qual as proteínas regulam a expressão de muitos genes e participam de vias importantes, incluindo inibição do crescimento tumoral, promoção do reparo do DNA, apoptose, parada do ciclo celular e senescência (WHIBLEY et al., 2009).

Na subfase G1, o produto do gene *Tp53* (proteína p53) desencadeia um *checkpoint* que bloqueia a progressão do ciclo celular (VOUSDEN ; PRIVES, 2009) pela indução da síntese da proteína p21 (CHAN et al., 2000), permitindo que os danos no DNA sejam reparados antes que a célula entre na subfase S.

No entanto, se a célula já está comprometida com a divisão, esta proteína desencadeia a sinalização de apoptose por fragmentação de DNA nuclear (HE et al., 2009). Os polimorfismos no gene *Tp53* promovem a desregulamentação do ciclo celular, a instabilidade genômica e a proliferação celular (PIETSCH et al., 2006). Assim, quando o mecanismo de reparo do DNA falha, a célula continuará a se dividir com o seu DNA danificado, o que pode causar doenças, como tumores (NACCARATO et al., 2012), cuja perda da função do gene *Tp53* confere maior capacidade de multiplicação às células (BROSH; ROTTER, 2009).

Além do produto do gene *Tp53*, a serina/treonina cinase ATM, o produto do gene *ATM*, desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade do genoma (DERHEIMER; KASTAN, 2010). Os níveis e a localização da proteína ATM permanecem constantes ao longo de todas as fases do ciclo celular (SHILOH; ZIV, 2013).

Isso tem grande importância na cascata de sinalização após quebras duplas do DNA (SHILOH, 2003), por fosforilação (CHENG; CHEN, 2010), não apenas nos mecanismos de reparo do DNA, mas também nos *checkpoints* do ciclo celular por vias apoptóticas (BAKKENIIST; KASTAN, 2003). Outros autores também sugeriram a participação da proteína ATM na resposta celular ao estresse oxidativo (ALEXANDER et al., 2010).

As células deficientes em ATM não possuem *checkpoints* relacionados à verificação das fases G1 e G2, bem como não apresentam ativação do gene *Tp53* após exposição a agentes genotóxicos, sugerindo a importância da proteína ATM para estabilidade celular (SHACKELFORD et al., 2001). Isso demonstra a relação entre ATM e *Tp53*, já que a ATM controla a parada na sub-fase G1 ao regular a ativação/estabilização da proteína *Tp53* (CHENG; CHEN, 2010). A fosforilação da proteína *Tp53* pela proteína ATM e cinases a jusante da proteína ATM é um mecanismo importante para regular os níveis de proteína *Tp53* e sua atividade, embora a *Tp53* também possa ser ativada através de mecanismos independentes da ATM (LOMBARD et al., 2005). Por outro lado, foi demonstrado que a ativação da proteína *Tp53* poderia estimular ou reprimir a transcrição de genes coordenando uma série de vias (MEEK, 2004).

A proteína *Tp53* pode ser reprimida pelo produto do gene *Mouse double minute 2 homolog* (MDM2) (SHI; GU, 2012), devido à sua associação física entre as proteínas *Tp53* e MDM2 (HINDS et al., 1987), e/ou pela superexpressão da proteína MDM2 (SHI; GU, 2012), que é um mecanismo molecular pelo qual as células podem reprimir o gene *Tp53* para a transformação de células tumorais (OREN; ROTTER, 2010).

Estudos indicaram que a fosforilação MDM2 pela ATM altera o papel da MDM2 de um regulador negativo para um regulador positivo da *Tp53*, uma vez que isso aumenta a interação entre a MDM2 e o RNAm do *Tp53*, causando maior tradução do RNAm da proteína *Tp53* (GAJJAR et al., 2012; GANNON et al., 2012).

A *Tp53* atua como um supressor tumoral, participando de alguns processos celulares, como a regulação do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA (VOUSDEN; LANE, 2007).

A inativação da *Tp53* aborta a regulação de *feedback TRF2-ATM-p53* (HORIKAWA et al., 2011), como representado também na Figura 6 induzindo condições para indução de tumores, como a do câncer de pulmão. Nessas condições, os telômeros não funcionais com quantidades suprafisiológicas de *TRF2* são suscetíveis à instabilidade cromossômica e o ponto de verificação da senescência é prejudicada (MUÑOS et al., 2006).

Não há estudos que correlacionem o desenvolvimento de LPA diretamente com a estabilidade do DNA, mas após o início da doença, o dano ao DNA é comumente associado ao estresse oxidativo e pode ser usado como marcador diagnóstico. Além disso, não foi relatado se a LPA é induzida pela ausência, ou disfunção, de enzimas envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA, bem como na regulação de telômeros. No entanto, é possível supor que esses mecanismos desempenhem um papel fundamental na correção de danos no DNA, o que poderia contribuir para um melhor prognóstico.

1.6. Alvos terapêuticos

A LPA continua sendo uma causa de morbimortalidade em pacientes gravemente enfermos. Apesar de uma melhor compreensão da patogênese da LPA, o tratamento de suporte com estratégia de ventilação mecânica pulmonar protetora permanece como o único tratamento com perspectiva de melhora do prognóstico de pacientes com LPA. A maioria dos ensaios clínicos em LPA tem sido realizada com pacientes sob ventilação mecânica. Portanto, novas terapias são necessárias, com a busca de alvos terapêuticos, como novos antibióticos para o tratamento da sepse. As terapias que modulam os mecanismos de reparo do DNA podem contribuir para melhorar os pacientes com LPA ou SDRA.

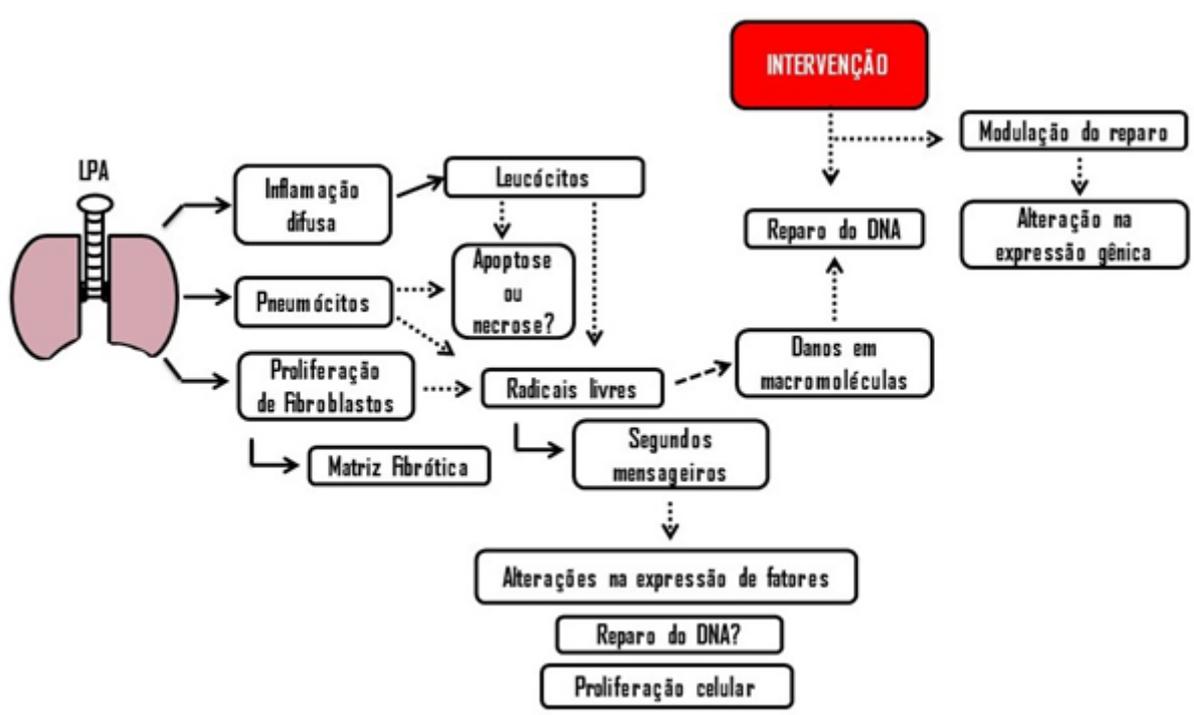
Lee et al. (2017) demonstraram o papel principal da proteína OGG1 na supressão de danos no DNA mitocondrial no tecido pulmonar lesionado por *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, Ye et al. (2017) relataram o papel do OGG1 nas condições de hiperóxida pulmonar na imunidade inata. Nessas condições, foi encontrada maior fragmentação do DNA pelo teste do cometa.

Animais deficientes em OGG-1 tiveram a resposta imunológica prejudicada, resultando em alto infiltrado de células polimorfonucleares nos pulmões e uma resposta inflamatória exacerbada. A OGG-1, neste modelo, interage com os produtos dos genes relacionados à autofagia por ligação molecular, que controla a translocação nuclear de NF-kB, levando a altos níveis de ROS e citocinas pró-inflamatórias, sugerindo como um novo alvo para intervenções clínicas.

A exposição ao oxigênio (hiperóxia) pode causar danos em bases nitrogenadas do DNA de células pulmonares e isso é consistente com os efeitos primários das ERO, demonstrando que agentes oxidantes inalados têm capacidade de alterar o genoma pulmonar (BARKER et al., 2006). Esses autores também relataram quebras na fita de DNA em uma pequena proporção de células pulmonares com exposição prolongada ao oxigênio, bem como efeitos da expressão da IL-6 nos danos no DNA, que modula as vias de morte celular e evita danos em curto prazo no tecido.

Novas estratégias para o tratamento da LPA são viáveis e avaliações dos mecanismos de reparo do DNA podem contribuir para melhorar o estado clínico no desenvolvimento da LPA como esquematizado na Figura 7. No entanto, são necessários estudos para avaliar a eficácia da modulação dessas vias de reparo do DNA na LPA.

Figura 7 – Representação esquemática da terapêutica no reparo do DNA como tratamento alternativo para lesão pulmonar aguda



Legenda: Lesão pulmonar aguda (LPA).

Nota: Pela exposição a microrganismos, o processo inflamatório instaura-se, os macrófagos identificam o lipopolissacarídeo e inicia a fagocitose, ativam-se os neutrófilos, que migram dos vasos sanguíneos para os alvéolos. A matriz extracelular é remodelada, e há extravasamento de hemáceas. No interior dos alvéolos, ocorre intensa produção de citocinas pro-inflamatórias, produção de radicais livres e proteases. Os radicais livres podem interagir com a molécula do DNA e lesioná-la. A possibilidade de intervenção nos mecanismos de reparo do DNA pode ser uma estratégia no tratamento da LPA. As linhas pontilhadas conotam uma tendência à algo, enquanto as linhas tracejadas conotam uma consequência.

Fonte: O autor, 2020.

1.7 Origem e desenvolvimento dos lasers

Antigas civilizações, como a Egípcia e a Grega, cultuavam a luz como Deus Sol, tal importância perpetuou até filósofos gregos, os quais usavam a luz para tratamento e prevenção de enfermidades. Hipócrates (460a.C.–377a.C.) defendia o uso da luz e da água como os geradores de saúde e 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 lesões de varíolas na pele de pessoas expostas ao Sol cicatrizavam rapidamente e permaneciam cobertas, direcionando estudos para a luz ultravioleta.

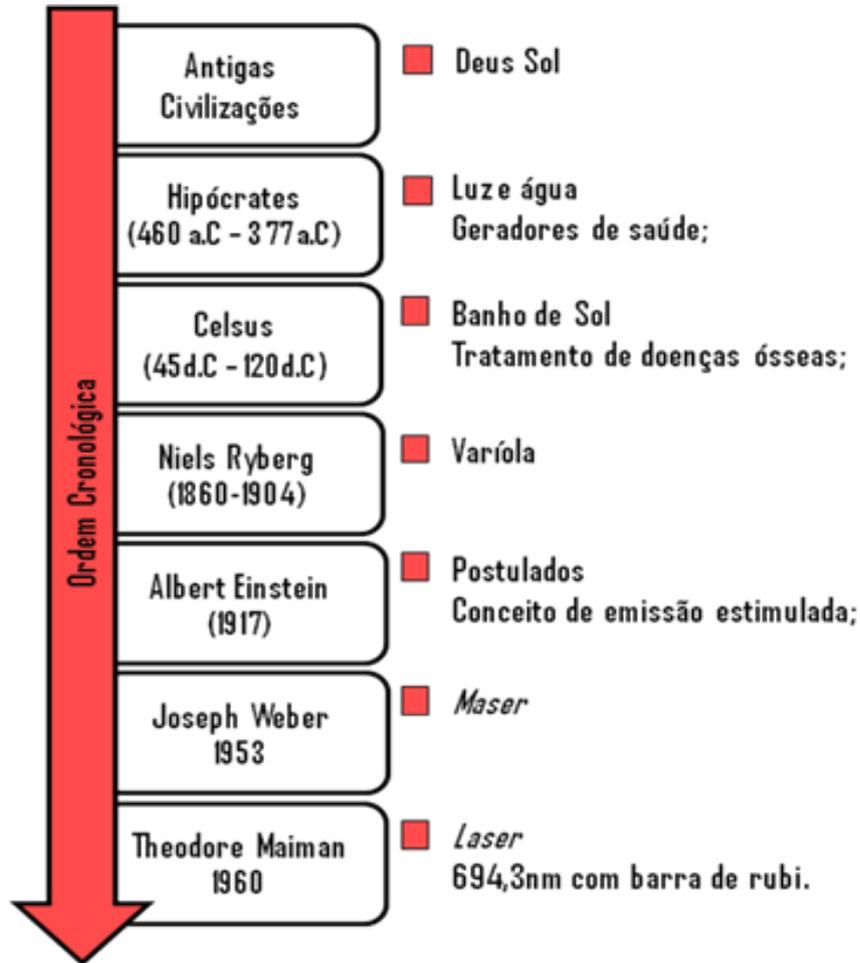
Nova perspectiva foi apresentada com os postulados de Albert Einstein em 1917, num artigo intitulado “*Zur Quantum Theories der Strahlung*”, abordavam os conceitos sobre emissão estimulada de luz. Estes postulados foram de grande importância para Townes et al., que em 1952, desenvolveram um equipamento emissor de radiação monocromática e coerente em feixes colimados e com alta densidade de energia.

O *Maser* ou “*(M)icrowave (A)mplification by (S)timulated (E)mission of (R)adiation* desenvolvido em 1953 por Joseph Weber era capaz de amplificar micro-ondas por estimulação emissão estimulada por radiação, e este equipamento foi a base para o desenvolvimento do *Laser*. Theodore Maiman direcionado pelos estudos de Weber, construiu em 1960 um equipamento *laser* composto de uma barra de cristal de rubi como meio emissor, capaz de emitir em 694,3 nm (BERTOLOTTI, 1983; PRENTICE, 2014), esta cronologia pode ser observada na Figura 8. 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 então União Soviética, juntos de Townes receberam o prêmio Nobel de Física pelos progressos no desenvolvimento dos *lasers*, fato esse que marca a União Soviética, depois, 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 apresentando características especiais (monocromática, coerente, colimada e de alta densidade de energia), tornando-o um instrumento de uso científico e tecnológico de grande importância.

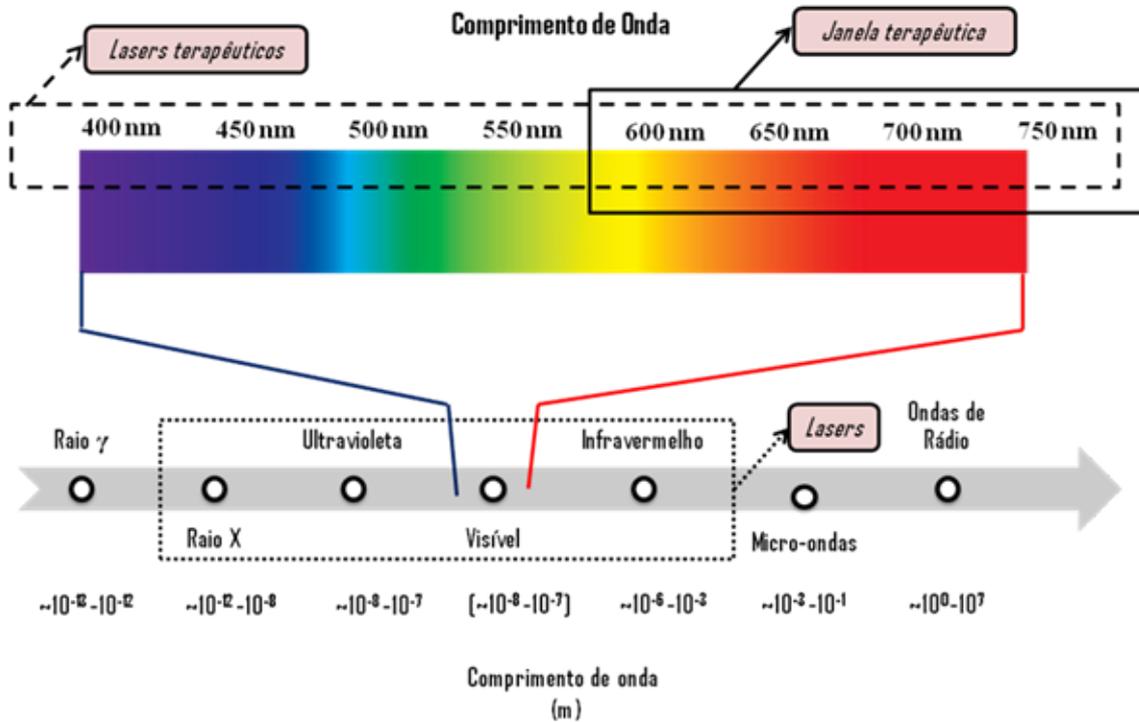
Figura 8 - Representação cronológica dos estudos sobre a luz até o desenvolvimento do *laser*



Fonte: O autor, 2020.

As ondas eletromagnéticas são organizadas de acordo com a frequência e o comprimento de onda. Essa organização é conhecida como espectro eletromagnético (Figura 9) (BAXTER et al., 1994), e nele as radiações emitidas pelos *lasers* terapêuticos de baixa potência se estendem da radiação ultravioleta à infravermelha próxima, em que a janela terapêutica está localizada em bandas espectrais extremamente estreitas entre ~600nm à 1000nm.

Figura 9 - Representação do espectro eletromagnético enfocando a janela terapêutica



Fonte: O autor, 2020.

1.7.1 Princípios e propriedades

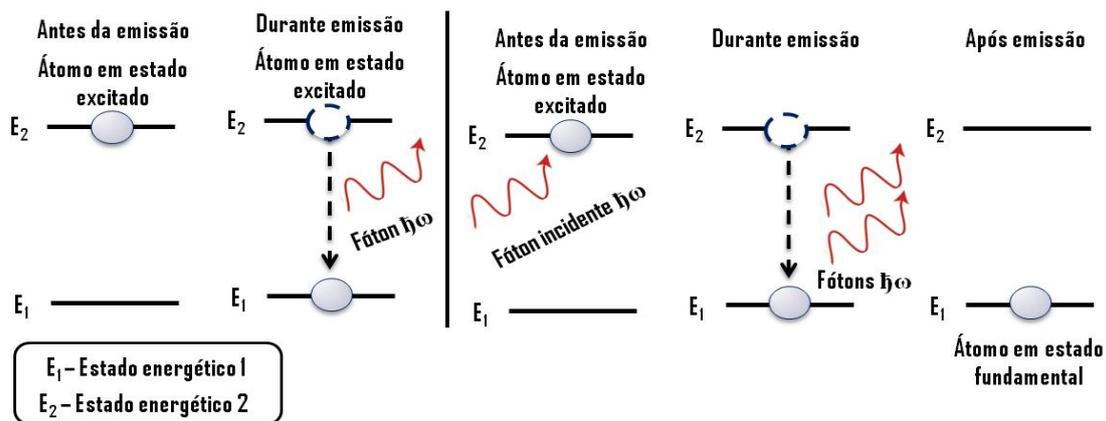
Um átomo em estado fundamental, tende a permanecer neste estado até que seja fornecida energia por uma fonte externa. A absorção de energia de uma fonte externa pode provocar saltos eletrônicos em sua eletrosfera. Se uma radiação (fótons) ressonante incide sobre a matéria que contenha átomos num estado 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 (Figura 10). Na emissão espontânea, ao realizar essa transição, o excesso de energia (obtida num processo de absorção de energia) pode ser devolvida ao meio 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 que é fundamental para o entendimento do funcionamento do *laser*, a emissão estimulada (BAGNATO, 2008).

Um agente externo (outro fóton) pode estimular o processo de emissão de radiação, de forma a causar um salto para um nível energético inferior (KARU, 1986). Assim, um fóton externo pode estimular o salto do elétron e este, ao passar para um nível de menor energia, emite um fóton que emerge do sistema (meio emissor ou meio ativo) juntamente com aquele que provocou a sua emissão (Figura 10).

Figura 10 - Esquema ilustrativo da emissão estimulada



Fonte: O autor, 2020.

Desse modo, na emissão estimulada, o fóton incidente e o fóton gerado, emergem do sistema juntos, com a mesma energia, propagando-se na mesma direção, podendo atingir outros átomos e causar novas emissões estimuladas. Dizemos a partir de então, que a emissão os tornam praticamente em fase e são indistinguíveis (BAGNATO, 2008). A emissão estimulada de radiação se torna possível a partir de um processo conhecido como inversão de população.

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 (do estado energético 1 para o estado energético 2, na Figura 10) dentro da cavidade óptica. Este processo é chamado de bombeamento. No caso do *laser* de rubi de Maiman, a 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.

A cavidade óptica, ou cavidade de ressonância, é formada por dois espelhos paralelos posicionados nas extremidades da cavidade óptica, entre os quais fica encerrado o meio emissor. Estes espelhos refletem os fótons emitidos pelo meio emissor, permitindo múltiplas

passagens de ida e volta através do meio ativo, amplificando o campo eletromagnético na cavidade e, portanto, a radiação emitida. Um dos espelhos, sendo semirreflexivo, semitransparente ou apresentando um orifício, permite a saída da radiação do sistema, formando um feixe de radiação único (YOUNG, 1998).

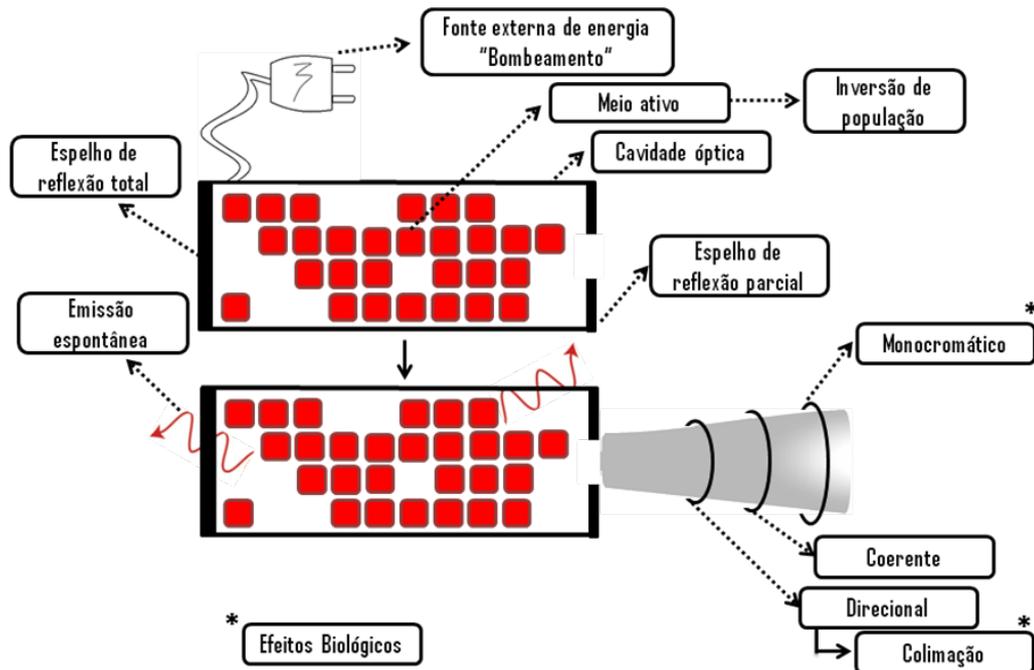
Assim, a radiação *laser* provém da emissão que ocorre quando átomos ou elétrons decaem (“saltam”) de seus níveis energéticos de forma estimulada, produzindo um feixe de radiação onde os fótons se comportam identicamente. Essa é a máxima quantidade de radiação que pode ser emitida por esse meio. Uma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

1.7.2 Constituição do equipamento

Um equipamento *laser* é constituído pelo um meio ativo, uma fonte de energia externa e uma cavidade ótica ou ressonador, como representado na Figura 11, onde o meio ativo pode ser encontrado nos três estados físicos da matéria (sólido, líquido ou gasoso) constituído por átomos que podem ser excitados e passem para níveis de energia superiores ao absorverem energia da fonte externa (RIBEIRO, 2000). Como exemplos de meios emissores podem ser citados:

- a) sólidos (cristais): óxidos de safira (Al_2O_3) e fluoretos (LiYF_4 - Tetrafluoreto de Ítrio e Lítio), são encontrados nos *lasers* de rubi, hólmio, neomídeo, 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.

Figura 11 - Esquema ilustrativo da constituição do equipamento *laser* e seu feixe



Nota: Neste o meio ativo, a fonte de energia e cavidade óptica compreendem a base para constituição do equipamento. No processo de emissão estimulada um elétron em um estado superior de energia é estimulado em uma transição por um fóton. O fóton resultante estimulado pelo primeiro é emitido com a mesma energia.

Fonte: O autor, 2020.

Há também os *lasers* de semiconductor, ou *lasers* de diodo, que utilizam junções semicondutoras do tipo p-n como meio ativo. Os *lasers* de semicondutores 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* (Arseniato de Gálio), *GaAsAl* (Arseniato de Gálio e Alumínio) e *InGaAs* (Arseniato de Gálio e Índio).

A fonte de energia externa, promove o bombeamento, possibilitando a inversão de população e transformando o meio em ativo, como um amplificador. O tipo de meio ativo determina o tipo de bombeamento necessário. Pode ser uma lâmpada flash ou até outro *laser* (bombeamento óptico); descargas elétricas (bombeamento eletrônico); reações químicas (bombeamento químico); e partículas pesadas ou radiações ionizantes ou térmicas (RIBEIRO, 2000).

1.7.3 Propriedades da radiação *laser* e diferenciação de equipamentos

Diferente das fontes ordinárias 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: alta colimação e coerência espacial e temporal (YOUNG, 1998).

Diferente de outras fontes luminosas, a radiação emitida pelos *lasers* (SCHAFFER et al., 2000 grifos nossos):

- a) é monocromática, ou seja, é constituída de fótons de mesmo comprimento de onda, consequentemente, apenas uma cor;
- b) possui coerência temporal (por ser monocromática) e espacial (presença de uma frente de onda de fase única), ou seja, quando a radiação é composta por ondas de mesmo comprimento de onda e possuem a mesma fase, propagam-se de forma similar no espaço e no tempo:
 - Espacial: é a medida da correlação da fase da onda luminosa em diferentes pontos na direção transversal a direção de propagação – ela nos diz quão uniforme é a fase da frente de onda. Ocorre devido às múltiplas reflexões entre os espelhos paralelos na cavidade óptica,
 - Temporal: é a medida da correlação da fase da onda luminosa em diferentes pontos ao longo da direção de propagação – ela nos diz quão monocromática é a fonte, logo as ondas têm a mesma fase em um determinado ponto, alcançado em dois instantes diferentes;
- c) a colimação é a característica em que o feixe cujo raios são quase paralelos, e portanto, espalhando-se lentamente à medida que tais se propagam, é obtida quanto o feixe resultante é constituído de ondas que se propagam na mesma direção com pouca dispersão entre os raios de luz produzidos pelo *laser*, sendo eles praticamente paralelos. Isso faz com que essa luz consiga propagar-se em grandes distâncias sem perder potência;
- d) alta densidade de energia ocorre devido à pequena divergência do feixe de fótons emitido, logo, em uma pequena área é depositada uma grande quantidade de energia;

- e) a potência pode ser extremamente grande, atingindo ordens de terawatt (10¹² Watts), ocorrendo em *lasers* pulsados, onde a energia acumulada em longo tempo é emitida toda em um intervalo de tempo muito pequeno, que pode ser 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, low level* ou *low power lasers*) apresentam efeitos biomoduladores e não térmicos em tecidos biológicos, enquanto os de alta energia (*hight intensity, high level* ou *high power lasers*) são capazes de cortar, coagular e vaporizar tecidos biológicos (NIEMZ, 2007).

Podem ser denominados de acordo com as substâncias que constituem o meio ativo, como o *laser* Hélio-Neônio (HeNe) e o de Dióxido de Carbono (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 da sua frequência. *Lasers* pulsados (*free-running mode*) têm uma largura temporal (tempo de pulso) da ordem de microssegundos a milissegundos.

1.7.4 Aplicações em saúde

Lasers de baixa potência emitem radiações sem potencial destrutivo e são utilizados para diversas aplicações em Odontologia, Fisioterapia, Estética, Medicina e Medicina Veterinária. A energia contida no feixe causará efeitos fotofísicos, fotoquímicos e/ou fotobiológicos nas células expostas, estimulando-as se as condições de irradiação (parâmetros físicos). Os efeitos causados pelas radiações emitidas por estes *lasers* se tornam mais visíveis em células debilitadas, ou seja, é dependente de parâmetros biológicos, ou seja, das condições dos tecidos ou das células expostas à radiação *laser* (KARU, 1989). Esses efeitos ocorrem

mediante absorção da radiação *laser* por moléculas endógenas (fotoceptores ou cromóforos), e não por geração de calor, pois não apresentam efeitos térmicos (LOPES, 2003).

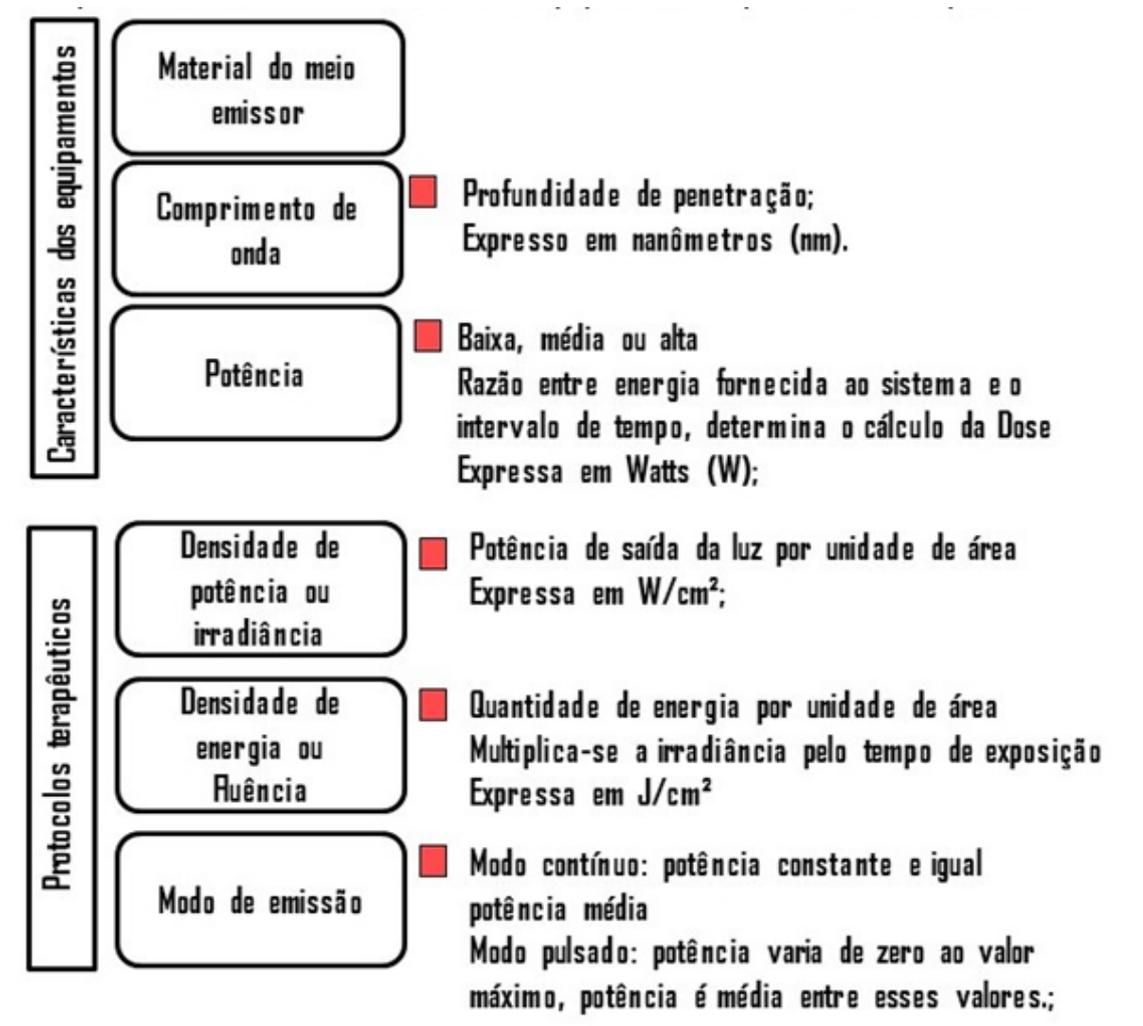
1.7.4.1 Parâmetros associados

A fim de alcançar resultados desejados, os parâmetros físicos do *laser* devem ser determinados, onde a escolha do comprimento de onda, densidade de energia (dose ou fluência), densidade de potência (irradiância), modo de emissão do *laser* e frequência do pulso (taxa de repetição), serão determinantes para o efeito terapêutico desejado. Em relação aos parâmetros associados à *laser*terapia resumidos na Figura 12, temos (KARU, 1986, LOPES, 2003, ENWEMEKA, 2009; 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 em mesmo tecido. Por regra geral, quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração da radiação, tal que uma radiação infravermelha de 808 nm apresenta maior penetração quando comparada à uma radiação vermelha de 660 nm em tecidos biológicos. Por esta razão, para o tratamento de lesões mais profundas, pode ser utilizada radiação emitida por *laser* infravermelho, uma vez que, os fótons são absorvidos principalmente em tecidos mais profundos. Entretanto, isso não significa que a radiação emitida por um *laser* infravermelho não será absorvida em tecidos mais superficiais. O comprimento de onda é definido como a distância entre dois máximos (cristas), ou mínimos (vales), consecutivos da onda. Este parâmetro é usualmente expresso em nanômetros (nm);
- b) a frequência é definida como o número de ciclos ou oscilações completas que passam por um ponto estacionário num determinado tempo estabelecido e é inversamente proporcional ao comprimento de onda no vácuo. Este parâmetro é expresso em Hertz (Hz);

- c) o período é o intervalo de tempo necessário para uma oscilação completa. O período é expresso em segundos (s);
- d) a energia radiante é a mensuração de energia da radiação eletromagnética visível e invisível e é expressa em Joules (J);
- e) a potência, ou potência radiante, tem sua importância no cálculo da dose de radiação a ser administrada. É a razão entre a energia fornecida ao sistema (ou trabalho realizado) e o 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. A potência é expressa em Watts (W);
- f) a densidade de potência (ou irradiância), definida como potência de saída da luz por unidade de área, é expressa em W/cm^2 ;
- g) a energia do fóton é o produto entre a frequência da radiação e a constante de Planck. É expressa em elétron-volt (eV) e Joule (J) são as unidades utilizadas para expressar a energia do fóton;
- h) 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 definida como a quantidade de energia por unidade de área. A fluência é expressa em J/cm^2 ;

Figura 12 – Resumo esquemático das características dos equipamentos e protocolos terapêuticos



Fonte: O autor, 2020.

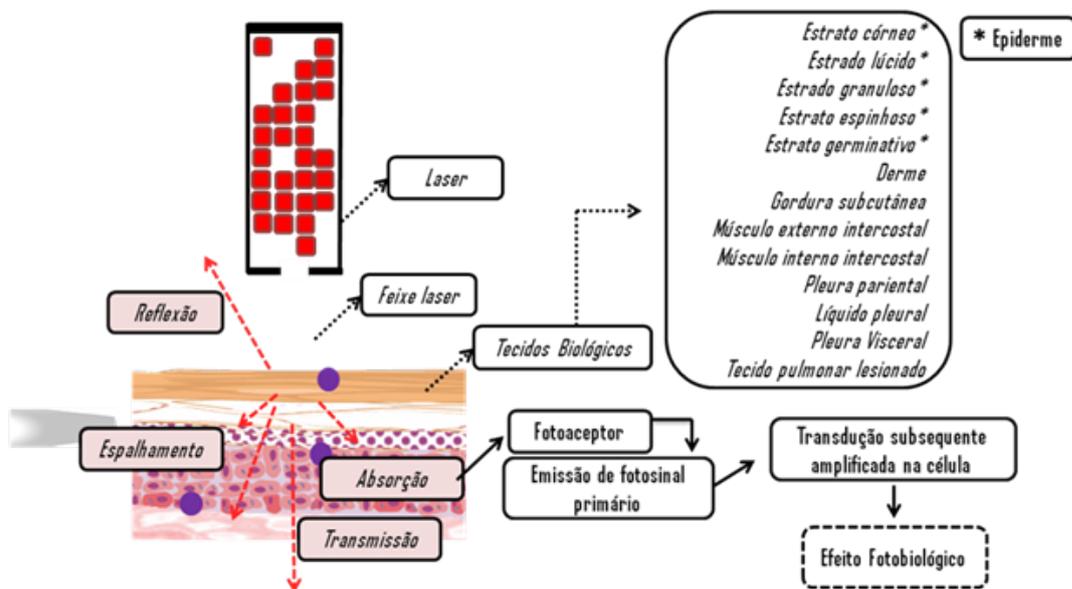
1.7.4.2 Interações das radiações emitidas por *lasers* de baixa potência com tecidos biológicos

As radiações emitidas por *lasers* de baixa potência interagem com os tecidos biológicos, que são meios absorvedores opticamente heterogêneos, tal característica se dá pela presença de diferentes moléculas ou partes de moléculas 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 a serem 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 para radiações no espectro infravermelho, a partir de 1150nm, e microondas), hemoglobina e melanina (com alta absorção para comprimentos de onda menores que 600nm), bem como moléculas intracelulares, como a citocromo c oxidase. A energia absorvida da radiação por estas moléculas (fotoceptores) 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 constitui a radiação transmitida. Assim, reflexão, absorção, espalhamento e a transmissão são os fenômenos ópticos que ocorrem quando a radiação *laser* incide em um tecido biológico (Figura 13) (GARCEZ et al., 2012).

Figura 13 - Esquema ilustrativo da interação *laser*-tecido e as diversas camadas até o tecido pulmonar lesionado



Fonte: O autor, 2020.

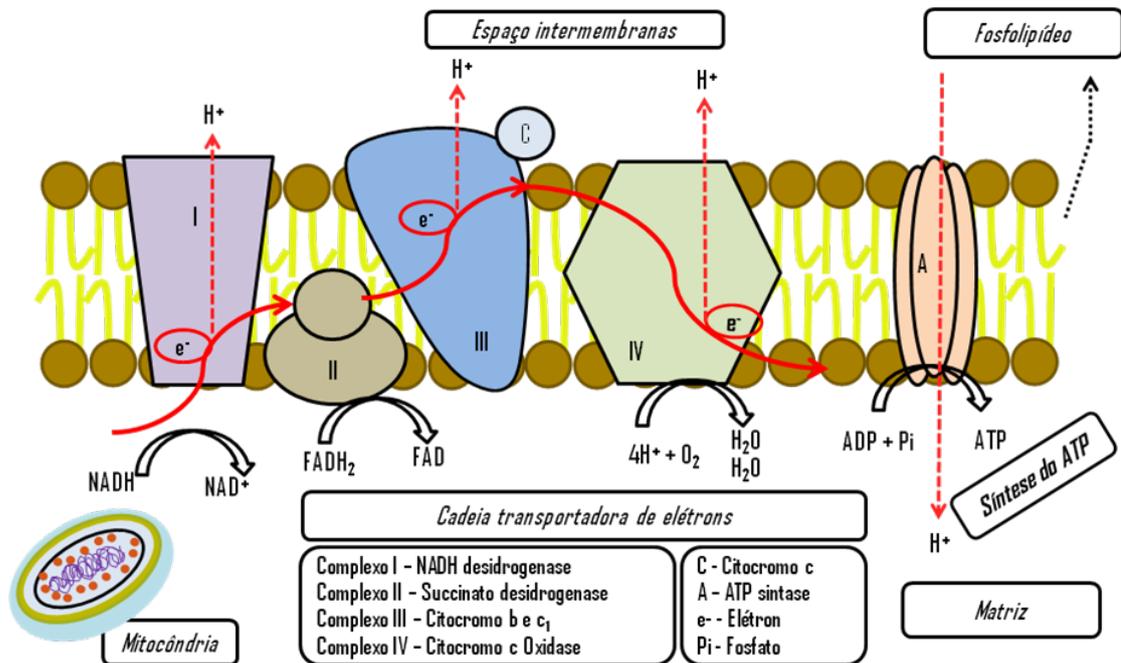
1.7.4.3 O papel dos fotoceptores

Devido às baixas densidades de energia utilizadas e a sua capacidade de penetração em tecidos biológicos, os *lasers* foram introduzidos em protocolos terapêuticos, contudo os mecanismos de ação ainda não foram totalmente compreendidos. Estudos indicam a existência de três mecanismos sequenciais para os *lasers* de baixa potência, e estes estão relacionados ao conceito de fotobiomodulação ou fotobioestimulação.

O termo fotobioestimulação refere-se aos efeitos estimulatórios capazes de modular processos metabólicos no interior das células (GARCEZ et al., 2008, 2012). Trabalho publicado por Karu (1999) sugerem e propõe que os efeitos biológicos são gerados a partir da absorção da energia da radiação *laser* por fotoceptores presentes na membrana das mitocôndrias, que ao absorver a energia, promove o aumento da síntese de ATP (adenosina trifosfato), culminando no aumento da produção de radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio (*ROS*), e estes atuam como sinalizadores intracelulares (LEONARDUZZI et al., 2011), base do mecanismo primário.

Um dos principais fotoceptores, a citocromo c oxidase ou complexo IV, é localizada na cadeia transportadora de elétrons, e nela atua acelerando a transferência de quatro elétrons para o oxigênio molecular. Ao realizar o transporte de elétrons, aumenta a produção de adenosina trifosfato (ATP) pela ATP-sintase (GARCEZ et al., 2008), como na Figura 14.

Figura 14 - Esquema ilustrativo simplificado da cadeia transportadora de elétrons

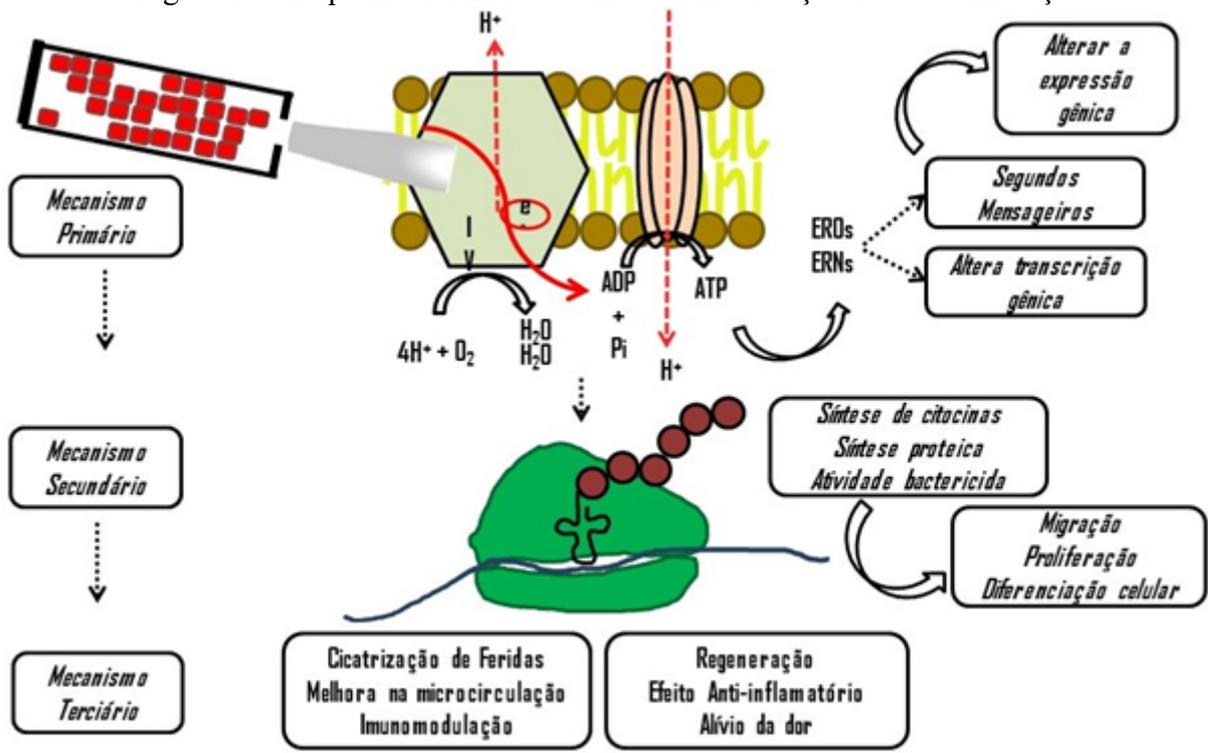


Fonte: Adaptado de KANEHISA LABORATORIES, 2020.

1.7.4.4 Mecanismos de ação

Garcez et al. (2012) sugeriram que a absorção da radiação por fotoceptores leva ao aumento da síntese de proteínas e citocinas, que estimula a 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, esquematizado na Figura 15.

Figura 15 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da bioestimulação



Fonte: Adaptado de KANEHISA LABORATORIES, 2020.

Como consequência do mecanismo secundário, ocorre 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 fotoceptor 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).

1.7.4.5 Efeitos terapêuticos

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.

O potencial terapêutico dos *lasers* de baixa potência tem sido descrito, em diferentes aplicações na odontologia, medicina (dermatologia e reumatologia, por exemplo), enfermagem (tratamento de feridas), biomedicina (estética) e fisioterapia, devido ao efeito analgésico, antiedematoso e anti-inflamatório (HUANG; HAMBLIN, 2012). Entretanto, os resultados atualmente disponíveis são por vezes conflitantes.

O efeito analgésico estaria relacionado ao aumento da concentração de β -endorfina no líquido cefalorraquidiano. Esse peptídeo é um fator analgésico endógeno que modula a dor no sistema nervoso central (GARCEZ et al., 2012), não somente como evitando a redução do limiar de excitabilidade dos nociceptores através da redução na síntese de prostaglandinas e redução da ação da bradicinina. Já o efeito antiedematoso ocorre devido ao estímulo à microcirculação, proporcionando melhores condições de drenagem do plasma extravasado e a ação fibrinolítica, proporcionando resolução efetiva do coágulo (GARCEZ et al., 2012).

O aumento na produção de ATP leva a um aumento da atividade mitótica e aumento da síntese de proteínas, e como consequência o aumento da regeneração tecidual, facilitando a multiplicação de células e a formação de novos vasos a partir dos pré-existentes.

O efeito anti-inflamatório é atribuído ao bloqueio ou inibição da via de NF-kB (CHEN et al., 2011). Este fator regula a expressão de uma série de genes, dentre eles, os relacionados a modulação da inflamação, estresse e sobrevivência celular (CHEN et al., 2011). A ação do *laser* sobre neutrófilos se dá pelo aumento da atividade respiratória mitocondrial e da expressão de iNOS (MORGAN; RASHID, 2009), também ao aumento da apoptose de polimorfonucleares (HEMVANI et al., 2005).

Boschi et al. (2008) demonstraram que a exposição a *laser* de baixa potência modula IL-6, IL-10, além da óxido nítrico em modelo de inflamação da pleura.

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), promovendo cicatrização de feridas, reparo de tecidos (RODRIGUES, 2001; PELOW et al., 2010) e a prevenção da morte tecidual, no alívio da inflamação e do edema por causa de lesões ou doenças crônicas; e no tratamento para problemas neurológicos. 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 dos *lasers* de baixa potência terem maior potencial para aplicações clínicas, seus efeitos biológicos necessitam ainda de estudos para que sejam melhor compreendidos e que suas aplicações clínicas possam ser mais eficazes e seguras.

1.8 Ação do *laser* nos mecanismos de reparo do DNA e integridade genômica

1.8.1 LBP e reparo por excisão de base

Estudos têm demonstrado que LBP afeta REB em células procariotas, assim, os dados experimentais obtidos a partir de culturas de *Escherichia coli* (*E. coli*) proficientes ou deficientes nos mecanismos de reparo do DNA foram utilizados para avaliar os efeitos induzidos pelos *lasers* nestes mecanismos (KOHLI et al., 2001; KOHLI; GUPTA, 2003; TEIXEIRA et al., 2014; BARBOZA et al., 2015).

Barbosa et al. (2015) verificaram que os *lasers* vermelhos e infravermelhos em alta fluência (250, 500 e 1000 J/cm²) são letais, induzindo filamentação em células bacterianas, que é uma das chamadas respostas SOS relacionadas ao reparo do DNA, alterando a morfologia celular em culturas de cepa selvagem de *E. coli* (AB1157), deficientes em endonuclease III (JW1625-1) e deficientes em endonuclease IV (JW2146-1).

Culturas de *E. coli* BW9091 (deficiente em exonuclease III), BH20 (deficiente em formamidopirimidina DNA glicosilase/proteína MutM), BW375 (deficiente em endonuclease III) e BW527 (deficiente em endonuclease IV) foram utilizadas para avaliar os efeitos do *laser* vermelho e infravermelho na sobrevivência e no fenótipo filamentoso. Roos et al. (2013) demonstraram que a exposição ao *laser* vermelho (658 nm) de baixa potência em baixas fluências (1 e 8 J/cm²) é capaz de induzir o fenótipo filamentoso em *E. coli* AB1157 e BW9091.

No entanto, culturas de *E. coli* BW9091 apresentaram altas porcentagens de filamentação em comparação com culturas de cepas do tipo selvagem, sugerindo que genes não funcionais relacionados ao reparo do DNA podem ser importantes para os efeitos induzidos pelo *laser*.

Outro estudo com culturas de *E. coli* AB1157, BW9091, BH20 e BW375 demonstraram que o *laser* vermelho (660 nm) em fluências mais altas (25 e 45 J/cm²) diminui a

sobrevivência em culturas de *E. coli* deficiente em endonucleases III, bem como induz fenótipo filamentosos (MARCIANO et al., 2012). No entanto, Sergio et al. (2013), observaram que o *laser* vermelho de baixa potência (658 nm) não tem efeito sobre a sobrevivência em culturas de *E. coli*, apesar de induzir o fenótipo de filamentação e induzir lesões no DNA reconhecidas pela exonuclease III. Ainda, em culturas de *E. coli* AB1157, BW9091 e BH20 irradiadas com *laser* infravermelho (808 nm, 60 e 120 J/cm²), observou-se que este *laser* altera a sobrevivência de *E. coli* do tipo selvagem e induz o fenômeno da filamentação em células bacterianas, dependendo das condições de cultura celular e das vias de reparo do DNA, além de induzir lesões de DNA. Quebras simples ou dupla da cadeia de DNA, sítios álcali-lábeis, que não são alvos da exonuclease III ou da formamidopirimidina DNA glicosilase/proteína MutM (CANUTO et al., 2013).

Teixeira et al. (2014) observaram efeitos sub-letais em culturas de *E. coli* AB1157, BW9091, BH20 e BW375 irradiadas com *laser* infravermelho de baixa potência (808 nm, 100 mW, 40 e 60 J/cm²). Reforçando esses resultados, Fonseca et al. (2012) observaram-se que o *laser* infravermelho de baixa potência (10 mW, 830 nm) em baixas fluências (1, 4 e 8 J/cm²), em modos de emissão de onda contínua e pulsada (2,5, 250 e 2500 Hz), diminui a sobrevivência bacteriana em nível sub-letal em culturas de *E. coli* AB1157, BW9091 e BH20.

Em outro estudo, culturas de *E. coli* AB1157, BW375 e BW9091 foram irradiadas com *laser* infravermelho (830nm) em diferentes fluências (1, 4 e 8 J/cm², 10 mW) em modos de emissão contínuo e pulsado (2,5, 250 e 2500 Hz). Os resultados mostraram que o *laser* infravermelho induz a filamentação bacteriana em culturas dessas cepas de *E. coli*, tanto na fase exponencial, como na fase estacionária de crescimento (FONSECA et al., 2011).

Os efeitos bioestimuladores do *laser* de baixa potência também foram descritos em culturas de células eucarióticas. Em mioblastos em condições normais (10% de soro bovino fetal) e sob uma condição de estresse (2% de soro bovino fetal) irradiado com *laser* infravermelho (808 nm, 100 mw, 10 J/cm², 35 J/cm² e 70 J/cm²), observou-se que o *laser* infravermelho altera os níveis de RNAm dos genes APE1 e *OGGI* (TRAJANO et al., 2016b).

APE2 codifica uma enzima com sequência homóloga à proteína codificada pelo APE1, que foi identificada como uma endonuclease AP alternativa (ANDRES et al., 2015). Embora a atividade de endonuclease da APE2 seja muito menor do que a atividade da APE1, sua atividade de exonuclease 3'-5' é forte em comparação com o APE1. Observou-se também que a APE2 interage com a PCNA e pode recrutar polimerases de translesão propensas a erros (WILLIS et al., 2013). Fonseca et al. (2014) observaram que o *laser* infravermelho (830 nm)

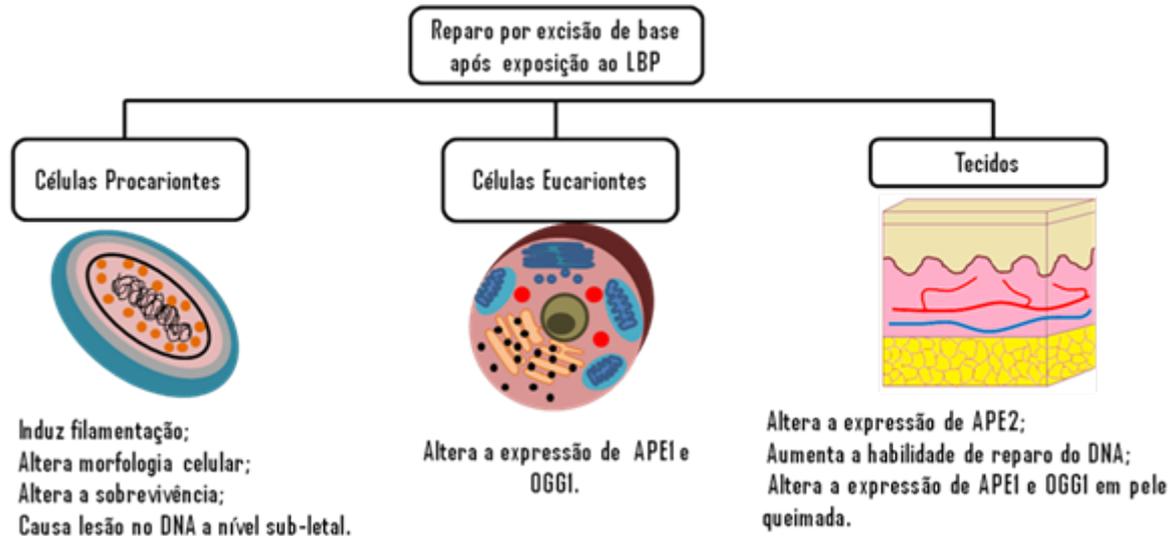
altera os níveis de RNAm do gene APE2 na pele e no tecido muscular de ratos *Wistar* 1 e 24 horas após a irradiação nas fluências de 5 e 10 J/cm².

Outro estudo mostrou que *laser* infravermelho de baixa potência (830 nm; 10 mW; 1, 5 e 10 J/cm²) tem diferentes efeitos no reparo de lesões de DNA na pele e nos tecidos musculares. No tecido muscular, o *laser* de baixa potência poderia aumentar a capacidade de reparo do DNA e, na pele, poderia ter efeitos em fluências específicas (5 J/cm², por exemplo) (FONSECA et al., 2013).

Na pele queimada, o *laser* vermelho (660 nm) de baixa potência (100 mW) reduz os níveis de RNAm da APE1 e aumenta os níveis de RNAm da *OGG1*, sugerindo que a alteração dos níveis de RNAm da APE1 ocorre devido à ativação de uma via de reparo dependente de *OGG1* (TRAJANO et al., 2014).

Os resultados publicados até o momento mostraram que o *laser* de baixa potência também influencia a sobrevivência e a filamentação de *Escherichia coli* e altera a expressão de genes envolvendo o REB em células e tecidos (Figura 16). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que parte do efeito da fotobioestimulação induzido por *laser* de baixa potência está relacionada à modulação do reparo de lesões oxidativas no DNA pelo mecanismo REB.

Figura 16 – Representação esquemática para REB após a exposição ao LBP



Legenda: *laser* de baixa potência (LBP); *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and 2* (APE1 e APE2), *8-oxoguanine DNA glycosylase-1* (OGG1).

Fonte: adaptada de TRAJANO et al., 2018.

1.8.2 LPB e reparo por excisão de nucleotídeo

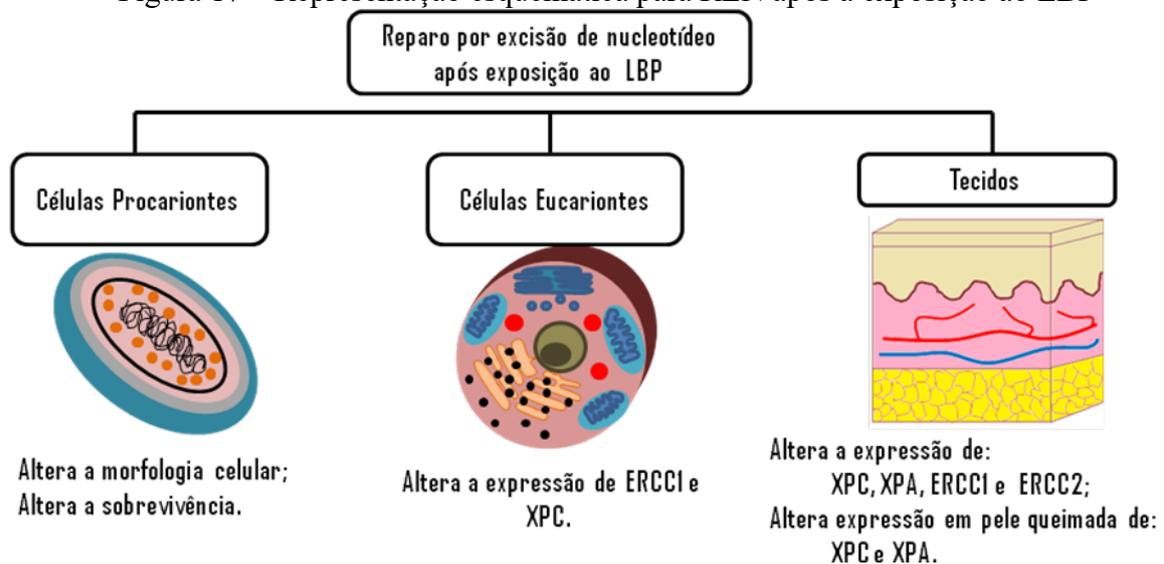
O REN em *E. coli* compreende três proteínas (uvrA, uvrB e uvrC), que possuem funções de reconhecimento, clivagem, endonuclease e remoção de fragmentos contendo bases danificadas (SELBY, 2017). Estudos realizados para avaliar os efeitos do *laser* no NER em culturas *E. coli* AB1886 (deficientes em proteínas UvrA) mostraram que o *laser* infravermelho de baixa potência (830 nm) reduz a sobrevivência celular em culturas desta cepa (FONSECA et al., 2012) dependendo da fluência e do modo de emissão do *laser* (FONSECA et al., 2015a).

Em culturas de mioblastos, o *laser* infravermelho (880 nm) altera os níveis de RNAm de genes relacionados com o REN (*ERCCI* e *XPC*) em células normais e em condição de estresse (TRAJANO et al., 2016a). Na pele e tecido muscular de ratos *Wistar*, os níveis de RNAm dos genes *XPA* e *XPC* são alterados após a exposição a *lasers* vermelhos (660nm) e infravermelho (808 nm) de baixa potência.

Os efeitos causados por estes *lasers* dependem de parâmetros biológicos (tecido, por exemplo) e de parâmetros físicos (fluência e comprimento de onda, por exemplo) (FONSECA et al., 2015a).

Sergio et al. (2016) relataram alterações dos níveis de RNAm dos genes *ERCC1* e *ERCC2* nesses tecidos de ratos *Wistar* expostos a *lasers* vermelho e infravermelho e sugeriram que esse efeito poderia contribuir para a estabilidade do genoma e a homeostase de tecidos biológicos afetados por doenças. Além disso, a exposição ao *laser* vermelho (660 nm) altera os níveis de RNAm dos genes *XPC* e *XPA* na pele queimada de ratos *Wistar* (TRAJANO et al., 2014). Esses resultados reforçam que a modulação do reparo de lesões oxidativas do DNA através do NER pode ser parte da fotobiomodulação induzida por *lasers* de baixa potência (Figura 17).

Figura 17 – Representação esquemática para REN após a exposição ao LBP



Legenda: *laser* de baixa potência (LBP); *Excision repair cross complementation 1 and 2* (*ERCC1* e *ERCC2*), *xeroderma pigmentosum group C* (*XPC*) e *xeroderma pigmentosum group A* (*XPA*).

Fonte: adaptada de TRAJANO et al., 2018.

1.8.3 Laser: integridade genômica e regulação de telômeros.

A manutenção da estabilidade genômica é necessária para preservar o material genético durante a divisão celular. Este processo apresenta pontos críticos, nos quais o genoma pode ser submetido a agentes endógenos e exógenos, que são capazes de causar danos ao DNA e interromper o ciclo celular (ZHAO et al., 2017).

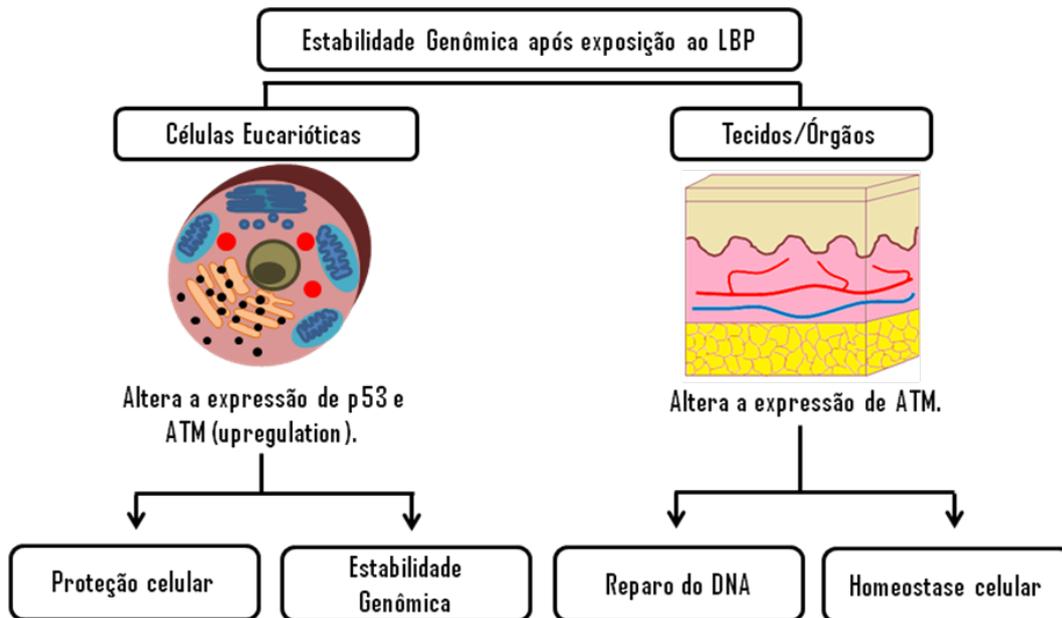
A estabilidade genômica, pelo controle dos pontos de controle do ciclo celular, é de extrema importância para a manutenção do material genético, segregação cromossômica, coordenação da diferenciação celular, senescência e morte celular (BRANDMAJER et al.,

2017). Mau funcionamento do ponto de controle e mudanças no ciclo celular podem causar mutações e aberrações cromossômicas favorecendo o desenvolvimento de doenças, como o câncer (MALUMBRES ; BARBACID, 2009).

Trajano et al. (2016) relataram que mioblastos apresentam níveis aumentados de RNAm dos genes ATM e *Tp53* após a exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência. De fato, a ativação da *Tp53* por mecanismos de transcrição interrompe o ciclo celular ou induz apoptose, regulando os pontos de controle G1/S e G2/M (LAVIN; GUEVEN, 2006). O ponto de controle G1/S também é regulado pela proteína ATM pela fosforilação da *Tp53*, causando a regulação de genes alvo, como p21. Esta regulação por fosforilação reduz a capacidade da proteína *Tp53* em regular positivamente a proteína MDM2, estabilizando e aumentando sua atividade (TEUFEL et al., 2009), interrompendo o ciclo celular em G1/S ou G2/M fase (LOMBARD et al., 2005).

O aumento dos níveis de RNAm dos genes ATM e *Tp53* sugere que a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência protege mioblastos através da indução de mecanismos de reparo do DNA, que podem ser parte do efeito da fotobiomodulação. No entanto, na pele e nos tecidos musculares, o RNAm do gene *Tp53* não é alterado após a exposição a *lasers* vermelho (660nm) e infravermelho (808nm) de baixa potência ,mas os níveis de RNAm do gene ATM aumentam em músculo esquelético exposto a estes *lasers* (GUEDES et al., 2017). Esses resultados indicam que a exposição a *lasers* vermelhos e infravermelhos de baixa potência não induzem vias apoptóticas por alteração dos níveis de RNAm do gene *Tp53*. No entanto, isso poderia indicar a ativação de mecanismos de reparo do DNA, que poderiam ser parte do efeito da bioestimulação induzido por *laser* (Figura 18).

Figura 18 – Representação esquemática para o laser na estabilidade genômica

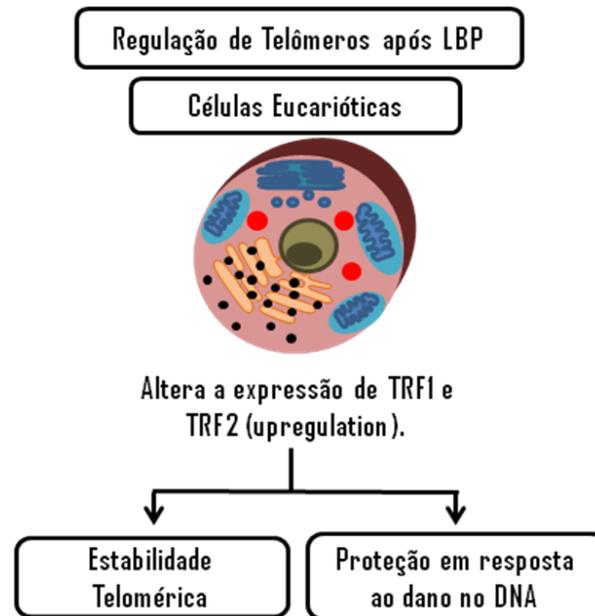


Legenda: *laser* de baixa potência (LBP), *protein 53* (p53) e *ataxia telangiectasia-mutated* (ATM).
 Fonte: adaptada de TRAJANO et al., 2018.

A estabilidade genômica é necessária para a homeostase celular e pode ser um componente importante da fotobioestimulação induzida por *lasers* de baixa potência na cicatrização de feridas, por exemplo. Estudos demonstraram que as lesões no DNA causam instabilidade genômica, bem como o encurtamento de telômeros (SHAMMAS, 2011), estas regiões nas extremidades cromossômicas, estão relacionadas à proteção de telômeros e à longevidade celular (SHAY; WRIGHT, 2011).

Poucos estudos avaliaram a modulação de genes envolvidos na estabilidade genômica e na regulação telomérica por *laser* de baixa potência. Um estudo recente mostrou que culturas de mioblastos em condições normais e estressantes (10% de soro bovino fetal) expostas ao *laser* infravermelho (808nm) de baixa potência apresentam níveis aumentados de RNAm do *TRF2* e induz a expressão do *TRF1* (TRAJANO et al., 2016). Esse efeito sugere que o *laser* de baixa potência modula a estabilidade dos telômeros, já que os genes *TRF2* e *TRF1* estão associados ao envelhecimento celular (HIYAMA; HIYAMA, 2007) e proteção contra danos no DNA (AUGUSTINE et al., 2017). Assim, a proteção das células contra o encurtamento de telômeros poderia ser parte da fotobioestimulação, que é considerado a base para aplicações terapêuticas do *laser* de baixa potência (Figura 19).

Figura 19 - Representação esquemática para o efeito do *laser* na regulação de telômeros



Legenda: *laser* de baixa potência (LBP), *Telomeric Repeat Factor 1* (TRF1) e *Telomeric Repeat Factor 2* (TRF2).

Fonte: adaptada de TRAJANO et al., 2018.

Faz-se necessário o contínuo entendimento das respostas celulares e moleculares utilizando terapias com *lasers* de baixa potência, bem como suas diferentes aplicações terapêuticas, uma vez que ainda há dúvidas sobre os efeitos desses *lasers*, e dessa forma, uma dosimetria adequada pode melhorar a segurança e eficácia das aplicações clínicas destes equipamentos em diferentes doenças.

O reparo do DNA e estabilidade genômica são cruciais para as funções celulares normais, bem como é uma estratégia de sobrevivência sob condições fisiológicas e patológicas. Há um potencial no uso dos *lasers* de baixa potência no tratamento da LPA, uma vez que há necessidade de novas terapias eficazes afim de contribuir para um bom prognóstico na LPA. Sendo assim, a sobrevivência das células pulmonares na LPA poderia ser aumentada, uma vez que LBP pode modular os genes relacionados aos mecanismos de reparo do DNA e estabilidade genômica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do *laser* infravermelho de baixa potência no processo inflamatório pulmonar agudo induzido por LPS (lipopolissacarídeo), utilizando fluências sugeridas em protocolos terapêuticos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar efeitos da exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência (808 nm) no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da lesão pulmonar aguda, onde no:

- a) Estudo 1: avaliar os efeitos da exposição a *laser* infravermelho de baixa potência no alvéolo e interalveolar septos de ratos *Wistar* afetados pela LPA induzida por sepse, pela administração de LPS;
- b) Estudo 2: avaliar os níveis de RNAm dos genes *OGG1*, *APEX1*, *ERCC2* e *ERCC1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* afetados pela LPA em resposta a sepse pela administração de LPS e após exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em diferentes fluências;
- c) Estudo 3: avaliar a efeitos da fotobiomodulação nos níveis relativos do mRNA de *caspase-3* e *Bcl-2*, bem como a fragmentação do DNA das células alveolares e do infiltrado inflamatórios de ratos *Wistar* afetados pela LPA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento da lesão pulmonar aguda e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência.

3.1.1 Reagentes

Foram utilizados o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich, EUA), NaCl (cloreto de sódio), CH₂O (formaldeído - (0,01M, pH 7,4) e Hematoxilina e Eosina adquiridos da Vetec (Brasil), TRIZOL (EUA) e Entellan da Roche (Alemanha).

3.1.2 Animais

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Vinte e quatro ratos *Wistar* machos adultos (pesando $285,0 \pm 22,9$ g) foram obtidos do Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO (Brasil). Durante o desenvolvimento, os animais receberam ração e água *a libitum*. Cinco animais por grupo foram alojados em caixas de polietileno com tampas de arame de aço inoxidável e aparas de pinheiro como cama. Adicionalmente, os animais foram mantidos em ambiente com condições ambientais controladas (12h de luz/12h de ciclo escuro, temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade federal de Juiz de Fora (UFJF), protocolo número 012/2016 (APÊNDICE A).

3.1.3 Parâmetros de irradiação

Foi utilizado equipamento *laser* terapêutico infravermelho de baixa potência (Photon Lase III), adquirido da D.M.C. equipamentos Ltda (São Paulo, Brasil). As condições de irradiação estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros do *laser* de baixa potência

Comprimento de onda (nm)	808
<i>Laser</i> diodo	AsGaAl
Potência (mW)	100
Spot size (cm ²)	0,028
Densidade de potência (W/cm ²)	3,571
Energia por ponto (J)	1
Densidade de energia ou Fluência (J/cm ²)	10 e 20
Tempo de exposição por ponto (s)	2 e 5
Número de pontos por pulmão	4
Técnica de aplicação	Pontual sobre a pele
Números de sessões	1

Fonte: o autor, 2020.

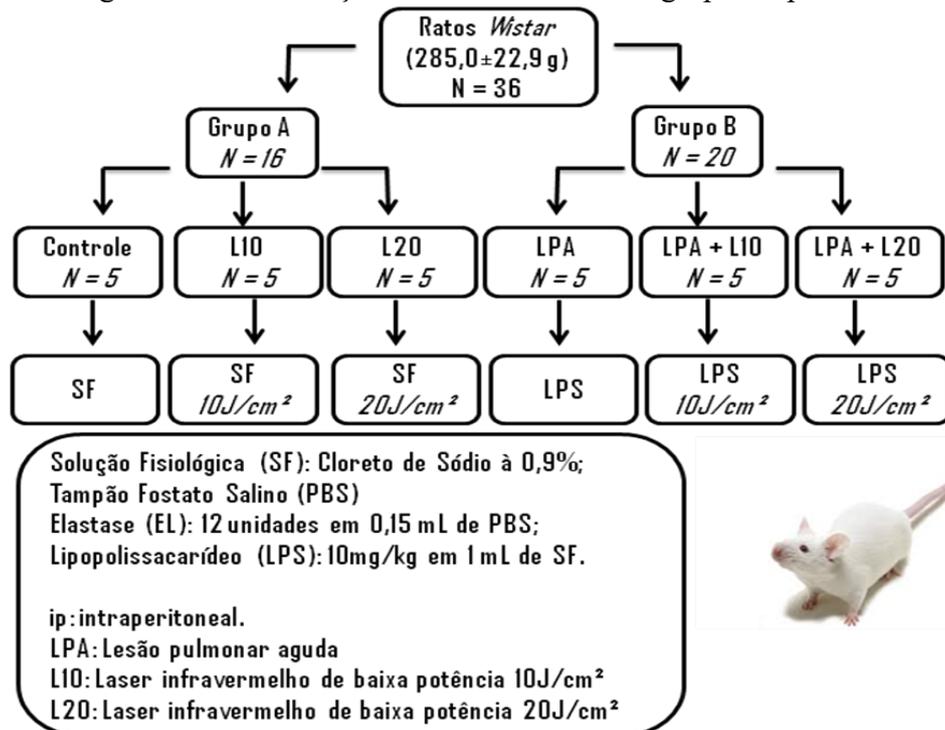
3.1.4 Procedimento experimental

A indução da LPA foi realizada segundo protocolo de Kabir et al. (2002) através de administração intraperitonela de LPS (10mg/kg, em solução NaCl a 0,9%). animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos (n=5, para cada grupo) (Figura 20):

- a) Grupo 1 - Controle: animais tratados com solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%);
- b) Grupo 2 - LPA : animais tratados com LPS (10mg/kg);

- c) Grupo 3 - L10: animais tratados com solução salina fisiológica e, após quatro horas, foram anestesiados e expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 10J/cm²;
- d) Grupo 4 - L20: animais tratados com solução salina fisiológica e, após quatro horas, foram anestesiados e expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 20J/cm²;
- e) Grupo 5 - LPA-L10: animais tratados com LPS (10mg/kg) e, após quatro horas, foram anestesiados e expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 10J/cm²;
- f) Grupo 6 - LPA-L20: animais tratados com LPS (10mg/kg) e, após quatro horas, foram anestesiados e expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 20J/cm².

Figura 20 - Distribuição dos animais entre os grupos experimentais



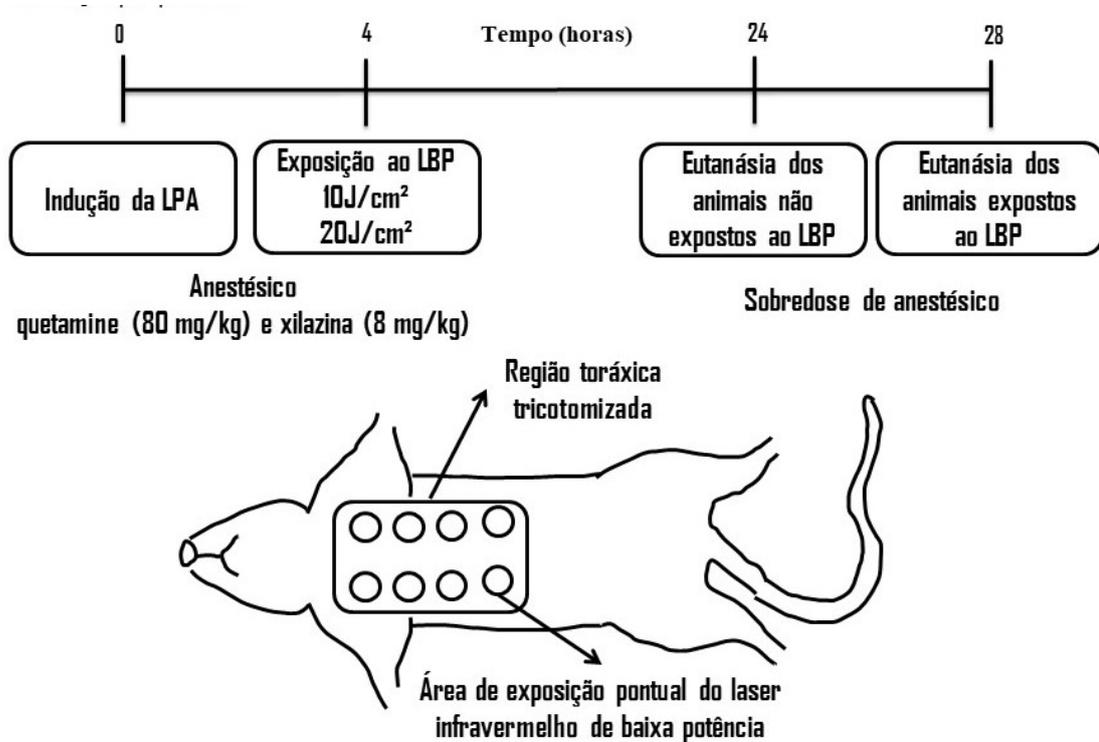
Fonte: O autor, 2020.

O procedimento de irradiação ocorreu após sedação com administração intraperitoneal de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), os animais foram dispostos em posição de decúbito dorsal e realizada tricotomia da região torácica. Em seguida, foi procedida a exposição ao *laser* infravermelho em quatro pontos entre as costelas ao longo de cada pulmão

(Figura 21). A exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência ocorreu após 4 horas de indução da LPA, de acordo com estudos anteriores (RITTIRSCH, 2008; FAN et al., 2010).

Após 24 horas da sepse induzida por LPS, ou após a exposição ao *laser* infravermelho, os animais foram eutanaseados por sobredose de anestésico e a laparotomia foi realizada. A traqueia foi pressionada e os pulmões foram removidos para posterior análise histológica e expressão relativa de RNAm.

Figura 21 - Representação esquemática da exposição do tórax de ratos *Wistar* ao *laser* infravermelho de baixa potência, ilustrando os 4 pontos de irradiação em cada pulmão



Nota: As exposições ao *laser* infravermelho de baixa potência foram pontuais, posicionando a caneta *laser* entre as costelas, após a tricotomia do tórax, dos animais em posição decúbito dorsal.

Fonte: O autor, 2020.

3.2 Coleta do material biológico

Após a eutanásia dos animais, o tórax foi aberto e a parede torácica anterior removida. A porção abdominal e o esôfago identificado e isolado, assim como as veias subclávica, jugular interna e hepática foram identificadas e presas por uma pinça hemostática.

As estruturas do pescoço foram dissecadas permitindo a liberação das vias aéreas. Com todas as estruturas individualizadas, a traquéia foi seccionada, e posteriormente, o esôfago e o coração separados dos pulmões e das vias aéreas por incisão. O pulmão esquerdo de cada animal foi fixado em solução tamponada de paraformaldeído, e o lobo médio e inferior do pulmão direito foram fixados em TRIzol.

3.3 Avaliação morfológica

Esta etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia/ICB - UFJF. O pulmão esquerdo foi fixado em paraformaldeído tamponado a 4% e posteriormente encaminhado para técnicas histológicas rotineiras. Cortes histológicos de 4 μm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina, secos em temperatura ambiente e montados com Entellan (Merck).

Vinte e uma imagens por cortes foram realizadas usando um microscópio Carl Zeiss Axio Lab A1, capturado com um objetiva de 20/0.45 e 40/0.65 x a cores e câmera 5M Axiocam ERc5S Rev. 2.0, 20 / 0.40, utilizando o software Zen 2 (edição azul) (Zeiss, Alemanha).

As imagens uniformes de pulmões foram obtidas por 7 campos que não se sobrepõem em três seções (superior, médio e base do pulmão) capturadas com objetivas de 20 e 40x. No que diz respeito aos critérios de parâmetros estereológicos e aos modelos de estudo no trato respiratório (estudo duplo cego) (MÜHLFELD; OCHS, 2013), determinou-se a densidade numérica, a densidade superficial das células alveolares e a interceptação do forro (Lm) nas seções com coloração com hematoxilina-eosina.

O volume de referência foi estimado por contagem de pontos usando o sistema de teste de arcos cíclicos de 32 pontos no Stepanizer 1.6 sobreposto na tela do monitor do computador (WEIBEL et al., 1966; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Os pontos que fizeram contato com septos interalveolares e alvéolos pulmonares foram contados para estimar a densidade de volume das estruturas em seções com coloração com hematoxilina-eosina. Resumidamente, esse método envolve a determinação do número de vezes que as estruturas no parênquima cruzam uma série de linhas de grade (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros Estereológicos

Parâmetros	Unidades	Definições
Vv [as]	%	Densidade de volume da parede do septo interalveolar em relação ao parênquima pulmonar.
Vv [air space]	%	Densidade de volume do espaço aéreo alveolar em relação ao parênquima pulmonar.
Sv	μm^{-1}	Densidade da superfície alveolar em relação ao parênquima pulmonar.
Lm	μm	Comprimento de intercepções médias lineares do espaço aérea acinar.

Legenda: Alveolar septum (as, em português, septo alveolar).

Fonte: O autor, 2020.

A densidade de volume de septos interalveolares foi obtida por meio do número de septos sob os pontos da grade de arco cíclico dividido pelo número de pontos na grade:

$$Vv [as] = \frac{\text{número de septos interalveolares}}{32} \quad (1)$$

Para a densidade do volume do espaço aéreo, o número de alvéolos sob os pontos da grade de arco cíclico foi dividido pelo número de pontos da grade:

$$Vv [air space] = \frac{\text{número de alvéolos}}{32} \quad (2)$$

A densidade superficial alveolar foi obtida pelo número de intercepções em alvéolos dividido pelo número de pontos na grade e tamanho dos arcos, sendo 2 contínuo da fórmula e 52, o tamanho dos arcos:

$$Sv = \frac{2 \times \text{Intercepções}}{32 \times 2 \times 52} \quad (3)$$

Lm foi obtido usando uma equação, onde Ltot é o comprimento total das linhas em campo microscópico, e Li é o número de intercepções de estruturas alveolares com linhas de septos interalveolares:

$$Lm = \frac{L_{tot}}{L_i} \quad (4)$$

Para esse fim, 7 campos de cada corte foram contados e observados através de uma grade sobre o parênquima visualizado no monitor. A morfometria geral não foi avaliada em áreas brônquicas, mas apenas no parênquima pulmonar (espaço aéreo fisiológico). A área do

infiltrado inflamatório foi quantificada pelo software *Image ProPlus* (Media Cybernetics, Inc.). As capturas de imagens e a contagem foram realizadas de forma cega.

A densidade celular nos infiltrados inflamatórios (D_{ii}) foi obtida usando os mesmos campos utilizados para análise estereológica e calculada por:

$$D_{ii} = \frac{\text{número de células no campo} \times \text{área do infiltrado}}{\text{área do campo}} \quad (5)$$

3.4 Avaliação da expressão dos níveis de RNAs mensageiros

3.4.1 Reagentes

Para o estudo da expressão gênica: Reagente TRIzol® foi obtido da Invitrogen (EUA), da Merck (Alemanha) foram obtidos C₃H₈O (isopropanol), CHCl₃ (clorofórmio), C₂H₅OH (etanol) e DEPC (deítil pirocarbonato). Entellan proveniente da Merck (Alemanha), o DEPC (Diethyl pyrocarbonate) foi de Sigma (EUA) e NaCl (cloreto de sódio) foi de Vetec (Brasil). Proteinase K, Kit TUNEL POD e DNase 1 foram obtidas da Roche Diagnostics (EUA) e solução DAB foi obtida da Sigma Aldrich (Brasil).

3.4.2 Extração de RNA total

Após a eutanásia, as amostras (50 a 100 mg) de tecido do pulmão direito foram coletadas e transferidas para tubos flexíveis para microcentrífuga com reagente TRIzol® para extração total de RNA por procedimento padrão. Brevemente, as amostras de tecido foram trituradas em tubos flexíveis para microcentrífuga com reagente TRIzol® e centrifugadas (12.000xg, 4°C, 10 minutos). Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, clorofórmio foi adicionado, as misturas foram centrifugadas (12000xg, 4°C, 15 minutos), as fases aquosas foram transferidas para outros tubos e foi adicionado isopropanol. A incubação

se deu em temperatura ambiente por 15 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas (12000xg, 4°C, 10 minutos), os sobrenadantes descartados e o RNA total precipitado foi lavado com solução de DEPC a 0,1% (em solução aquosa de etanol a 80%) e centrifugada. Os sobrenadantes foram retirados e o RNA total foi reconstituído em solução de DEPC (0,1%) e armazenado (-80°C).

3.4.3 Síntese de cDNA

A concentração de RNA e a pureza foram avaliadas em espectrofotômetro através do cálculo da razão das densidades ópticas obtidas nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada seguindo protocolo sugerido pelo fabricante do *kit* de síntese de cDNA (Promega, EUA). Brevemente, quatro microgramas de RNA foram transcritos reversamente em cDNA usando transcriptase reversa GoScript™ (Promega, EUA), em reação com volume final de 20 µL. A reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada usando 5 µL de GoTaq RT-qPCR Master Mix (Promega, EUA) para um volume final de 10 µL contendo 50 ng de cDNA. Para determinar os níveis relativos de RNAm, as amostras de cDNA foram amplificadas com *primers* para *Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1 (APEXI)*, *8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (OGGI)*, *excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1)*, *excision repair cross-complementing group 2 (ERCC2)*, *Tumor protein 53 (Tp53)*, *Telomeric factor 2 (TRF2)*, *Cysteine-aspartic-acid-protease 3 (CASP-3)*, *B-Cell lymphoma 2 (BCL-2)* e *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)*.

As reações, em duplicatas para cada amostra, foram executadas em equipamento App-Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA). A PCR foi inicialmente desnaturada a 94°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, reaquecidas a 60°C durante 30 s (exceto *OGGI* cujo passo de reaquecimento foi de 67°C durante 30 s), e um período de extensão de 30 s a 72°C. As análises da curva de fusão foram realizadas para todos os genes e a especificidade do produto de PCR foi confirmada pela presença de um único pico.

Os níveis relativos de RNAm foram normalizados pelos níveis relativos de RNAm do gene de referência (*GAPDH*), usando animais LPA do grupo controle. Os valores das

duplicatas de Ct foram analisados no Microsoft Excel (Microsoft) usando o método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$) método (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.5 Análise da fragmentação de DNA

Entre os métodos para detectar apoptose em tecidos histológicos, a técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling*) está entre os mais utilizados. Uma característica importante da apoptose é a degradação do DNA após a ativação de endonucleases dependentes de Ca^{+2}/Mg^{+2} . O método de TUNEL identifica a fragmentação do DNA *in situ* pela ligação da biotina-dUTP em terminações clivadas no DNA, pela ação da deoxinucleotídeo transferase (TdT). Os pontos de clivagem ligados à biotina são detectados pela reação com HRP (*horse radish peroxidase*) conjugada com estreptavidina e visualizada por DAB (diaminobenzidina), que confere a cor marrom.

Neste estudo foi utilizado *kit* TUNEL POD (Roche, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Após desparafinização por lavagem com xilol e sequencial hidratação, as lâminas foram incubadas com solução de proteinase K a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Roche Diagnostics, EUA) por 30 minutos a 37 °C e em seguida em solução metanólica (metanol puro) e peróxido de hidrogênio (0,3%) por 30 minutos a temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena.

As lâminas contendo os cortes foram incubadas com a solução de reação contendo a enzima e os nucleotídeos TdT e dUTP por 60 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS, reveladas com solução de DAB (Sigma Aldrich, Brasil) a 0,5 mg/ml e contra coradas com solução de verde de metila. Como controle positivo, cortes incubados com DNase 1 (Roche Diagnostics, EUA) antes da utilização da solução contendo a enzima. Como controles negativos, cortes não incubados com a solução de enzima.

3.6 Análise estatística

Para realizar as análises estatísticas foi utilizado o software InStat Graphpad (GraphPad InStat versão 5.0 para Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA. A

normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, onde os dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão e dados não paramétricos foram expressos como mediana (intervalo intercuartil).

3.6.1 Análises morfológicas

A ANOVA de um critério, seguida pelo teste de comparação múltipla da Bonferroni, foi utilizada para comparar os dados paramétricos. Para dados não paramétricos, o teste Kruskal-Wallis foi seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. $p < 0,05$ foi considerado como menor nível de significância.

3.6.2 Análises da expressão de RNAm de genes de reparo do DNA

Foi realizado teste t de Student não pareado e teste de Mann Whitney. A ANOVA de um critério, seguida pelo teste de comparação múltipla da Bonferroni, foi utilizada para comparar os dados paramétricos. Para dados não paramétricos, o teste Kruskal-Wallis foi seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. $p < 0,05$ foi considerado como menor nível de significância.

3.6.3 Análises da fragmentação do DNA

A ANOVA de um critério, seguida pelo teste de comparação múltipla da Bonferroni, foi utilizada para comparar os dados paramétricos. $p < 0,05$ foi considerado como menor nível de significância.

3.6.4 Análises dos níveis de RNAm de genes relacionados à apoptose

Teste Mann Whitney foi realizado para comparar os dados do grupo LPA com o controle. A ANOVA de um critério, seguida pelo teste de comparação múltipla da Bonferroni, foi utilizada para comparar os dados paramétricos. Para dados não paramétricos, o teste Kruskal-Wallis foi seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. $p < 0,05$ foi considerado como menor nível de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

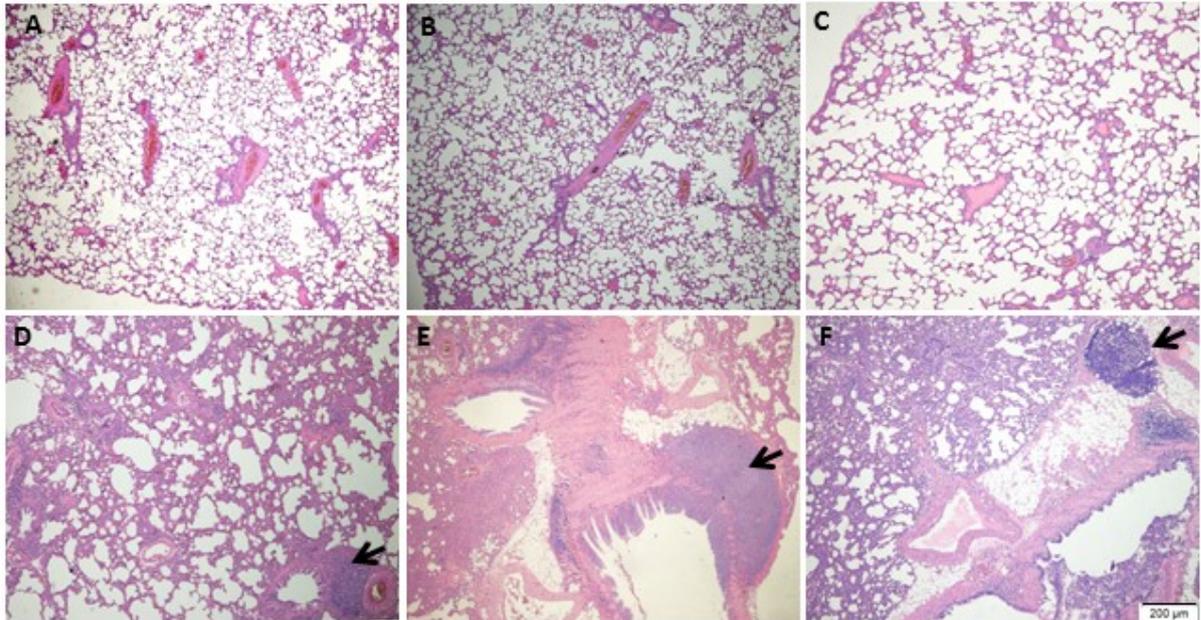
4.1 Estudo 1: Avaliação de efeitos de *laser* infravermelho de baixa potência na modificação da morfologia do tecido pulmonar de ratos *Wistar* afetados pela LPA induzida pela administração de LPS.

4.1.1 Resultados

A Figura 22 são fotomicrografias representativas de cortes histológicos do parênquima pulmonar de ratos *Wistar* afetados pela LPA induzida pela administração de LPS (sepsis). A arquitetura pulmonar microscópica foi observada 24 horas após a indução da LPA e/ou pela última exposição ao *laser* de infravermelho de baixa potência (Figura 22). Na Figura 22D observar-se a modificações morfológicas indicativas da LPA, demonstrando que o modelo de indução da LPA com administração de LPS foi eficiente. Quando comparado com o grupo controle (Figura 22A), a parede dos septos interalveolares se encontra espessa, apresentando redução do espaço alveolar e intenso infiltrado inflamatório com células polimorfonucleares (PMN).

No entanto, a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em ambas as fluências utilizadas (Figuras 22E e 22F) reduziram o espessamento do septo interalveolar nos pulmões com indução da LPA pelo LPS, aumentando o espaço alveolar. Ainda apresentam infiltrados inflamatórios quando comparados ao grupo LPA (Figura 22D). Não foram observadas alterações significativas em animais expostos apenas ao *laser* infravermelho de baixa potência quando comparados com o grupo controle (Figuras 22B e 22C).

Figura 22 – Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de ratos *Wistar* após a indução da LPA por administração de LPS

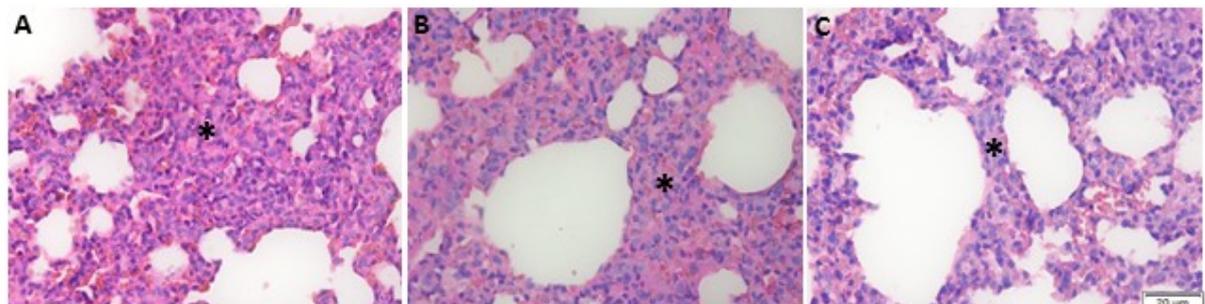


Legenda: A) Controle; B) *laser* 10J/cm²; C) *laser* 20J/cm²; D) LPA; E) LPA e *laser* 10J/cm²; (F) LPA e *laser* 20J/cm² group. Barra = 200 µm. A seta indica infiltrados inflamatórios. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

A área do infiltrado inflamatório (em µm²) presente na parede do septo interalveolar após LPA induzida por LPS e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência é visualizada na fotomicrografia da Figura 23, enfatizando a espessura do septo interalveolar nas condições de LPA e após exposição ao *laser* nas duas fluências utilizadas.

Figura 23 – Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de ratos *Wistar* após a indução da LPA por administração de LPS

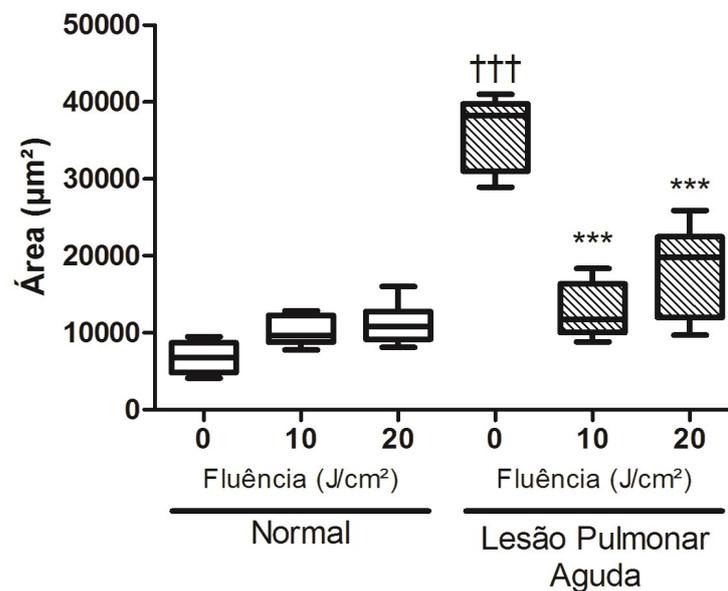


Legenda: Pode-se observar processo inflamatório para todos os grupos. A LPA, B LPA + *laser* 10J/cm², C LPA + *laser* 20J/cm². * indicam células polimorfonucleares (PMN) nos septos interalveolares. Para todas as imagens bar = 20µm

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados obtidos na Figura 24 indicaram aumento significativo ($p < 0,001$) da área de infiltrado inflamatório no grupo LPA quando comparado com o grupo controle. Os animais expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência, em ambas as fluências, apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) da área de infiltrado inflamatório quando comparados com o grupo LPA não irradiado.

Figura 24 – A área do infiltrado inflamatório (em μm^2) na parede do septo interalveolar de ratos *Wistar* após a indução da LPA por administração de LPS, seguida de exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência

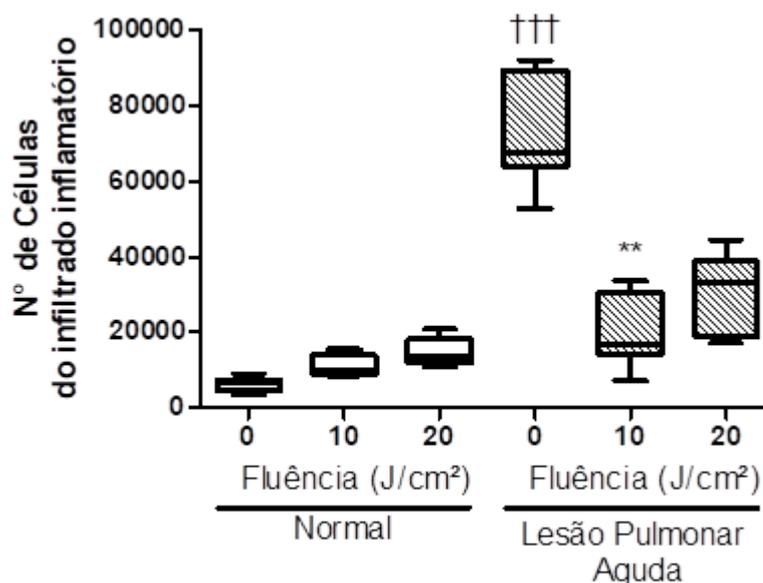


Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (*laser* 10 J/cm²), 20 (*laser* 20 J/cm²); Lesão pulmonar aguda: 0 (lesão pulmonar aguda), 10 (lesão pulmonar aguda e *laser* 10 J/cm²), 20 (lesão pulmonar aguda e *laser* 20 J/cm²). (†) quando comparado com o controle grupo e (*) quando comparado com o grupo LPA. (†††) $p < 0,001$ e (***) $p < 0,001$.

Fonte: O autor, 2020.

Na Figura 25 estão apresentados dados da densidade celular dos infiltrados inflamatórios presentes na parede do septo interalveolar após a LPA induzida pelo LPS e a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência. Estes dados sugerem que houve aumento significativo ($p < 0,001$) da densidade celular no grupo LPA quando comparado com o grupo controle e, após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 10 J/cm², houve redução significativa ($p < 0,01$) de densidade celular de infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo LPA não exposto.

Figura 25 – Número de células no infiltrado inflamatório na parede de septos interalveolares de ratos *Wistar* após a indução da LPA por administração de LPS, seguida de exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência

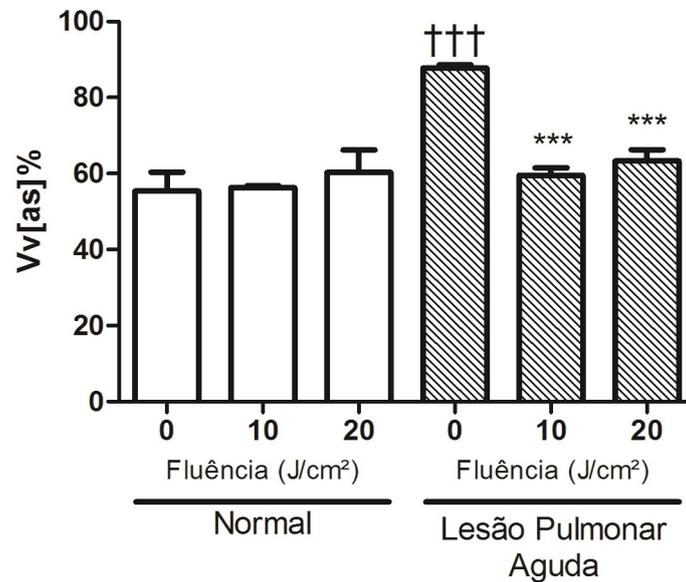


Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (*laser* 10 J/cm²), 20 (*laser* 20 J/cm²); Lesão pulmonar aguda: 0 (lesão pulmonar aguda), 10 (lesão pulmonar aguda e *laser* 10 J/cm²), 20 (lesão pulmonar aguda e *laser* 20 J/cm²). (†) quando comparado com o controle grupo e (*) quando comparado com o grupo LPA. (†††) p<0,001 e (***) p<0,001.

Fonte: O autor, 2020.

As alterações morfológicas induzidas pelo LPS no tecido pulmonar foram quantificadas por morfometria utilizando um sistema de teste de arcos ciclóides de 32 pontos no Stepanizer 1.6. Os resultados apresentados na Figura 26 sugerem aumento significativo (p<0,001) na densidade volumétrica do tecido da parede do septo interalveolar no grupo LPA quando comparado ao grupo controle. No entanto, após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em ambas as fluências (10 e 20J/cm²), houve redução significativa (p<0,001) na densidade volumétrica do tecido intertalveolar da parede septal quando comparada ao grupo LPA não exposto ao *laser*. Por outro lado, a densidade do tecido da parede do septo interalveolar foi semelhante (p>0,05) em ambos os grupos, controle e grupo LPA exposto ao *laser*.

Figura 26 – Densidade volumétrica da parede do septo interalveolar de ratos *Wistar* em relação ao parênquima pulmonar após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência

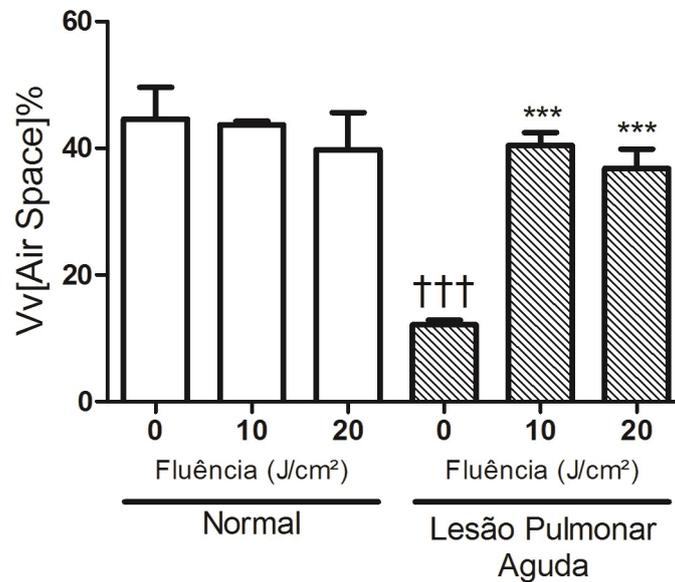


Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (10 J/cm²), 20 (20 J/cm²); Lesão pulmonar aguda: 0 (lesão pulmonar aguda), 10 (lesão pulmonar aguda e 10 J/cm²), 20 (lesão pulmonar aguda e 20 J/cm²). (†) quando comparado com o grupo de controle e (*) quando comparado com o grupo LPA. (†††) $p < 0,001$ e (***) $p < 0,001$.

Fonte: O autor, 2020.

A densidade de volume do espaço alveolar apresentou redução significativa ($p < 0,001$) no grupo LPA quando comparado ao grupo controle (Figura 27). Foi possível verificar aumento significativo ($p < 0,001$) deste parâmetro no grupo LPA exposto ao *laser* infravermelho de baixa potência nas fluências de 10 e 20 J/cm² quando comparado ao grupo LPA não exposto.

Figura 27 – Densidade volumétrica do espaço aéreo alveolar de ratos *Wistar* em relação ao parênquima pulmonar após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência

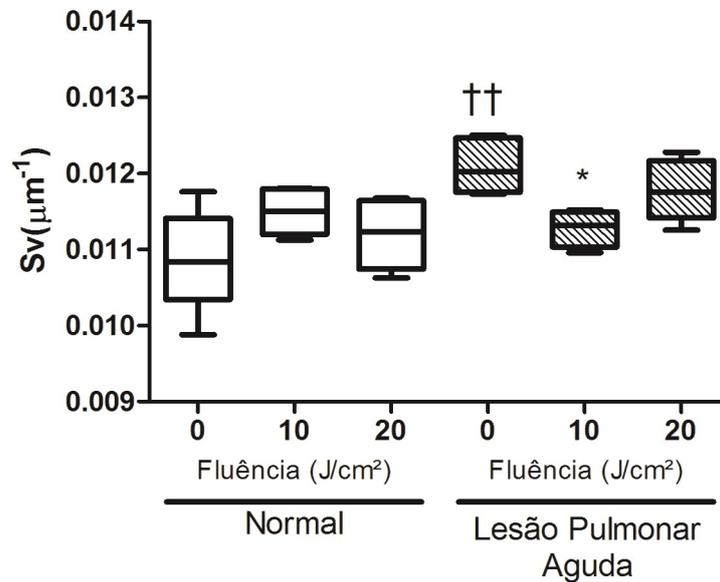


Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (10 J/cm²), 20 (20 J/cm²); Lesão pulmonar aguda: 0 (lesão pulmonar aguda), 10 (lesão pulmonar aguda e 10 J/cm²), 20 (lesão pulmonar aguda e 20 J/cm²). (†) quando comparado com o grupo de controle e (*) quando comparado com o grupo LPA. (†††) $p < 0,001$ e (***) $p < 0,001$.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados na Figura 28 sugerem aumento significativo ($p < 0,001$) da densidade da superfície alveolar no grupo LPA quando comparado ao grupo controle. Houve redução significativa ($p < 0,001$) da densidade da superfície alveolar após a indução da LPA e a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 10J/cm² quando comparado ao grupo LPA não exposto, enquanto não houve diferença estatística da densidade da superfície alveolar quanto induzida de LPA e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 20J/cm².

Figura 28 – Densidade superficial do alvéolo em relação ao parênquima pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência

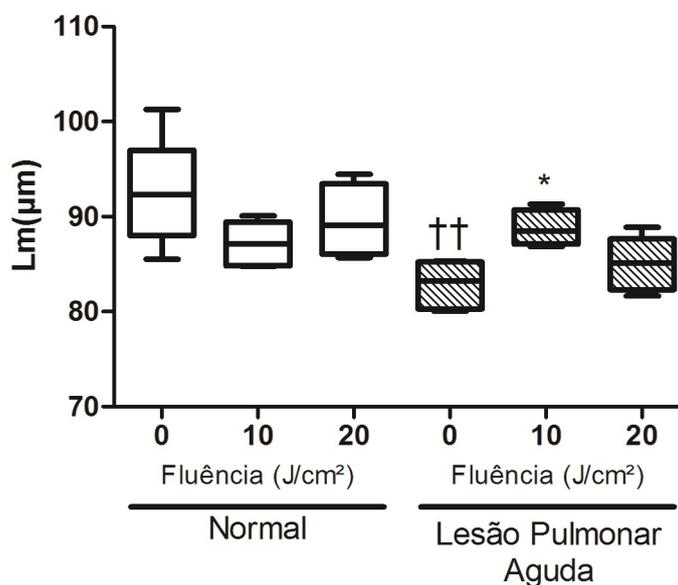


Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (10 J/cm²), 20 (20 J/cm²); Lesão pulmonar aguda: 0 (lesão pulmonar aguda), 10 (lesão pulmonar aguda e 10 J/cm²), 20 (lesão pulmonar aguda e 20 J/cm²). (†) quando comparado com o grupo de controle e (*) quando comparado com o grupo LPA. (††) p<0,01 e (*) p<0,05.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados de comprimento médio das intercepções lineares do espaço aéreo (diâmetro alveolar) são apresentados na Figura 29. É possível verificar redução significativa (p<0,001) do comprimento médio das intercepções lineares no grupo LPA quando comparado ao grupo controle. Além disso, houve aumento significativo (p<0,001) no diâmetro alveolar no grupo exposto ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 10J/cm² após a indução da LPA quando comparado ao grupo LPA não exposto.

Figura 29 – Comprimento médio de intercepção linear nos espaços aéreos do parênquima pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência



Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (10J/cm²), 20 (20J/cm²); Lesão pulmonar aguda: 0 (lesão pulmonar aguda), 10 (lesão pulmonar aguda e 10J/cm²), 20 (lesão pulmonar aguda e 20J/cm²). (†) quando comparado com o grupo de controle e (*) quando comparado com o grupo LPA. (††) p<0,01 e (*) p<0,05.

Fonte: O autor, 2020.

4.1.2 Discussão

Os efeitos fotobioestimuladores dos *lasers* de baixa potência foram observados em diferentes células, tecidos e órgãos, como fibroblastos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006; CHEN et al., 2011; MARTIGNANO et al., 2015), osteoblastos (MIGLIÁRIO et al., 2014), mioblastos (MESQUITA-FERRARI et al., 2015; TRAJANO et al., 2016b), células epiteliais (EDUARDO et al., 2007), pele queimada (TRAJANO et al., 2014; TRAJANO et al., 2015), tecido muscular (ASSIS et al., 2013) e cérebro (TIAN et al., 2016).

Estudos recentes demonstram que um feixe de *laser* infravermelho de baixa potência, ao longo de sua trajetória, gera um volume longo e estreito de radiação coerente que é capaz de penetrar profundamente nos tecidos biológicos (KARU, 2003; HUDSON et al., 2013; HENDERSEN; MORRIES, 2015).

Byrnes et al. (2005) reforçam que a radiação infravermelha próxima, na faixa de 770-850 nm, penetra mais profundamente através de tecidos de ratos do que a luz vermelha. Dados experimentais mostram que a penetração em qualquer tecido biológico, quando aplicado percutaneamente, atinge entre 2 e 5 cm, dependendo das camadas e do estado metabólico do tecido (JOENSEN et al., 2012; GIACOMO et al., 2013).

O dano alveolar difuso causado pela LPA é dividido em fase exsudativa e fase fibroproliferativa. Na fase exsudativa ocorrem edema intersticial e intralveolar, hemorragia intralveolar e acumulação de neutrófilos (MUHLFELD; OCHS, 2013). Em ratos, a LPA induzida por LPS, causa aumento significativo dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (HU et al., 2017). Além disso, a administração de LPS causa hemorragia alveolar, infiltração de leucócitos e edema intersticial pulmonar (TANAKA et al., 2017), como mostrado nas Figuras 22 e 23, que evidencia infiltrado inflamatório e espessamento do septo interalveolar.

A análise morfológica mostra efeitos anti-inflamatórios do *laser* infravermelho de baixa potência, diminuindo a área inflamatória e a densidade de células PMN em animais LPA, como observado nas Figuras 24 e 25. De fato, esses resultados concordam com os de Oliveira et al. (2014), que observaram diminuição dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em animais afetados pela síndrome do desconforto respiratório agudo pulmonar e extrapulmonar induzida pelo LPS. Além disso, outros modelos inflamatórios mostraram alterações morfológicas semelhantes após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência, com redução do número de células PMN e resolução inflamatória (DOS ANJOS et al., 2017).

Os resultados de nossa pesquisa mostram redução da densidade volumétrica de septos alveolares e aumento da densidade volumétrica do espaço aéreo alveolar em ambos os grupos LPA expostos as fluências de 10 e 20J/cm² em comparação com o grupo LPA não exposto ao *laser*. Embora a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência pareça não acabar com o processo inflamatório causado pelo LPA (Figuras 26 e 27), sua ação reduz significativamente o processo inflamatório.

O aumento da densidade superficial e a redução do diâmetro alveolar no grupo LPA (Figuras 28 e 29) são indicativos que há aumento da espessura do septo interalveolar causada pelo edema. Embora a redução da densidade superficial e o aumento do diâmetro alveolar tenham ocorrido apenas no grupo exposto ao *laser* na fluência de 10J/cm², também este efeito ocorreu no grupo LPA exposto ao *laser* na fluência de 20J/cm².

Esses resultados confirmam os dados de densidade de volume que sugerem que a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência tem ação benéfica no tecido pulmonar, reduzindo o processo inflamatório em animais afetados pela LPA.

A melhora significativa nos animais afetados pela LPA expostos ao *laser* de baixa potência pode ser atribuída à ação da radiação no processo inflamatório. Peron and Coworkers (2015) observaram redução dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em ratos C57BL-6 com DPOC expostos a *laser* de baixa potência. Lima et al. (2011) observaram redução do nível de TNF- α e neutrófilos em animais afetados por inflamação pulmonar aguda após exposição a *laser* vermelho de baixa potência (660nm). Os animais afetados pela inflamação pulmonar causada por inalação de formaldeído apresentaram redução do processo inflamatório (TNF, IL-6, monócitos e neutrófilos) após a exposição a *laser* vermelho de baixa potência (MIRANDA DA SILVA et al., 2015).

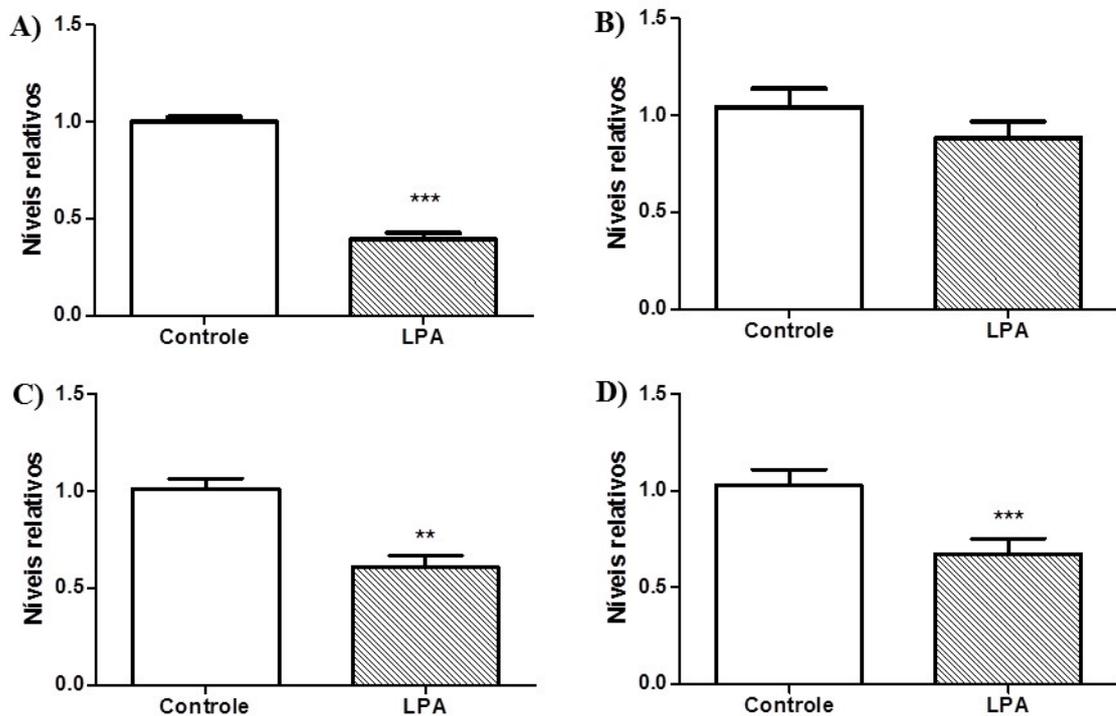
O tecido pulmonar de animais afetados pela LPA em resposta à sepse induzida pela administração de LPS mostra uma melhora significativa após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência. Assim, a terapia com *laser* de baixa potência pode ser considerada uma terapia alternativa para tratamento da inflamação pulmonar aguda.

4.2 Estudo 2: Avaliação de efeitos do *laser* infravermelho de baixa potência na alteração dos níveis relativos de RNA mensageiro de genes de reparo do DNA no tecido pulmonar de ratos *Wistar* afetados pela LPA induzida pela administração de LPS

4.2.1 Resultados

Os resultados apresentados na Figura 30 representam valores de níveis relativos de RNAm de *OGGI*, *APEX1*, *ERCC2* e *ERCC1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da lesão pulmonar aguda (LPA) por administração de LPS.

Figura 30 – Níveis relativos de RNAm de genes de reparo do DNA no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA por administração de LPS



Legenda: Mecanismo de reparo por excisão de base: (A) OGG1 e (B) APEX1; Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo: (C) ERCC2 e (D) ERCC1. GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ quando compara-se o grupo LPA com o grupo controle. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

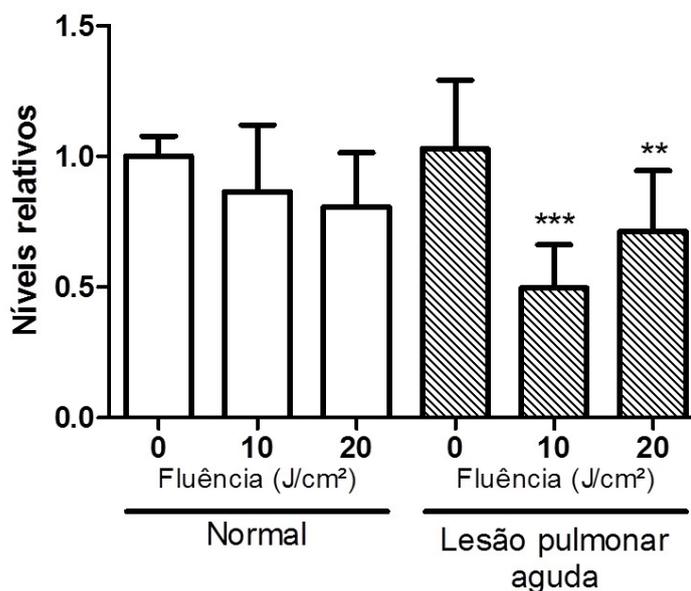
Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados na Figura 30A indicam redução significativa ($p < 0,001$) dos níveis relativos de RNAm de *OGG1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após a indução da LPA pela administração de LPS quando comparado ao grupo controle. Contrário aos níveis relativos do RNAm de *OGG1*, os níveis relativos de RNAm de *APEX1* não apresentou alteração significativa ($p > 0,05$) no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA quando comparado com o grupo controle (Figura 30B).

Os resultados apresentados na Figura 30C indicam redução significativa ($p < 0,01$) dos níveis relativos do RNAm de *ERCC2* no tecido pulmonar de ratos após indução LPA quando comparado ao grupo controle, e os dados apresentados na Figura 30D indicam que os níveis relativos de RNAm de *ERCC1* apresentou redução significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle.

Os resultados apresentados na Figura 31 sugere os níveis relativos de RNAm de *OGG1* no tecido pulmonar após indução da LPA e exposição a *laser* infravermelho (808nm) de baixa potência em diferentes fluências (10 e 20 J/cm²).

Figura 31 – Níveis relativos de RNAm de *OGGI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência



Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), 20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda: 0 (LPA), 10 (LPA e *laser* 10J/cm²), 20 (LPA e *laser* 20J/cm²). GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (*) quando comparado com o grupo LPA. (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

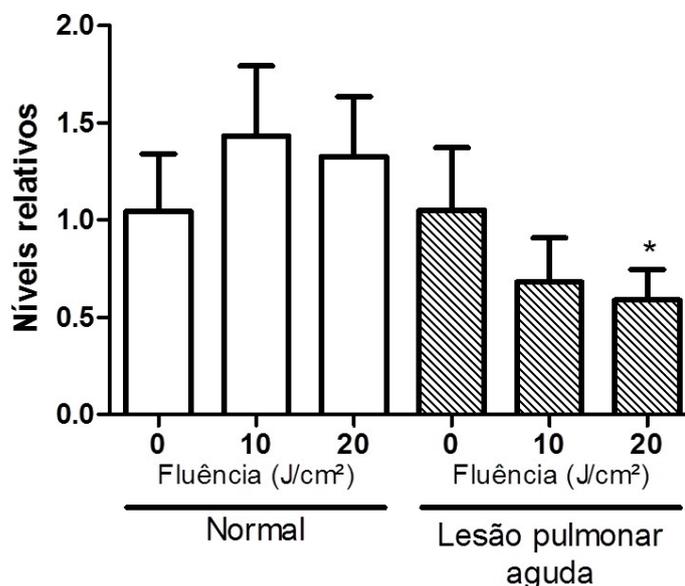
Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados nesta figura indicam que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) dos níveis de RNAm de *OGGI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* normais expostos ao *laser* infravermelho quando comparados com o grupo controle. No entanto, uma diminuição significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) foi observada no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho nas fluências 10 e 20 J/cm² ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), quando comparado ao grupo LPA não exposto.

Os níveis relativos do RNAm *APEXI* foram avaliados para confirmar os efeitos do *laser* infravermelho (808nm) de baixa potência nos níveis de RNAm de genes relacionados com a via de reparo por excisão de bases (Figura 32).

Semelhante ao obtido para os níveis relativos de RNA de *OGGI*, a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis relativos de RNAm de *APEXI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* normais expostos ao *laser* infravermelho quando comparados ao grupo controle.

Figura 32 – Níveis relativos de RNAm de *APEXI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência



Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), 20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda: 0 (LPA), 10 (LPA e *laser* 10J/cm²), 20 (LPA e *laser* 20J/cm²). GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (*)quando comparado com o grupo LPA. (*) p<0.05. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

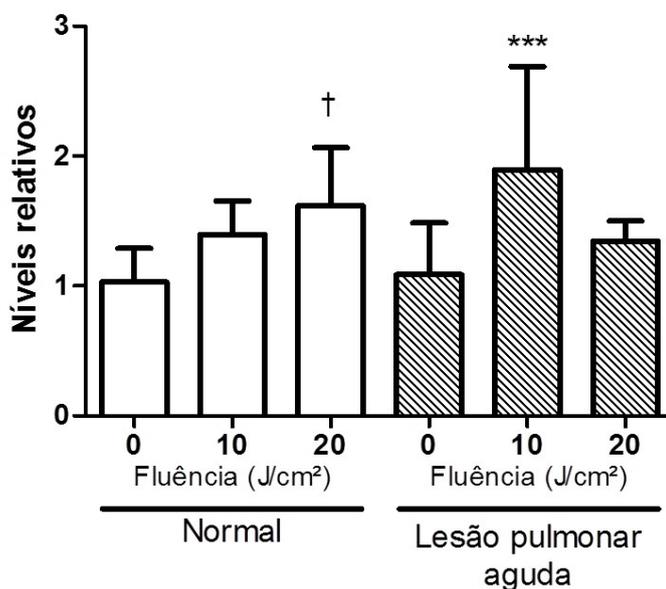
Fonte: O autor, 2020.

Além disso, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos níveis relativos de RNAm de *APEXI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho na menor fluência utilizada (10J/cm²). No entanto, foi observada redução significativa ($p<0,05$) dos níveis relativos de RNAm de *APEXI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho na maior fluência (20J/cm²) quando comparado com o grupo LPA não exposto ao *laser* infravermelho.

Após verificar os níveis relativos de RNAm de genes relacionados à via de reparo por excisão de bases (*OGG1* e *APEXI*), e observar alterações no tecido pulmonar após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência, foram avaliados os níveis relativos do RNAm dos genes de reparo por excisão de nucleotídeos (*ERCC2* e *ERCC1*).

Os resultados apresentados na Figura 33 mostram valores dos níveis relativos do RNAm de *ERCC2* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA e exposição a *laser* infravermelho de baixa potência em diferentes fluências (10 e 20J/cm²).

Figura 33 – Níveis relativos do RNAm de *ERCC2* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência



Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), 20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda: 0 (LPA), 10 (LPA e *laser* 10J/cm²), 20 (LPA e *laser* 20J/cm²). GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (†) quando comparado com o grupo controle e (*) quando comparado com o grupo LPA. (†) $p < 0.05$ e (***) $p < 0.001$. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

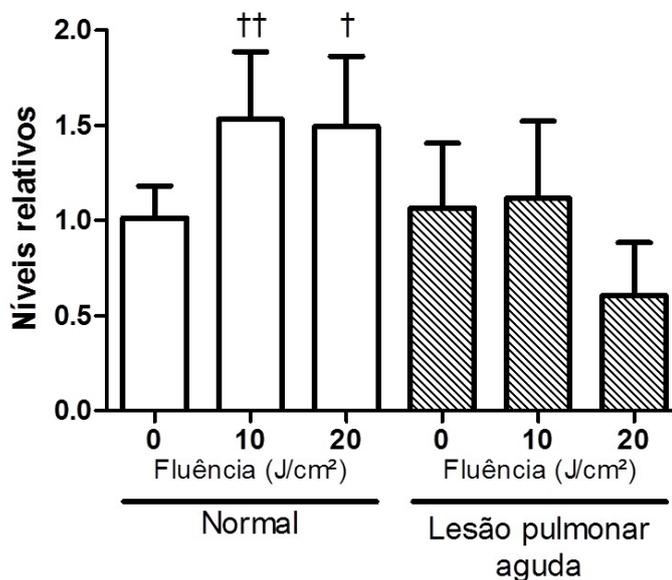
Fonte: O autor, 2020.

Os dados indicam aumento significativo dos níveis de RNAm no tecido pulmonar de ratos *Wistar* normais expostos ao *laser* infravermelho nas fluências de 10 e 20J/cm² ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) quando comparados com o grupo controle. No entanto, nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) nos níveis de RNAm de *ERCC2* no tecido pulmonar de animais após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência quando comparado com o grupo LPA não exposto ao *laser* infravermelho.

Os níveis relativos de RNAm de *ERCC1* foram avaliados para confirmar a alteração dos níveis relativos de RNAm dos genes de reparo por excisão de nucleotídeos (Figura 34).

Semelhante ao RNAm de *ERCC2*, a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis relativos de RNAm de *ERCC1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* normais expostos ao *laser* infravermelho na maior fluência (20J/cm²) quando comparados ao grupo controle.

Figura 34 – Níveis relativos do RNAm de *ERCC1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência



Legenda: Grupos: Normal: 0 (controle), 10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), 20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda: 0 (LPA), 10 (LPA e *laser* 10J/cm²), 20 (LPA e *laser* 20J/cm²). GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (†) quando comparado com o grupo controle. (†) $p < 0.05$ and (††) $p < 0.01$. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

Não houve alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis relativos de RNAm de *ERCC1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na maior fluência, porém, houve aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis relativos de RNAm de *ERCC1* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA e seguido da exposição ao *laser* infravermelho na menor fluência (10J/cm²) quando comparado com o grupo LPA não exposto ao *laser* infravermelho de baixa potência.

4.2.2 Discussão

Na LPA induzida pelo LPS, há dano alveolar difuso com diminuição das vias aéreas acompanhado de espessamento da parede dos septos interalveolares, com progressão para a

fibrose (BUTT et al., 2016) como foi verificado no estudo anterior (Figura 28D). Estudos com pacientes em condições de sepse mostram uma relação entre espécies reativas de oxigênio, redução da capacidade antioxidante e acúmulo de marcadores de estresse oxidativo (GOODE et al., 1995; BORELLI et al., 1996; GUERREIRO et al., 2010) no processo inflamatório estabelecido em pulmões lesionados, com ativação de neutrófilos causando lesões microvasculares por liberação de proteases e produção de espécies reativas de oxigênio (COWLEY et al., 1996; FEIN; CALALANG-COLLUCI, 2000; HOESEL et al., 2005; NARASARAJU et al., 2011).

Alguns estudos sugerem que o aumento do estresse oxidativo supera as defesas antioxidantes, causando danos em moléculas intracelulares (STRIETER et al., 1990; CZAIKOSKI, 2016). Danos na molécula de DNA podem ser causados pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, uma consequência da sepse na lesão pulmonar aguda. Nossos dados sugerem alterações nos níveis de RNAm de genes relacionados ao reparo por excisão de bases e de nucleotídeos.

OGGI (8-oxoguanina DNA glycosylase) é uma enzima com atividade de liase para a clivagem da cadeia de DNA, responsável pela excisão da 8-oxoguanina, um subproduto mutagênico que ocorre como resultado da exposição ao oxigênio reativo (BOITEUX et al., 2017).

Nossos dados mostram diminuição dos níveis relativos de RNAm de *OGGI* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA (Figura 30A). Foi relatado que a enzima *OGGI* protege contra a lesão no DNA mitocondrial induzido por oxidantes e a apoptose nas células endoteliais da artéria pulmonar (RUCHLO et al., 2011), bem como protege contra lesões pulmonares induzidas por ventilação mecânica em camundongos saudáveis (HASHIZUME et al., 2013).

Diferente daqueles obtidos para *OGGI*, não há alteração significativa nos níveis de RNAm de *APEXI* no tecido pulmonar de ratos após LPA induzida (Figura 30B).

APEX 1 inicia o reparo de sítios apurínicos/apirimidínicos no DNA catalisando a incisão hidrolítica no esqueleto fosfodiéster imediatamente adjacente à lesão, gerando uma quebra de fita, expondo a extremidade 5' fosfato e a extremidades 3-hidroxil para inserção de um novo nucleotídeo pela DNA polimerase (HAZRA et al., 2007).

O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na patogênese da sepse e isso está associado à redução da sobrevivência do paciente (QUOILIN et al., 2014). De fato, o reparo por excisão de bases é uma via de reparo do DNA importante que atua sobre lesões oxidativas causadas pelo ataque ao DNA por radicais livres (KLUNGLAND; BJELLAND,

2007). Curiosamente, os níveis relativos de RNAm dos genes *OGGI* e *APEXI* não aumentaram no tecido pulmonar afetado pela sepse, apesar da LPA induzida por sepse aumentar o estresse oxidativo no tecido pulmonar (MATUTE-BELLO, FREVERT; MARTIN, 2008). Isso pode estar relacionado ao fato de que, nos pulmões em condições de sepse, há hipóxia com consequente redução da pressão parcial de oxigênio e redução da produção de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo relatado na doença pulmonar aguda pode ser manifestado em células de defesa, uma vez que o material coletado apresentava mais células pulmonares do que células de defesa, esse fato poderia explicar tais resultados.

Essa redução, ou a não alteração, pode ser associada à atividade enzimática, uma vez que a capacidade de reparo fisiológico do DNA está relacionada aos níveis de proteínas envolvidas neste processo, que são controlados por níveis de transcrição (níveis de RNAm) (CHENG et al., 2000). Portanto, os níveis basais de transcrição do gene de reparo do DNA estão relacionados à capacidade das células de reparar o DNA quando estimuladas por agentes endógenos e exógenos (CHENG et al., 2000). De fato, a diminuição da capacidade de reparo das lesões oxidativas aumenta o número de lesões no DNA e na resposta inflamatória (HOLMES et al., 2003).

A redução da capacidade enzimática das proteínas atuantes nos mecanismos de reparo pode ocorrer uma vez que os polimorfismos em algum gene de reparo do DNA no tecido pulmonar afetado pela LPA foram relatados (HOLMES et al., 2003; DELONGUI et al., 2011; ZHANG et al., 2014). No entanto, polimorfismos em genes de reparo de DNA, especificamente *OGGI* e *APEXI* em condições de lesão pulmonar agudas, ainda não foram relatados.

ERCC2 (*excision repair cross-complementation group 2*) e *ERCC1* (*excision repair cross-complementation group 1*) atuam na via de reparo por excisão de nucleotídeos (REN). O REN atua sobre lesões oxidativas não específicas, enquanto o reparo por excisão de bases (REB) atua em lesões específicas causadas por reações de moléculas de DNA com agentes oxidativos, como os radicais livres (SLUPPHAUG et al., 2003).

ERCC1 e *ERCC2* estão envolvidas no reparo de lesões oxidativas e adutos volumosos, que devem ser removidas da molécula de DNA por mecanismos de reparo para preservar a estabilidade do DNA (COSTA et al., 2003). O produto do gene *ERCC1* forma um complexo heterodímero com a proteína XPF (MITCHEL et al., 2003) e realiza a incisão 5' na cadeia de DNA no sítio da lesão do DNA após a realização de todos os outros passos da excisão (SANCAR; REARDON, 2004; FONSECA et al., 2013).

Os resultados apresentados na Figura 30C e 30D sugerem redução significativa dos níveis de RNAm de *ERCC2* e *ERCC1* no tecido pulmonar após a indução da LPA por sepse. A redução dos níveis de RNAm de genes do REN no tecido pulmonar pode estar relacionada à ação não específica sobre lesões de DNA oxidativo. Uma vez que as alterações nos níveis de RNAm dos genes de reparo por excisão de base e de nucleotídeos foram verificadas em ratos afetados pela sepse pelo LPA, os níveis de RNAm desses genes de reparo de DNA foram avaliados após exposição do tecido pulmonar desses animais ao *laser* de infravermelho de baixa potência, bem como a exposição do tecido pulmonar de animais normais (não afetados pela LPA).

Apesar da exposição ao *laser* infravermelho não modificar os níveis de RNAm no tecido pulmonar de ratos normais, os níveis relativos de RNAm de *OGGI* diminuem no tecido pulmonar de ratos afetados pela LPA induzida por sepse após exposição ao *laser* infravermelho (Figura 31). Esses resultados sugerem que os efeitos induzidos pelo *laser* nos níveis de RNAm de *OGGI* dependem das condições do tecido.

Por outro lado, foi demonstrado que os níveis relativos de RNAm de *OGGI* aumentam após a exposição ao *laser* infravermelho (830nm, 10J/cm²) no tecido muscular de ratos normais (FONSECA et al., 2010) e nas culturas de mioblastos expostos ao *laser* infravermelho (808nm, 10J/cm²) sob condições normais e em condição de estresse nutricional (TRAJANO et al., 2016).

De forma semelhante aos níveis de RNAm de *OGGI*, os níveis relativos de RNAm de *APEXI* não são alterados no tecido pulmonar de animais normais, contudo no tecido pulmonar afetado pela LPA, os níveis de RNAm de *APEXI* são reduzidos após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência mais elevada (20J/cm²). Os estudos mostraram que os níveis de RNAm de *APEXI* aumentam no tecido muscular normal depois de serem expostos ao *laser* infravermelho (830nm, 1 e 5J/cm²), mas numa fluência maior (10J/cm²) há uma redução dos níveis relativos do RNAm de *APEXI* na pele normal exposta a este *laser* (FONSECA e tal, 2010). Além disso, a exposição ao *laser* infravermelho (808nm, 10, 35 e 70 J/cm²) aumenta os níveis relativos de RNAm de *APEXI* em culturas de mioblastos sob condições normais e de estresse nutricional (TRAJANO et al., 2016).

Após a avaliação dos níveis de RNAm de genes do REB (*OGGI* e *APEXI*), os efeitos da fotobiomodulação nos níveis de RNAm de genes do REN foram avaliados para verificar a ação de uma via de reparo de DNA não específica para lesões oxidativas no tecido pulmonar normal e afetado pela LPA. Diferente dos genes de reparo por excisão de bases, os níveis de RNAm de *ERCC2* aumentam no tecido pulmonar de ratos normais após a exposição ao *laser*

infravermelho, mas não no tecido pulmonar afetado pela LPA. Os resultados dos animais normais discordam de resultados anteriores obtidos na pele exposta ao *laser* infravermelho (808nm, 25, 50 e 100J/cm²), mas eles concordam com outros resultados obtidos em tecido muscular após a exposição ao mesmo *laser* na fluência de 50J/cm² (SERGIO et al., 2016).

Os níveis de RNAm de *ERCC1* foram avaliados para confirmar aqueles obtidos para níveis de RNAm *ERCC2*. De fato, há aumento nos níveis de RNAm de *ERCC1* no tecido pulmonar, tanto nos animais normais quanto nos afetados pela LPA. O estudo mostra que há redução nos níveis de RNAm de *ERCC1* na pele após a exposição ao *laser* infravermelho (808nm, 25, 50 e 100J/cm²). Entretanto, há aumento na expressão relativa no tecido muscular quando exposto ao *laser* nas mesmas condições (SERGIO et al., 2016).

Além disso, em culturas de mioblastos em condições normais e de estresse nutricional, a exposição ao *laser* infravermelho (808nm; 10, 35 e 70J/cm²) aumenta os níveis de RNAm de *ERCC1* e ocorre o mesmo para os níveis de RNAm de XPC na fluência de 35J/cm² (TRAJANO et al., 2016b).

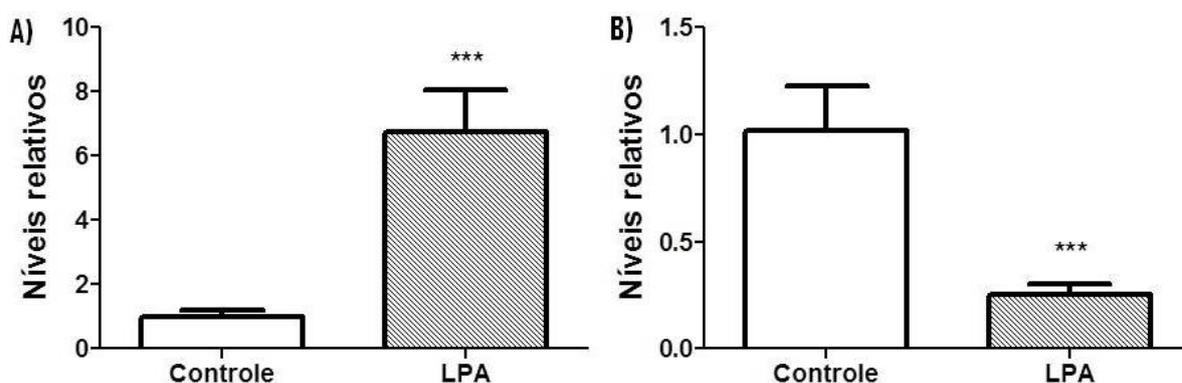
Em conjunto, as semelhanças e discrepâncias dos níveis de RNAm dos genes relacionados ao reparo do DNA podem ser explicadas devido aos diferentes cromóforos ou à concentração de cromóforos em cada tecido. Também, pelo fato de que o feixe *laser* para chegar ao tecido pulmonar pode sofrer absorção ou dispersão nos tecidos anteriores como o tecido muscular (KARU, 1986; CHUNG ; MARWICK, 2010).

4.3 Estudo 3: Avaliação da fragmentação do DNA e da expressão de genes anti e pró-apoptóticos após exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência do tecido pulmonar de ratos *Wistar* afetados pela LPA induzida pela administração de LPS

4.3.1 Resultados

A Figura 35 apresenta os níveis relativos de RNAm dos genes de Caspase 3 e Bcl-2 no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA pela administração de LPS. Os dados apresentados na Figura 35A sugerem aumento significativo ($p < 0,001$) dos níveis relativos do RNAm de *Caspase 3* no tecido pulmonar de ratos após a indução da LPA quando normalizado e comparado ao grupo controle. Complementar a estes, os resultados apresentados na Figura 35B sugerem redução significativa ($p < 0,001$) do RNAm de *Bcl-2* no tecido pulmonar de ratos após indução da LPA quando normalizado e comparado ao grupo controle.

Figura 35 – Níveis relativos do RNAm de *Caspase 3* e *Bcl-2* no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS



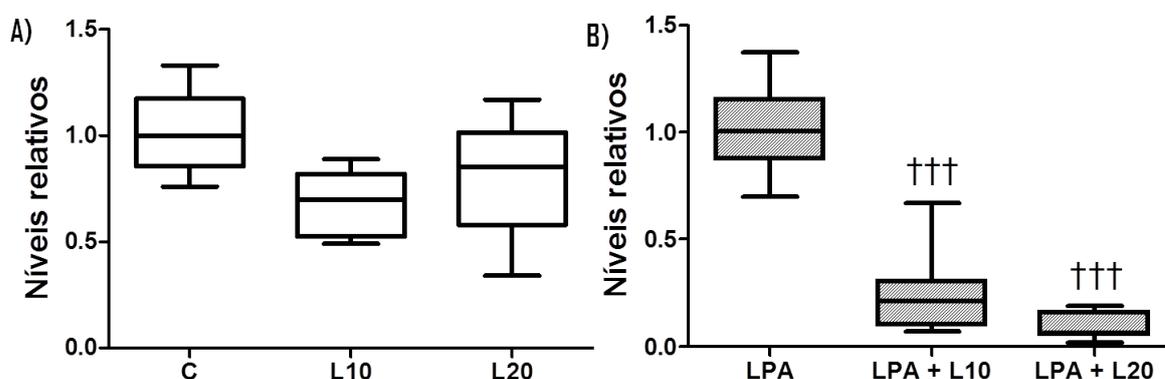
Legenda: (A) e (B) os níveis relativos de RNAm da Caspase 3 e Bcl-2, respectivamente, de induzidos pelo normal e por LPA. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados na Figura 36 sugerem os níveis relativos do RNAm de *Caspase 3* no tecido pulmonar após a indução da LPA pela administração de LPS e a exposição ao *laser* de infravermelho de baixa potência em diferentes fluências (10 e 20J/cm²).

Os dados nesta figura indicam que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) dos níveis relativos do RNAm de *Caspase 3* no tecido pulmonar de ratos normais expostos ao *laser* infravermelho em ambas as fluências avaliadas (10 e 20J/cm²) quando normalizados e comparados com o grupo controle. Entretanto, uma redução significativa ($p < 0,001$) da expressão relativa foi obtida no tecido pulmonar de ratos após a indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho em ambas as fluências quando comparado ao grupo LPA não exposto ao *laser* infravermelho de baixa potência.

Figura 36 – Níveis relativos de RNAm de Caspase 3 no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência



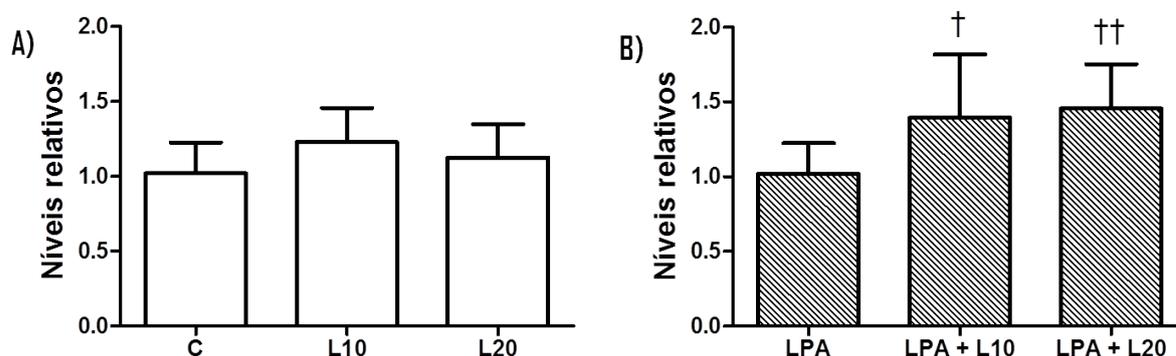
Legenda: Grupos: Normal: C (controle), L10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), L20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda (LPA), LPA + L10 (LPA e *laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), LPA + L20 (LPA e *laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto). GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (†) quando comparado com o grupo LPA. (†††) $p < 0.001$. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados na Figura 37 sugere os níveis relativos do RNAm de *Bcl-2* no tecido pulmonar após a indução da LPA pela administração por LPS e a exposição a *laser* de infravermelho de baixa potência em diferentes fluências (10 e 20J/cm²). Semelhante à Figura 36, os dados nesta não indicam alteração significativa ($p > 0,05$) dos níveis relativos do RNAm de *Bcl-2* no tecido pulmonar de ratos normais expostos ao *laser* infravermelho nas fluências avaliadas (10 e 20J/cm²) quando normalizados e comparados com o grupo controle.

No entanto, um aumento significativo nos níveis relativos foi observado no tecido pulmonar de ratos após a indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho nas fluências 10 e 20 J/cm² ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) quando normalizado e comparado ao grupo LPA não exposto.

Figura 37 – Níveis relativos do RNAm de Bcl-2 no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho (808 nm) de baixa potência

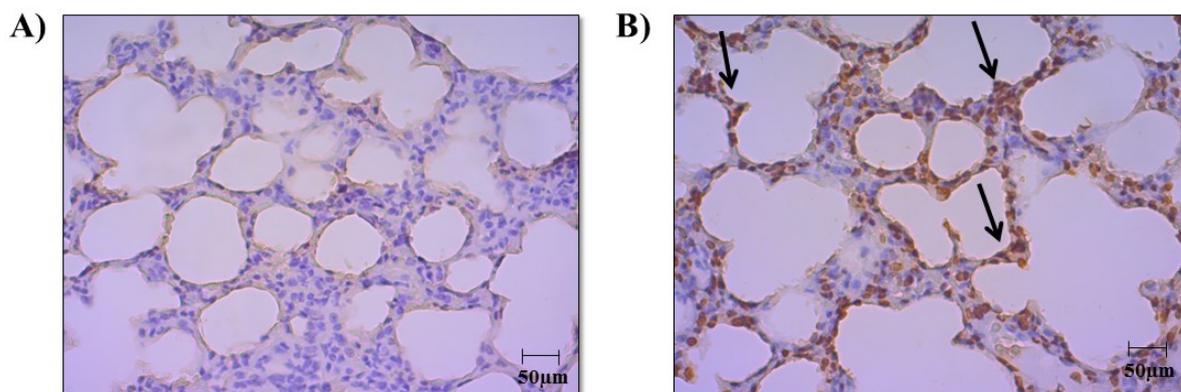


Legenda: Grupos: Normal: C (controle), L10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), L20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda (LPA), LPA + L10 (LPA e *laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), LPA + L20 (LPA e *laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto). GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (*) quando comparado com o grupo LPA. (†) $p < 0.05$ e (††) $p < 0.01$. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020..

Imagens representativas da marcação positiva para a fragmentação do DNA nas células do tecido pulmonar são apresentadas na Figura 38. Esta marcação foi predominantemente em células inflamatórias no grupo LPA. Além disso, essas imagens sugerem que o modelo de LPA foi bem-sucedido. Para verificar qual é o tipo de célula envolvida na fragmentação do DNA e no processo de apoptose, a arquitetura pulmonar foi avaliada 24 horas após a indução de lesão pulmonar aguda (LPA) por administração de LPS e exposição ao *laser* de infravermelho de baixa potência.

Figura 38 – Fotomicrografia representativa da fragmentação do DNA pelo método TUNEL de células do parênquima pulmonar após indução da LPA pela administração de LPS

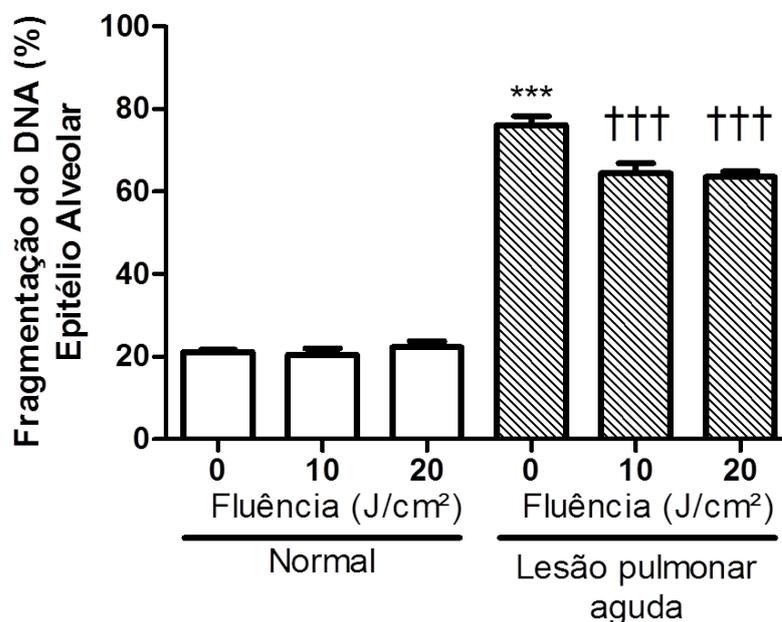


Legenda: (A) e (B) Imagens representativas dos pulmões normais (A) e induzidos à LPA (B). A seta indica rotulagem positiva para a fragmentação do DNA, especialmente nas células PMN. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados na Figura 39 não sugerem alteração ($p > 0,05$) da marcação positiva no tecido pulmonar de ratos normais expostos ao *laser* infravermelho de baixa potência em ambas as fluências avaliadas (10 e 20J/cm²) quando comparado com o grupo controle. No entanto, após a indução da lesão pulmonar aguda, observou-se aumento ($p < 0,001$) da marcação positiva em células alveolares. Por outro lado, após a exposição ao *laser*, houve redução significativa ($p < 0,001$) da marcação positiva em células alveolares no tecido pulmonar em ambas as fluências avaliadas.

Figura 39 – Porcentagem de fragmentação do DNA pela quantificação da marcação positiva de TUNEL POD em células alveolares de ratos *Wistar* expostos ao *laser* infravermelho



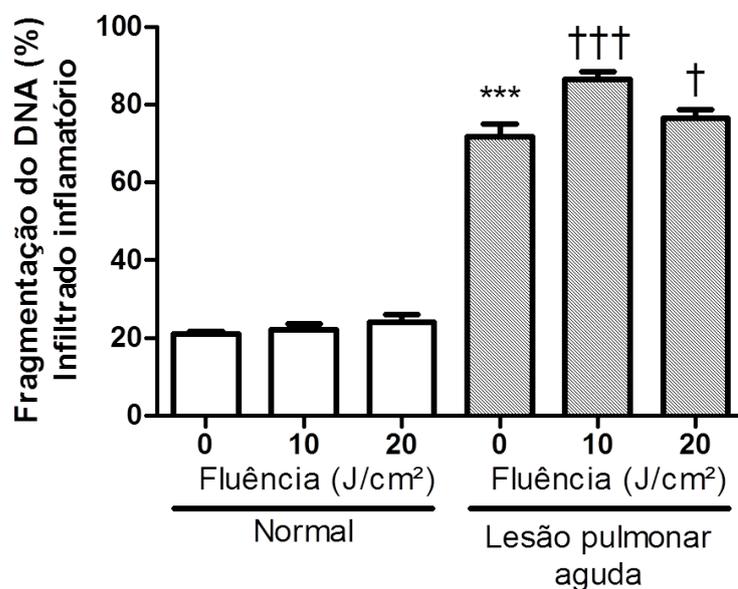
Legenda: Grupos: Normal: C (controle), L10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), L20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda (LPA), LPA + L10 (LPA e *laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), LPA + L20 (LPA e *laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto). *laserlaserlaserlaser*GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (*) quando comparado com o grupo controle. (†) quando comparado com o grupo LPA. (***) p<0.001 e (†††) p<0.001. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

Os resultados apresentados na Figura 40 não sugerem alteração ($p>0,05$) da marcação positiva de células do tecido pulmonar de ratos normais expostos ao *laser* infravermelho em ambas as fluências avaliadas (10 e 20J/cm²) quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, após a indução da lesão pulmonar aguda, observou-se aumento significativo ($p<0,001$) da marcação positiva de células inflamatórias no tecido pulmonar de ratos *Wistar*.

Além disso, houve aumento significativo da marcação positiva em células inflamatórias no tecido pulmonar de ratos após a indução da LPA e exposição ao *laser* infravermelho nas fluências de 10 e 20J/cm² ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente) quando comparado ao grupo LPA não exposto ao *laser*.

Figura 40 – Porcentagem de fragmentação do DNA pela quantificação da marcação positiva de TUNEL POD no infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar de ratos *Wistar* após indução da LPA pela administração de LPS e exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência



Legenda: Grupos: Normal: C (controle), L10 (*laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), L20 (*laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto); Lesão pulmonar aguda (LPA), LPA + L10 (LPA e *laser* 10J/cm², 2J e 2 segundos por ponto), LPA + L20 (LPA e *laser* 20J/cm², 5J e 5 segundos por ponto). *laserlaserlaserlaser* GAPDH foi usado como gene padrão para a normalização e grupo LPA foi usado como segundo normalizador ($\Delta\Delta Ct$). (*) quando comparado com o grupo controle. (†) quando comparado com o grupo LPA. (***) p<0.001, (†) p<0.05 e (†††) p<0.001. LPA: lesão pulmonar aguda, LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: O autor, 2020.

4.3.2 Discussão

A fotobiomodulação é usada para o tratamento de algumas doenças, como as doenças inflamatórias (LIM et al., 2007, ARANY, 2016) por exemplo, com base em seu efeito bioestimulativo, sendo considerada uma abordagem segura e efetiva (ROLA et al., 2014).

Estudo relata efeito anti-inflamatório por modulação de RNAm de genes relacionados à resposta pró-inflamatória induzida pela exposição a *lasers* de baixa potência, que seria depende dos parâmetros da *laser*terapia, como a fluência (BORTONE et al., 2008). Além disso, a exposição ao *laser* de baixa potência pode induzir ou inibir a apoptose (DOS ANJOS et al., 2017).

Neutrófilos e células epiteliais são duas das principais células que sofrem apoptose na SDRA, e a apoptose de neutrófilos intra-alveolares foi relatada (LESUR et al., 2000; GALANI et al., 2010), bem como alterações estruturais no parênquima pulmonar devido à apoptose de pneumócitos (BARDALES et al., 1996; MARTINS et al., 2005). A *Caspase 3* e *Bcl-2* atuam sobre a indução e proteção de células apoptóticas, respectivamente (SHAMAS-DIN et al., 2013).

Nossos resultados sugerem aumento nos níveis relativos do RNAm de *Caspase 3* e aumento da fragmentação do DNA no tecido pulmonar de ratos *Wistar* após a indução da LPA pela sepse (Figuras 35A e 39). Por outro lado, os resultados apresentados na Figura 35B indicam redução dos níveis relativos do RNAm *Bcl-2* em animais submetidos às mesmas condições. O aumento da taxa de apoptose também pode estar relacionado à presença de células polimorfonucleares após a indução da sepse. Este tipo de célula possui um mecanismo adicional para a produção de radicais livres e pode ser mais sensível à exposição a *lasers* de baixa potência, induzindo processo de apoptose (HUANG et al., 2009). Nossos achados reforçam resultados de outro estudo que descreve a ação seletiva do *laser* infravermelho de baixa potência em diferentes tipos de células em modelo de inflamação em tendões (DOS ANJOS et al., 2017).

A fotobiomodulação resulta das mudanças nas reações bioquímicas e, em consequência, nas funções celulares após a absorção de fótons pela citocromo c oxidase, o que aumenta a síntese de ATP e os níveis de espécies reativas de oxigênio (KARU, 2010), além de regular positivamente genes de proliferação e morte celular (KARU, 2008).

Nossos resultados não sugeriram mudanças nos níveis relativos do RNAm de *Caspase 3* e *Bcl-2* após exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em animais normais (Figuras 36 e 37). No entanto, em animais afetados pela LPA, há redução nos níveis de RNAm de *Caspase 3* e aumento do RNAm de *Bcl-2* após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência. É possível que os níveis de RNAm de *Caspase 3* já tenham diminuído e as células PMN estejam no processo de apoptose.

De fato, a taxa de fragmentação do DNA na área de inflamação é aumentada nesses animais (Figura 39). Além disso, esses achados podem indicar efeito anti-inflamatório dos *lasers* de baixa potência. Assim, os níveis de RNAm de *Bcl-2* aumentando poderiam ser detectados e isso poderia ser atribuído ao outro tipo de célula. De fato, outros autores relataram redução de processo inflamatório (SILVEIRA et al., 2016) e aumento dos níveis do RNAm de *Bcl-2* após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência (DOS ANJOS et

al., 2017), sugerindo que a apoptose faz parte do efeito anti-inflamatório da fotobiomodulação.

Outros autores relataram redução de apoptose induzida por TNF- α /cicloheximida em células endoteliais expostas a *laser* vermelho de baixa potência (CHU et al., 2017). Além disso, a fotobiomodulação ativa NF-Kb, que poderia induzir proteção contra estresse oxidativo e apoptose mediada pela Caspase 3, que ocorre após a perda auditiva induzida por ruído induzida pela exposição dos ouvidos ao *laser* infravermelho de baixa potência (TAMURA et al., 2016).

A partir da absorção do feixe *laser* por fotoacceptores nas mitocôndrias, com modulação subsequente do potencial redox, fatores de transcrição, como NF-kB, poderiam ser induzidos e atuar sobre genes alvo de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, por exemplo. Além disso, a aceleração na síntese de proteínas reguladoras do DNA, do RNA e do ciclo celular culminaria na promoção da proliferação celular e na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que poderiam participar, como segundos mensageiros, nas vias de sinalização celular (SHINGYOCHI et al., 2017) ou reagir com o DNA causando danos no nível sub-letais (FONSECA et al., 2010; SCHULZ et al., 2014).

Lesões no DNA podem ser detectadas pela marcação das zonas hidroxilo-terminais 3' recorrendo a nucleotídeos modificados numa reação enzimática pela TdT (*deoxynucleotidyl transferase*) que cataliza, sem necessidade de uma cadeia de molde, a polimerização de desoxiribonucleotídeos nas zonas 3', mediada pelos dUTP marcados (TUNEL) (HEATWOLE, 1999). Essa fragmentação de DNA foi relacionada com o estresse oxidativo (LOPES et al., 1998) e estudo com fibroblastos humanos expostos ao peróxido de hidrogênio mostram a condensação de cromatina, alterações no potencial da membrana mitocondrial e aumento da fragmentação do DNA detectada por TUNEL (FORMICHI et al., 2006).

Nossos resultados obtidos pela técnica do TUNEL sugerem aumento da fragmentação do DNA em células alveolares do tecido pulmonar afetadas pela LPA induzida pela sepse. No entanto, após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência há redução da fragmentação do DNA (Figura 40), principalmente na fluência mais alta (20J/cm²). Nossos resultados sugerem efeitos anti-inflamatórios nas fluências avaliadas, acelerando a morte das células PMN e protegendo as células alveolares.

Além disso, na maior fluência, a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência tende a acelerar a resolução do processo inflamatório. De fato, alguns estudos têm demonstrado a importância da morte de células polimorfonucleares pela apoptose em doenças

inflamatórias, já que isto marca o início da fase de resolução da inflamação (AIMBIRE et al., 2008; KEBIR ; FILEP, 2010; MIRANDA DA SILVA et al., 2015).

CONCLUSÕES

No desenvolvimento da LPA, o processo inflamatório é intenso, resultando em estresse oxidativo mediado por radicais livres no pulmão e nas células do sistema imunológico, causando danos na molécula de DNA. Apesar de poucos estudos terem avaliado os danos oxidativos na LPA, o reparo do DNA desempenha um papel crucial na adaptação a condições prejudiciais, respostas celulares e reparo tecidual. De fato, as vias REB e REN são sugestivas para permitir que as células pulmonares ou adjacentes sobrevivam ao estresse oxidativo através do reparo eficaz dos danos no DNA. Além disso, essas vias estão intimamente ligadas, como conexões regulatórias entre elas e genes que codificam proteínas envolvidas no reparo do DNA poderiam ser modulados terapêuticamente. Assim, as vias de reparo envolvidas na integridade do DNA poderiam ser consideradas alvos para o desenvolvimento de novas terapias para reduzir a morbimortalidade dos pacientes com LPA.

Tomados em conjunto, nossa pesquisa mostra que a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência melhora o parênquima pulmonar em ratos *Wistar* afetados pela lesão pulmonar aguda, aumentando o espaço aéreo e reduzindo a parede do septo interalveolar, o que poderia melhorar a função respiratória e conseqüentemente poderia ser uma abordagem alternativa para o tratamento de lesão pulmonar inflamatória. Este efeito poderia estar relacionado à modulação de vias de reparo do DNA, uma vez que neste trabalho foi verificada alteração dos níveis do RNAm de genes relacionados ao reparo por excisão de bases e nucleotídeos, sugerindo que o reparo do DNA faz parte da resposta celular à sepse e que a exposição a *lasers* de baixa potência pode modular os níveis de RNAm desses genes no tecido pulmonar. Além disso, os efeitos do *laser* infravermelho no tecido pulmonar afetado pela LPA poderia envolver a modulação do processo apoptótico, pois é capaz de alterar os níveis relativos de RNAm de genes envolvidos neste processo e causar fragmentação do DNA em células inflamatórias e alveolares após a LPA, bem como ação seletiva no processo apoptótico em células inflamatórias, o que poderia ser parte do efeito anti-inflamatório induzido por *lasers* de baixa potência.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L.A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review, **Vet. World**, v. 11, p.627–635, 2018.
- AEFFNER, F. et al. Postinfection A77-1726 treatment improves cardiopulmonary function in H1N1 influenza-infected mice, **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v. 47, p. 543–551, 2012.
- AHEL, I. et al. Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins, **Nature**, v. 451, p.81–85, 2008.
- 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.
- AIMBIRE, F. et al. Low-level *laser* therapy decreases levels of lung neutrophils anti-apoptotic factors by a NF-kappaB dependent mechanism, **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 4, p.603-605, 2008.
- ALBERTINI, R. et al. Anti-inflammatory effects of low-level *laser* therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan- induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 89; 50–55, 2007.
- ALEXANDER, A. et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. **Proceeding of National Academy of Science of the United State of America**, v. 107, p.4153-4158, 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.
- ALONSO DE VEJA, J. M. et al. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 8, p.1782-1786, 2002.
- ANDRES, S. N. et al. Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, p.1-21, 2015.
- ARANY, P. R. Craniofacial wound healing with photobiomodulation therapy: new insights and current challenges, **Journal of Dentistry Research**, v. 95, n. 9, p.977-984, 2016.
- ARTIGAS, A. et al. The American-European consensus conference on ARDS, Part 2. **Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 4, p.378-398, 1998.
- ASSIS, L. et al. Low-level *laser* therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 3, p.947–955, 2013.
- AUGUSTINE, T.; MAITRA, R.; GOEL, S. Telomere length regulation through epidermal growth factor receptor signaling in cancer. **Genes Cancer**, v.8, p.550-558, 2017.

- BAGNATO, V. S. *Laser: e suas Aplicações em Ciências e Tecnologia*. São Paulo: Livraria da Física, 2008. 88 p.
- BAKKENIIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and nuclear dissociation. **Nature**, v. 692, p. 499-506, 2003.
- BALLARD-CROFT, C. et al. Large-Animal Models of Acute Respiratory Distress Syndrome, **Ann. Thorac. Surg.** v.93, p.1331-1339, 2012.
- BANNERED, A.; GERONDAKIS, S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system, **Immunol. Cell Biol.** v. 85, p. 420–424, 2007.
- BARAN, C. P. et al. The role of ROS and RNS in regulating life and death of blood monocytes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 8, p.855–866, 2004.
- BARBER, R. D. et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues, **Physiology Genomics**, v. 21, n.3, p.398-395, 2005.
- BARBOSA, L. L. et al. Low-intensity red and infrared *laser* effects at high fluences on *Escherichia coli* cultures. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 10, p. 945-952, 2015.
- BARDALES, R. H. et al. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury, **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 3, p. 845-852, 1996.
- BARKER, G.F. et al. DNA damage induced by hyperoxia: quantitation and correlation with lung injury, **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v.35, p.277-288, 2006.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J.; Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods in Molecular Biology**, v. 1170, p. 29-40, 2014.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, n. 8-9, p. 1109-1115, 2004.
- BASTARACHE, J.A.; BLACKWELL, T.S. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome, **Dis. Model Mech.** v.2, p.218–223, 2009.
- BAXTER, G D. **Therapeutic Lasers: Theory and Practice**. New York: Churchill Livingstone, 1994. 259 p.
- BELONCHE, F. et al. Update in acute lung injury and mechanical ventilation, **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.198, p.1187-1193, 2014.
- BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, n. 3, p. 818, 1994.

BERRA, C.M. et al. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. **Free Radic. Biol. Med.** v.61, p. 343-356, 2013.

BERRIER, A.L. YAMADA, K.M. Cell-matrix adhesion, **J. Cell. Physiol.** v.213, p. 565-573, 2008.

BERTOLOTI, 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, 1983, p. 63-69.

BERTRAND, P. et al. Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair, **Proc. Natl. Acad. U.S.A.**, v.95, p. 14278-14283, 1998.

BESSON, A.; DOWDY, S. F.; ROBERTS, J. M. CDK Inhibitors: Cell cycle regulators and beyond. **Developmental Cell**, v. 14, p. 159-169, 2008.

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.

BOITEUX, S.; COSTE, F.; CASTING, B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p.179-201, 2016.

BORELLI, E. et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 3, p. 392-397, 1996.

BORTONE, F. et al. Low level *laser* therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation, **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p.206-210, 2008.

BOSCHI, E. S. **Efeito antiinflamatório da terapia laser da baixa potência (660nm) na pleurisia em ratos.** 2008. 35f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2008.

BRANDMAIER, A.; HOU, S. Q.; SHEN, W. H. Cell cycle control by PTEN. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, p. 2265-2277, 2017.

BRANZEI, D.; FOINAI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature Review Molecular and Cellular Biology**, v. 9, p. 297-308, 2008.

BRIDGE, G.; RASHID, S.; MARTINS, S.A. DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. **Cancers (Basel)**. v.6, p.1597-1614, 2014.

BRIGHAM, K.L. Role of free radicals in lung injury. **Chest**, v.89, p.859–863, 1986.

BROSH, R.; ROTTER, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. **Nature Review Cancer**, v. 9, p.701-713, 2009.

- BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute lung injury: a clinical and molecular review. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 140, n. 4, p. 345-350, 2016.
- BYRNES, K. R. et al. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 3, p.171-185, 2005.
- CADET, J. et al. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. **Mutation Research**, v. 462, n. 2-3, p.121-128, 2000.
- CALDECOTT, K.W. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair (Amst)**, v.2 p.955-969, 2003.
- CANUTO, K. S. et al. DNA repair in bacterial cultures and plasmid DNA exposed to infrared *laser* for treatment of pain. **Laser Physics Letters**, v. 10, p.065606, 2013.
- CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. **Antioxidant Redox Signal**, v. 21, n. 3, p.396-413, 2014.
- CARDOSO, E. M. et al. Acute respiratory distress syndrome in cancer patients: Epidemiology, risk factors, and outcomes. **J. Crit. Care**. v. 23, p. 30-40, 2018.
- CHAN, T. A. et al. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. **Genes Developmental**, v. 14, p.1584-1588, 2000.
- CHEN, A. H. et al. Low-Level *Laser* Therapy Activates NF-kB via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p.e22453, 2011.
- CHENG, L. et al. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 8, p. 1527-1530, 2000.
- CHENG, Q.; CHEN, J. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage, **Cell cycle**, v. 9, p.472-478, 2010.
- CHOI, S.H. et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake, **Circ. Res.** v.104, p.1355-1363, 2009.
- CHOW, C.W. et al. Oxidative stress and acute lung injury, **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v.29, p. 427-431, 2003.
- CHU, Y. H. et al. Low-level *laser* therapy prevents endothelial cells from TNF- α /cycloheximide-induced apoptosis, **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 2, p.279-286, 2018.
- CHUNG, K.F.; MARWICK, J.A. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Annals of The Lyceum of Natural History of New York**, v. 1203, p.85-91, 2010.
- CLANCY, S. DNA damage ; repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v.1, p.103, 2008.

COLLINS, A.R. et al. DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. **Faseb J.** v.12, p.1397–1400, 1998.

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

COWLEY, H. C. et al. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 7, p.1179-1183, 1996.

CZAIKOSKI, P. G. et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p.e0148142, 2016.

da SILVA, C. M. et al. Low Level *Laser* Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p.e0142816, 2015.

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 em Periodontia) - Curso de Pós-graduação em Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

de LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes ; Development**, v. 19, n. 18, p.2100-2110, 2005.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol.**, v.19, p.198–208, 2011.

DELONGUI, F. et al. Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 2, p.349-356, 2011.

DERHEIMER, F. A.; KASTAN, M. B. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. **FESBS Letters**, v. 584, p.3675-3681, 2010.

DEWEESE, T.L. et al. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p.11915-11920, 1998.

DEXHEIMER, T. S. DNA repair pathways and mechanisms. In: MATTHEWS, L. A.; CABARCAS, S. M.; HURT, E. M. (Ed.). **DNA Repair of Cancer Stem Cells.** Netherlands: Springer, 2013. p. 19–32.

DIANOV, G.L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel, **Nucleic Acids. Res.** v.41, p. 3483-3490, 2013.

DONATE, L. E.; BLASCO, M. A. Telomeres in cancer and ageing. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Serie B Biological Science**, v. 366, n. 1561, p.76–84, 2011.

- DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level *laser* in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. ***Lasers in Medical Science***, v. 32, n. 5, p.975-983, 2017.
- DUNSMORE, S. E.; RANNELS, D. E. Extracellular matrix biology in the lung. ***American Journal of Physiology***, v. 270, n. 1, p.L3-L27, 1996.
- DURHAM, A. L.; ADCOCK, I. M. The relationship between COPD and lung cancer. ***Lung Cancer***, v. 90, n. 2, p.121–127, 2015.
- DZANTIEV, L. et al. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision, ***Mol. Cell***. v.15, p.31-41, 2004.
- EDUARDO, F. P. et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity *laser*. ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 39, n. 4, p.365-372, 2007.
- ELICKER, B. M. et al. Imaging of acute lung injury. ***Radiologic clinics of North America***, v. 54, n. 6, p.1119-1132, 2016.
- EL-KHAMISY, S. F. et al. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. ***Nucleic Acids Research***, v. 31, n. 19, p.5526–5533, 2003.
- ENWEMEKA. C. S. Intricacies of dose in *laser* phototherapy for tissue repair and pain relief. ***Photomedicine and Laser Surgery***, v.27, n.3, p.387-393, Jun.2009.
- FAN, W.; LUO, J. SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. ***Molecular Cell***, v. 39, n. 2, p.247–258, 2010.
- FANELLI, V. et al. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options, ***J. Thorac. Dis.*** v.5, p.326-334, 2013.
- FEIN, A. M.; CALALANG-COLLUCI, M. G. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock. ***Critical Care Clinics***, v. 16, n. 2, p.289-317, 2000.
- FONSECA, A. S. et al. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared *laser*. ***Laser in Medical Science***, v. 28, n. 4, p.1077-1084, 2013.
- FONSECA, A. S., et al. Effect of *laser* therapy on DNA damage. ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 42, n. 6, p.481–488, 2010.
- FONSECA, A. S. et al. Nucleotide excision repair pathway assessment in DNA exposed to low-intensity red and infrared *lasers*. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 48, p.929-938, 2015a.
- FONSECA, A. S. et al. Low intensity infrared *laser* affects expression of oxidative DNA repair genes in mitochondria and nucleus. ***Laser Physics***, v. 24, p.115605, 2014.

- FONSECA, A. S. et al. Low intensity infrared *laser* induces filamentation in *Escherichia coli* cells. **Laser Physics**, v. 21, p.1829-1837, 2011.
- FONSECA, A. S. et al. Low Intensity Infrared *Laser* Effects on *Escherichia coli* Cultures and Plasmid DNA. **Laser Physics**, v. 22, p.1635-1641, 2012.
- FORMICHI, P. et al. Human fibroblasts undergo oxidative stress-induced apoptosis without internucleosomal DNA fragmentation, **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, n. 2, p.289-297, 2006.
- FRIEDBERG, E. L. C. et al. **DNA repair and mutagenesis**. 2. ed. Washington: American Society For Microbiology, 2006. 1118 p.
- FU, H. et al. Calcitonin gene-related peptide protects type II alveolar epithelial cells from hyperoxia-induced DNA damage and cell death. **Exp Ther Med**. v. 13, p. 1279-1284, 2017.
- GAJJAR, M. et al. The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls MDM2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. **Cancer Cell**, v. 21, p.25-35, 2012.
- GALANI, V. et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review, **Pathology Research and Practice**, v. 206, n. 3, p.145-150, 2010.
- GALATI, A. et al TRF1 and TRF2 binding to telomeres is modulated by nucleosomal organization. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 12, p.5824–5837, 2015.
- 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.
- GARCEZ, A. S., NUNES, S. C., RIBEIRO, M. S. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2012. p. 14-27.
- GBD. Mortality and Causes of Death Collaborators, Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v.388, n. 10053, p.1459–1544, 2015.
- GIACOMO, P. D. et al. Low Level *Laser* Therapy: *laser* radiation absorption in biological tissues. **Applied Physics A**, v. 112, n. 1, p.71-75, 2013.
- GIRAUD-PANIS, et al. One identity or more for telomeres? **Frontier Oncology**, v. 3 p.48, 2013.
- GOBBINI, E. et al. Telomere uncapping at the crossroad between cell cycle arrest and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Oncology**, v.1, p.e29901, 2014.
- GOLLOSHI, R.; SANDERS, J. T.; McCORD, R. P. Genome organization during the cell cycle: unity in division. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**. p. e1389, 2017.

GOODE, H. F. et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 4, p.646-651, 1995.

GU, Y. et al. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6, **The J. Biol. Chem.** v.277, p.11135-11142, 2002.

GUEDES, L. A. et al. Tp53 and ATM mRNA expression in skin and skeletal muscle after low-level *laser* exposure. **Journal of Cosmetic Laser Therapy**, v. 19, n. 3, p.227-231, 2017.

GUERREIRO, M. O. et al. Plasma superoxide dismutase activity and mortality in septic patients (corrected). **Journal of Trauma**, v. 69, n. 6, p. E102-E106, 2010.

GUO, C.; SUN, L.; CHEN, X.; ZHANG, D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 21, p.2003–2014, 2013.

GUO, S. et al. Regulation of replication protein A functions in mismatch repair by phosphorylation, **J. Biol. Chem.** v.281, p.21607-21616, 2006.

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

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

HANAOKA, S.; NAGADOI, A.; NISHIMURA, Y. Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. **Protein Science**, v. 14, n. 1, p.119–130, 2005.

HASHIZUME, M. et al. Mitochondrial-targeted DNA repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 protects against ventilator-induced lung injury in intact mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 304, n. 4, p.287-297, 2013.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. The role of *laser* fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon *laser* irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 1, p.74-83, 2006.

HAZRA, T.K. et al. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n.4, p.470–480, 2007.

HE, B.; LU, N.; ZHOU, Z. Cellular and Nuclear Degradation during Apoptosis. **Current Opinion in Cellular Biology**, v. 21, p.900–912, 2009.

HEATWOLE, V. M. TUNEL assay for apoptotic cells, **Methods Molecular Biology**, v. 115, p.141-148, 1999.

- HEMVANI, N. et al. In vitro effect of nitrogen and He-Ne *laser* on the apoptosis of human polymorphonuclear cells from burn cases and healthy volunteers. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 5, p.476-479, 2005.
- HENDERSON, T. A.; MORRIES, L. D. Near-infrared photonic energy penetration: can infrared phototherapy effectively reach the human brain? **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 11, p.2191-2208, 2015.
- HINDS, P. H. et al. Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, p.2863-2869, 1987.
- HIYAMA, E.; HIYAMA, K. Telomere and telomerase in stem cells. **Brazilian Journal of Cancer**, v. 96, p.1020-1024, 2007.
- HOESEL, L. M. et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. **Shock**, v. 24, n. 1, p.40-47, 2005.
- HOLMES, C. L.; RUSSEL, J. A.; WALLEY, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, v. 124, n. 2, p.1103-1115, 2003.
- HORIKAWA, I.; FUJITA, K.; HARRIS, C. C. p53 governs telomere regulation feedback too, via TRF2, **Ageing (Albany NY)**, v. 3, n.1, p.26-32, 2011.
- HSIEH, P.; YAMANE, K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and aging, **Mech. Ageing Dev.** v.129, p.391-407, 2009.
- HU, Y. et al. Protective effect of TM6 on LPS-induced acute lung injury in mice. **Scientific Reports**, v. 572, n. 7, 2017.
- 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, 2011.
- HUANG, Y. Y., HAMBLIN, M. R. Mecanismos da terapia *laser* de baixa potência. In: GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; NÚÑEZ, S. C. (Org.). **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012. p27-43
- HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p.358-383, 2009.
- HUDSON, D. E. et al. Penetration of *Laser* Light at 808 and 980 nm in Bovine Tissue Samples. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 31, n. 4, 2013.
- IRRCHEER, I.; LJUBICIC, V.; HOOD, D. A. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. **American Journal Physiology. Cellular Physiology**, v. 296, n. 1, p.C116-C123, 2009.

JOENSEN, J. et al. Skin Penetration Time-Profiles for Continuous 810 nm and Superpulsed 904 nm *Lasers* in a Rat Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 12, 2012.

KABE, Y. et al. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxidant Redox Signal**, v. 7, n. 3–4, p.395–403, 2005.

KABIR, K. et al. Characterization of a murine modelo f endotoxin-induced acute lung injury. **Shock**, v. 17, n. 4, p.300-303, 2002.

KANEHISA LABORATORIES. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2020.
Disponível em: <<https://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 14 de jan. de 2020.

KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation, **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 5, p.1091-1099, 2008.

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

KARU, T. I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation, **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 62, n.8, p.607-610, 2010.

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

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

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

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p.316-323, 2004.

KEBIR, D. E.; FILEP, J. G. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation, **Scientific World Journal**, v.10, p.1731-1748, 2010.

KLUNGLAND, A., BJELLAND, S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 4, p. 481–488, 2007.

KNUDSEN, L. et al. Ultrastructural changes of the intracellular surfactant pool in a rat model of lung transplantation-related events. **Respiratory Research**, v. 12, p.79, 2011.

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, 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, 2003.

KRASIKOVA, Y. S. et al. Interaction of nucleotide excision repair factors XPC-HR23B, XPA, and RPA with damaged DNA. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 73, n. 8, p.886–896, 2008.

KROKAN, H. E.; BJORAS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p.a012583, 2013.

KUNKEL, T.A.; ERIE, D.A. DNA mismatch repair, **Annu. Rev. Biochem.** v.74, p.681-710, 2005.

LAHUE, R.S.; AU, K.G.; MODRICH, P. DNA mismatch correction in a defined system, **Science**, v.245, p.160-164, 1989.

LANE, D. P. Cancer: p53, guardian of the genome. **Nature**. v. 358, p.15-16, 1992.

LAVIN, M. F.; GUEVEN, N. The complexity of p53 stabilization and activation. **Cell death differ**, v.13, p.941-950, 2006.

LEE, Y.L. et al. Mitochondrial DNA Damage Initiates Acute Lung Injury and Multi-Organ System Failure Evoked in Rats by Intra-Tracheal Pseudomonas Aeruginosa. **Shock**, v.48, p.54-60, 2017.

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

LESUR, O. et al. Interleukin-2 involvement in early acute respiratory distress syndrome: relationship with polymorphonuclear neutrophil apoptosis and patient survival, **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 12, p.3814-3822, 2000.

LIMA, F. M. et al. Dual Effect of low-level *laser* therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 5, p.410-420, 2011.

LIN, Y. et al. DNA Repair Interacts with autophagy to regulate inflammatory responses to pulmonary hyperoxia, **J. Immunol.** v.198, p.2844-2853, 2017.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, p.709-715, 1993.

LINDSEY-BOLTZ, L.A. et al. In vitro analysis of the role of replication protein A (RPA) and RPA phosphorylation in ATR-mediated checkpoint signaling, **J. Biol. Chem**, v.19, p.36123-36131, 2012.

LIU, F.; LI, W. et al. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats: comparative assessment of intratracheal instillation and aerosol inhalation, **Toxicology**, v.8, p.158-166, 2013.

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, 2001.

LOMBARD, D. B. et al. DNA repair, genome stability, and aging. **Cell**, v.120, p.497-512, 2005.

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

LOPES, S. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproductive**, v. 13, n. 4, p.896-900, 1998.

MALINS, D.C. et al. Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer, **Cancer Res.** v.61, p.6025–6028, 2001.

MALUMBRES, M. BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Review Cancer**. v. 9, p.153-166, 2009.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p.469-486, 2003.

MARCIANO, R. S. *Laser for treatment of aphthous ulcers on bactéria cultures and DNA*, **Photochemical and Photobiological Science**, v. 11, p.1476-1483, 2012.

MARTIGNANO, 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. **Laser in Medical Science**, v. 30, n. 1, p.203-208, 2015.

MARTINS, T. R. et al. Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 3, p.214-220, 2005.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annuals reviews of Pathology**, v. 6, p.147-163, 2011.

MATTHAY, M. A.; ZIMMERMAN, G. A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades os inquiry into pathogenesis and rational management. **American Journal of Respiratory Cellular and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p.319-327, 2005.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p.L379-L399, 2008.

MAZUREK, A. et al. Sequence context effect for hMSH2-hMSH6 mismatch-dependent activation, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.106, p.4177-4182, 2009.

McNICHOLASA, B.A.; ROONEYB, G.M.; LAFFEYB, J.G. Lessons to learn from epidemiologic studies in ARDS, **Curr Opin Crit Care**. v.24, p.41-48, 2018.

MEEK, D. The p53 response to DNA damage. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, p.1049-1056, 2004.

MELIS, J.P.; VAN STEEG, H.; LUIJTEN, M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. **Antioxid. Redox. Signal.** v.18, p.2409-2419, 2013.

MERCAT, A. et al. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 299, n. 6, p.646-655, 2008.

MESQUITA-FERRARI, R. A. et al. Low-level *laser* irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells during the differentiation process. **Laser in Medical Science**, v. 30, n. 8, p.2209-2213, 2015.

MEYER, N. J. Beyond SNPs—genetics, genomics and other ‘omic approaches to ARDS. **Clin Chest Med.** v. 4, p. 673–684, 2014.

MIRANDA DA SILVA, C. et al. Low level *laser* therapy reduces the development of lung inflammation induced by formaldehyde exposure. **PLoS one**, v. 10, n.11, p.e0142816, 2015.

MITCHEL, J. R.; HOEIJMAKERS, J. H.; NIEDERNHOFER, L. J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Current Opinion in Cellular Biology**, v. 15, n. 2, p.232–240, 2003.

MORGAN, M. C.; RASHID, R. M. The effect of phototherapy on neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 383-388, 2009.

MÓROCZ, M. et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer’s disease, **Neurobiol. Aging.**, v.23, p.47–53, 2002.

MÜHFELD, C.; OCHS, M. Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various diseases of the respiratory tract. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 3, p.L205-L221, 2013.

MUÑOZ, P.; BLANCO, R.; BLASCO, M. A. Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing. **Cell Cycle**, v. 5, n. 7, p.718–721, 2006.

NACCARATO, A. et al. Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. **Mutagenesis**, v. 27, p.211-218, 2012.

NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p.199–210, 2011.

NEWTON, A.C.; BOOTMAN, M.D.; SCOTT, J.D. Second messengers. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v. 8, n. 8, p.a005926, 2016.

NI, T.; MARSISCHKY, G.T.; KOLODNER, R.D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. **Mol. Cell.** v.4, p.439-444, 1999.

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

NOLL, D.M.; MILLER, P.S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA, **Chem. Rev.** v.106, p.277-301, 2006.

O'CONNOR, M. S. et al. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in highorder telomeric complex assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 103, n. 32, p.11874–11879, 2006.

OLIVEIRA J. R. et al. Low level *laser* therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. **Journal of Photochemistry and Photobiological B: Biology**, v. 134, p.57-63, 2014.

OREN, M.; ROTTER, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**, v. 2, p.a001107, 2010.

O'SHEA, D. C. et al. **Introduction to lasers and their applications**. California: Addison-Wesley Publishing Company, 1977. 276 p.

PANTANO, C. et al. Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappa B signaling pathway. **Antioxidant Redox Signal**, v. 8, n. 9–10, p.1791–1806, 2006.

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

PERON, J. P. S. et al. Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level *Laser* Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke–Induced COPD in C57BL/6 mice. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p.e0136942, 2015.

PETERMANN, E.; ZIELER, M.; OEI, S. L. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. **DNA Repair (Amst)**, 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.

PICCO, V. et al. ERK1/MAPK pathway-dependent regulation of the telomeric factor TRF2. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p.46615–46627, 2016.

PIETSCH, E. C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M. E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v. 25, p.1602-1611, 2006.

PODLUTSKY, A.J. et al. Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. **EMBO J.**, v.20, p.1477–1482, 2001.

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

PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia**, v. 2, n. 4, p.291-299, 2000.

QUOILIN, C. et al. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. **Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics**, v.1837, n. 10, p.1790-1800, 2014.

RABELO, M.A.E. et al. Acute Lung Injury in Response to Intratracheal Instillation of Lipopolysaccharide in an Animal Model of Emphysema Induced by Elastase. **Inflammation**, v.41, p.174–182, 2018.

RAETZ, C.R. et al. Nathan, Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction, **Faseb J.** v.5, p.2652-2660, 1991.

RAGALLER, M.; RICHTER, T. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Journal of Emergencies, Trauma and Shock**, v. 3, n. 1, p. 43-51, 2010.

RANIERI, V. et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition. **Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, p.2526-2533, 2012.

REMICK, D. G. Pathophysiology of sepsis. **American Journal of Pathology**, New York, v. 170, n. 5, p. 1435-1444, 2007.

REPMAN, S. OLIVEIRA-HARRIS, M.; JIRICNY, J. Influence of oxidized purine processing on strand 27 directionality of mismatch repair. **J. Biol. Chem.** v.290, p.9986-9999, 2015.

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.

RINALDO, J.E. Mediation of ARDS by leukocytes: clinical evidence and implications for therapy. **Chest**, v.89, p.590–593, 1986.

RITTIRSCH, D. et al. Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide Is Independent of Complement Activation. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p.7664-7672, 2008.

ROCCO, P. R. M.; ZIN, W. A. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? **Current Opinion in Critical Care**, v. 11, n. 1, p.10-17, 2005.

ROCHETTE, P.J. et al. Human cells bearing homozygous mutations in the DNA mismatch repair genes hMLH1 or hMSH2 are fully proficient in transcription-coupled nucleotide excision repair. **Oncogene**, v.21, p.5743-5752, 2002.

RODE, L. et al. Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46.396 individuals. **Thorax**, v. 68, n. 5, p.429–435, 2016.

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

ROLA, P.; DOROSZKO, A.; DERKACZ, A. The Use of Low-Level Energy *Laser* Radiation in Basic and Clinical Research, **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 5, p.835-842, 2014.

ROOS, C. et al. The effects of a low-intensity red *laser* on bacterial growth, filamentation and plasmid DNA, **Laser Physics**. v.23, p.075602, 2013

ROSA, A. S. 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.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p.1685-1693, 2005.

RUBENFELD, G. D.; HERRIDGE, M. S. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. **Chest**, v. 131, n. 2, p.554-562, 2007.

RUCHKO, M. et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidant-challenged lung endothelial cells, **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.** v.288, p.L530-535, 2005.

RUCHLO, M. V. et al. The DNA glycosylase, Ogg1, defends against oxidant-induced mtDNA damage and apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 9, p.1107-1113, 2011.

SALZANO, S. et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 111, n. 33, p.12157–12162, 2014.

SANCAR, A; REARDON, J T. Nucleotide Excision Repair in E. Coli and Man. **Advances In Protein Chemistry**, v. 69, p.43-71, 2004.

SARKELE, M. et al. The Activity of Oxidative Stress Markers in Acute Respiratory Distress Syndrome. **Proceedings of the Latvian Academy of Science**, v. 68, n. 5-6, p.1-11, 2014.

SARKELE, M. Et al. The role of oxidative stress markers in acute respiratory distress syndrome. **Acta Chirurgica Latviensis**, v. 13, n. 2, p.22-26, 2013.

SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene**, v. 28, p.2925- 2939, 2009.

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.

SCHARER, O. D. Nucleotide excision repair in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**, v. 5, n. 10, p.a012609, 2013.

SCHAUR, R. J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. **Molecular Aspects Medicine**, v. 24, n. 4–5, p.149–159, 2003.

SCHULZ, E. et al. Mitochondrial redox signaling: interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress, **Antioxidant and Redox Signaling**, v. 20, n. 2, p.308-324, 2014.

SERGIO, L. P. S. et al. Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red *Laser*. **Journal of Clinic Experimental Dermatology Research**, v. 3,p.166, 2013.

SERGIO, L. P. S. et al. Therapeutic low-intensity red *laser* for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 12, p.930-935, 2013.

SERGIO, L.P.S et al. Low-power *laser* alters mRNA levels from DNA repair genes in acute lung injury induced by sepsis in Wistar rats. **Lasers Med. Sci.** v.43, p.157-168, 2019.

SERGIO, L.P.S. et al. Low-intensity red and infrared *lasers* affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 3, p.429-435, 2016.

SETHI, S.; MURPHY, T.F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. **New England Journal Medicine**, v. 359, n. 22, p.2355–2365, 2008.

SETLOW, R.; CARRIER, W. L. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error correcting mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, p.226. 1964.

SHACKELFORD, R. E. et al. The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p.21951- 21959, 2001.

SHAMAS-DIN, A. et al. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p.a008714, 2013.

SHAMMAS, M. A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 1, p.28–34, 2011.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, p.349-353, 2011.

SHELBY, C. P. Mfd Protein and transcription-repair coupling in *Escherichia coli*, **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, p.280-295, 2017.

SHELL, S.S.; PUTNAM, C.D.; KOLODNER, R.D. The N terminus of *Saccharomyces cerevisiae* Msh6 is an unstructured tether to PCNA, **Mol. Cell**. v.26, p.565-578, 2007.

SHI, D.; GU, W. Dual roles of MDM2 in the regulation of p53: Ubiquitination dependent and ubiquitination independent mechanisms of MDM2 repression of p53 activity. **Genes Cancer**, v. 3, p.240-248, 2012.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nature Review Cancer**, v. 3, p.155-168, 2003.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nature Review Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p.197-210, 2013.

SHINGYOCHI, Y. et al. A Low-Level Carbon Dioxide *Laser* Promotes Fibroblast Proliferation and Migration through Activation of Akt, ERK, and JNK. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p.e0168937, 2017.

SILVA, D. F. T., ALMEIDA-LOPES, L., RIBEIRO, M. S. Interação *Laser*-tecido biológico e princípios de dosimetria. In: NUNEZ, A. S. G. et al. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 14-26.

SILVEIRA, P. C. et al. Effect of Low-power *laser* (LPL) and light-emitting diode (LED) on inflammatory response in burn wound healing. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p.1395-1404, 2016.

SIMMONS, J.D. et al. Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. **Ann. Surg.** v.258, p.591-598, 2013.

SIPAHI, E.Y.; ATALAY, F. Experimental Models of Acute Lung Injury. **J. Transl. Inter. Med.** v.2, p.154-159, 2015.

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, 2003.

SOUBANI, A. O. et al. The outcome of cancer patients with acute respiratory distress syndrome. **J. Crit. Care**, v. 29, p. 183.e7-183.e12, 2014.

STRIETER, R. M. et al. Host responses in mediating sepsis and adult respiratory distress syndrome. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 5, n. 3, p.233-247, 1990.

SUGASAWA, K. et al. Two-step recognition of DNA damage for mammalian nucleotide excision repair: Directional binding of the XPC complex and DNA strand scanning. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p.642-653, 2009.

SUN, S. et al. Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways. **PLoS One**. v.8, p.e59989, 2013.

SUN, W. et al. Endogenous expression pattern of resolvin D1 in a rat model of self-resolution of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p.247-253, 2014.

SVELTO, O.; HANNA, D. C. **Principles of Laser**. Plenum Press, New York, USA. 1998.

TAMURA, A. et al. Photobiomodulation rescues the cochlea from noise-induced hearing loss via upregulating nuclear factor κ B expression in rats. **Brain Research**, v. 1646, p.467-474, 2016.

TANAKA, K. I. et al. Preventive Effects of Carnosine on Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. **Scientific Reports**, v. 7, p.42813, 2017.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, p.1803-1815, 2001.

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.

TEUFEL D. P.; BYCROFT, M.; FERSHT, A. R. Regulation by phosphorylation of the relative affinities of the N-terminal transactivation domains of p53 for p300 domains and MDM2. **Oncogene**, v.28, p.2112-2118, 2009.

TIAN, F. et al. Transcranial *laser* stimulation improves human cerebral oxygenation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 48, n. 4, p.343-349, 2016.

TRAJANO, E. T. L. et al. Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red *laser*. **Laser in Medical Science**, v. 29, n. 6, p.1953-1957, 2014.

TRAJANO, E. T. L. et al Low-level red *laser* improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Laser in Medical Science**, v. 30, n.4, p.1297-1304, 2015.

TRAJANO, L. A. S. N. et al. Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared *laser*. **Laser in Medical Science**, v. 31, n. 5, p.841-848, 2016a.

TRAJANO, L.A.S.N. et al. Low-level *laser* irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts. **Laser Physics Letters**. v. 13, n. 7, p.075601, 2016b.

TRAJANO, L.A.S.N. et al. Photobiomodulation effects on mRNA levels from genomic and chromosome stabilization genes in injured muscle. **Lasers Med. Sci.**, v.33, p.1513-1519, 2018.

TRAYLOR, Z.P.; AEFNER, F.; DAVIS, I.C. Influenza A H1N1 induces declines in alveolar gas exchange in mice consistent with rapid post-infection progression from acute lung injury to ARDS. **Influenza Other Respir. Viruses**, v.7, p.472-479, 2013.

- TSUSHIMA, K. et al. Acute lung injury review. **International Medicine**, v. 48, n. 9, p. 621-630, 2009.
- VALAVANIDIS, A. et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. **International Journal of Environment Research and Public Health**, v. 10, n. 9, p.3886–3907, 2013.
- VAN LOON, B.; MARKKANEN, E.; HUÜBSCHER, U. Oxygen as a friend and enemy: how to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. **DNA Repair**, v. 9, n. 6, p.604–616, 2010.
- VICTOR, V. M. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 9, n. 4, p.376-389, 2009.
- VON ZGLINICKI, T. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends Biochemistry Science**, v. 27, n. 7, p.339–344, 2002.
- VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v. 137, p.413-431, 2009.
- VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P. p53 in health and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p.275-283, 2007.
- WAN, R.; MO, Y. et al. Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice. **Part. Fibre Toxicol.** v.14, p.13-38, 2017.
- WARE, L.B. Modeling human lung disease in animals. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v.294, p.L149–L150, 2008.
- WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **New England Journal Medicine**, v. 342, p.1334-1349, 2000.
- WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal of Cell Biology**, v. 30, n. 1, p.23, 1966.
- WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**, v. 369, n. 9572, p.1553–1564, 2007.
- WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature Review Cancer**, v. 9, p.95-107, 2009.
- WILLIS, J. et al. APE2 is required for ATR-Chk1 checkpoint activation in response to oxidative stress. **Proceeding of the National Academy of Science of The United State of America**, v. 110, p.10592- 10597, 2013.
- WILSON, M.R.et al. High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. **J. Appl. Physiol.** v.95, p.1385-1393, 2003.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal**, v. 313, n. Pt 1, p.17–29, 1996.

WOLTHUIS, E.K. et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. **Crit. Care**. v.13, p.R1, 2009.

WU, T. C. et al. Vitamin E and vitamin C supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **International Journal Vitamin Nutrient Research**, v. 77, n. 4, p.272–279, 2007.

YE, Y. et al. DNA Repair Interacts with Autophagy To Regulate Inflammatory Responses to Pulmonary Hyperoxia. **J. Immunol.** v. 198, p. 2844-2853, 2017.

YOUNG, M. *Óptica e Lasers*. São Paulo: EdUSP, São Paulo, 1998.

YUAN, F. et al. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.20935-20940, 2004.

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p.43500965, 2016.

ZHANG, Q. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v.464, p.104-107, 2010.

ZHAO, J. et al. Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks. **Nucleic Acids Res.**, v.37, p.4420-4429, 2009.

ZHAO, X. et al. Cell cycle-dependent control of homologous recombination. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 25, p.1-14, 2017.

ZHU, Q.; WANI, A. A. Nucleotide excision repair: finely tuned molecular orchestra of early pre-incision events. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 1, p.166–177, 2016.

APÊNDICE A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade
Federal de Juíz de Fora - UFJF, protocolo CEUA/012/2016



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 012/2016 – CEUA sobre “EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA NA LESÃO PULMONAR AGUDA APÓS SEPSE POR ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATOS WISTAR” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MAYCON DE MOURA REBOREDO com a colaboração de BRUNO DO VALLE PINHEIRO, FLÁVIA DE PAOLI, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, ADENILSON DE SOUZA DA FONSECA e LUIZ PHILIPPE DA SILVA SÉRGIO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 64 ratos Wistar (64 machos) de 90 dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 18/08/2016 a 27/07/2018.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 011/2016 – CEUA about “EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR” under responsibility of MAYCON DE MOURA REBOREDO and collaboration of BRUNO DO VALLE PINHEIRO, FLÁVIA DE PAOLI, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, ADENILSON DE SOUZA DA FONSECA and LUIZ PHILIPPE DA SILVA SÉRGIO is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. For the development of this research 64 Wistar rats (64 males) of 90 days of age, will be delivered as requested in the period of 18/08/2016 to 27/07/2018.

Juiz de Fora, 29 de julho de 2016

Coordenadora
CEUA

Vice-coordenadora
CEUA

APÊNDICE B – Artigos publicados correspondentes aos estudos apresentados nessa tese

1. SERGIO, L. P. S. et al. DNA repair and genomic stability in lungs affected by acute injury. **Biomed Pharmacother**, v. 119, p. 109412, 2019.
2. TRAJANO, L. A. S. N et al. Low power lasers on genomic stability. **J Photochem Photobiol B.**, v. 180, p. 186-197, 2018.
3. SERGIO, L. P. S. et al. Low power infrared laser modifies the morphology of lung affected with acute injury induced by sepsis. **Laser Physics**, v. 28, n. 6, 2018.
4. SERGIO, L. P. S. et al. Low-power laser alters mRNA levels from DNA repair genes in acute lung injury induced by sepsis in Wistar rats. **Lasers Med Sci.**, v. 34, n. 1, p.157-168, 2019.
5. SERGIO, L. P. S. et al. Photobiomodulation prevents DNA fragmentation of alveolar epithelial cells and alters the mRNA levels of caspase 3 and Bcl-2 genes in acute lung injury. **Photochem Photobiol Sci.**, v. 17, n. 7, p. 975-983, 2018.

APÊNDICE C – Artigos publicados correspondentes aos demais estudos realizados durante o período de curso

1. SERGIO, L. P. S. et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: From Injury to Genomic Stability. **COPD**, v. 14, n. 4, p. 439-450, 2017.
2. SERGIO, L. P. S. et al. Emphysema induced by elastase alters the mRNA relative levels from DNA repair genes in acute lung injury in response to sepsis induced by lipopolysaccharide administration in Wistar rats. **Exp Lung Res**. v.44, n.2, p. 79-88, 2018.