



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

Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano

**Avaliação de expressão gênica em músculo lesionado de ratos *Wistar*
expostos a laser infravermelho de baixa intensidade**

Rio de Janeiro

2017

Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano

Avaliação de expressão gênica em músculo lesionado de ratos *Wistar* expostos a laser infravermelho de baixa intensidade

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado

Coorientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Rio de Janeiro

2017

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

T768 Trajano, Larissa Alexsandra da Silva Neto.
Avaliação de expressão gênica em músculo lesionado de ratos *Wistar*
expostos a laser infravermelho de baixa intensidade / Larissa Alexsandra da
Silva Neto Trajano. – 2017.

178 f.

Orientadora: Ana Carolina Stumbo Machado.

Coorientador: 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 Biologia
Humana e Experimental.

1. Terapia a laser de baixa intensidade - Teses. 2. Genética – Teses. 3.
Expressão gênica – Teses. 4. Estresse oxidativo - Teses. 5. Rato como animal
de laboratório – Teses. 6. Linhagens celulares – Teses. 7. Reparo do DNA –
Teses. I. Machado, Ana Carolina Stumbo. II. Fonseca, Adenilson de Souza da.
III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-003.9

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano

Avaliação de expressão gênica em músculo lesionado de ratos *Wistar* expostos a laser infravermelho de baixa intensidade

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em de 20 de dezembro de 2017.

Coorientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

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

Prof.^a Dra. Simone Nunes de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof Dr. Erick Vaz Guimarães
Fundação Oswaldo Cruz

Prof Dr. Flávio José da Silva Dantas
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

A todos que contribuíram direta e indiretamente para que este trabalho pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado e permitido que este trabalho se realizasse.

Agradeço aos meus pais e meus irmãos pelo apoio constante.

Ao meu marido pelo companheirismo e parceria em todos os momentos, não só durante a realização deste trabalho, mas também em todos os momentos da minha vida. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

A ADN por ter sido mais que um orientador, por sempre ter sido um amigo. Quando bati na porta do seu laboratório com uma idéia de projeto e sem orientador eu me encontrava em um período muito difícil da minha vida, em que eu descreditava de mim mesma e me perguntava se fazer um doutorado valia a pena. Sua confiança e fé em mim trouxeram a confiança em mim mesma novamente e com certeza foi essencial para que este trabalho acontecesse. Saiba que para mim você é um exemplo não apenas de orientador, mas também de ser humano. Obrigado por ser essa pessoa incrível.

A Carol por ter aceitado me orientar sem nem me conhecer direito. Por ter acreditado em meu trabalho e por ser esse doce de pessoa que torna todo trabalho mais fácil de ser feito. Obrigado pela confiança e pela orientação ao longo da realização desse trabalho.

A Camila por ter me ensinado e me ajudado com a cultura de células. Poucas pessoas têm tão boa vontade para ajudar como você. Você foi essencial no desenvolvimento deste trabalho, obrigada.

A todos os professores e componentes do LPCT que estiveram envolvidos e contribuíram para a realização deste trabalho.

Quero agradecer também a todos os amigos do laboratório por ter feito o dia a dia leve e feliz. Saber que ia encontrar vocês durante o dia de trabalho era um grande motivo de felicidade. Vou sentir muita saudade das risadas, da amizade, do companheirismo e das palavras de incentivo de vocês. Obrigado Keila, Adilson, Isis, Edmo, Ju, Layane foi muito bom conhecer e conviver com vocês.

Algumas pessoas são anjos que aparecem em nossas vidas que a gente não esperava conhecer, mas que no final fazem toda a diferença, você Luiz Philippe é uma dessas pessoas. No início começou me ensinando a fazer os RTq-PCR, mas as coisas evoluíram e você passou a ser mais que um colega, passou a ser um amigo. Obrigado pela sua amizade, por estar sempre disposto a me ajudar, por nossas jornadas de trabalho, pelos sorrisos, pelos conselhos,

por sempre me ouvir, foi muito bom trabalhar com você, você também é parte essencial na realização deste trabalho.

Ao meu docinho de pessoa que amo muito Andrezza que entrou no decorrer deste trabalho, mas que também foi importante para a realização dele. Obrigado pela amizade, o otimismo, e toda a ajuda para a realização deste trabalho.

Ao professor André pelas dicas nos RTq-PCR sempre e a professora Simone pela valiosa ajuda na citometria de fluxo.

A todos meu muito obrigado!!

Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena acreditar
no sonho que se tem ou que seus planos nunca vão dar
certo ou que você nunca vai ser alguém

Legião urbana

RESUMO

TRAJANO, Larissa Aleksandra da Silva Neto. **Avaliação de expressão gênica em músculo lesionado de ratos *Wistar* expostos a laser infravermelho de baixa intensidade.** 2017. 178 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Durante o processo de reparo muscular espécies reativas de oxigênio ativam importantes vias de sinalização. Entretanto, se ocorrer estresse oxidativo pode levar ao dano secundário de fibras não lesionadas. Os danos provenientes de lesões oxidativas são reparados pelo mecanismo de reparo por excisão de bases e de nucleotídeos. A proteção contra danos não oxidativos no DNA pode ocorrer através de mecanismos chamados de checkpoints. Além disso, telômeros não funcionais também funcionam como danos no DNA e ativam vias de respostas aos danos no DNA. A terapia com laser de baixa potência é uma técnica considerada segura e eficaz que tem sido amplamente utilizada para o reparo de lesões musculares. Estudos recentes mostraram que os efeitos bioestimulatórios do laser influenciam a estabilidade genômica. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência do laser infravermelho de baixa potência na expressão de genes relacionados ao reparo de lesões musculares, de reparo no DNA e manutenção de telômeros em mioblastos em cultura e em modelo de lesão muscular utilizando ratos *Wistar*. Para o estudo *in vitro* foram utilizadas células C2C12 que foram expostas ao laser e foi avaliado seu efeito na viabilidade celular, na geração de espécies reativas de oxigênio, na apoptose e na necrose, bem como na expressão de genes relacionados com o reparo muscular, com a estabilidade genômica e na manutenção de telômeros. Para os estudos *in vivo* foi utilizado o modelo de criolesão para causar a lesão muscular e foi avaliada a expressão de genes relacionados com o reparo muscular, com a estabilidade do genoma e na manutenção de telômeros e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Os resultados do estudo *in vitro* mostraram que a exposição ao laser de baixa potência aumenta a viabilidade celular, reduz a porcentagem de células apoptóticas e aumenta a necrose dependendo da fluência utilizada. Além disso, modula a expressão de genes envolvidos no reparo de danos oxidativos (APE1, OGG1, ERCC1, XPC), na estabilidade genômica (ATM e Tp53), no reparo muscular (MyoD e Pax7) e na estabilidade de cromossomos (TRF1 e TRF2). O estudo *in vivo* mostrou que a exposição ao laser dependente de potência modula a expressão de genes relacionados à estabilidade genômica (ATM e Tp53), manutenção de telômeros (TRF1 e TRF2), reparo de lesões musculares (MyoD, Myf5, MyoG, MRF4 e Pax3), citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 β) e na citocina anti-inflamatória IL-4. Em conclusão, a modulação desses genes tanto nos estudos *in vitro* quando nos estudos *in vivo* pode ser mais um dos efeitos benéficos resultantes de exposição ao laser de baixa potência.

Palavras-chave: Laser de baixa potência. Estabilidade genômica. Regulação de telômeros. Bioestimulação. Expressão gênica. Reparo de DNA. Lesões oxidativas. Ratos *Wistar*. Células C2C12.

ABSTRACT

TRAJANO, Larissa Aleksandra da Silva Neto. **Evaluation of gene expression in injured muscle of *Wistar* rats exposed to low level infrared laser.** 2017. 178 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

During the muscle repair process, reactive oxygen species activate important signaling pathways. However, if oxidative stress occurs it can lead to secondary damage of non-injured fibers. Damage from oxidative injury is repaired by the mechanism of base and nucleotide excision repair. Protection against non-oxidative DNA damage can occur through mechanisms called checkpoints. In addition, non-functional telomeres also function as DNA damage and activate pathways of DNA damage response. Low-power laser therapy is a safe and effective technique that has been widely used for the repair of muscle injuries. Recent studies have shown that the biostimulatory effects of laser influence the genomic stability. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of low level infrared laser on the expression of genes related to muscle injury repair, DNA repair and telomere maintenance in culture myoblast and muscle injury model using *Wistar* rats. For the *in vitro* study, C2C12 cells were used that were exposed to the laser and evaluated its effect on cell viability, generation of reactive oxygen species, apoptosis and necrosis, as well as the expression of genes related to muscle repair, genomic stability and the telomere maintenance. For the *in vivo* studies the cryoinjury model was used to cause muscle injury and the expression of genes related to muscle repair, genome stability, telomere maintenance and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines were evaluated. The results of the *in vitro* study showed that low level laser exposure increases cell viability, reduces the percentage of apoptotic cells and increases necrosis depending on the fluence used. In addition, it modulates the expression of genes involved in repair of oxidative damage (APE1, OGG1, ERCC1, XPC), genomic stability (ATM and Tp53), muscle repair (MyoD and Pax7) and chromosome stability (TRF1 and TRF2). The *in vivo* study showed that power-dependent laser exposure modulates expression of genes related to genomic stability (TMJ and Tp53), telomere maintenance (TRF1 and TRF2), repair of muscle lesions (MyoD, Myf5, MyoG, MRF4 and Pax3), proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-1 β) and the anti-inflammatory cytokine IL-4. In conclusion, modulation of these genes in the *in vitro* studies and in the *in vivo* studies could be one of the beneficial effects of low level laser exposure.

Keywords: Low level laser. Genomic stability. Telomere Regulation. Biostimulation. Gene expression. DNA repair. Oxidative lesions. *Wistar* rats. C2C12 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração do Tempo e curso da regeneração do músculo lesionado.....	28
Figura 2 -	Representação esquemática para a participação dos fatores envolvidos no reparo muscular.....	31
Figura 3 -	Imagem ilustrativa do modelo de lesão muscular por Criolesão.....	33
Figura 4 -	Representação esquemática para o mecanismo de reparo por excisão de bases.....	37
Figura 5 -	Representação esquemática do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo.....	40
Figura 6 -	Representação esquemática do mecanismo de regulação telomérica.....	42
Figura 7 -	Esquema mostrando os checkpoints da Tp53.....	47
Figura 8 -	Processo de absorção ou emissão de fótons.....	50
Figura 9 -	Representação do processo de emissão estimulada e sua diferença entre os processos de absorção e emissão espontânea.....	51
Figura 10 -	Esquema das partes que constituem o laser.....	52
Figura 11 -	Ilustração representando o comprimento de onda da luz.....	56
Figura 12 -	Mecanismo de ação dos lasers de baixa potência.....	60
Figura 13 -	Esquema representando a ação do laser no reparo de lesões oxidativas.....	64
Figura 14 -	Esquema representando a ação dos lasers de baixa potência na estabilidade do genoma.....	65
Figura 15 -	Representação dos efeitos dos lasers de baixa potência no reparo por excisão de bases.....	67
Figura 16 -	Representação dos efeitos dos lasers de baixa potência no reparo por excisão de nucleotídeos.....	68
Figura 17 -	Viabilidade celular em culturas de mioblastos em diferentes concentrações de soro fetal bovino.....	80
Figura 18 -	Viabilidade celular em culturas de mioblastos expostas a laser infravermelho de baixa potência.....	81

Figura 19 - Espécies reativas de oxigênio em culturas de mioblastos após exposição ao laser infravermelho de baixa potência.....	82
Figura 20 - Porcentagem de células apoptóticas em culturas de mioblastos expostas a laser infravermelho de baixa potência.....	83
Figura 21 - Porcentagem de células necróticas em culturas mioblastos expostos a laser infravermelho de baixa potência.....	84
Figura 22 - Níveis relativos de RNAm do gene APE1 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo.....	89
Figura 23 - Níveis relativos de RNAm do gene OGG1 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo.....	90
Figura 24 - Níveis relativos de RNAm do gene ERCC1 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo.....	91
Figura 25 - Níveis relativos de RNAm do gene XPC em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo.....	92
Figura 26 - Níveis relativos de RNAm do gene ATM em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo.....	93
Figura 27 - Níveis relativos de RNAm do gene Tp53 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo.....	94
Figura 28 - Níveis relativos de RNAm do gene MyoD em mioblastos 2 h após exposição a laser infravermelho de baixa potência em 10% e 2% de SFB.....	98
Figura 29 - Níveis relativos de RNAm do gene Pax7 em mioblastos 2 h após exposição a laser infravermelho de baixa potência em 10% e 2% de SFB.....	98
Figura 30 - Níveis relativos de RNAm do gene TRF2 em mioblastos 2 h após exposição a laser infravermelho de baixa potência em 10% e 2% de SFB.....	99

Figura 31 - Fotografia de gel de agarose após eletroforese de transcritos do gene TRF1 em mioblastos expostos a laser infravermelho de baixa potência em culturas com 10% e 2% de SFB.....	100
Figura 32 - Níveis relativos do RNAm do gene ATM em músculo lesionado de ratos Wistar após fotobiomodulação em diferentes potências.....	104
Figura 33 - Níveis relativos do RNAm do gene Tp53 em músculo lesionado de ratos Wistar após fotobiomodulação em diferentes potências.....	105
Figura 34 - Níveis relativos do RNAm do gene TRF1 em músculo lesionado de ratos Wistar após fotobiomodulação em diferentes potências.....	106
Figura 35 - Níveis relativos do RNAm do gene TRF2 em músculo lesionado de ratos Wistar após fotobiomodulação em diferentes potências.....	107
Figura 36 - Representação esquemática da participação dos genes ATM, Tp53, TRF1 e TRF2 na proteção do músculo esquelético.....	108
Figura 37 - Níveis relativos de RNAm do gene MyoD em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	110
Figura 38 - Níveis relativos de RNAm do gene MyoG em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	111
Figura 39 - Níveis relativos de RNAm do gene MYf5 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	112
Figura 40 - Níveis relativos de RNAm do gene MRF4 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	113
Figura 41 - Níveis relativos de RNAm do gene Pax3 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	114
Figura 42 - Níveis relativos de RNAm do gene Pax7 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	115
Figura 43 - Fotomicrografia de músculo tibial anterior lesionado de ratos Wistar após exposição ao laser de baixa potência.....	119
Figura 44 - Níveis relativos de RNAm do gene IL-6 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	120
Figura 45 - Níveis relativos de RNAm do gene IL-1 β em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	121
Figura 46 - Níveis relativos de RNAm do gene IL-4 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.....	122

Figura 47 - Fotografia de gel de agarose após eletroforese de transcritos do gene IL-10 em músculo tibial anterior de ratos Wistar lesionados expostos ao laser de baixa potência..... 123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análise de variância
AP	Apurínico/apirimidínico
APE1	Endonuclease apurínica/apurimidínica 1
APE2	Endonuclease apurínica/apurimidínica 2
AP-1	Proteína ativadora- 1
AsGa	Arseneto de gálio
AsGaAl	Arseneto de gálio e alumínio
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATR	Telangiectasia mutada dependente de Rad3
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	BCL-2 associada à proteína X
BCL-2	Proteína anti-apoptótica célula B de linfoma 2
CDK	Quinases dependentes de ciclina
cDNA	DNA complementar
Cox-2	Ciclooxigenase 2
CSA	Síndrome de Cockayne A
CSB	Síndrome de Cockayne B
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
ECM	Matriz extracelular
ERCC1-XPF	Grupo de complementação cruzada de reparo de excisão 1-Xeroderma pigmentoso grupo F
ERCC2	Grupo de complementação cruzada de reparo de excisão 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBM	Fotobiomodulação
FAPs	Fatores fibro/adipogênicos
FEN-1	FLAP endonuclease-1
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos

GAPDH	Desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato
G0	<i>Gap</i> zero
G1	<i>Gap</i> um
G2	<i>Gap</i> dois
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina-2
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
LASER	Light Amplification by stimulated emission of radiation (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
MAP quinase	Proteína quinase ativada por motógeno
MASER	Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação)
MDM2	Murino duplo minuto 2
MyoD	Fator de determinação miogênico 1
Myf5	Fator miogênico 5
MRF4	Fator regulatório miogênico 6
MyoG	Miogenina (fator miogênico 4)
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
OGG1	8-Oxoguanina-DNA glicosilase-1
ON	Óxido nítrico
P	Fosfato
Pax3	Fator de transcrição tipo <i>homeobox</i> pareado 3
Pax7	Fator de transcrição tipo <i>homeobox</i> pareado 7
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PNK	Polinucleotídeo fosfatase quinase
Pol β	DNA polimerase beta
POT1	Proteção de telômeros 1

PUA	Aldeído poliinsaturado
QCD	Quebras de cadeia dupla no DNA
RAP1	Repressor/ativador da proteína 1
REB	Reparo por excisão de bases
REN	Reparo por excisão de nucleotídeos
REN-AT	Reparo por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição
REN-GG	Reparo por excisão de nucleotídeos genômico global
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAPII	RNA polimerase II
RPA	Proteína A de replicação
RT-qPCR	Reação quantitativa da cadeia de polimerase em tempo real
S	Síntese
SBF	Soro bovino fetal
TFIIH	Fator de transcrição humano II
TIN2	TRF1 e TRF2 interagindo com proteína nuclear 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
TPP1	Displasia adrenocortical da proteína homóloga
Tp53	Proteína tumoral 53
TRF1	Fator de ligação de repetição de telômeros 1
TRF2	Fator de ligação de repetição de telômeros 2
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XPA	Xeroderma pigmentoso grupo A
XPC-hHR23B	Xeroderma pigmentoso grupo C- proteína humana Rad23 B
XPG	Xeroderma pigmentoso grupo G
XRCC1	Proteína de complementação cruzada para reparo de raio X 1

LISTA DE SÍMBOLOS

κ	Kappa
Ca^{2+}	Cálcio
%	Porcento
He-Ne	Hélio e Neônio
Ar	Argônio
α	Alfa
β	Beta
+	Mais
-	Menos
\pm	Mais ou menos
O_2	Oxigênio
8-oxoG	8-oxo-7,8-di-hidroguanina
FapyG	2-6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidinas
5'-dRP	5'-fosfato na cadeia polinucleotídica
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
cm	Centímetros
δ	Delta
ϵ	Épsilon
nm	nanômetros
H2DCFDA	2'-7'diclorodihidrofluoresceína diacetato
W	Watts
mW	Miliwatts
λ	Lambda
J	Joules
Hz	Hertz
CU_A	Cobre redox ativo A
CU_B	Cobre redox ativo B
ml	Mililitros
mg	Miligrama
rpm	Rotação por minuto

°C

Grau Célisio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	REVISÃO DE LITERATURA	24
1.1	Tecido muscular	24
1.1.1	<u>Organização do músculo esquelético</u>	24
1.1.2	<u>Organização das fibras musculares esqueléticas</u>	25
1.1.3	<u>Mecanismo de relaxamento e contração muscular</u>	26
1.2	Lesão do tecido muscular	27
1.2.1	<u>Epidemiologia</u>	27
1.2.2	<u>Fases da lesão do tecido muscular</u>	27
1.2.3	<u>Células satélites</u>	29
1.2.4	<u>Modelos experimentais de lesão muscular</u>	31
1.3	Lesões no DNA	33
1.3.1	<u>Espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos no DNA em músculo saudável e lesionado</u>	33
1.3.2	<u>Reparo por excisão de base</u>	35
1.3.3	<u>Reparo por excisão de nucleotídeos</u>	37
1.3.3.1	<u>REN-GG</u>	38
1.3.3.2	<u>REN-AT</u>	41
1.4	REB e REN na manutenção dos telômeros	41
1.4.1	<u>Manutenção de telômeros em músculo saudável e lesionado</u>	44
1.5	Estabilização genômica	45
1.6	Laser	48
1.6.1	<u>Histórico e definição</u>	48
1.6.2	<u>Princípios e propriedades do laser</u>	50
1.6.2.1	<u>Emissão estimulada</u>	50
1.6.2.2	<u>Constituição do equipamento laser</u>	51
1.6.2.3	<u>Características do feixe laser</u>	54
1.6.3	<u>Parâmetros físicos do laser</u>	55
1.6.4	<u>Mecanismos de ação da radiação laser de baixa potência</u>	57
1.6.5	<u>Lasers de baixa potência e reparo muscular</u>	61

1.6.6	<u>Lasers de baixa potência e lesões oxidativas no DNA</u>	62
1.6.7	<u>Lasers de baixa potência e estabilidade genômica</u>	64
1.6.8	<u>Lasers de baixa potência e REB</u>	65
1.6.9	<u>Lasers de baixa potência e REN</u>	68
2	OBJETIVO	69
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
3	MATERIAIS E MÉTODOS	70
3.1	Estudo <i>IN VITRO</i>	70
3.1.1	<u>Laser de baixa potência</u>	70
3.1.2	<u>Cultura da linhagem celular de mioblastos (C2C12)</u>	70
3.1.3	<u>Procedimento de irradiação com laser de baixa potência</u>	71
3.1.4	<u>Ensaio de viabilidade celular</u>	71
3.1.5	<u>Citometria de fluxo: espécies reativas de oxigênio e morte celular</u>	72
3.1.6	<u>Extração de RNA total</u>	73
3.1.7	<u>Síntese de cDNA</u>	73
3.1.8	<u>Eletroforese de transcritos do gene TRF1 em gel de agarose</u>	74
3.1.9	<u>Análise estatística</u>	74
3.2	Estudo <i>IN VIVO</i>	75
3.2.1	<u>Criolesão</u>	75
3.2.2	<u>Modelo experimental</u>	75
3.2.3	<u>Laser de baixa potência</u>	76
3.2.4	<u>Extração de RNA total</u>	76
3.2.5	<u>Síntese de cDNA</u>	76
3.2.6	<u>Eletroforese em gel de Agarose da transcrição da IL-10</u>	77
3.2.7	<u>Análise microscópica</u>	78
3.2.8	<u>Análise estatística</u>	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	Estudo 1: Viabilidade celular, espécies reativas de oxigênio, apoptose e necrose em culturas de mioblastos expostos ao laser infravermelho de baixa potência	79
4.1.1	<u>Resultados</u>	79
4.1.2	<u>Discussão</u>	84

4.2	Estudo 2: A exposição ao laser de baixa potência altera a expressão de RNA mensageiro de genes envolvidos no reparo de danos oxidativos no DNA e na estabilidade genômica em mioblastos.....	88
4.2.1	<u>Resultados.....</u>	88
4.2.2	<u>Discussão.....</u>	94
4.3	Estudo 3: Laser infravermelho de baixa potência modula os níveis relativos de RNAm de genes de reparo muscular e de estabilidade de cromossomos em mioblastos.....	97
4.3.1	<u>Resultados.....</u>	97
4.3.2	<u>Discussão.....</u>	100
4.4	Estudo 4: Efeitos da fotobiomodulação (FBM) nos níveis de RNA mensageiro dos genes de estabilidade genômica e manutenção de telômeros em músculo lesionado.....	103
4.4.1	<u>Resultados.....</u>	103
4.4.2	<u>Discussão.....</u>	107
4.5	Estudo 5: Laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão pulsada altera os níveis de RNA mensageiro de genes de reparo muscular dependente da potência em ratos <i>Wistar</i>.....	110
4.5.1	<u>Resultados.....</u>	110
4.5.2	<u>Discussão.....</u>	115
4.6	Estudo 6: Laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão pulsado modula os níveis de RNAm de genes de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias favorecendo a aceleração do processo de reparo de lesão muscular.....	118
4.6.1	<u>Resultados.....</u>	118
4.6.2	<u>Discussão.....</u>	123
5	CONCLUSÕES.....	128
	REFERÊNCIAS.....	129
	APÊNDICE A - Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser (Estudo 1)...	149
	APÊNDICE B - Low-level laser irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts (Estudo 2).....	157

APÊNDICE C - Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts (Estudo 3).....	163
APÊNDICE D - Low-level infrared laser at different powers protects muscle injury against DNA damage (Estudo 4).....	170
APÊNDICE E - Pulsed low-level infrared laser alters mRNA levels from muscle repair genes dependent on power output in <i>Wistar</i> rats (Estudo 5).....	171
APÊNDICE F -Low Power Lasers on Genomic Stability (artigo de revisão)..	177
APÊNDICE G -Genomic stability and telomere regulation in skeletal muscle tissue (artigo de revisão).....	178

INTRODUÇÃO

A lesão muscular pode resultar de trauma direto ou indireto. O trauma direto ocorre quando uma força externa é aplicada ao músculo, e estruturas internas e externas são esmagadas umas contra as outras. O trauma indireto ocorre quando não há força traumática externa, e a principal causa de lesão é uma contração muscular excêntrica (MAFFULI et al., 2014). As lesões musculares são classificadas em três graus: no grau I a laceração envolve poucas fibras musculares, com preservação ou mínima perda da função; no grau II ocorre dano tecidual com redução da força na unidade musculotendínea; no grau III a laceração é completa e ocorre perda de função (MUELLER-WOHLFAHRT et al., 2013).

O processo de regeneração muscular é constituído por quatro fases interconectadas: necrose, inflamação, ativação e diferenciação de células satélites, maturação das novas miofibrilas formadas e remodelamento muscular (DOMINGUES-FARIA et al., 2016). Na fase inflamatória espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas em grandes quantidades, predominantemente em neutrófilos e macrófagos M2 (BARBIERI; SESTILI, 2012). Além disso, há ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1) pelas EROs que induzem uma resposta protetora no músculo lesionado (JI, 2007; BARBIERI; SESTILI, 2012). Também, enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase 2, glutathiona peroxidase e catalase, estão aumentadas nos primeiros dias após a lesão (SINGH et al., 2014). Portanto, as EROs ativam importantes vias de sinalização para o reparo muscular. Entretanto, o aumento de estresse oxidativo pode levar ao dano secundário de fibras não lesionadas (KOSAKOWSKA et al., 2015).

O estresse oxidativo pode levar a danos oxidativos no DNA. O dano no DNA pode afetar a diferenciação miogênica de células musculares esqueléticas e bloquear a formação de miotubos. Além disso, a presença de dano no DNA em células satélites musculares pode afetar a capacidade de reparo no músculo lesionado (SAADA et al., 2017). Os danos provenientes de lesões oxidativas são reparados pelo mecanismo de reparo por excisão de bases (REB) e pelo mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN), que garantem o reparo do DNA e a manutenção da estabilidade genômica (MELIS et al., 2013).

A proteção contra danos não oxidativos no DNA pode ocorrer através de mecanismos chamados de *checkpoints*. Durante esse processo, as células reconhecem o dano no DNA e

param a divisão celular até que ocorra a reparação dos danos esteja completada (HYUN, 2015). Tp53 (proteína tumoral 53) é uma proteína ativada pela ATM (ataxia telangiectasia mutada) e desempenha um papel central no *checkpoint*, sendo responsável pela parada da atividade do ciclo celular e permitindo a ativação de vias de reparo, funcionando desta forma como um transdutor e mediador indireto (HORIKAWA, 2011; IVY, 2016).

O telômero é uma região constituída de seqüências de nucleotídeos repetitivos na terminação de cada cromossomo eucariótico, com função de proteção contra atritos e danos (DIMAURO, 2017). Telômeros não funcionais também funcionam como danos no DNA e ativam vias de respostas aos danos no DNA, tais como Tp53 (SAHIN, 2012). O encurtamento de telômeros induzido por um estresse oxidativo prolongado pode atuar como um gatilho no envelhecimento através da ATM e Tp53. ATM e Tp53 mediam apoptose induzida por telômeros ou senescência muscular (HORIKAWA, 2011). Mais recentemente, tem sido mostrado que REB modula positivamente a regulação de telômeros, entretanto, poucos estudos têm sido realizados para esclarecer o papel do REN no processo de regulação de telômeros (JIA et al., 2015; SERVANT et al., 2017).

A terapia com laser de baixa potência é uma técnica considerada segura e eficaz que tem sido amplamente utilizada para o tratamento da dor, reparo de lesões e para o tratamento de diversas doenças (HAMBLIN, 2017). Estudos recentes mostraram que os efeitos bioestimulatórios do laser influenciam a estabilidade genômica (GUEDES, 2017). Dessa forma, torna-se importante avaliar os efeitos da exposição a radiações emitidas por lasers de baixa potência na expressão de genes relacionados com reparo de lesões musculares, na expressão de genes relacionados com a estabilidade genômica e de telômeros para que se possa entender melhor como esses efeitos ocorrem no tecido muscular lesionado.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Tecido muscular

O tecido muscular esquelético é formado por feixes de células muito longas, cilíndricas, multinucleadas e contendo muitos filamentos, **as miofibrilas**. No embrião essas fibras se originam pela fusão dos **mioblastos**. Nas fibras musculares esqueléticas os núcleos se localizam na periferia das fibras, nas proximidades do sarcolema (JUNQUEIRA, 2004).

1.1.1 Organização do músculo esquelético

O músculo esquelético é envolvido pelo **epimísio**, um tecido conjuntivo denso não-modelado. O **perimísio**, um tecido conjuntivo mais frouxo e menos fibroso, derivado do epimísio, envolve feixes (fascículos) de fibras musculares. O **endomísio**, composto de fibras reticulares e uma lâmina externa (lâmina basal), envolve cada célula muscular (GARTER, 2007).

O tecido conjuntivo mantém as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro. Este papel do tecido conjuntivo tem grande significado funcional porque na maioria das vezes as fibras não se estendem de uma extremidade a outra do músculo. Além disso, a força de contração do músculo pode ser regulada pela variação do número de fibras estimuladas pelo nervo. É ainda por intermédio do tecido conjuntivo que a força de contração do músculo se transmite a outras estruturas como tendões e ossos (JUNQUEIRA, 2004).

1.1.2 Organização das fibras musculares esqueléticas

Grande parte do sarcoplasma das células do tecido muscular esquelético é ocupado por miofibrilas, cada uma medindo de 1 a 2 μm de diâmetro. As miofibrilas se estendem por todo o comprimento da célula e estão alinhadas umas as outras adjacentes no sarcoplasma. Este arranjo estritamente paralelo das miofibrilas é responsável pelas estriações transversais com faixas claras e escuras que são características das fibras musculares estriadas esqueléticas (GARTER, 2007).

As faixas escuras são conhecidas como bandas A (anisotrópicas quando vistas à luz polarizada) e as faixas claras são conhecidas como banda I (isotrópicas quando vistas à luz polarizada). O centro de cada banda A é ocupada por uma banda pálida, a banda H, que é dividida por uma delgada linha M. Cada banda I é dividida por uma delgada linha escura, o disco Z. A região das miofibrilas entre os dois discos Z sucessivos é conhecida como sarcômeros, que mede 2,5 μm de comprimento, e é considerado a unidade contrátil das fibras musculares esqueléticas (GARTER, 2007).

As miofibrilas do músculo estriado contêm quatro proteínas principais: miosina, actina, tropomiosina e troponina. Os filamentos grossos são formados de miosina e as outras três proteínas são encontradas dos filamentos finos. A miosina e a actina juntas representam 55% do total das proteínas do músculo estriado (JUNQUEIRA, 2004).

A actina apresenta-se sob forma de polímeros longos (actina F) formados por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcida uma sobre a outra, formando uma hélice dupla. A tropomiosina é uma molécula longa e fina constituída por duas cadeias polipeptídicas uma enrolada sobre a outra. A troponina é um complexo de três subunidades: TnT, que se liga fortemente à tropomiosina; TnC, que tem grande afinidade pelos íons de cálcio; e TnI, que cobre o sítio ativo da actina, onde ocorre a interação da actina com a miosina. A molécula de miosina é formada por dois peptídeos enrolados em hélice. Numa de suas extremidades a miosina apresenta uma cabeça com local específico para ligação de moléculas de ATP (adenosina trifosfato). É nesta parte da molécula que ocorre hidrólise do ATP para liberar energia usada na contração. Nesta porção da molécula da miosina também se encontra o local de interação com a actina (JUNQUEIRA, 2004).

1.1.3 Mecanismo de relaxamento e contração muscular

A contração muscular depende da disponibilidade dos íons Ca^{2+} e o músculo relaxa quando a concentração desse íon diminui no sarcoplasma. O retículo sarcoplasmático armazena e regula o fluxo de íons Ca^{2+} . Quando a membrana do retículo sarcoplasmático é despolarizada pelo estímulo nervoso, os canais de Ca^{2+} se abrem, difundem-se passivamente para o sarcoplasma, ligam-se à troponina, possibilitando formação de pontes entre a actina e a miosina. Quando a despolarização da sarcolema é finalizada, a membrana do retículo sarcoplasmático, por processo ativo, transfere íons Ca^{2+} para dentro das cisternas levando à finalização da atividade contrátil, ou seja, ao relaxamento da fibra muscular (JUNQUEIRA, 2004).

A contração muscular ocorre devido a uma sequência de eventos:

- a) antes do início da contração muscular as pontes cruzadas das cabeças de miosina se ligam ao ATP. A atividade da ATPas das cabeças de miosina imediatamente cliva o ATP, mas deixa o ADP (adenosina difosfato) e o íon fosfato como produtos dessa clivagem ainda ligados à cabeça. Nessa etapa a conformação da cabeça é tal que se estende perpendicularmente em direção ao filamento de actina, só que ainda não está ligada à actina.
- b) quando o complexo troponina-tropomiosina se liga aos íons cálcio, os locais ativos no filamento de actina são descobertos, e as cabeças de miosina então se ligam a eles.
- c) a ligação entre a ponte cruzada da cabeça e o local ativo do filamento de actina causa alteração conformacional da cabeça, fazendo com que se incline em direção ao braço da ponte cruzada. Essa alteração gera um *movimento de força* para puxar o filamento de actina. A energia que ativa o movimento de força é a energia já armazenada, como uma mola “engatilhada”, pela alteração conformacional que ocorreu na cabeça quando as moléculas de ATP foram clivadas.
- d) uma vez que a cabeça da ponte cruzada esteja inclinada, isso permite a liberação do ADP e do íon fosfato que estavam ligados à cabeça. No local onde foi liberado o ADP, nova molécula de ATP se liga. A ligação desse novo ATP causa o desligamento da cabeça pela actina.

- e) após a cabeça ter sido desligada da actina, a nova molécula de ATP é clivada para que seja iniciado novo ciclo, levando a novo movimento de força. Ou seja, a energia volta a “engatilhar” a cabeça em sua posição perpendicular, pronta para começar o novo ciclo do movimento de força.
- f) quando a cabeça engatilhada (com energia armazenada derivada da clivagem do ATP) se liga a novo local ativo no filamento de actina, ela descarrega e de novo fornece outro movimento de força (HALL, 2011).

1.2 Lesão do tecido muscular

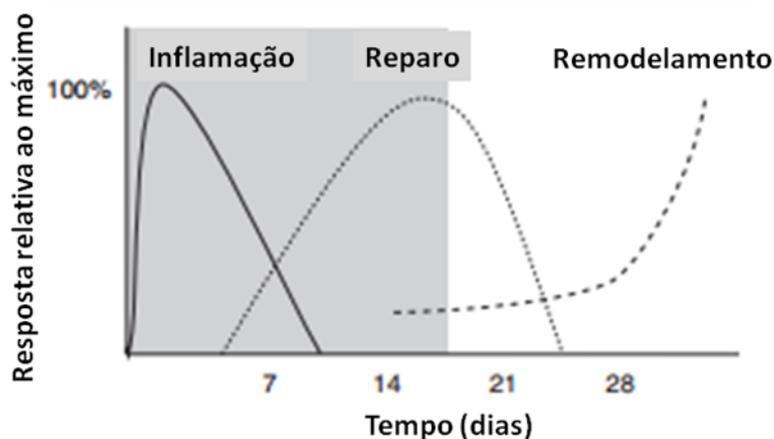
1.2.1 Epidemiologia

Mais de 20 milhões de lesões ocorrem no sistema músculo-esquelético todos os anos nos EUA; entorses, fraturas e contusões são as mais comuns. Coletivamente, eles custam ao sistema de saúde dos 150 bilhões de dólares por ano (EVANS ET AL., 2015). Lesão musculoesquelética é a causa mais comum de deficiência física grave e de dor crônica que afeta centenas de milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma grande preocupação para a medicina esportiva. A contusão muscular traumática e as lesões por esforço representam aproximadamente 55% de todas as lesões agudas relacionadas com esportes (CONTRERAS-MUÑOZ ET AL., 2017).

1.2.2 Fases da lesão do tecido muscular

O mecanismo de reparo e lesão geralmente é similar na maioria dos tipos de lesões musculares. O reparo de lesões musculares se divide em três estágios: destruição e fase inflamatória (1 a 3 dias), fase de reparo (3 a 4 semanas) e a fase de remodelamento (3 a 6 semanas). As duas últimas fases tendem a sobrepor-se (BAOGE, 2012). (Figura 1)

Figura 1 - Ilustração do Tempo e curso da regeneração do músculo lesionado



Nota: A regeneração do músculo esquelético inclui três eventos fisiológicos: inflamação, reparo e remodelamento.

Fonte: Adaptado de SMITH, 2008.

Quando um músculo é lesionado, há um rompimento, necrose das miofibras e um hematoma é formado. Ao mesmo tempo, durante esta primeira fase, as células inflamatórias podem invadir livremente os sítios da lesão devido ao rompimento de vasos sanguíneos. As células inflamatórias mais abundantes são os leucócitos polimorfonucleares. Os leucócitos são substituídos por monócitos algumas horas após a lesão. Em seguida, os monócitos se transformam em macrófagos, que tem duas funções: 1) fazer a remoção das fibras necróticas por fagocitose; 2) produzir, juntamente com fibroblastos, sinais quimiotáticos, tais como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. A matriz extracelular também contém fatores de crescimento que se tornam ativos quando há um dano tecidual. Alguns desses fatores de crescimento, tais como FGF (fator de crescimento de fibroblastos), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1), IGF-2 (fator de crescimento semelhante à insulina-2), TGF- β (fator de crescimento transformante- β), HGF (fator de crescimento de hepatócitos), TNF- α (fator de necrose tumoral α), e IL-6 (interleucina-6) podem ativar precursores miogênicos que atuam nas chamadas células satélites (BAOGE, 2012).

A fase seguinte, a fase de reparo, consiste em duas fases concomitantes. A primeira é a regeneração das miofibras rompidas. A regeneração pode ocorrer porque ainda existe uma reserva de células indiferenciadas, também chamadas de precursores miogênicos ou células satélites, que se localizam sob a lâmina basal das miofibras. As células satélites irão se proliferar e eventualmente se diferenciarão em mioblastos. Esses novos mioblastos se fundem

com as miofibras lesionadas preenchendo o espaço entre as duas extremidades das miofibras lesionadas (BAOGE, 2012).

O segundo processo da fase de reparo é a formação de uma cicatriz de tecido conjuntivo pela fibrina e fibronectina, que são provenientes do sangue do hematoma formado imediatamente após a lesão. O tecido cicatricial fornece ao músculo resistência para suportar as contrações e fornece aos fibroblastos um local de ancoragem para invadir o tecido de granulação. No entanto, em caso de proliferação excessiva desses fibroblastos, um tecido cicatricial denso é formado dentro do músculo lesionado. Isso não só interfere no processo de reparo como também interrompe o processo de regeneração muscular e contribui para a recuperação funcional incompleta do músculo lesionado durante a terceira fase (fase de remodelamento). Nesta última fase, as miofibras recém-formadas amadurecem e ao mesmo tempo o tecido cicatricial é reorganizado (BAOGE, 2012).

1.2.3 Células satélites

As células satélites são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição tipo *homeobox pareado*, Pax7, que foi identificado como o primeiro marcador para quantificação de células satélites, tanto no estado quiescente, quanto no estado ativado e é essencial para o desenvolvimento e a sobrevivência das destas células. O Pax7 está diretamente relacionada com o Pax3, que também é expresso em células satélites quiescentes em alguns músculos, sendo que estes fatores desempenham um papel essencial na manutenção da proliferação de progenitores e na prevenção da diferenciação miogênica precoce e morte celular por apoptose (MOTOHASHI, 2014).

Os fatores miogênicos MyoD (fator de determinação miogênico 1), Myf5 (fator miogênico 5), MRF4 (fator regulatório miogênico 6) e miogenina (fator miogênico 4) desempenham papéis essenciais na especificação miogênica, diferenciação e manutenção durante o desenvolvimento e a regeneração muscular. MyoD serve especificamente como um potente fator de transcrição miogênico que pode reprogramar muitos tipos de células não musculares para uma linhagem miogênica, quando expressa nessas células (MOTOHASHI, 2014).

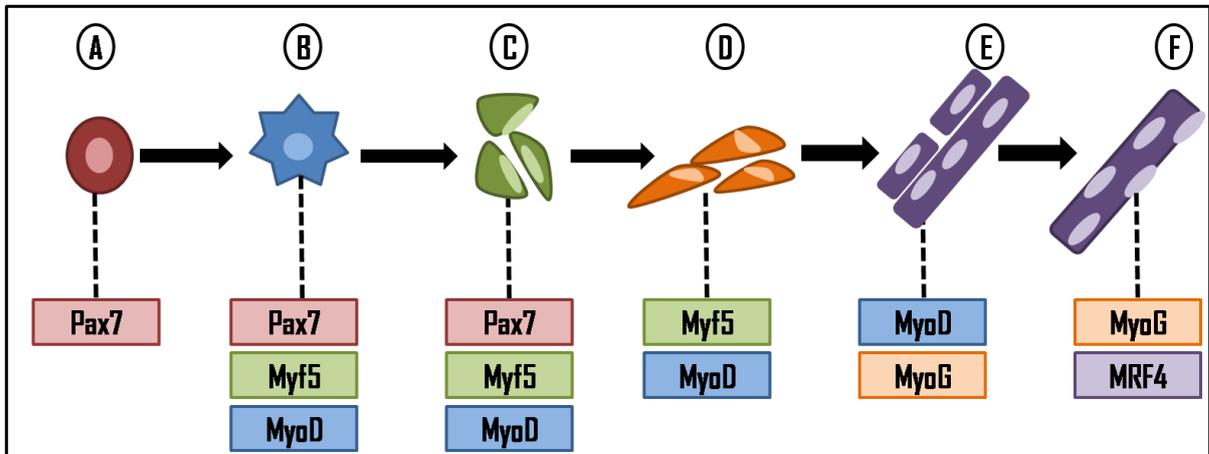
No músculo esquelético adulto, a Myf5 é expressa na maioria das células satélites quiescentes. Entretanto, nas células satélites quiescentes, nem o RNA mensageiro, nem a proteína de MyoD são detectados. Em caso de lesão muscular, as células satélites iniciam o programa miogênico pela expressão de MyoD, retiram-se do seu estado de repouso e entram no ciclo celular como células satélites ativadas. Essa proliferação de células satélites ativadas gera as chamadas células precursoras miogênicas, ou mioblastos (MOTOHASHI, 2014).

Além disso, durante a regeneração muscular, as células satélites podem ser diferenciadas com base na expressão de proteínas codificadas pelos genes Pax7 e MyoD: Pax7 (+) MyoD (-) células estão num estado de repouso, Pax7 (+) MyoD (+) células estão em estágio de proliferação e Pax7 (-) MyoD (+) células estão sofrendo diferenciação miogênica seguida de fusão celular gerada por miofibras multinucleadas (MOTOHASHI, 2014).

A expressão de fatores miogênicos em resposta a uma lesão muscular ocorre da seguinte forma:

- a) a ativação de células satélites ocorre quando há a expressão de Pax 7 e Myf5;
- b) quando a fase de migração e diferenciação começa a Pax7 não é expressa, enquanto é mantida a expressão da Myf5. Nesta fase a MyoD também é expressa;
- c) após este processo ocorre a fusão de miotubos em que há a expressão de MyoD e também a expressão de miogenina (nessa fase já não há mais expressão de Myf5);
- d) na última etapa, de maturação em miofibras, é observada apenas a expressão de miogenina e MRF4 (Figura 2) (ZANOU, 2013).

Figura 2 - Representação esquemática para a participação dos fatores envolvidos no reparo muscular



Legenda: A) Células satélites quiescentes; B) Células satélites ativadas; C) Proliferação de células satélites; D) Migração e diferenciação de células satélites; E) Fusão em miotubos; F) Maturação em miofibras. Pax7: paired box 7, Myf5: fator miogênico 5, MyoD: diferenciação miogênica 1, MyoG: Miogenina, MRF4: fator miogênico 6.

Fonte: A autora, 2017.

1.2.4 Modelos experimentais de lesão muscular

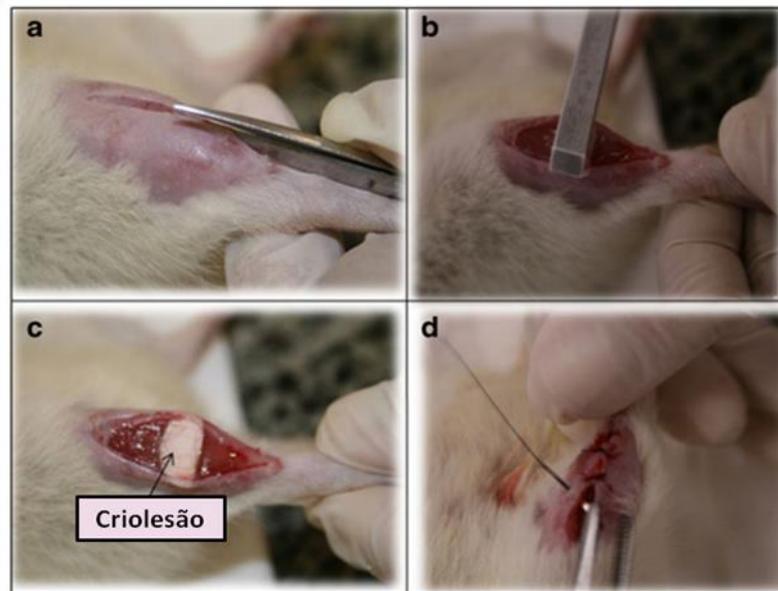
Os principais modelos experimentais de lesão muscular são: contusão, tensão, laceração e criolesão.

- a) Contusão: a contusão muscular é um dos tipos mais comuns de lesões e ocorre quando o tecido é exposto a uma força de compressão rápida e forte ou, por exemplo, uma batida direta e não penetrante ao ventre muscular, que normalmente leva à formação de um hematoma dentro do músculo. A maioria dos estudos usa o modelo de impacto contundente e não-penetrante. a lesão é causada pela queda de uma massa metálica através de um tubo guia, a massa é então liberada na região do ventre muscular. Outros estudos utilizam o esmagamento, um modelo de lesão mais invasivo que usa cirurgia para exposição do ventre muscular seguido de esmagamento (SOUZA, 2013);
- b) Tensão: a lesão muscular por tensão ocorre quando o músculo é submetido a uma força de tensão excessiva, resultando em estiramento excessivo.

Normalmente, as tensões musculares ocorrem na junção miotendinosa distal, onde maior força é concentrada e transferida para o músculo esquelético. Geralmente, ocorre tensão quando o músculo está envolvido em uma contração excêntrica e as forças de tração opostas estão simultaneamente presentes. Na literatura são descritos diversos protocolos de replicação de lesão por tensão em animais, que podem ser divididos em dois grandes grupos: (i) por estímulo muscular elétrico para simular contrações excêntricas com aplicação de estiramento e, (ii) por tração do tendão muscular (SOUZA, 2013);

- c) **Laceração:** semelhante às lesões musculares por contusão, as lacerações também causadas por traumas diretos. Entretanto, este tipo de trauma acontece quando o tecido é exposto a uma força de esmagamento ou a objetos pontiagudos, causando destruição local de estruturas teciduais ou perda volumétrica de tecido muscular. Todos os estudos com modelo animal de laceração usam a transecção do ventre muscular, variando apenas a extensão e a profundidade de corte (SOUZA, 2013);
- d) **Criolesão:** consiste em um corte transversal (cerca de 1cm) na pele sobre o meio do músculo, expondo o músculo. Em seguida uma barra de ferro retangular congelada em nitrogênio líquido é aplicada por 10 segundos no centro do músculo. O procedimento é, em geral, repetido por duas vezes consecutivas, com um intervalo de tempo de 30 segundos. Após o procedimento, a pele é suturada (ASSIS, 2013) (Figura 3).

Figura 3 - Imagem ilustrativa do modelo de lesão muscular por Criolesão



Legenda: Inicialmente o músculo é exposto com uma pequena incisão na pele (a); em seguida o metal que já foi imerso em nitrogênio líquido é colocado em contato com o músculo (b), causando a criolesão (c); em seguida a pele é suturada (d).

Fonte: Adaptado de ASSIS, 2013.

1.3 Lesões no DNA

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos no DNA em músculo saudável e lesionado

EROs são formadas de forma endógena pelo processo de fosforilação oxidativa mitocondrial ou, através de fontes exógenas, tais como radiação ultravioleta, consumo de álcool, fumaça de cigarro, ingestão de drogas antiinflamatórias não esteróides e infecções (DIAZ DE BARBOZA et al., 2017). O estresse oxidativo ocorre quando os níveis de EROs aumentam e a capacidade antioxidante celular reduz (RAY et al., 2012).

Em níveis elevados, as EROs causam danos em estruturas celulares, como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO et al., 2007). Os danos no DNA podem ocorrer como resultado da geração de radical hidroxila na reação de metais de transição com peróxido de hidrogênio, ou devido ao aumento da concentração intracelular de íons cálcio que ativam nucleases (DABROWSKA; WICZKOWSKI, 2017). Modificações permanentes do material

genético causada por danos oxidativos representam o primeiro passo para mutagênese, carcinogênese e envelhecimento (VALKO et al., 2007; MANDAL, 2017).

Danos de DNA que ocorrem devido às EROs incluem as lesões de bases de DNA, lesões na desoxirribose, quebras simples da cadeia polinucleotídica e ligações cruzadas entre proteínas e DNA. A guanina é a base nitrogenada mais suscetível à oxidação devido ao seu baixo potencial redox (BOITEUX et al., 2017). O radical hidroxila interage com a guanina resultando num radical neutro redutor que reage com o oxigênio molecular (O_2) e, via transferência de elétrons, produz diferentes produtos no DNA, como 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) e 2-6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidinas (FapyG) (BOITEUX et al., 2017).

No músculo sadio, espécies reativas são importantes em níveis basais contribuindo para que a contração muscular ocorra. De fato, a depleção dos níveis de EROs, pela ativação de antioxidantes, resulta na inibição da contração muscular (ROY et al., 2017). Além disso, EROs participam do processo de reparo de lesões musculares onde são geradas em larga escala, predominantemente em macrófagos e neutrófilos, e são essenciais para a fagocitose (KOSAKOWSKA et al., 2015). Em níveis adequados, as EROs, em conjunto com fatores de crescimento e citocinas, são importantes para o reparo de lesões musculares, devido ao redirecionamento de células satélites para o local da lesão (RIBEIRO et al., 2016).

Entretanto, níveis elevados de EROs durante um longo período de tempo no tecido lesionado podem causar danos oxidativos por reação direta com constituintes celulares vitais, tais como lipídeos, proteínas e DNA, que podem interferir negativamente na diferenciação das células musculares (KOSAKOWSKA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Apesar dos danos no DNA ocorrerem frequentemente, as células possuem mecanismos para reparar estes danos causados por radicais livres. O reparo dos danos é muito importante para a manutenção da estabilidade genômica e para a homeostase celular normal. Enzimas que participam do reparo do DNA são de grande importância para manutenção da integridade genômica, prevenindo a ocorrência de mutações causadas por EROs endógenas e exógenas (CADET; DAVIES, 2017). O REB é considerado o mecanismo primário de reparo de danos oxidativos no DNA. Também, acredita-se que o REN participe do reparo de danos oxidativos no DNA (MELIS et al., 2013).

1.3.2 Reparo por excisão de base

O REB é um mecanismo responsável pelo reparo de diferentes tipos de danos oxidativos no DNA (CADET; DAVIES, 2017). Esse mecanismo realiza o reparo do DNA em cinco fases: (i) remoção da base danificada, (ii) incisão do sítio abásico, (iii) limpeza do terminal de DNA, (iv) inserção do nucleotídeo correto e, (v) ligação do *gap* remanescente na cadeia polinucleotídica (PARSONS; DIANOV, 2013).

Na primeira fase ocorre o reconhecimento da base danificada por uma DNA glicosilase (OGG1, por exemplo), que catalisa a clivagem da ligação N-glicosídica removendo a base danificada e criando um sítio apurínico/apirimidínico (AP) (ROBERTSON et al., 2009). As DNA glicosilases são classificadas como monofuncionais e bifuncionais com base no seu mecanismo de ação (MENONI et al., 2017). O primeiro e o segundo estágio são realizados por uma DNA glicosilase monofuncional, também conhecido como REB de via curta, em que 80% dos danos no DNA são reparados (PARSONS; DIANOV, 2013). As DNA glicosilases bifuncionais (via REB de via longa) tem a atividade AP liase, que cliva o sítio abásico no DNA resultando na formação de uma terminação com um grupo fosfato (P) (eliminação β , δ), ou um aldeído poliinsaturado (PUA) α,β (eliminação β) na terminação 3' (MENONI et al., 2017; SHAVIROVICH; GEACINTOV; 2017; TALHAOUI et al., 2017).

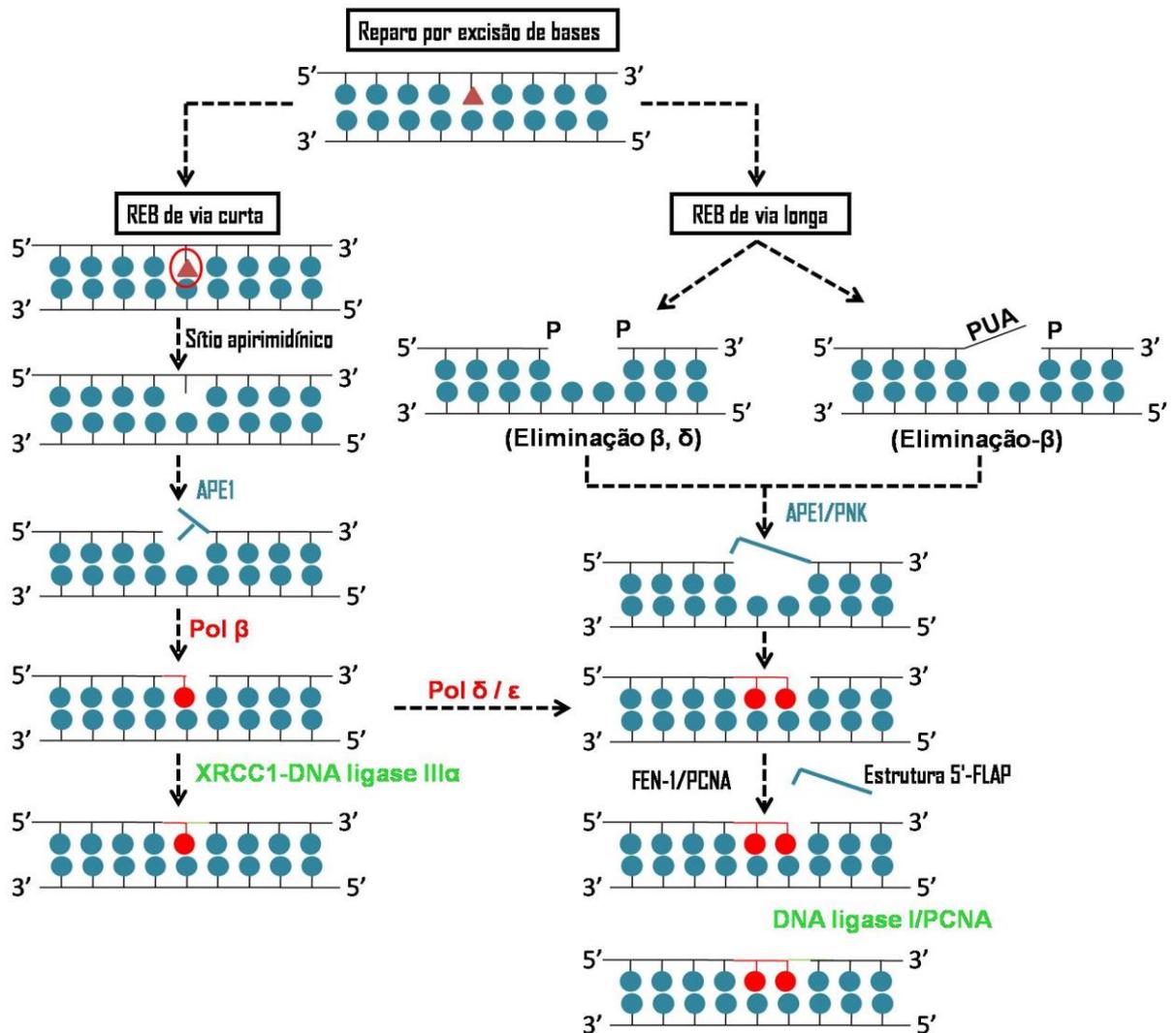
Na segunda fase, o sítio abásico é clivado por uma AP endonuclease (APE1, por exemplo) para formar terminações 3'-OH e 5'-fosfato na cadeia polinucleotídica (5'-dRP). AP endonucleases desempenham um papel importante no reconhecimento e processamento de sítios AP no REB (MENONI et al., 2017; SHAVIROVICH; GEACINTOV; 2017; TALHAOUI et al., 2017). AP endonucleases podem ser classificadas em classe I (AP liases) e classe II (AP endonucleases) (ABBOTTS; MADHUSUDAN, 2010). Ao contrário das AP endonucleases, as AP liases clivam o lado 3' do sítio AP através de uma reação de β -eliminação para produzir um aldeído insaturado - α , β . Esse produto bloqueia a síntese de reparo do DNA e deve ser removido por uma 3' fosfodiesterase antes que o reparo possa prosseguir (DALEY et al., 2010). AP endonucleases são divididas em duas famílias distintas: exonuclease III e endonuclease IV (ABBOTTS; MADHUSUDAN, 2010). Em mamíferos não existe ortólogo para endonuclease IV. Mas existe uma proteína homóloga da exonuclease III chamada APE2. Entretanto, sua função como uma enzima de reparo permanece desconhecida (LI; WILSON, 2014).

No terceiro estágio, o *gap* contendo 5-dRP (DNA glicosilase monofuncional) é clivado pela DNA polimerase β e os grupos 3'-PUA and 3'-fosfato são removidos pela atividade diesterase da APE1 e da polinucleotídeo fosfatase quinase (PNK), com o objetivo de formar uma lacuna (PARSONS; DIANOV, 2013; MENONI et al., 2017; SHAVIROVICH; GEACINTOV; 2017; TALHAOUI et al., 2017). O quarto estágio do REB de via curta consiste na ação da polimerase β adicionando um nucleotídeo complementar novo na lacuna formada durante o reparo (PARSONS; DIANOV, 2013; MENONI et al., 2017; SHAVIROVICH; GEACINTOV; 2017; TALHAOUI et al., 2017).

Entretanto, quando o reparo do DNA acontece através do REB de via longa, se o resíduo 5'-dRP é oxidado ou reduzido para a excisão pela polimerase β , após a adição do primeiro nucleotídeo pela polimerase β para iniciar o reparo, um interruptor de polimerases para as enzimas replicativas de DNA e então as polimerases δ or ϵ (Pol δ/ϵ) (CARTER; PARSONS, 2016) adicionam de 2-8 nucleotídeos na lacuna formada pelo reparo do DNA, criando uma estrutura chamada 5'-FLAP que é reconhecida e cortada pela FLAP endonuclease-1 (FEN-1) em associação com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (PARSONS; DIANOV, 2013; QUIÑONES; DEMPPE, 2016).

O quinto passo é realizado pela DNA ligase I, que promove o fechamento dos *gaps* remanescentes na cadeia polinucleotídica, finalizando o REB de via longa (PARSONS; DIANOV, 2013; QUIÑONES; DEMPPE, 2016). No REB de via curta, o complexo XRCC1 e a DNA ligase III α fecham o *gap* na cadeia polinucleotídica (ROBERTSON et al., 2009) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática para o mecanismo de reparo por excisão de bases



Legenda: APE1: endonuclease apurínica/apirimidínica 1, Pol β: DNA polimerase beta, XRCC1: proteína de complementação cruzada para reparo de raio X 1; P: fosfato, PUA: PUA aldeído fosfato insaturado α,β, PNK: polinucleotídeo quinase, FEN1: flap endonuclease 1, PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular.

Fonte: A autora, 2017.

1.3.3 Reparo por excisão de nucleotídeo

O REN é constituído por mais de 30 proteínas e é capaz de reparar um amplo espectro de danos no DNA que resultam da exposição a agentes endógenos e exógenos, tais como a radiação ultravioleta (SHAFIROVICH; GEACINTOV, 2017). Esse mecanismo pode estar envolvido no reparo de alguns tipos de danos no DNA, tais como as bases oxidadas, mas seu papel no mecanismo de reparo de danos oxidativos não está completamente elucidado

(CURTIS, 2012). O REN pode ocorrer por duas sub-vias, que se iniciam mecanicamente diferentes, mas após o reconhecimento do dano, ambas as vias seguem a mesma rota molecular: REN acoplado à transcrição (REN-AT) e REN genômico global (REN-GG) (MELIS et al., 2013).

REN-AT é responsável pela eliminação de lesões em sequências gênicas ativas, reparando danos no DNA que bloqueiam a transcrição. Por outro lado, REN-GG reconhece e remove danos no DNA ao longo de todo o genoma, e é considerado um processo relativamente lento e um pouco ineficiente, porque examina todo o genoma para avaliar se há algum dano (MELIS et al., 2013).

As duas vias podem ser divididas em quatro fases: (i) reconhecimento do dano no DNA, (ii) recrutamento do complexo pré-incisão e desdobramento do DNA, (iii) criação de incisões duplas no local do dano no DNA e subsequente excisão do fragmento danificado, e (iv) ligação e síntese de reparo do DNA (BOWDEN, 2014).

1.3.3.1 REN-GG

O REN-GG é composto por diversas proteínas, incluindo a Xeroderma pigmentoso grupo A (XPA), Xeroderma pigmentoso grupo C - proteínas humanas Rad23 B (XPC-hHR23B), fator de transcrição humano II (TFIIH), grupo de complementação cruzada de reparo de excisão 1-Xeroderma pigmentoso grupo F (ERCC1-XPF), Xeroderma pigmentoso grupo G (XPG), proteína A de replicação (RPA), PCNA, DNA polimerase e DNA ligase I (MU et al., 2017). Todo o processo inclui reconhecimento dos danos, incisão dupla na cadeia polinucleotídica e síntese de DNA para fechamento dos *gaps* (SCHUCH et al., 2017). O principal complexo de reconhecimento de danos no REN-GG é o XPC-hHR23B-Centrina-2 (geralmente chamado de XPC). Alguns danos são reconhecidos pela proteína DDB2 em complexo com a proteína DDB1, criando uma torção que é reconhecida pela XPC. DDB1 e DDB2 fazem parte do complexo ubiquitina ligase CUL4-ROC1, que ubiquitina DDB2, XPC e histonas após a ocorrência de danos no DNA (SPIVAK, 2015; SCHUCH et al., 2017). O complexo XPC reconhece o dano ao longo de todo o processo de reparo para garantir um alto nível de discriminação de danos (ZHU; WANI, 2017).

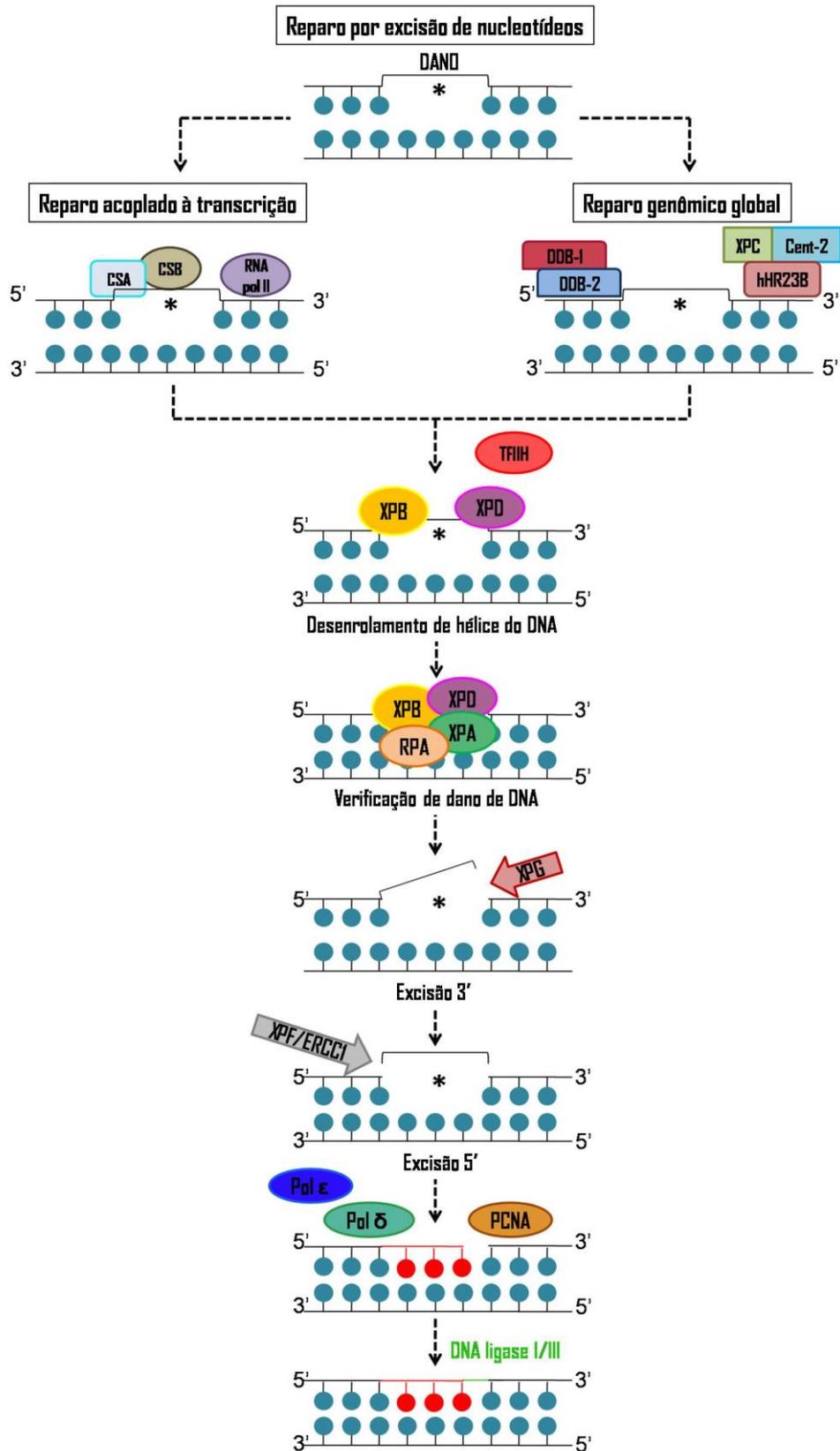
No entanto, o complexo XPC não entra em contato direto com a cadeia de DNA que contém a lesão, mas com a cadeia de DNA complementar, enquanto desloca pares de bases contendo danos, induzindo uma conformação invertida. Esta interação permite que o complexo XPC sirva como uma plataforma para o recrutamento de TFIIH para verificar lesões de DNA com a ajuda da proteína XPA (MARTEIJN et al., 2014; SCHUCH et al., 2017).

A verificação de danos é realizada por um sistema de seleção de danos no DNA que ocorre quando a XPC detecta alterações no DNA com emparelhamento incorreto de bases nitrogenadas. Em seguida, o complexo TFIIH recruta as proteínas XPB e XPD para desenrolar a dupla fita de DNA, facilitando a entrada no dano pelo complexo pré-incisão (MELIS et al., 2013; ZHU; WANI, 2017).

XPA é responsável pela verificação de danos e também atua como um fator organizacional, estimulando a posição correta de proteínas de reparo em torno da lesão (MELIS et al., 2013; SUGITANI et al., 2016). Além disso, tanto a XPA quanto a RPA protegem a fita não danificada de uma incisão incorreta e buscam a abertura completa da DNA danificado (MELIS et al., 2013). Posteriormente, as nucleases XPF-ERCC1 e XPG são recrutadas para realizar a incisão dupla para permitir a remoção de 24 até 32 nucleotídeos contendo o dano do DNA (ZHU; WANI, 2017). A incisão do lado 5' é realizada pelo heterodímero XPF-ERCC1, seguido da incisão do lado 3' pelo XPG (MELIS et al., 2013).

Uma vez que os nucleotídeos são removidos, a re-síntese é realizada pelo PCNA (LEHMANN, 2011) e as DNA polimerases δ e ϵ , que usam a extremidade 3'-hidroxila gerada pela incisão XPF/ERCC1 como início para sintetizar DNA dentro do intervalo de 30 nucleotídeos (SCHUCH et al., 2017). O corte resultante na extremidade 5' da lacuna é selado pela DNA ligase I e III, restaurando a molécula original (SCHUCH et al., 2017) (Figura 5)

Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos



1.3.2.2 REN-AT

No REN-AT, a RNA polimerase II (RNAPII) é paralisada nos sítios de danos nas sequências que estão sendo transcritas, assim, esta enzima participa da etapa de reconhecimento (LAGERWERF et al., 2011). A interrupção da transcrição, o reconhecimento de danos e o reparo subsequente envolvem as proteínas da síndrome de Cockayne A (CSA) e B (CSB), que são necessárias para a ubiquitinação do domínio carboxi-terminal da RNAPII (SCHUCH et al., 2017). Estas proteínas desempenham um papel importante no REN-AT, mas também estão relacionadas com a função de transcrição da RNA polII (MELIS et al., 2013). A proteína CSB interage com a RNAPII e foi sugerido que a CSB é responsável pelo deslocamento da RNA polII no REN-AT (MELIS et al., 2013; VÉLEZ-CRUZ; EGLY, 2013). A função da CSA parece estar relacionada com o alongamento do processo de transcrição no REN-AT (MELIS et al., 2013; VÉLEZ-CRUZ; EGLY, 2013). Posteriormente, o reparo do DNA segue a mesma via do REN-GG através do complexo de ligação TFIIH através da interação com o XPC ou com a maquinaria de transição (SCHUCH et al., 2017) (Figura 5).

1.4 REB e REN na manutenção dos telômeros

Os telômeros são elementos cromossômicos essenciais que garantem replicação e proteção adequadas das extremidades cromossômicas, desempenhando um papel fundamental na estabilidade genômica. Eles consistem em 2 a 20 kb de repetições de TTA GGG de cadeia dupla em seres humanos. À medida que ocorre a proliferação celular, os telômeros tornam-se mais curtos, levando a uma parada de crescimento irreversível, um processo chamado senescência celular (DIOTTI; LOAYZA, 2011; SAMPATHI; CHAI, 2011; WANG et al., 2017).

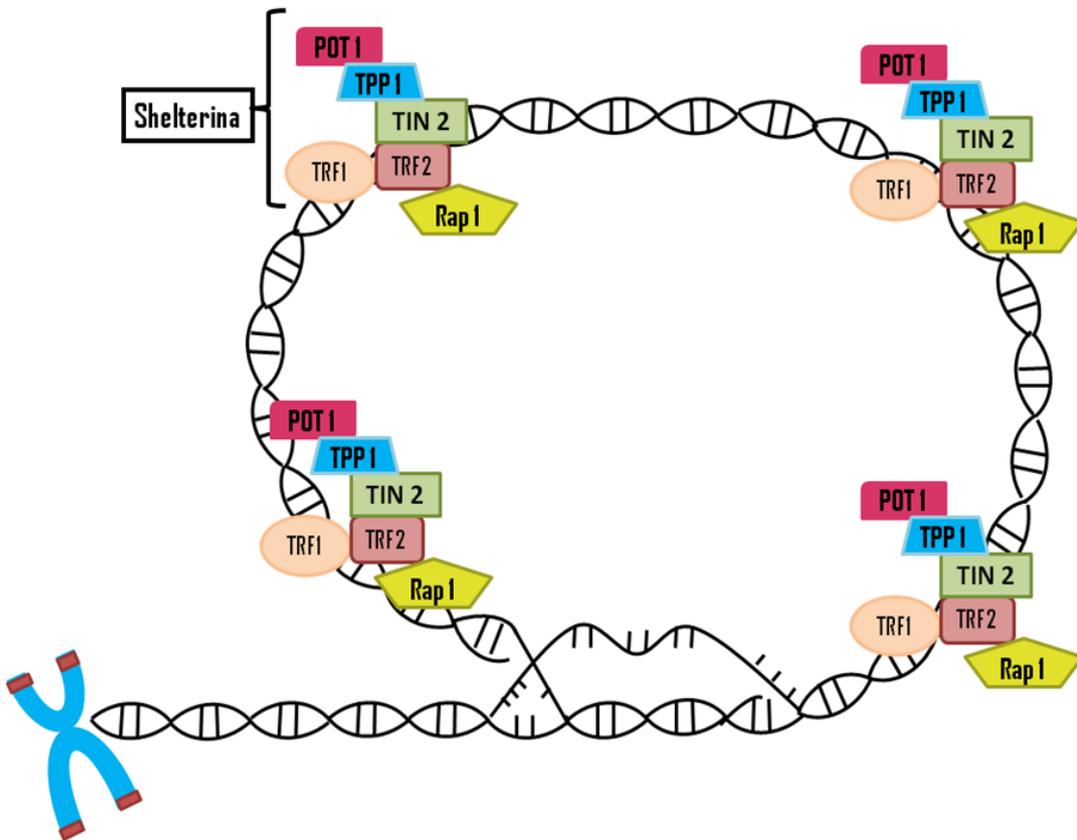
A telomerase é uma enzima com uma unidade catalítica que impede a replicação final pelo alongamento de telômeros (ARSENIS et al., 2017). Na ausência de telomerase podem ocorrer erros na replicação de moléculas lineares de DNA, que levam ao encurtamento dos telômeros em cada divisão celular. No início da senescência ocorre apoptose ou instabilidade

genômica, quando os telômeros estão encurtados abaixo do limite crítico (BIANCHI; SHORE, 2008).

A proteção e a regulação dos telômeros são realizadas por um complexo estável de proteínas, chamado de Shelterina (NADERLINGER; HOLZMANN, 2017). Este complexo é capaz de interagir ou recrutar atividades transitórias específicas que são importantes para a função dos telômeros (DIOTTI; LOAYZA, 2011).

O complexo Shelterina é composto por seis proteínas: fator de ligação de repetição de telômeros 1 e 2 (TRF1, TRF2), proteção de telômeros 1 (POT1), TRF1 e TRF2 interagindo com proteína nuclear 2 (TIN2), repressor/ativador da proteína 1 (Rap1) e displasia adrenocortical da proteína homologa 1 (TPP1) (SAMPATHI; CHAI, 2011), que se ligam às regiões de cadeia simples e/ou dupla do telômero, desempenhando função importante na regulação da telomerase e na prevenção da degradação dos telômeros pelas nucleases (SAMPATHI; CHAI, 2011; IVANCICH et al., 2017) (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de regulação telomérica



Fonte: A autora, 2017.

O complexo Shelterina reprime a resposta a danos no DNA dos telômeros, evitando a ativação da proteína ATM e da telangiectasia mutada dependente de Rad3 (ATR), que podem induzir a parada do ciclo celular em resposta a quebras de cadeia dupla no DNA (QCD) e outros tipos de danos no DNA (KIBE et al., 2016). Além disso, garante que os telômeros não sejam processados através de várias vias de reparo de QCD, incluindo a via de reparo por recombinação não homóloga, que pode levar à fusão de terminações cromossômicas (MACIYOWSKI; DE LANGE, 2017). Além disso, protege parcialmente os telômeros pela formação da estrutura t-loop (YALÇIN et al., 2017).

A TRF1 foi a primeira proteína do complexo Shelterina descoberta e é relacionada à replicação dos telômeros, proteção e manutenção do comprimento de telômero pela supressão da atividade da telomerase e resolução de telômeros irmãos. A TRF2 também está relacionado à proteção dos telômeros (WALKER; ZHU, 2012; PATEL et al., 2015).

TRF1 e TRF2 são estabilizadas através da sua ligação ao TIN-2, além disso, o TIN-2 participa no recrutamento das proteínas TPP1 e POT1 (DOKSANI AND DE LANGE, 2014). A POT1 participa da manutenção dos telômeros e se liga ao DNA com alta afinidade e especificidade. A ligação da POT1 ao DNA auxilia na redução do alongamento dos telômeros, na resposta a danos no DNA e é dependente da proteína ATR (RICE et al., 2017). A proteína TPP1 participa da manutenção do comprimento dos telômeros (TONG et al., 2015) e a proteína RAP1 participa da estabilização do complexo (DONATI; VALENTI., 2016).

Uma perturbação nas proteínas Shelterina nos telômeros desregula a homeostase do comprimento dos telômeros e reduz a proteção dos telômeros, resultando na formação de anormalidades, que incluem fusões ponto a ponto, perda de telômeros e telômeros duplos/frágeis. Esses telômeros não funcionais podem danificar o DNA e contribuir para a instabilidade genômica, sendo associados à formação de tumores e ao envelhecimento (WALKER; ZHU, 2012).

O encurtamento dos telômeros pode ser causado pelo aumento do estresse oxidativo. A consequência da formação de elevado número de danos oxidativos, como a 8-oxoG, pode ser a saturação da capacidade do reparo pelo mecanismo de reparo do DNA por excisão de bases, o que contribui para o encurtamento dos telômeros (TAN; LAN, 2016). Os arranjos longos das repetições TTAGGG tornam os telômeros suscetíveis a lesões oxidativas (JIA et al., 2015).

Assim, além do REB ter um papel importante no reparo de danos no DNA, ele desempenha um papel importante na regulação do comprimento dos telômeros (LU; LIU, 2010). Wang et al (2010) demonstraram que o REB é necessário para reparar guaninas oxidadas nos telômeros, mantendo sua integridade, uma vez que a ablação da função OGG1 resulta em aumento do número de guaninas oxidadas nos telômeros de camundongos idosos. Lu et al (2010) demonstraram que ocorre alongamento dos telômeros quando o gene OGG1 é excluído. APE1 está associada à proteção dos telômeros, interagindo com a proteína TRF2 (JIA et al., 2015). A depleção de APE1 resulta em encurtamento de telômeros em duas linhagens de células humanas, BJ-HTERT e HeLa, mesmo que estas células expressem telomerase para a manutenção dos telômeros (MADLENER et al., 2013).

Poucos estudos têm sido realizados para avaliar o papel do REN na manutenção dos telômeros (JIA et al., 2015). Apesar disso, foi demonstrado que o complexo ERCC1/XPF participa da manutenção dos telômeros (ZHU et al., 2003). Muñoz et al (2005) mostraram que a nuclease XPF também está localizada nos telômeros e está envolvida na degradação de telômeros associada com o aumento da expressão de TRF2, ligando geneticamente a TRF2 e o REN.

A XPB tem papel importante no reparo de danos no DNA induzidos pelo estresse oxidativo e na dinâmica dos telômeros (TING et al., 2010). Gopalakrishnan et al (2010) demonstraram que as proteínas XPB e XPD participam da manutenção dos telômeros em condições de estresse oxidativo causado por H₂O₂. Mais recentemente, foi demonstrado que a proteína XPA também está envolvida na proteção dos telômeros (PARIKH et al., 2015).

1.4.1 Manutenção de telômeros em músculo saudável e lesionado

Alguns estudos têm sido realizados para avaliar a manutenção de telômeros no tecido muscular esquelético, geralmente associado ao envelhecimento e à atividade física. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para avaliar a manutenção de telômeros na lesão muscular.

Wootton et al (2003) sugeriram que a expressão de telomerase poderia auxiliar na terapia gênica de doenças musculares. Estudos mostraram encurtamento de telômeros no músculo esquelético em idosos saudáveis em comparação com indivíduos jovens saudáveis,

bem como em modelos experimentais (LUND et al., 2007; BUNOUT et al., 2009; LUDLOW et al., 2014).

No entanto, não foi observada diferença no comprimento dos telômeros em culturas de mioblastos jovens e senescentes, células satélites jovens e senescentes, ou no músculo esquelético de adultos jovens e idosos, ou em músculos afetados por doenças, como a polimiosite e a dermatomiosite (DECARY et al., 1997; RENAULT et al., 2002; PONSOT et al., 2008; PONSOT et al., 2012; BARBERI et al., 2013).

Tem sido demonstrado que o exercício tem efeito protetor para os telômeros em adultos idosos (Osthus et al., 2013). No entanto, exercícios agudos podem resultar inicialmente em encurtamento dos telômeros (LUDLOW et al., 2012a). Kadi et al (2008) demonstraram que o exercício de longo prazo não está associado ao encurtamento dos telômeros no músculo esquelético, enquanto Ludlow et al (2012b) demonstraram que o exercício de longo prazo está associado ao encurtamento de telômeros.

Em atletas que sofrem de fadiga crônica relacionada ao exercício foram observados telômeros encurtados (COLLINS et al., 2003). Em outro estudo foi sugerido que a taxa de encurtamento dos telômeros no músculo esquelético é aumentada pelo aumento da inatividade muscular e não pela idade cronológica (VENTURELLI et al., 2014). Além disso, outros autores sugeriram que não existe diferença no comprimento do telômero entre indivíduos atletas e sedentários (RAE et al., 2010).

Estudos que avaliam o comprimento dos telômeros nas lesões musculares ainda são escassos. Recentemente, Mackey et al., (2016) não observaram encurtamento de telômeros em adultos jovens após uma lesão muscular induzida por estimulação elétrica nos músculos extensores das pernas. Associando a manutenção de telômeros com o laser de baixa intensidade, Trajano et al. (2016a) observaram que o laser modula positivamente a expressão de TRF1 e TRF2 em mioblastos em condições normais (10% de soro bovino fetal - SFB) e em condições de estresse (2% SFB).

1.5 Estabilização genômica

A manutenção da estabilidade genômica para preservar a transmissão de material genético durante a divisão celular apresenta pontos críticos, nos quais o genoma pode sofrer

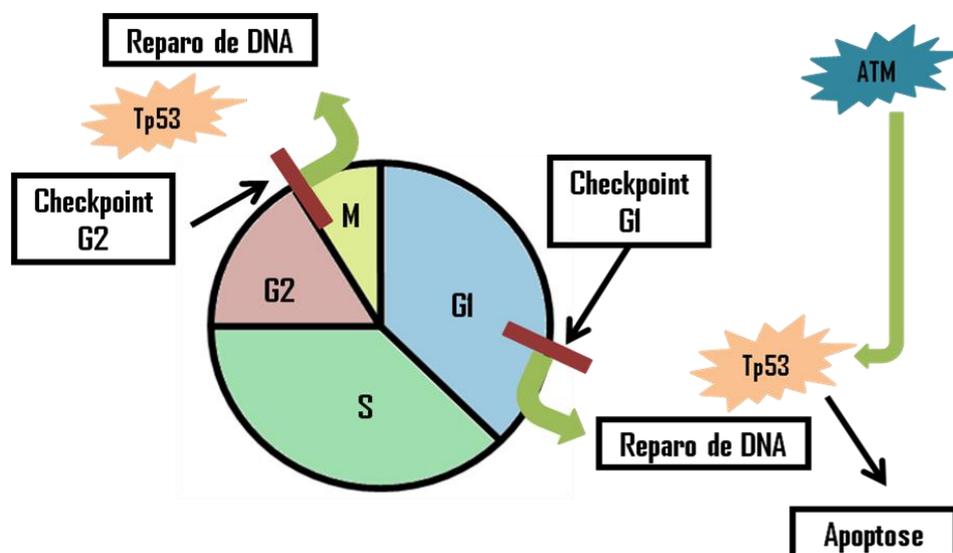
vários danos e interromper o ciclo celular (ZHAO et al., 2017). O ciclo celular é dividido em interfase e mitose, sendo o primeiro subdividido em *gap* zero (G0), *gap* um (G1), síntese (S) e *gap* dois (G2) (GOLLOSHI et al., 2017).

No G1 as células apresentam atividade bioquímica intensa produzindo ciclinas, proteínas que controlam o ciclo celular, bem como quinases dependentes de ciclina (CDK). As células nesta fase permanecem em estado de repouso temporário (G0) ou progridem no ciclo celular (SATYANARAYANA et al., 2009). Na subfase S, há uma duplicação do material genético e, conseqüentemente, aumento da produção de ATP necessária para a próxima fase, bem como aumento da expressão de ciclinas necessárias para a progressão para o G2 (BESSON et al., 2008). No G2 existem pontos de verificação para preparar as células para a divisão de modo a manter sua integridade genômica (KASTAN; BARTEK, 2004).

Com o objetivo de minimizar as falhas ao longo dos estágios do ciclo celular, as células apresentam *checkpoints*, nos quais eventos intracelulares são monitorados. Os *checkpoints* são controlados por proteínas que regulam e controlam o ciclo celular, determinando o tempo exato para a divisão celular ou a interrupção desta divisão (MALUMBRES et al., 2009). Estudos mostram que o controle de *checkpoints* está associado à ativação de mecanismos de reparo do DNA (BRANZEI; FOIANI, 2008), controle de transcrição de genes (BARNUM; O'CONNELL MJ, 2014), comprimento dos telômeros (GOBBINI et al., 2014) e, em alguns casos, na indução da morte celular através de apoptose (PUCCI et al., 2000). Portanto, os pontos de verificação compreendem não apenas as respostas ao dano celular, mas também a sobrevivência celular e estabilidade genômica (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

Os *checkpoints* que acarretam a parada do ciclo celular em resposta aos danos no DNA estão associados ao aumento da expressão do gene Tp53 (TAYLOR, 2001). O Tp53 é identificado como um gene supressor de tumor (LANE, 1992), cuja proteína regula muitos genes e participa de vias importantes, incluindo a inibição do crescimento tumoral, promoção do reparo do DNA, apoptose, parada do ciclo celular e senescência (WHIBLEY et al., 2009). No G1, a proteína Tp53 desencadeia um ponto de controle que bloqueia a progressão da célula no ciclo celular (VOUSDEN; PRIVES, 2009) através da síntese da proteína p21 (CHAN et al., 2000), o que permite que os danos no DNA sejam reparados antes da célula entrar na subfase S. No entanto, se a célula já está comprometida com a divisão, esta proteína desencadeia a sinalização para apoptose, através da fragmentação do DNA nuclear (HE et al., 2009) (Figura 7).

Figura 7 - Esquema mostrando os *checkpoints* da Tp53



Nota: A Tp53 é regulada pela ATM e tem um papel fundamental no reparo do DNA. Quando não é possível reparar os danos no DNA, ocorre a apoptose.

Fonte: A autora, 2017.

Os polimorfismos na Tp53 desregulam o ciclo celular e levam à perda de controle da estabilidade genômica e da proliferação celular (PIETSCH et al, 2006). Assim, quando o mecanismo de reparo falha, a célula continua a dividir com DNA danificado, o que pode levar a doenças, como um tumor (NACCARATI et al, 2012), cuja perda da função da Tp53 confere uma vantagem multiplicativa às células (CARNERO et al, 2000). Além do produto do gene Tp53, um produto do gene ATM desempenha um papel importante na manutenção da integridade do genoma (MORGAN; KASTAN, 1997).

Os níveis e a localização da proteína ATM permanecem constantes em todas as fases do ciclo celular (SHILOH; ZIV, 2013), tendo um papel central na sinalização da cascata de quebras duplas do DNA (SHILOH, 2003), através da fosforilação (CHENG; CHEN, 2010), não só nos mecanismos de reparo do DNA, mas também nos *checkpoints* do ciclo celular nas vias apoptóticas (BAKKENIIST; KASTAN, 2003), outros estudos também sugerem a participação da proteína ATM na resposta celular ao estresse oxidativo (ALEXANDER et al, 2010).

As células deficientes no gene ATM não possuem *checkpoints* relacionados à verificação das fases G1 e G2, nem induzem a ativação da Tp53 após exposição a um agente genotóxico, sugerindo a importância da proteína ATM para a estabilidade celular (SHACKELFORD et al, 2002). Isto demonstra a relação entre ATM e Tp53, pois a ATM

controla o *checkpoint* G1 ao regular a ativação/estabilização da Tp53 (CHENG; CHEN, 2010). A fosforilação da Tp53 pela ATM é um mecanismo importante que leva ao aumento dos níveis e da atividade da Tp53, embora a Tp53 também possa ser ativada através de mecanismos independentes da ATM (LOMBARD et al, 2005). De fato, estudos demonstraram que a ativação da Tp53 poderia estimular ou reprimir a transcrição de vários genes coordenando uma série de vias de sinalização (MEEK, 2004).

A Tp53 pode ser reprimida pelo produto do gene MDM2 (murino duplo minuto 2) (SHI ; GU, 2012), devido à associação física entre as proteínas Tp53 e MDM2 (HINDS et al, 1987) e/ou através do aumento da expressão da proteína MDM2 (FAKHARZADEH et al., 1991), que é um mecanismo molecular pelo qual a célula pode impedir a transformação de Tp53 para células tumorais (OLINER et al, 1993). Estudos indicam que a fosforilação de MDM2 pela ATM, altera o perfil regulador negativo da MDM2 para um regulador positivo para a Tp53, aumentando a interação entre a proteína MDM2 e o RNAm de Tp53, levando ao aumento dos níveis de transcrição do gene Tp53 (GAJJAR et al, 2012; GANNON et al, 2012.).

A estabilidade genômica através do controle dos *checkpoints* do ciclo celular é de extrema importância para a manutenção do material genético, segregação cromossômica, coordenação da diferenciação celular, senescência e morte (BRANDMAIER, HOU; SHEN, 2017). Um mau funcionamento do *checkpoint* e mudanças no ciclo celular podem ser causadas por mutações cromossômicas e aberrações, que favorecem o desenvolvimento doenças, como o câncer (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

1.6 Laser

1.6.1 Histórico e definição

Foi Albert Einstein quem desenvolveu o conceito de luz viajando em ondas de partículas conhecidos como fótons e o conceito de "emissão estimulada", acabando por desenvolver as bases para o desenvolvimento do laser. O precursor do laser foi um equipamento capaz de amplificar microondas por emissão estimulada de radiação conhecido

como MASER (**M**icrowave **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation). O primeiro MASER foi criado por Charles Townes em 1954 e melhorado por James Gordon e Herbert Zeiger. O MASER inicial era incapaz de produzir saída de luz contínua até que Nikolai Basov e Alexander Prokhorov criaram um novo sistema que poderia liberar emissão estimulada de radiação a partir átomos excitados sem cair no estado fundamental, mantendo assim a saída contínua de luz (BARD; GOLDBERG, 2014).

Em 1964, Basov, Prokhorov e Townes dividiram o Prêmio Nobel de Física por seu trabalho fundamental no desenvolvimento dos princípios do MASER. Pouco após o desenvolvimento do MASER, os cientistas exploraram a possibilidade de emissão estimulada em outras regiões do espectro eletromagnético, tais como as regiões ópticas (visível) e infravermelhas. Em 1958, Arthur Schawlow e Charles Townes propuseram o primeiro MASER óptico que foi rebatizado mais tarde de "laser" (FRANCK et al., 2016; BARD; GOLDBERG, 2014).

Em 1960, foi criado por Maiman o primeiro laser de rubi funcional excitado por uma lâmpada de xenônio. Entretanto, esse laser possuía apenas o modo de emissão pulsada. Pouco tempo depois Peter Sorokin e Mirek Stevenson desenvolveram o primeiro laser com modo de emissão contínuo. Este feixe ininterrupto foi muito eficaz na destruição do tecido alvo desejado, mas expôs o tecido circundante a períodos prolongados de energia, culminando em danos colaterais excessivos, causando cicatrizes hipertróficas e alterações pigmentares. Assim, obturadores mecânicos foram introduzidos para interromper o feixe laser, criando lasers quase contínuos com o objetivo de minimizar os efeitos adversos (BARD; GOLDBERG, 2014).

Em 1983, Rox Anderson e John Parrish propuseram a teoria da termólise seletiva, revolucionando a cirurgia cutânea com laser. Com manipulação cuidadosa do comprimento de onda e duração do pulso em relação ao tempo alvo, os lasers poderiam selecionar alvos e destruir de forma seletiva estruturas específicas sem danificar os tecidos circundantes. Isto foi crucial no tratamento com laser direcionado a lesões vasculares (BARD; GOLDBERG, 2014).

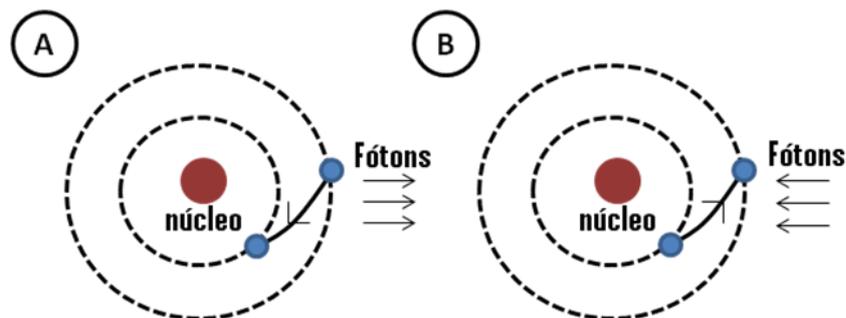
O LASER (**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation) é um dispositivo que gera radiação eletromagnética e que é relativamente uniforme em comprimento de onda, fase e polarização. O laser é descrito como uma fonte de energia luminosa ou de radiação. O laser de baixa potência é um tipo especial de laser que afeta sistemas biológicos por meios não térmicos (FARIVAR et al., 2014).

1.6.2 Princípios e propriedades do laser

1.6.2.1 Emissão estimulada

Considerando um modelo atômico simples, como aquele proposto por Niels Bohr, os elétrons giram ao redor do núcleo em trajetórias circulares bem definidas, as chamadas camadas eletrônicas ou níveis de energia. Nesse movimento de rotação eles não emitem radiação. Quando o elétron passa de uma camada eletrônica para outra ocorre emissão ou absorção de energia. Essa quantidade de energia absorvida ou emitida pelo elétron é denominada de “fóton”. Durante as mudanças de órbita o elétron irá emitir ou absorver uma quantidade específica de energia: um fóton. Dessa forma, quando o elétron que está girando em torno do núcleo passa de uma órbita externa para outra interna há a emissão de um fóton e quando ocorre o processo inverso há a absorção de um fóton. Esse processo em que um átomo sai espontaneamente de um estado excitado para um estado menos energético, é chamado de *emissão espontânea* (Figura 8) (BAGNATO, 2008).

Figura 8 - Processo de absorção ou emissão de fótons



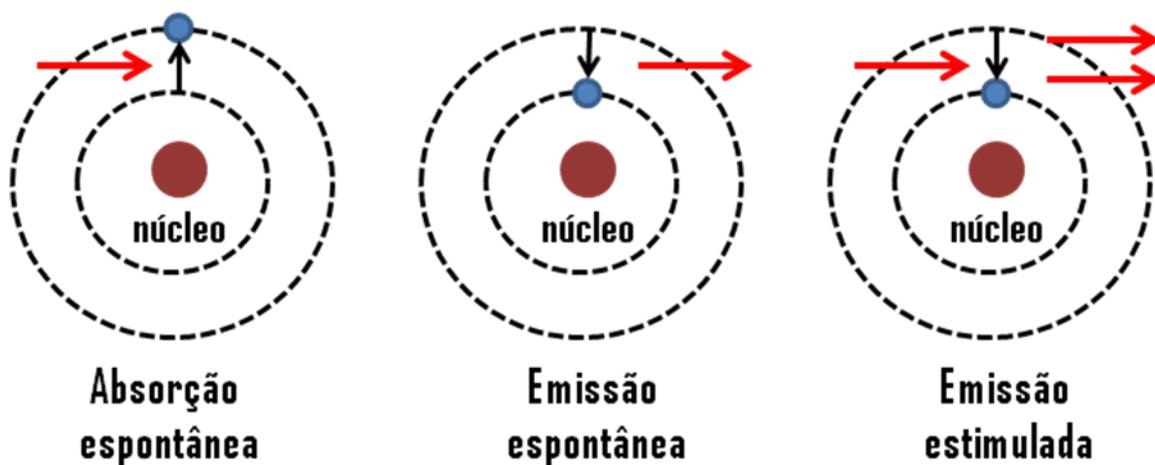
Legenda: A) O elétron passa de uma órbita externa para outra interna emitindo um fóton. B) O elétron passa de uma órbita interna para outra externa absorvendo um fóton.

Fonte: A autora, 2017.

Na emissão estimulada o sistema atômico absorve um fóton externo e o elétron usa a energia desse fóton para pular para o nível de energia mais alto. O elétron volta ao seu estado de energia mais baixa através da emissão de um fóton. Entretanto, esse retorno é causado pelo fóton externo. O resultado dessa emissão estimulada é que um fóton emerge ao lado do

primeiro fóton. Esses dois fótons resultantes da emissão estimulada irão estimular outros átomos com elétrons em seu estado excitado havendo emissão de mais fótons que se juntam aos iniciais (Figura 9). A radiação emitida pelo laser provém da emissão que ocorre quando elétrons decaem de seus níveis de energia de forma estimulada (BAGNATO, 2008).

Figura 9 - Representação do processo de emissão estimulada e sua diferença entre os processos de absorção e emissão espontânea



Fonte: A autora, 2017.

1.6.2.2 Constituição do equipamento laser

Para fazer um laser funcionar é necessário primeiro dispor de um meio ativo, ou seja, de uma coleção de átomos, moléculas ou íons que emitam radiação. Em segundo lugar, deve ser satisfeita uma condição conhecida como inversão de população que é gerada por um processo de excitação denominado bombeamento, transformando o meio ativo em amplificador da radiação e por último, dispor de uma cavidade óptica para que o sistema composto por tal reação e pelo meio ativo seja a sede de uma oscilação laser (GARCEZ et al., 2012).

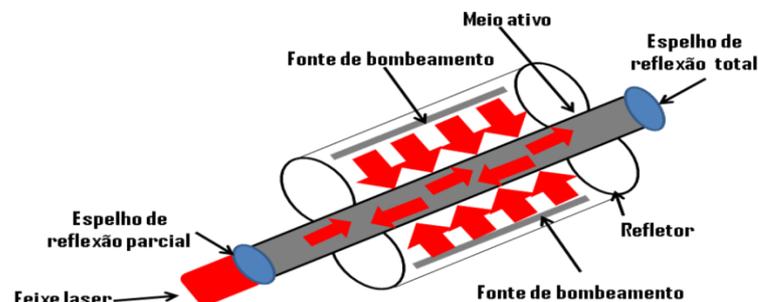
O equipamento laser apresenta três elementos essenciais:

- Meio ativo:** pode ser sólido, líquido ou gasoso. Essa parte do laser é a que contém os átomos ou moléculas, constituídos dos elétrons que, através dos

saltos de níveis de energia, emitem a luz (fótons) que configurarão a luz laser. O meio ativo pode ser de dióxido de carbono, de argônio, de hélio-neônio, de YAG, de exímeros, de corantes, de rubi e de diodos semicondutores, como o de arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl);

- b) **Fonte de energia:** para que os elétrons saltem para níveis de energia mais elevados é preciso fornecer energia. Esta é a finalidade da fonte externa de energia, que é o segundo elemento principal do laser. A fonte terá que produzir estados excitados para que nos decaimentos haja emissão de radiação. Desta forma, a fonte irá fornecer energia para o meio ativo, que pode ser na forma de luz (como no laser construído por Maiman), fazendo com que um grande número de átomos passe para um estado excitado (com elétrons em níveis mais elevados de energia). Quando isso ocorre diz-se que ocorreu uma inversão de população, que é fundamental para a emissão laser;
- c) **Cavidade óptica ou ressonador:** sua função é fazer com que os fótons emitidos pelo meio ativo fiquem retidos neste meio para produzir mais emissão e conseguir a amplificação da radiação necessária para emissão laser. Isso é realizado por dois espelhos, situados nas extremidades dessa cavidade, que refletem a luz emitida de volta às moléculas ou átomos do meio ativo. Um dos espelhos, sendo semireflexivo, semitransparente ou apresentando um orifício, permite a saída da radiação do sistema, formando um feixe de radiação único (Figura 10) (BAGNATO, 2008; CAVALCANTI et al., 2011).

Figura 10 - Esquema das partes que constituem o laser



Fonte: A autora, 2017.

O meio ativo do laser pode ser do estado gasoso, sólido ou líquido, e isto é utilizado para uma das formas de classificação dos lasers. Os lasers gasosos normalmente têm como fonte de energia a descarga elétrica através do meio ativo. Dentre os lasers gasosos aqueles formados pela mistura dos gases nobres Hélio e Neônio (He-Ne) é um dos mais comuns. No caso do laser He-Ne o meio ativo, uma mistura de gases de Hélio (90%) e Neon (10%), é excitado por uma descarga elétrica na ampola que contém os dois gases. Isto promove o movimento acelerado de elétrons e íons que ao colidirem conseguem excitar os átomos de He. Estes, ao colidirem com os átomos de Ne transferem sua energia aos átomos de Ne, produzindo uma inversão de população e dando início ao processo de emissão estimulada. O comprimento de onda da radiação emitida é de 632,8 nm, ou seja, radiação vermelha. Outros exemplos de lasers gasosos são: laser de argônio (Ar), CO₂, nitrogênio e álcool (BAGNATO, 2008; DANTAS et al., 2011).

Os lasers de estado sólido têm como meio ativo os íons de um determinado elemento embebidos em um cristal. Esse procedimento recebe o nome de dopagem e se diz que tem um cristal dopado com íons. Esses íons podem ser metálicos como o cromo, ou elementos da terra como érbio, európio ou hânio, por exemplo. No caso desses cristais dopados como meio ativo, a melhor forma de mantê-los excitados é através do uso de luz de uma lâmpada de emissão intensa (por exemplo, lâmpadas de xenônio ou halógenas) como fonte de energia externa.

Os lasers que têm seu meio ativo no estado líquido são os lasers de corante. Nestes lasers há uma molécula orgânica dissolvida em solvente apropriado e transformada em um jato ou mantida em uma cubeta. Nestes lasers, a fonte de energia externa para promover a inversão de população é a radiação emitida por outro laser, ou por lâmpadas. A vantagem desse tipo de laser é a possibilidade de emissão de radiação laser em diferentes comprimentos de onda devido ao fato de que as moléculas do corante podem apresentar diferentes estados de energia e, desta forma, emitirem radiações com diferentes comprimentos de onda (BAGNATO, 2008).

Nos lasers semicondutores o meio ativo é formado pela junção de dois tipos de semicondutores, um do tipo p e outro do tipo n. A corrente elétrica de uma fonte externa promove a passagem de elétrons de uma região para outra e, nesta passagem, os elétrons são excitados para a banda de condução. Na junção os elétrons retornam para a banda de valência emitindo fótons. O aumento da corrente elétrica permite aumentar o número de elétrons excitados, aumentando a quantidade de radiação emitida (BAGNATO, 2008). Os lasers

semicondutores mais comuns são os de AsGaAl (arseneto de gálio e alumínio), com o comprimento de onda desde o vermelho até o infravermelho próximo, variando entre 620 a 830 nm, e o AsGa (arseneto de gálio), que emitem no espectro infravermelho, variando de 830 a 920 nm (DANTAS et al., 2013).

1.6.2.3 Características do feixe laser

As principais características do feixe laser são: monocromaticidade, coerência, colimação e potência.

A monocromaticidade é caracterizada pela emissão de fótons com mesmo comprimento de onda, ou seja, fótons estimulam fótons da mesma frequência, ou de mesmo comprimento de onda. A emissão de fótons com mesmo comprimento de onda é o que diferencia as radiações emitidas por lasers das radiações emitidas por lâmpadas incandescentes, que são constituídas por radiações de vários comprimentos de onda, desta forma a radiação emitida por lâmpadas incandescentes é uma radiação policromática.

A propriedade mais importante da radiação laser é a coerência. A coerência se manifesta simultaneamente pela monocromaticidade (coerência espacial) ou pela frente de onda unifásica (temporal). A radiação é coerente se as diversas porções sucessivas no tempo da mesma onda oscilam para cima e para baixo ao mesmo tempo. Quando estas oscilações não ocorrem ao mesmo tempo, a fonte não é coerente e, neste caso uma porção da onda não preserva a mesma relação de oscilação com a outra porção da mesma onda.

O feixe laser é constituído de ondas que caminham na mesma direção havendo o mínimo de espalhamento, essa característica é denominada de colimação ou pouca divergência. Diferentemente da radiação laser, a radiação emitida por uma lâmpada comum não é colimada, ou seja, é constituída por feixes divergentes.

A intensidade é outra característica da radiação laser em que átomos ou moléculas emitem radiação de forma controlada, contribuindo para que a energia da radiação esteja, num certo intervalo de tempo, em uma área muito pequena. A potência do feixe laser pode ser extremamente elevada, podendo atingir a ordem de terawatts (10^{12} w). Essas grandes intensidades ocorrem em lasers pulsados, onde toda a energia acumulada durante um período é emitida num intervalo de tempo pequeno. Em lasers de baixa potência, para um mesmo

comprimento de onda, é possível ter diferentes potências de saída do equipamento, podendo variar de 10mW a 100mW (BAGNATO, 2008; GARCEZ et al., 2012).

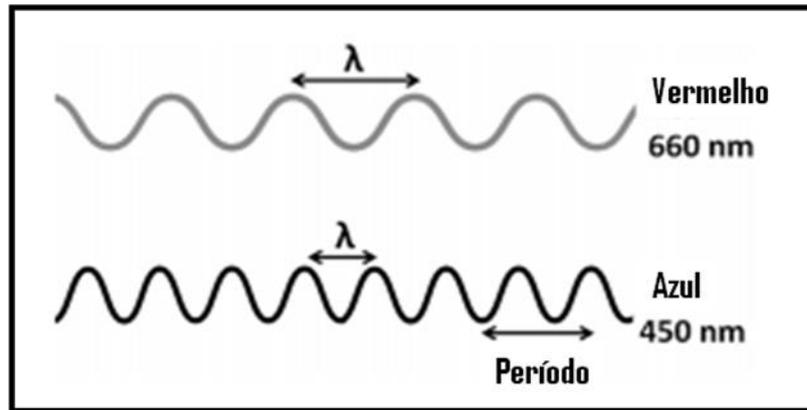
O laser pode se comportar de formas distintas em função do tempo. Os lasers de emissão contínua têm potência de saída constante durante todo o tempo. O modo de emissão pulsado tem potência de saída oscilante, que varia entre um valor máximo (potência pico) e zero, durante um determinado período de tempo, denominado largura temporal (GARCEZ et al., 2012).

1.6.3 Parâmetros físicos do laser

Definir adequadamente os parâmetros físicos do laser é de grande importância uma vez que a ação do laser no tecido biológico irá depender da escolha destes parâmetros. Os principais parâmetros físicos do laser são: comprimento de onda, densidade de potência, densidade de energia, energia radiante e potência radiante.

- a) Comprimento de onda: é definido como a distância entre dois picos (cristas) da onda. Quanto menor o comprimento de onda, maior a frequência da onda. Cada segmento repetido ou repetitivo da onda que corresponde ao mesmo ponto idêntico é considerado um ciclo ou período (Figura 11). Como regra geral, quanto maior o comprimento de onda, maior a profundidade de penetração do feixe no tecido. Desta forma, como a radiação infravermelha tem comprimento de onda acima de 700nm ela penetra mais profundamente no tecido do que a luz vermelha, que tem comprimento de onda abaixo de 700nm. Entretanto, isso não significa que o laser infravermelho não será absorvido por tecidos mais superficiais, implica apenas que no laser infravermelho as ondas continuam em direção a níveis mais profundos do tecido biológico. Por esta razão, para o tratamento de lesões mais profundas, é utilizado laser infravermelho e, para tratamento de tecidos alvo superficiais, é utilizado laser vermelho, uma vez que os fótons são absorvidos principalmente nesses tecidos (ENWEMEKA, 2009);

Figura 11 - Ilustração representando o comprimento de onda da luz



Legenda: λ denota comprimento de onda. Nota-se que a luz vermelha (660nm) tem comprimento de onda maior do que a luz azul (450 nm).

Fonte: Adaptado de ENWEMEKA, 2009.

- b) Densidade de energia (fluência): pode ser definida como a quantidade de energia entregue por unidade de área. Em outras palavras, é a energia dividida por área. É mensurada em J/cm^2 . Na prática a densidade de energia é tipicamente reportada como dose (ENWEMEKA, 2009);
- c) Potência radiante: pode ser definida como a taxa pela qual a energia é gasta. Geralmente é mensurada em Watts, mas na fototerapia devido às quantidades relativamente baixas de energia necessária para se alcançar os benefícios terapêuticos é frequentemente medida em miliwatts (mW). Por definição a potência pode ser definida calculando a energia por unidade de tempo (ENWEMEKA, 2009);
- d) Energia radiante: é a mensuração de energia da radiação eletromagnética visível e invisível e é mensurada em Joules (J). É calculada multiplicando a potência pelo tempo;
- e) Densidade de potência: pode ser definida como a razão da potência pela área de superfície do feixe. Também conhecida como irradiância, a densidade de potência é basicamente potência por unidade de área do ponto do feixe (*beam spot size*). O tamanho do ponto do feixe define a área coberta pelo feixe. Na ponta do aplicador, o tamanho do ponto é essencialmente o mesmo que a área de irradiação efetiva, ou seja, são de mesmo tamanho quando o aplicador é colocado em contato direto com o tecido biológico.

No entanto, quando o aplicador está distante do tecido, o feixe pode se espalhar dependendo do ângulo de divergência (ENWEMEKA, 2009);

- f) Frequência: é definida como o número de ciclos ou oscilações que passam por um ponto estacionário em um determinado tempo estabelecido e é inversamente proporcional ao comprimento de onda no vácuo. Expressa em Hertz (Hz).

1.6.4 Mecanismos de ação da radiação laser de baixa potência

Para que a luz visível de baixa potência tenha efeitos em um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos pelos elétrons orbitais ou moleculares pertencentes a alguma molécula, que desta forma age como cromóforo ou fotoceptor.

As mitocôndrias são o centro de muitas funções celulares integrando sinais entre a organela e o núcleo. Em 1981 foi sugerido que a fotossensibilidade pode ser uma propriedade mitocondrial comum em animais superiores. A irradiação com luz vermelha e infravermelha próxima pode levar a ativação de componentes da cadeia respiratória mitocondrial e ao início de uma cascata de sinalização que promove proliferação celular e citoproteção. A absorção de fótons causa uma mudança na configuração molecular de fotoceptores acompanhado de uma alteração associada a sinais moleculares dentro das células (GAO; XING, 2009).

As alterações na função do fotoceptor são as *reações primárias* e as subsequentes alterações na sinalização e função celular são as *reações secundárias*. As reações primárias que ocorrem após a absorção da luz podem ser explicadas pelas seguintes hipóteses: hipótese do oxigênio singleto, hipótese na alteração de propriedades redox, hipótese do óxido nítrico, hipótese de aquecimento local transitório e a hipótese do ânion superóxido. As reações secundárias após a absorção da luz são os caminhos de sinalização celular e sinalização mitocondrial retrógrada (GAO; XING, 2009).

A sinalização mitocondrial retrógrada é constituída por vias de sinalização intracelular entre as mitocôndrias e o núcleo, que influenciam atividades celulares sob condições normais ou patológicas. Elementos da sinalização mitocondrial retrógrada, tais como o potencial de membrana mitocondrial, EROs, óxido nítrico, cálcio e pH, têm sido modulados pela irradiação (GAO; XING, 2009).

Tem sido demonstrado que a luz vermelha e a radiação infravermelha próxima atuam na célula através de um fotoceptor primário, a citocromo c oxidase. A citocromo c oxidase é uma enzima terminal da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (complexo IV). A estrutura da citocromo c oxidase é formada por duas metades heme (heme a e heme a₃), dois sítios de cobre redox ativos (CU_A e CU_B), um zinco e um magnésio, que são responsáveis pela absorção da luz vermelha e da radiação infravermelha próxima. Quando um fóton é absorvido pela citocromo c oxidase há uma alteração no estado redox mitocondrial e/ou o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e há aumento da síntese de ATP. Há também aumento de cálcio intracelular, que estimula a síntese de RNA e DNA (HOURELD, 2014).

Tem sido especulado que a irradiação pode intensificar a transferência de elétrons dentro da citocromo c oxidase, disponibilizando mais elétrons. O aumento da transferência de elétrons e prótons acelera o metabolismo oxidativo que, em última instância, leva ao aumento da produção de ATP (HOURELD, 2014). Assim, a absorção da luz pela citocromo c oxidase pode aumentar o potencial de membrana mitocondrial, ATP e EROs, levando a um aumento da disponibilidade de energia e transdução de sinais intracelulares. Essas mudanças bioquímicas e moleculares causam efeitos macroscópicos, como proliferação celular e cicatrização de lesões (GAO; XING, 2009).

Outra classe de moléculas intracelulares que podem agir como cromóforos são as porfirinas. Porfirinas são formadas nas mitocôndrias como parte da biossíntese do grupo heme. Seu espectro de absorção apresenta cinco bandas na região visível do espectro eletromagnético, principalmente de 400 a 630nm. Moléculas com bandas de absorção no visível como a protoporfirina IX podem ser convertidas ao estado tripleto, de tempo de existência mais longo, depois da absorção dos fótons. Esse estado tripleto pode interagir com o oxigênio no estado fundamental com transferência de energia, conduzindo a produção de uma espécie química de alta capacidade reativa, o oxigênio singleto. Esta é a base da chamada “hipótese do oxigênio singleto”. Quando a irradiação ocorre em densidades de energia muito baixas podem causar proliferação celular e estimulação tecidual, entretanto, em altas densidades de energia a morte celular é observada (GARCEZ et al., 2012).

As flavoproteínas também podem agir como fotoceptor. Elas estão envolvidas em vários processos biológicos incluindo emissão de bioluminescência, desativação de EROs, redução de estresse oxidativo, fotossíntese, reparo do DNA e apoptose (GARCEZ et al., 2012).

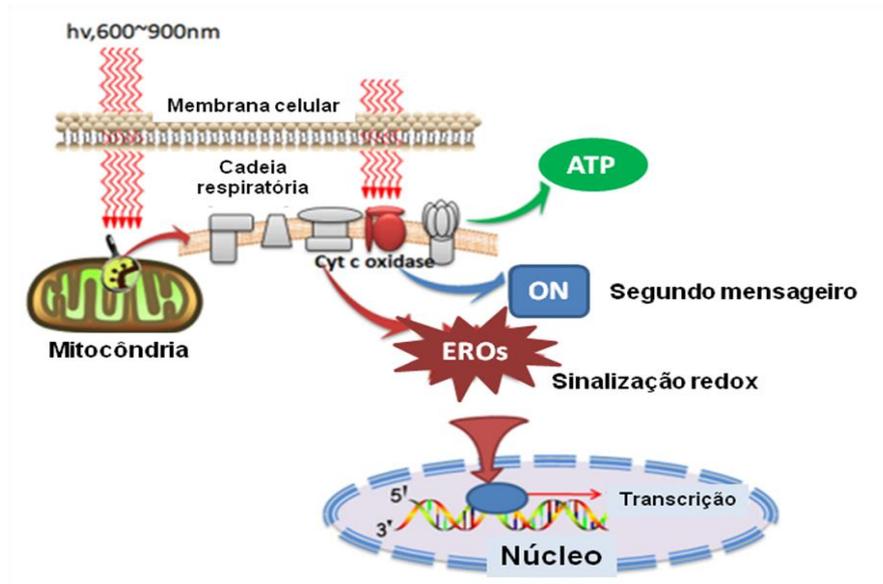
As reações secundárias à radiação laser estão relacionadas com os elementos da sinalização mitocondrial retrógrada cuja alteração mediante a ativação ou supressão de sinais moleculares no citoplasma e subsequentes alterações em cascatas de sinalização levam à síntese de DNA, RNA, proteínas e enzimas no núcleo ou citoplasma ou ainda a alterações na membrana plasmática, resultando em efeitos bioestimulatórios nas células como proliferação e diferenciação celular (GAO; XING, 2009).

A absorção da luz pelo fotoceptor leva ao aumento da síntese de ATP e aumenta o gradiente de prótons levando a um aumento na atividade de Na^+/H^+ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e nas bombas Na^+/K^+ ATPase e Ca^{2+} ATPase. O ATP é substrato da adenilciclase e, portanto, os níveis de ATP controlam os níveis de AMPc. Tanto o cálcio como o AMPc são segundos mensageiros muito importantes. O cálcio regula vários processos no corpo humano (contração muscular, coagulação do sangue, transmissão sináptica, expressão gênica, por exemplo). Portanto, a fotoativação de enzimas terminais, como a citocromo c oxidase, desempenha um papel vital na ativação de diversas cascatas biológicas observada posteriormente a exposição à radiação laser de baixa potência (FARIVAR et al., 2014).

A atividade da citocromo c oxidase é inibida por óxido nítrico (ON). Esta inibição pode ser explicada devido à competição direta entre NO e O_2 para a redução do centro binuclear CuB/a3 da citocromo c oxidase e é reversível. Foi proposto que a irradiação laser pudesse inverter essa inibição pela dissociação de ON de seus sítios de ligação. Porque essa ligação coordenada é muito mais fraca do que uma ligação covalente, essa dissociação poderia ser causada pela absorção da radiação laser. A dissociação do ON da citocromo c oxidase aumenta a taxa de respiração. De fato, a radiação laser poderia realmente reverter a inibição causada pela ligação ON na citocromo c oxidase, tanto em mitocôndrias isoladas quanto em células, bem como poderia proteger células contra morte celular induzida por ON (FARIVAR et al., 2014).

Tem sido relatado que a terapia com laser de baixa potência altera o potencial redox total das células, aumentando o potencial oxidante, a geração de EROs e a atividade redox celular. EROs são considerados segundos mensageiros com importante função ao regular vias de sinalização celular que controlam a expressão gênica. A modulação do estado redox celular pode ativar ou inibir as vias de sinalização. Mudanças no estado redox ativam a síntese de ácido nucléico, síntese protéica, ativação enzimática e progressão do ciclo celular (FARIVAR et al., 2014; MIGLIARIO et al., 2014) (Figura 12).

Figura 12 - Mecanismo de ação dos lasers de baixa potência



Fonte: adaptado de MIGLIARIO, 2014.

O mecanismo dessas reações secundárias é determinado por transdução (transferência de energia de um sistema para outro) e amplificação do fotosinal levando a uma fotoresposta. Isso significa que os efeitos derivados das reações primárias são amplificados e transmitidos para outras partes da célula resultando em efeitos fisiológicos gerais e efeitos específicos. A permeabilidade da membrana celular com alterações nos níveis intracelular de cálcio, aumento do metabolismo celular, síntese de DNA e RNA são considerados efeitos gerais enquanto que a proliferação de fibroblastos, ativação de linfócitos T, macrófagos e mastócitos, aumento da síntese de endorfinas e diminuição de bradicinina podem ser considerados efeitos específicos. Além disso, estes efeitos específicos podem ser consequência dos efeitos gerais (CHAVES et al., 2014).

As reações secundárias são responsáveis pela conexão entre resposta à ação da radiação laser por fotoceptores localizados dentro das mitocôndrias e efeitos localizados no núcleo. Este processo torna possível aplicar uma baixa dose de energia para produzir efeitos clinicamente significativos nos tecidos. Em suma, a absorção da radiação laser, dependendo do comprimento de onda, provoca reações primárias nas mitocôndrias. Estas são seguidas por uma cascata de reações secundárias (transdução de fotosinal e amplificação) que ocorrem no citoplasma, membrana e núcleo (CHAVES et al., 2014).

1.6.5 Lasers de baixa potência e reparo muscular

O processo de reparo muscular é caracterizado principalmente pela necrose de fibras musculares, presença de infiltrado inflamatório e aumento local de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e enzimas proteolíticas envolvidas na fagocitose de detritos celulares. Simultaneamente, células satélites são ativadas, proliferam e diferenciam em mioblastos que se fundem para reparar fibras danificadas ou formar uma nova fibra muscular funcional. Este processo termina com a maturação de novas fibras, a contração e reorganização do tecido conjuntivo, e a recuperação da função do músculo lesado (ALVES et al., 2016).

Diversos estudos têm sido realizados avaliando os efeitos do laser de baixa potência no músculo esquelético sadio e lesionado. Em lesões musculares tem sido observados efeitos bioestimulatórios da exposição à radiação laser de baixa potência na fase inflamatória, na fase proliferativa e na fase de remodelamento.

Na fase inflamatória tem sido observado que a exposição à radiação laser reduz os níveis de TNF- α , de ciclooxigenase 2 (Cox-2), IL-6, de interleucina 2 (IL-2) e de interleucina 1 beta (IL-1 β) após contusão em ratos *Wistar* (ALMEIDA et al., 2013; FERNANDES et al., 2013; MANTÍNEO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016; TOMAZONI et al., 2017). Também foi observado que a exposição à radiação laser aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias como interleucina 10 (IL-10) (SILVEIRA et al., 2016).

A exposição à radiação laser altera a expressão de fatores regulatórios miogênicos que são essenciais para a ativação das células satélites. Animais irradiados com laser tiveram aumento na expressão de MyoD, Myf5 e Miogenina (ALVES et al., 2016; ASSIS et al., 2016; MORAIS et al., 2017). Embora existam diversos estudos onde foi observada a ação da exposição ao laser na expressão de MyoD, Myf5 e miogenina beneficiando o processo de reparo muscular, não há trabalhos que investiguem os efeitos do laser na expressão de MRF4, Pax3 e Pax7 em modelos *in vitro* e em modelos animais, bem como se este efeito é influenciado pela potência do feixe laser utilizado.

Durante o processo de reparo muscular, as proteínas que compõem a matriz extracelular (ECM) no tecido muscular são sintetizadas e degradadas. No tecido muscular normal a ECM é composta principalmente de laminina, fibronectina, tenascina, proteoglicanos, e fibras de colágeno (dos tipos I, III e IV), que são sintetizados principalmente

por fibroblastos. Os componentes ECM são principalmente degradados pelas metaloproteinases de matriz (MMPs). As principais MMPs encontradas no tecido muscular são as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que degradam os tipos de colágeno desnaturado IV, VII e X em muitos tecidos, facilitando assim a proliferação e diferenciação de células satélites, fusão de mioblastos e angiogênese (MELO et al., 2016).

Em modelos experimentais de criolesão foi observado que a exposição ao laser aumenta o número de fibras de colágeno e a atividade de metaloproteinases de matriz 2 (ALVES et al., 2014b). Confirmando esses resultados Ribeiro et al. (2015) também observaram que a exposição ao laser aumenta o número de fibras de colágeno e a atividade de metaloproteinases de matriz 2 sete dias após a lesão muscular, contribuindo para o processo de reparo muscular em animais após criolesão.

O desenvolvimento de uma nova rede de vasos sanguíneos (angiogênese) no local da lesão é extremamente importante para a regeneração muscular bem sucedida. Este processo é regulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que exerce diferentes efeitos no endotélio vascular, incluindo proliferação e sobrevivência de células endoteliais, migração e adesão de células endoteliais. Além disso, tem sido demonstrado que o VEGF estimula a expansão do número de células satélites adjacentes a novos capilares (ALVES et al., 2014b). A terapia com laser de baixa potência é extremamente eficaz na modulação da expressão de RNAm de VEGF e consequente formação de novos vasos sanguíneos durante o reparo de músculo esquelético lesionado (ASSIS et al., 2016).

1.6.6 Lasers de baixa potência e lesões oxidativas no DNA

A exposição ao laser de baixa potência afeta a atividade de fotoceptores endógenos, que alteram o metabolismo celular, causando proliferação e diferenciação (YIN et al., 2017). A terapia com laser de baixa potência é uma técnica segura e não invasiva com ampla aplicação clínica para o tratamento de várias doenças, como redução da dor e inflamação (CERDEIRA et al., 2016; YIN et al., 2017) e têm sido amplamente utilizadas, apresentando efeitos benéficos em níveis celular (MIGLIARIO et al., 2014) e de tecidos (ASSIS et al., 2013; TRAJANO et al., 2014).

Entre os efeitos conhecidos da radiação emitida por lasers de baixa potência está o aumento de EROs (ânion superóxido e radical hidroxila, por exemplo), que poderia restaurar o equilíbrio redox pelo aumento de enzimas antioxidantes (TATMATSU-ROCHA et al., 2016). A alteração do estado redox pode induzir sinalização intracelular, ativação enzimática e progressão do ciclo celular (MASOUMIPOOR et al., 2014). No entanto, é importante estabelecer os parâmetros físicos nos quais as células e os tecidos são irradiados, porque em altas fluências pode ocorrer aumento excessivo dos níveis de EROs, o que causa danos celulares (TATMATSU-ROCHA et al., 2016; ENGEL et al., 2016). Assim, condições de exposição adequadas são necessárias para obter níveis adequados de EROs, que induzem o efeito bioestimulatório desejado em terapias baseadas nos lasers de baixa potência (ENGEL et al., 2016).

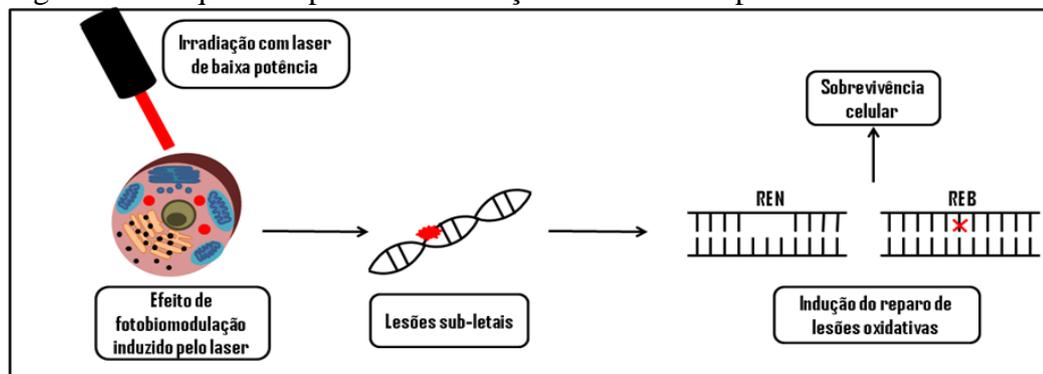
Os efeitos da exposição aos lasers de baixa potência nos níveis de EROs foram avaliados em vários estudos, mas alguns resultados são controversos. Assim, foi relatado que os lasers de baixa potência reduzem a concentração de EROs nas células (YIN et al., 2017) e nos tecidos (RIBEIRO et al., 2016; TATMATSU-ROCHA et al., 2016). Por outro lado, outros autores sugeriram que o aumento dos níveis de EROs pode ocorrer sem causar danos ao DNA (DILLENBURG et al., 2014). Além disso, dependendo dos parâmetros físicos utilizados, as radiações laser de baixa potência podem ser citotóxicas e induzir danos ao DNA (MIGLIARIO et al., 2014; SERGIO et al., 2015).

Estudos foram realizados avaliando a ação dos lasers de baixa potência no reparo de danos de DNA induzidos pelas radiações ultravioleta e ionizante. Os autores relataram que a exposição a lasers de baixa potência é capaz de induzir respostas adaptativas em células expostas à radiação ionizante, afetando a indução de mecanismos de controle responsáveis pela alteração da progressão do ciclo celular (KARU et al., 1994; JOYCE et al., 1999). Outros estudos mostraram que culturas de *Escherichia coli* (*E. coli*) previamente expostas ao laser vermelho de baixa potência (632,8nm) apresentam uma maior sobrevivência à radiação UV ultravioleta do que as culturas não expostas previamente a esta radiação e que esse efeito poderia ocorrer através do oxigênio singlete (KOHLI; GUPTA, 2001; KOHLI; GUPTA, 2003). Além disso, DUBE et al. (2001) mostraram que a exposição prévia ao laser vermelho de baixa potência protege linfoblastos B humanos contra a radiação ultravioleta A e que esse efeito ocorre devido à influência em processos que previnem danos iniciais ao DNA.

Mais recentemente, foi sugerido que as radiações laser vermelha e infravermelha de baixa potência são capazes de induzir lesões em DNA em nível sub-letal e/ou respostas

adaptativas (DA SILVA MARCIANO et al., 2012; CANUTO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014). Este poderia ser o mecanismo pelo qual as radiações laser de baixa potência protegem as células contra lesões de DNA (Figura 13). Sergio et al., (2013) relataram que o laser vermelho de baixa potência poderia alterar a molécula de DNA e as respostas celulares dependem do funcionamento dos mecanismos de reparo do DNA, bem como dependem das condições celulares. Assim, lesões sub-letais podem induzir mecanismos de reparação de lesões oxidativas no DNA, que podem ser parte dos efeitos de fotobiomodulação induzidos por lasers de baixa potência, resultando em estabilidade genômica.

Figura 13 - Esquema representando a ação do laser no reparo de lesões oxidativas

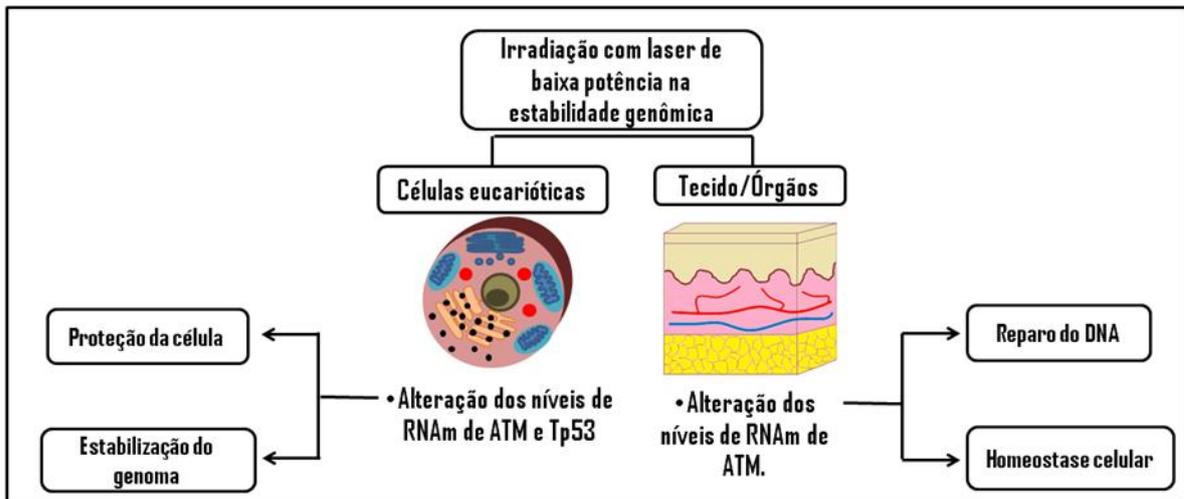


Fonte: A autora, 2017.

1.6.7 Lasers de baixa potência e estabilidade genômica

Poucos trabalhos têm sido realizados avaliando os efeitos dos lasers de baixa potência na estabilidade genômica. Na pele e nos tecidos musculares, os níveis de RNAm do Tp53 não é alterado após a exposição ao laser de baixa potência de vermelho (660nm) e infravermelho (808nm), mas os níveis de RNAm da ATM estão aumentados no músculo exposto aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência (GUEDES DE ALMEIDA., 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 de Tp53. No entanto, isso poderia indicar a ativação dos mecanismos de reparo do DNA, que poderiam ser parte do efeito biomodulador induzido por estes lasers (Figura 14). A estabilidade genômica é necessária para a homeostase celular e pode ser um componente importante do efeito biomodulador induzido por lasers de baixa potência na cicatrização de feridas, por exemplo.

Figura 14 - Esquema representando a ação dos lasers de baixa potência na estabilidade do genoma



Fonte: A autora, 2017.

1.6.8 Lasers de baixa potência e REB

Estudos têm sido conduzidos mostrando que lasers de baixa potência modulam o REB em células procariontes e eucariontes. Modelos experimentais que utilizam culturas de *E. coli*, proficientes ou deficientes nos mecanismos de reparo do DNA, foram utilizados para avaliar os efeitos induzidos por estes lasers nos mecanismos de reparo do DNA (KOHLI ; GUPTA, 2001; KOHLI ; GUPTA , 2003; TEIXEIRA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

Barbosa et al., (2015) usando culturas de *E. coli* de tipo selvagem (AB1157), deficientes em endonuclease III (JW1625-1) e endonuclease IV (JW2146-1) verificaram que os lasers vermelho e infravermelho em altas fluências (250, 500 e 1000J/cm²) são letais, induzem a filimentação e alteram a morfologia das células.

Culturas de *E. coli* BW9091 (deficiente em exonuclease III), BH20 (deficiente em proteína formamidopirimidina DNA glicosilase/proteína MutM) e BW375 (deficiente em endonuclease III) e BW527 (deficiente em endonuclease IV) foram utilizadas para avaliar os efeitos da radiação laser vermelha e infravermelha na sobrevivência e no fenótipo filamentosos. Roos et al., (2013) demonstraram que a exposição a laser de baixa potência (658nm) em baixas fluências (1 e 8 J/cm²) induz um fenótipo filamentosos em culturas de *E. coli* AB1157 e BW9091. No entanto, culturas de *E. coli* BW9091 apresentaram porcentagens de filimentação mais altas do que em culturas da cepa selvagem, sugerindo que os genes não

funcionais relacionados ao reparo do DNA poderiam ser importantes para os efeitos induzidos pelos lasers de baixa potência.

Um estudo com culturas de *E. coli* AB1157, BW9091, BH20 e BW375 mostrou que o laser vermelho (660nm, 25 e 45J/cm²) diminui a sobrevivência em culturas deficientes em endonucleases III e induz a filamentação bacteriana (DA SILVA MARCIANO et al., 2012). No entanto, da Silva Sergio et al., (2013) usando laser vermelho (658nm) em culturas de *E. coli* AB1157, BW527, BW9091, BH20 e BW375 observaram que o laser vermelho de baixa potência não tem efeito sobre a sobrevivência em culturas de *E. coli*, apesar de induzir a filamentação e lesões no DNA que são alvo da exonuclease III. Também em culturas de *E. coli* AB1157, BW9091 e BH20 irradiadas com laser infravermelho (808nm, 60 e 120 J/cm²), observou-se alteração da sobrevivência em culturas da cepa selvagem de *E. coli* e indução do fenótipo de filamentação, dependendo das condições das culturas bacterianas e das vias de reparo do DNA, além de indução de lesões no DNA que não são do tipo rupturas simples ou duplas na molécula de DNA ou sítios álcali-labeis, que não são alvo da exonuclease III ou da formamidopirimidina DNA glicosilase/proteína MutM (CANUTO et al., 2013).

TEIXEIRA et al., (2014) irradiaram culturas de *E. coli* AB1157, BW9091, BH20 e BW375 com laser infravermelho de baixa potência (808 nm, 100 mW, 40 e 60 J/cm²) e observaram que o laser causou efeito sub-letal. Reforçando esses resultados, FONSECA et al., (2012) irradiaram culturas de *E. coli* AB1157, BW9091 e BH20 com laser infravermelho de baixa potência (10 mW, 830 nm) em diferentes fluências (1, 4 e 8 J/cm²), em modos de emissão de onda contínua e pulsada (2,5, 250 e 2500 Hz), e observaram que o laser infravermelho diminuiu a sobrevivência bacteriana nestas culturas em nível sub-letal.

Em outro estudo, culturas de *E. coli* AB1157, BW375 e BW9091 foram irradiadas com laser infravermelho (830nm) em diferentes fluências (10 mW, 1, 4 e 8 J/cm²), em modos de emissão de onda contínua e pulsada (2.5 , 250 e 2500 Hz). Os resultados mostraram que o laser infravermelho pode induzir a filamentação bacteriana em culturas dessas cepas de *E. coli* em fases exponencial e estacionária de crescimento (FONSECA et al., 2011).

APE2 é uma enzima com sequência homóloga a APE1 e mais tarde identificada como uma AP endonuclease alternativa (ANDRES et al., 2015). Embora a atividade de endonuclease da APE2 seja muito menor do que a APE1, sua atividade de exonuclease 3'-5' é forte em comparação com o APE1. Observou-se também que a APE2 interage com PCNA e pode recrutar polimerases de translesão propensas a erros (WILLIS et al., 2015). Fonseca et al., (2014) observaram que a exposição à radiação laser infravermelha (10 mW, 830 nm, 1,0,

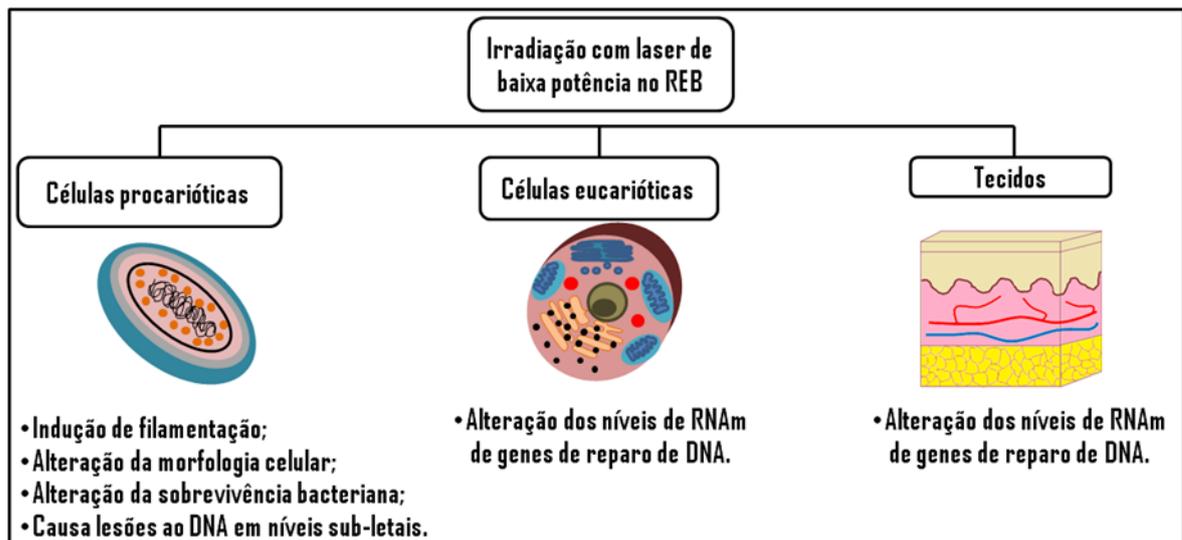
5,0 e 10,0 J/cm²) altera a expressão de APE2 na pele e tecido muscular de ratos *Wistar* 1 e 24 horas após a irradiação com fluências de 5 e 10J/cm².

Outro estudo mostrou que o laser de baixa potência (10 mW, 830nm, 1, 5 e 10 J/cm²) tem diferentes efeitos no reparo de lesões no DNA na pele e nos tecidos musculares. No tecido muscular 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 de baixa potência (100mW; 660nm; 20J/cm²) reduz os níveis de RNAm da APE1 e aumenta os níveis de RNAm de 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 na sobrevivência e na filimentação em culturas de *Escherichia coli*, bem como altera a expressão de genes que relacionados ao REB em células e tecidos biológicos (Figura 15).

Figura 15 - Representação dos efeitos dos lasers de baixa potência no reparo por excisão de bases



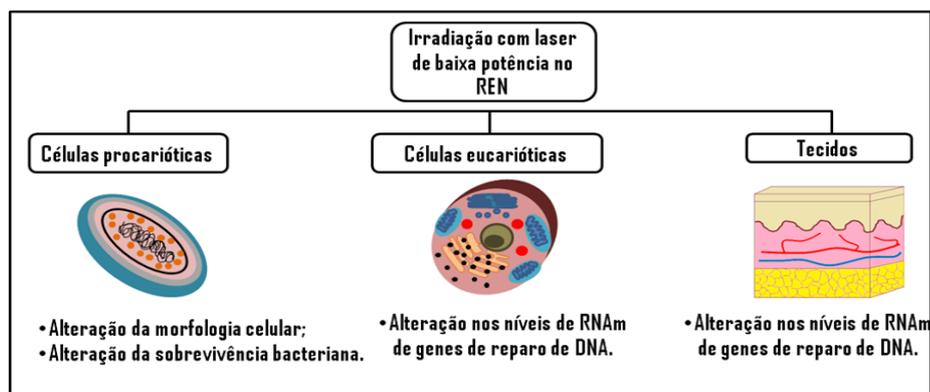
Fonte: A autora, 2017.

1.6.9 Lasers de baixa potência e REN

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 dos lasers de baixa potência no REN em culturas *E. coli* AB1886 (deficiente na proteína UvrA) mostraram que o laser infravermelho de baixa potência (830 nm) reduz a sobrevivência celular em nestas culturas (FONSECA et al., 2012) dependendo da fluência e do modo de emissão do laser (FONSECA et al., 2015a).

Na pele e tecido muscular de ratos *Wistar*, os níveis de mRNA dos genes XPA e XPC são alterados após a exposição a lasers vermelhos (660nm) e infravermelho (808nm) de baixa potência. Essas alterações estariam relacionadas a parâmetros biológicos (tipo de tecido, por exemplo) e a parâmetros físicos (fluência e comprimento de onda, por exemplo) (FONSECA et al., 2015b). Sergio et al., (2016) relataram alterações dos níveis de RNAm dos genes ERCC1 e ERCC2 nos tecidos de ratos *Wistar* expostos a lasers vermelhos e infravermelhos e sugeriram que esse efeito poderia contribuir para a estabilidade do genoma e homeostase de tecidos biológicos afetados por doenças. Além disso, o laser vermelho (660nm) alterou 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 no DNA poderia ser parte do efeito de fotobiomodulação induzida por lasers de baixa potência (Figura 16).

Figura 16 - Representação dos efeitos dos lasers de baixa potência no reparo por excisão de nucleotídeos



Fonte: A autora, 2017.

2 OBJETIVO

Avaliar a influência do laser infravermelho de baixa potência (LIBP) na expressão de genes relacionados ao reparo de lesões musculares, de reparo no DNA e manutenção de telômeros em mioblastos em cultura e em modelo de lesão muscular utilizando ratos *Wistar*.

2.1 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos avaliar efeitos da exposição ao laser de baixa potência nos seguintes parâmetros em mioblastos e músculo lesionado:

- a) viabilidade celular, indução de apoptose e necrose;
- b) expressão de genes relacionados à estabilidade genômica;
- c) expressão de genes relacionados à manutenção dos telômeros;
- d) expressão de genes de reparo de danos oxidativos no dna;
- e) expressão de genes relacionados com o reparo muscular;
- f) expressão de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudo *IN VITRO*

3.1.1 Laser de baixa potência

Para os estudos in vitro foi utilizado o laser infravermelho (808nm) de baixa potência (Photon Lase III, AsGaAl), fabricado pela D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brasil), em modo de emissão contínuo.

3.1.2 Cultura da linhagem celular de mioblastos (C2C12)

Células da linhagem C2C12, oriundas de músculo esquelético de camundongos C3H, foram gentilmente cedidas pela Dra Helene Santos Barbosa do Laboratório de Biologia Estrutural – IOC – FioCruz. As culturas de mioblastos C2C12 foram mantidas em meio Dulbecco de Eagle modificado: mistura de nutriente F-12 (DMEM-F12, Sigma-Aldrich), suplementado com 1, 2, 5 ou 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) com 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina, 5 mg/ml de garamicina e 0,006 mg/ml de anfotericina B em estufa umidificada contendo CO₂ a 5% e a 37 ° C. A cada dois dias, o meio foi descartado e o mesmo volume de meio fresco adicionado até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para expansão das células, foi realizado o subcultivo com a dissociação da monocamada de células utilizando solução de tripsina 0,25% e EDTA 0,01% por 5 min a 37°C. Após a inibição da ação da tripsina com DMEM suplementado com 10% de SFB, a suspensão de células foi centrifugada, ressuspensa em meio DEMEM F-12 suplementado com SFB e as células plaqueadas em garrafas de 25cm² ou placas de 24 poços ou placas de 96 poços de acordo com o procedimento que seria utilizado.

3.1.3 Procedimento de irradiação com laser de baixa potência

As células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), tripsinizadas, centrifugadas (1500 rpm, 10 min, 4 ° C), ressuspensas em meio DMEM-F12, e contadas na câmara de Neubauer. Em seguida, as alíquotas da suspensão celular foram distribuídas em volumes iguais em microtubos (1,5 ml) e centrifugados (1500 rpm, 5 min, 4 ° C) e foi adicionado PBS sem ressuspensão (1 ml), mantendo as células na parte inferior do microtubo cônico (0,13 cm²) para o procedimento de irradiação com laser. As células foram irradiadas com 10 J/cm² (0,2 J, 808 nm, 100 mW por 2 segundos em modo de emissão contínuo); 35 J/cm² (0,9 J, 808 nm, 100 mW, 9 segundos em modo de emissão contínuo) e 70 J/cm² (1,9 J, 808 nm, 100 mW, 19 segundos em modo de emissão contínuo). Após a exposição ao laser, o PBS foi removido e as células foram ressuspensas em meio DMEM-F12 e colocadas em placas de 96 poços para os ensaios de viabilidade celular e em placas de 24 poços para os ensaios de citometria de fluxo. Para os ensaios de citometria de fluxo, 1,5 x 10⁵ células foram cultivadas para ensaios após 24 h, 1,0 x 10⁵ células para ensaios após 48 h e 5,7 x 10⁴ células para ensaios após 72 h. Para os ensaios de viabilidade celular 1,0 x 10⁴ células foram cultivadas em cada poço quando os ensaios foram realizados após 24 h, 9,0 x 10³ células para ensaios após 48 h, e 8,0 x 10³ células para os ensaios após 72 h. Para a extração de RNA total, após a exposição ao laser, o PBS foi removido e as culturas de mioblastos C2C12 foram reconstituídas em meio DMEM-F12 e cultivadas em garrafas de 25 cm² por 2 h antes da extração de RNA total.

3.1.4 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células em resposta ao tratamento com radiação laser foi determinada através do ensaio de WST-1. WST-1 consiste em um ensaio colorimétrico baseado na capacidade de células converterem o sal tetrazolium (dissulfonato de 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno) em corante formazan. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial succinato-tetrazólio redutase e somente ocorre em células viáveis. Com isso, através de variações na coloração do meio contendo WST-1, é

possível inferir a proporção de células viáveis comparando as diferentes condições de tratamento. As células C2C12 foram cultivadas em microplacas de 96 poços com quantidade de células específicas para cada dia: $1,0 \times 10^4$ células foram cultivadas em cada poço quando os ensaios foram realizadas após 24 h, $9,0 \times 10^3$ células para ensaios após 48 h e $8,0 \times 10^3$ células para ensaios após 72 h. O tempo e o número de células utilizadas estavam de acordo com o protocolo de ensaio com WST-1.

O ensaio de WST-1 foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Roche, Mannheim, Alemanha). As C2C12 células foram incubadas com WST-1 (2 μ l para cada poço) e mantidas em 37 °C em estufa umidificada contendo CO₂ a 5% durante 60 minutos. A quantificação das variações colorimétricas foi realizada em um leitor de microplacas (Celer, Minas Gerais, Brasil) utilizando o comprimento de onda de 450 nm e, como referência, o comprimento de onda de 630 nm. Nestes ensaios o diluente dos compostos analisados foi utilizado como controle negativo para os tratamentos. O número relativo de células viáveis foi expresso como a porcentagem de células não expostas ao laser. Os experimentos foram realizados quatro vezes.

3.1.5 Citometria de fluxo: espécies reativas de oxigênio e morte celular

As porcentagens de células apoptóticas e necróticas foram determinadas por análise de externalização de fosfatidil serina e integridade da membrana com coloração dupla usando a Anexina V PE e o 7-AAD (BD Pharmingen, EUA). Espécies reativas de oxigênio intracelular foram avaliadas por análise de oxidação dependente de peróxido de 2'-7'diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCFDA, Life technologies, OR, EUA), que permite detectar peróxido de hidrogênio, radical peroxil, incluindo ambos os radicais alquilperoxila e hidroperoxila, bem como o anion peroxinitrito. Após a tripsinização, as células foram ressuspensas em PBS e a concentração celular foi ajustada em $1,0 \times 10^5$ células/ml. Anexina V PE e 7-AAD ou H2DCFDA foram adicionados, e as amostras foram incubados durante 15 e 10 minutos no escuro, respectivamente. Depois de cada procedimento, as amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (BD Accuri™ C6) e 10.000 eventos foram considerados.

3.1.6 Extração de RNA total

Os fragmentos de tecidos armazenados nos microtubos com reagente TRIzol® foram macerados e centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi transferido para outros tubos, adicionado clorofórmio, misturados e centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), a fase aquosa foi transferida para outros tubos, e adicionado isopropanol. Após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, as amostras foram misturadas e centrifugadas (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com solução de etanol-DEPC (80% etanol, DEPC 0,1%) e centrifugado novamente nas mesmas condições. Sobrenadantes foram retirados e o RNA total foi reconstituído em solução de água-DEPC (0,1%) e armazenados em freezer a -80 °C.

3.1.7 Síntese de cDNA

A concentração de RNA e a pureza foram determinadas em espectrofotômetro pela razão da densidade óptica em 260nm e 280nm. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizou-se o *kit* de síntese de cDNA *two-step* (Promega, EUA). Quatro microgramas de RNA foram transcritos de modo reverso em cDNA usando a transcriptase reversa GoScript™ (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando um total de 20 µl de reação. A reação quantitativa da cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada utilizando 5 µl de GoTaq qPCR Master Mix (Promega) para um volume final de 10 µl contendo 50 ng de cDNA. Para a determinação da quantidade relativa inicial de cDNA, as amostras foram amplificadas com *primers* dos genes: Pax 7, MyoD, TRF1, TRF2, APE1, OGG1, ERCC1, XPC, ATM, P53 e desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH). As reações foram realizadas em equipamento da Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA).

As preparações foram inicialmente desnaturadas a 94°C durante 10 minutos. As PCR consistiram de 40 ciclos com as seguintes condições: desnaturação a 94°C durante 30s, emparelhamento a 60°C durante 30s, e um período de 30s de extensão a 72°C. As análises das curvas de *melt* foram realizadas para todos os genes como indicativo de especificidade das

reações de amplificação, bem como a integridade dos produtos de PCR foram confirmados pela presença de um único pico. A expressão relativa foi normalizada pela níveis de mRNA do gene de referência (GAPDH). Os valores das réplicas de CT foram analisados no Microsoft Excel (Microsoft), utilizando o método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.1.8 Eletroforese de transcritos do gene TRF1 em gel de agarose

A presença de transcritos do gene TRF1 foi verificada por eletroforese em gel de agarose após a segunda amplificação por RT-qPCR. Amostras de transcritos de TRF1 foram misturadas com corante de DNA e tampão de carregamento (0,25% xileno cianol, 0,25% azul de bromofenol e glicerol em água) e aplicado em gel horizontal de agarose a 2% na câmara de eletroforese (Biosystem, São Paulo, Brasil) em tampão tris-acetato-EDTA (pH 8,0, 7 V/cm). As amostras foram vistas sob fluorescência usando um sistema de trans-iluminação ultravioleta (Biosystem, São Paulo, Brasil). Em seguida, a imagem do gel foi digitalizada (Kodak Digital Science 1d, EDAS 120, Manus, Amazônia, Brasil).

3.1.9 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. O teste de análise de variância (ANOVA) foi realizado para determinar possíveis diferenças estatísticas seguidas por pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a distribuição normal de dados. O software InStat GraphPad foi usado para executar análise estatística (GraphPad InStat versão 5.0 para Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

3.2 Estudo *IN VIVO*

3.2.1 Criolesão

A criolesão foi causada através da aplicação de uma barra de ferro no músculo tibial anterior. Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O músculo tibial anterior foi exposto cirurgicamente e uma barra de ferro cilíndrica (3mm de diâmetro), submetida ao nitrogênio líquido, foi colocada sobre o músculo por 10 segundos. Após o intervalo de 30 segundos, o procedimento foi repetido e, em seguida, o músculo foi suturado (ASSIS et al., 2013).

3.2.2 Modelo experimental

Ratos *Wistar* machos adultos (peso corporal 250-300 g e 3-4 meses de idade) foram mantidos em um ambiente controlado com cinco animais por gaiola e condições normais de ciclo claro/escuro (luz 12 h/12 h escuro, luzes acesas às 6 horas da manhã). Os animais tiveram acesso livre à água e à ração, e a temperatura ambiente foi mantida a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com os padrões éticos da instituição. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê Institucional de Cuidados com Animais (Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro), protocolo CEUA / 024/2014. Os animais foram divididos em seis grupos: (1) controle - cirurgicamente exposto e suturado, não lesionado e não irradiado; (2) laser 25mW - cirurgicamente exposto e suturado, não lesionado e irradiado a 25mW; (3) laser 75mW - cirurgicamente exposto e suturado, não lesionado e irradiado a 75mW; (4) lesão - lesionados e não irradiados; (5) lesão 25mW - lesionado e irradiado a 25mW; (6) lesão 75mW - lesionado e irradiado a 75mW. Cada grupo continha cinco ratos *Wistar*.

3.2.3 Laser de baixa potência

Para os estudos *in vivo* foi utilizado laser infravermelho (904nm) de baixa potência (FLUENCE, GaAs), fabricado pela HTM Indústria de Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda (São Paulo, Brasil), em modo de emissão pulsada (5 kHz). O músculo esquelético foi irradiado por varredura imediatamente após a lesão nos três dias seguintes. A eutanásia foi realizada no 5º dia após a lesão, totalizando 4 procedimentos de irradiação (3J/cm² por irradiação, totalizando 12J/cm²). Os parâmetros físicos do laser foram: 904nm, potência (25mW e 75mW), área 6,9mm², densidade de potência (0,36W/cm² e 1,10W/cm²), energia por ponto 0,5J, Densidade de energia 3J/cm² e tempo por ponto (13 segundos e 38 segundos).

3.2.4 Extração de RNA total

Os fragmentos de tecidos armazenados em microtubos com reagente TRIzol® foram macerados, centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos). Sobrenadante foi transferido para outros tubos, adicionado clorofórmio, misturados e centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), a fase aquosa foi transferida para outros tubos, e adicionado isopropanol. Após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, as amostras foram misturadas e centrifugadas (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com solução de etanol-DEPC (80% etanol, DEPC 0,1%) e centrifugado novamente nas mesmas condições. Sobrenadantes foram retirados e o RNA total foi reconstituído em solução de água-DEPC (0,1%) e armazenados em freezer -80 °C.

3.2.5 Síntese de cDNA

A concentração de RNA e a pureza foram determinadas em espectrofotômetro pela razão da densidade óptica em 260nm e 280nm. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizou-se o *kit* de síntese de cDNA *two-step* (Promega, EUA). Quatro microgramas

de RNA foram transcritos de modo reverso em cDNA usando a transcriptase reversa GoScript™ (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando um total de 20 µl de reação. A reação quantitativa da cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) foi realizada utilizando 5 µl de GoTaq qPCR Master Mix (Promega) para um volume final de 10 µl contendo 50 ng de cDNA. Para a determinação da quantidade relativa inicial de cDNA, as amostras foram amplificadas com *primers* dos genes: ATM, P53, TRF1, TRF2, Pax3, Pax7, MyoD, Myf5, MyoG, MRF4, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-4 e GAPDH. As reações foram realizadas em equipamento da Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA).

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

3.2.6 Eletroforese em gel de Agarose da transcrição da IL-10

A presença de transcritos do gene IL-10 foi verificada por eletroforese em gel de agarose após a amplificação por RT-qPCR. Amostras de transcritos de IL-10 foram misturadas com corante de DNA e tampão de carregamento (0,25% xileno cianol, 0,25% azul de bromofenol e glicérol em água) e aplicado em gel horizontal de agarose a 2% na câmara de eletroforese (Biosystem, São Paulo, Brasil) em tampão tris-acetato-EDTA (pH 8,0, 7 V/cm). As amostras foram vistas sob fluorescência usando um sistema de trans-iluminação ultravioleta (Biosystem, São Paulo, Brasil). Em seguida, a imagem do gel foi digitalizada (Kodak Digital Science 1d, EDAS 120, Manus, Amazônia, Brasil).

3.2.7 Análise microscópica

As amostras de músculo foram recolhidas 5 dias após a lesão muscular. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado (pH 7,2), incluídos em parafina e cortes de 5 μ m foram feitos para análises histológicas. Foi realizada a coloração de Hematoxilina ; Eosina para observação histopatológica do tecido.

3.2.8 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. O teste ANOVA foi realizado para determinar possíveis diferenças estatísticas seguidas por pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado para verificar a distribuição normal de dados. O software InStat GraphPad foi usado para executar análise estatística (GraphPad InStat versão 5.0 para Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

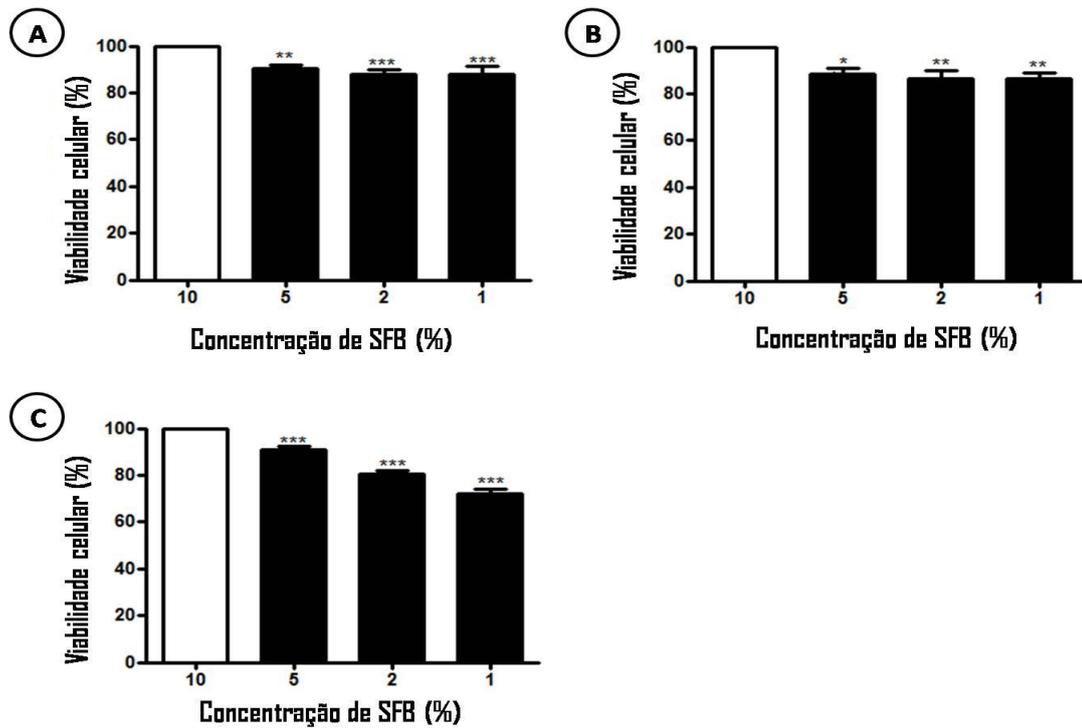
Os resultados dos experimentos *in vitro* estão descritos nos estudos 1, 2 e 3. Os resultados dos experimentos *in vivo* estão descritos nos estudos 4, 5 e 6.

4.1 Estudo 1: Viabilidade celular, espécies reativas de oxigênio, apoptose e necrose em culturas de mioblastos expostos ao laser infravermelho de baixa potência

4.1.1 Resultados

Na Figura 17 estão apresentados os resultados da viabilidade celular em culturas de mioblastos C2C12 expostos a diferentes concentrações de SFB. A viabilidade celular foi reduzida significativamente ($p < 0,05$) em 24, 48 e 72 h nas concentrações mais baixas de SFB (5, 2 e 1%) em comparação com culturas de mioblastos C2C12 em SFB a 10% (Figura 17a-c, respectivamente).

Figura 17 - Viabilidade celular em culturas de mioblastos em diferentes concentrações de soro fetal bovino

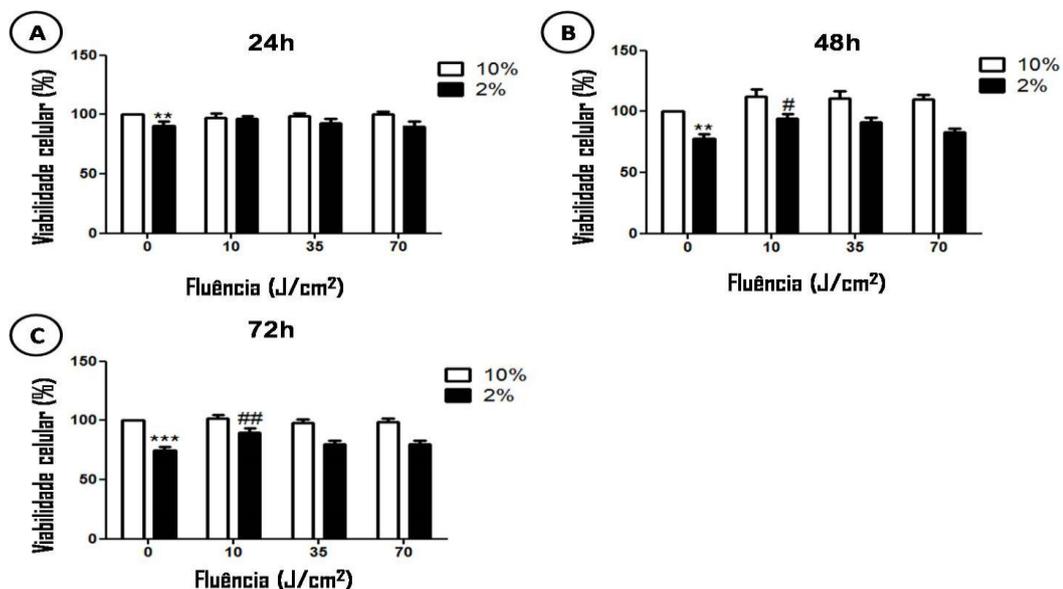


Legenda: (*) $p < 0,05$ quando comparado com o grupo 10% de FBS, (**) $p < 0,01$ quando comparado com o grupo 10% de SFB, (***) $p < 0,01$ quando comparado com o grupo 10% de SFB. A) viabilidade celular em culturas de mioblastos após 24 h; B) viabilidade celular em culturas de mioblastos após 48 h; C) viabilidade celular em culturas de mioblastos após 72 h.

Fonte: A autora, 2016.

Os efeitos da exposição ao laser infravermelho de baixa potência na viabilidade celular foram avaliados em culturas de mioblastos na menor (2%) e na maior concentração (10%) de SFB. A exposição ao laser infravermelho não alterou significativamente ($p > 0,05$) a viabilidade celular em culturas de mioblastos na concentração de 10% de SFB após 24, 48 e 72 h (Figura 18a-c, respectivamente). Não ocorreu alteração significativa ($p > 0,05$) da viabilidade celular nas culturas de mioblastos 24h após a exposição com laser infravermelho em todas as fluências e concentrações de SFB avaliadas (Figura 18a). No entanto, a viabilidade celular nas culturas com concentração de 2% de SFB aumentou significativamente ($p < 0,05$) 48 e 72h depois da exposição ao laser na menor fluência (10 J/cm², Figura 18b, c, respectivamente). Não foi observada alteração significativa ($p > 0,05$) na viabilidade celular em culturas mioblastos expostas ao laser infravermelho nas fluências mais altas (35 e 70 J/cm²), tanto na concentração de SFB de 10%, quanto na de 2%.

Figura 18 - Viabilidade celular em culturas de mioblastos expostas a laser infravermelho de baixa potência

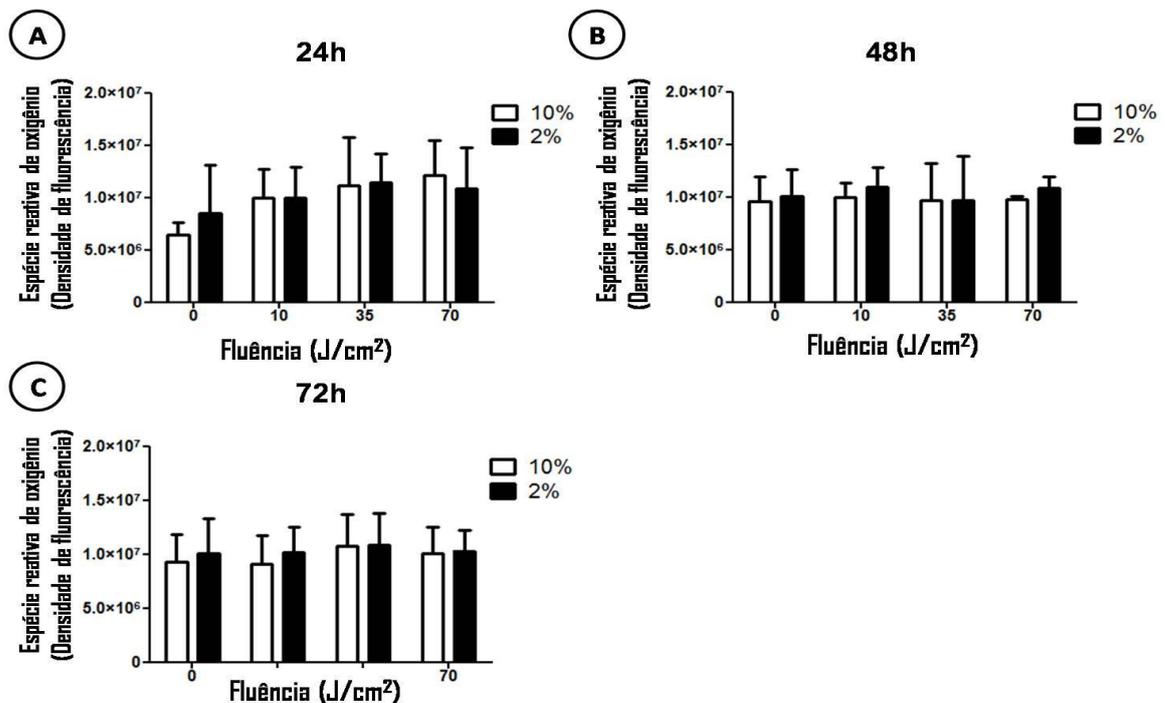


Legenda: A) viabilidade celular em culturas de mioblastos 24h após a exposição ao laser; B) viabilidade celular em cultura de mioblastos 48h após a exposição ao laser; C) viabilidade celular em cultura de mioblastos 72h após a exposição ao laser. (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle com 10% de SFB; (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle com 10% de SFB, (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle com 2% de SFB, ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle com 2% de SFB.

Fonte: A autora, 2016.

Para avaliar a geração de EROs, culturas de mioblastos foram expostas ao laser infravermelho de baixa potência e incubadas com H2DCFDA. Dados na Figura 19 mostram que a exposição ao laser não induziu alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis de EROs em culturas de mioblastos com 2 e 10% de SFB em todas as fluências avaliadas. Apesar de não significativo, um aumento dos níveis de EROs dependente da fluência foi observado 24 h após exposição ao laser em culturas de mioblastos, tanto com 2%, quanto com 10% de SFB (Figura 19a). Nenhuma alteração foi observada nos níveis de EROs em culturas de mioblastos 48 e 72h depois da exposição ao laser infravermelho de baixa potência (Figura 19 b, c, respectivamente).

Figura 19 - Espécies reativas de oxigênio em culturas de mioblastos após exposição ao laser infravermelho de baixa potência

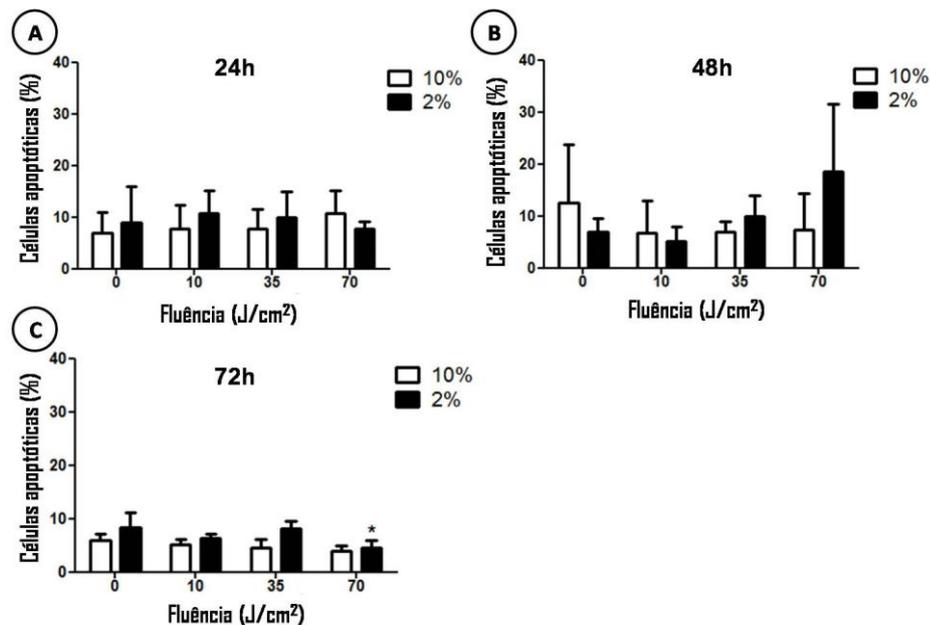


Legenda: A) Espécies reativas de oxigênio em culturas de mioblastos 24h após a exposição ao laser; B) Espécies reativas de oxigênio em culturas de mioblastos 48h após a exposição ao laser; C) Espécies reativas de oxigênio em culturas de mioblastos 72h após a exposição ao laser.

Fonte: A autora, 2016.

A apoptose em culturas de mioblastos foi avaliada através da anexina V PE. Vinte e quatro horas após a exposição ao laser, não foram observadas ($p > 0,05$) alterações na porcentagem de células apoptóticas em culturas de mioblastos, tanto nos grupos com 10% de SFB, quanto nos grupos com 2% de SFB para todas as fluências avaliadas (Figura 20a). Da mesma forma, nenhuma alteração significativa foi observada 48 horas após a exposição ao laser nas concentrações de 2 e 10% de SFB (Figura 20b). No entanto, após 48 h, a porcentagem de células apoptóticas aumentou, mas não significativamente, em culturas com 2% de SFB expostas ao laser infravermelho na fluência mais alta (70 J/cm^2 ; Figura 20b). Após 72 h, a porcentagem de apoptose foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) em culturas expostas ao laser infravermelho na fluência mais alta (70 J/cm^2) em 2% de SFB (Figura 20c).

Figura 20 - Porcentagem de células apoptóticas em culturas de mioblastos expostas a laser infravermelho de baixa potência

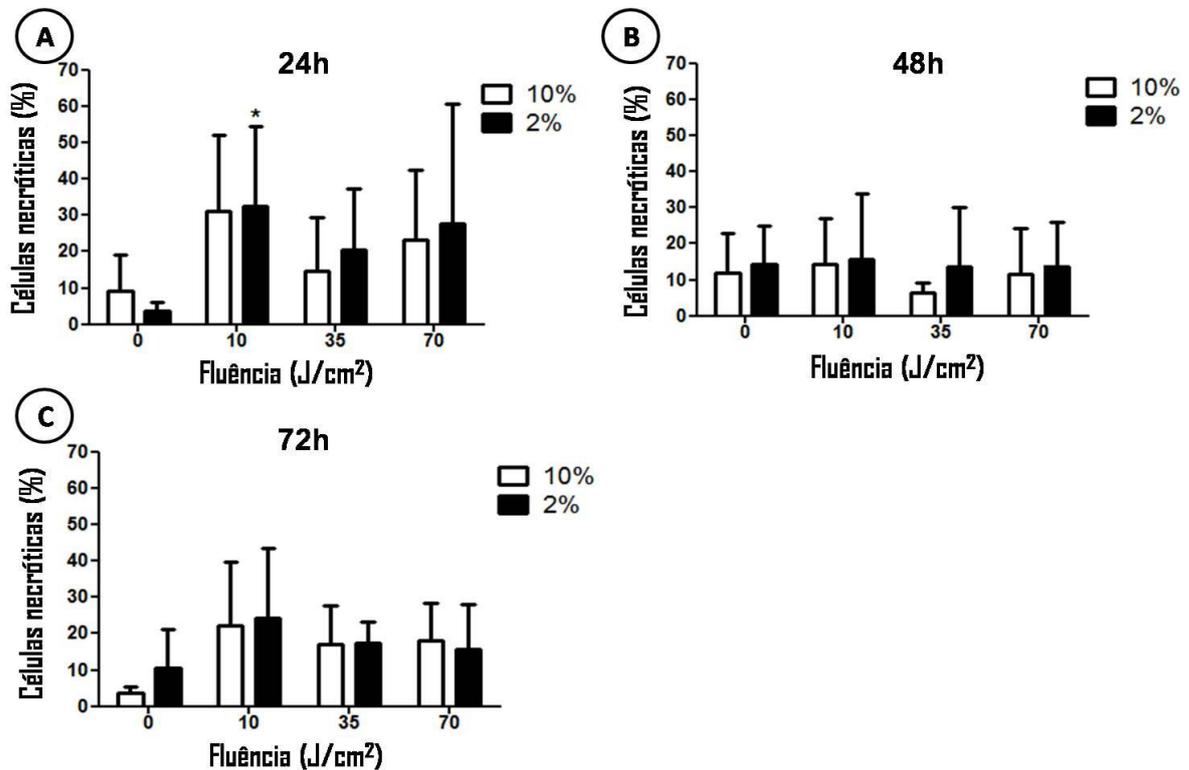


Legenda: A) Porcentagem de células apoptóticas em culturas de mioblastos 24h após a exposição ao laser; B) Porcentagem de células apoptóticas em culturas de mioblastos 48h após a exposição ao laser; C) Porcentagem de células apoptóticas em culturas de mioblastos 72h após a exposição ao laser. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle com 2% de SFB.

Fonte: A autora, 2017.

A porcentagem de células necróticas aumentou significativamente ($p < 0,05$) em culturas de mioblastos 24h após a exposição ao laser na fluência de 10 J/cm^2 nos grupos com 2% de SFB (Figura 21). Após 48 e 72 h da exposição ao laser, a porcentagem de células necróticas em culturas de mioblastos expostas ao laser infravermelho foram semelhantes aos observados nos grupos controles não expostos ao laser (Figura 21b, c, respectivamente).

Figura 21 - Porcentagem de células necróticas em culturas mioblastos expostos a laser infravermelho de baixa potência



Legenda: A) Porcentagem de células necróticas em culturas de mioblastos 24h após a exposição ao laser; B) Porcentagem de células necróticas em culturas de mioblastos 48h após a exposição ao laser; C) Porcentagem de células necróticas em culturas de mioblastos 72h após a exposição ao laser. (*) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle com 2% de FBS.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.2 Discussão

Os efeitos da terapia com laser de baixa potência têm sido observado em vários tipos de tecidos biológicos levando ao alívio da dor (MAIA et al., 2012), melhora da circulação sanguínea (HEU et al., 2013), e acelera o reparo de tecidos biológicos (RODRIGUES et al., 2013). Além disso, foi observado que a exposição ao laser reduz a fadiga muscular, melhora a

flexibilidade, acelera o reparo do tecido muscular lesionado e contribui para o alívio da dor em atletas (YONEZU; KOGURE, 2013).

Os protocolos terapêuticos baseados em laser de baixa potência têm sido amplamente utilizados, obtendo efeitos benéficos no tratamento de várias doenças. Apesar disso, as diferenças nos dispositivos lasers e nos parâmetros físicos (fluência, potência e modos de emissão) dificultam a comparação entre os estudos e a determinação do valor exato desses parâmetros. Isso poderia reduzir os efeitos benéficos induzidos pela radiação laser, bem como aumentar possíveis efeitos adversos, o que poderia tornar a terapia com laser de baixa potência inócua. Na verdade, alguns autores relataram ausência de eficácia da exposição ao laser em diferentes parâmetros físicos (FERREIRA et al., 2009; MESQUITA-FERRARI et al., 2011)

FERREIRA, et al., (2009) e MESQUITA-FERRARI et al., (2011) mostraram que a exposição aos lasers vermelho e infravermelho de baixa potência não aumentou a viabilidade celular em culturas de fibroblastos em concentrações de 5% de SFB nas fluências de 3.8, 6.3 e 10 J/cm². Inicialmente, nosso objetivo foi avaliar a viabilidade celular em culturas de mioblastos em diferentes concentrações de SFB, e os resultados mostraram redução da viabilidade celular nessas culturas nas menores concentrações de SFB (Figura 17).

Com base nesses resultados e de outros autores (FERREIRA et al., 2009; MESQUITA-FERRARI et al., 2011), foi utilizada a concentração de 2% de SFB e uma concentração normal de SFB (10%) para avaliação dos efeitos induzidos por laser nas culturas de mioblastos. Esta concentração de SFB foi escolhida porque concentrações mais baixas de SFB (1%, por exemplo) induzem diferenciação celular em culturas de mioblastos C2C12 (BURATTINI et al., 2004).

As culturas de mioblastos em concentrações de 2% de SFB apresentaram maior viabilidade celular 48 e 72h após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência na menor fluência (10 J/cm²). Curiosamente, 24h após a exposição ao laser, nas fluências mais altas (35 e 70 J/cm²) e na concentração normal de SFB (10%), o laser de baixa potência não alterou a viabilidade celular em cultura de mioblastos (Figura 18). Esses resultados reforçam que os efeitos do laser de baixa potência são dependentes das condições fisiológicas das células. De fato, esse aumento na viabilidade celular pode ter ocorrido porque as culturas de mioblastos estavam em condições de estresse (com 2% de SFB) induzindo efeitos bioestimulatórios do laser, aumentando a viabilidade celular. Além disso, o efeito benéfico induzido pela radiação laser aumentou nas culturas 48 e 72 h após a exposição ao laser na

concentração de 2% de SFB. Nas maiores concentrações de SFB (5 e 10%, por exemplo), este efeito não pode ser detectado porque a viabilidade celular ainda é alta. Nossos resultados corroboram com outros autores (EDUARDO et al., 2007) que mostraram um aumento na viabilidade celular em culturas Vero 24, 48 e 72h após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência em fluências similares em concentrações de 2% de SFB. Além disso, a exposição ao laser infravermelho aumenta a viabilidade celular em culturas de macrófagos após três dias (SOUZA et al., 2014).

A terapia com laser de baixa potência não pode induzir efeitos benéficos sobre os tecidos biológicos caso seja aplicada uma fluência insuficiente ou alta, sugerindo que uma fluência ideal deve ser usada para a obtenção de efeitos benéficos. De fato, o efeito da bioestimulação pode não ocorrer quando doses muito altas são aplicadas, nesse caso, um efeito inibitório pode ser induzido (HUANG et al., 2011). Os resultados deste estudo sugerem que a exposição ao laser infravermelho de baixa potência nas fluências de 35 e 70 J/cm² é alta para induzir bioestimulação em culturas de mioblastos C2C12 em concentrações baixas (2%) e normais (10%) de SFB.

A energia é absorvida por fotoceptores endógenos durante tratamento com laser alterando os níveis de EROs intracelulares, que modificam proteínas redox sensíveis envolvidas na proliferação e diferenciação celular (FARIVAR et al., 2014). Em nosso estudo, nenhuma diferença significativa nos níveis de EROs foi observada 24, 48 ou 72 h após exposição ao laser (Figura 19). No entanto, um aumento nos níveis de EROs dependente da fluência ocorreu 24 horas após a exposição ao laser em culturas de mioblastos tanto na concentração de SFB de 2% quanto na concentração de 10%. Outros autores demonstraram que o laser infravermelho (904 nm) bloqueia os efeitos de EROs no tecido muscular lesionado utilizando uma fluência de 5 J/cm² (RODRIGUES et al., 2014). As discrepâncias dentro deste estudo poderiam ser explicadas pelo comprimento de onda (808 nm) e pelas fluências (10, 35 e 70 J/cm²) utilizadas em nosso estudo. Além disso, as EROs foram avaliadas pelo ensaio H2DCFDA. Este ensaio não avalia todas as espécies reativas de oxigênio e também não avalia as espécies reativas de nitrogênio. Além disso, o aumento dos níveis de EROs pode ser um fenômeno rápido que retorna aos níveis basais antes das 24 h, mas o suficiente para causar uma melhoria da viabilidade celular em culturas mioblastos expostas a laser infravermelho na fluência de 10 J/cm². Na verdade, EROs em baixas concentrações atua como segundo mensageiro intracelular enquanto que em concentrações mais elevadas pode induzir efeitos tóxicos, como peroxidação lipídica e morte celular (HAO et al., 2014). Além disso, a linha de

base do estresse oxidativo poderia ser alta em culturas de mioblastos após 48 h, e a exposição ao laser infravermelho de baixa potência não pode induzir um aumento detectável nos níveis de EROs intracelulares.

A apoptose é regulada por vários fatores, incluindo EROs, tais como alterações no estado redox intracelular induzidas por alguns agentes endógenos e exógenos. Esses agentes causam danos nas mitocôndrias levando à apoptose, em que as vias de sinalização mitocondrial estão envolvidas (DAI et al., 2014). LEE et al., (2013) mostraram que as culturas de mioblastos expostas a peróxido de hidrogênio tiveram aumento de células apoptóticas. Um estudo com as células I28 mostrou que o laser de baixa potência (632,8 nm, 4,5 mW) aumenta a proteína anti-apoptótica célula B de linfoma 2 (BCL-2) e reduz a proteína apoptótica BCL-2 associada à proteína X (BAX) (SHEFER et al., 2002). Em nosso estudo, a apoptose não é alterada em cultura de mioblastos expostas ao laser infravermelho de baixa potência nas menores fluências avaliadas (10 J/cm² e 35 J/cm²) tanto na maior quanto na menor concentração de SFB (10 e 2%, respectivamente). No entanto, houve uma redução da porcentagem de células apoptóticas na maior fluência (70 J/cm²) evidenciando o efeito protetor do laser. Uma hipótese para explicar esses resultados é que a ação do laser infravermelho de baixa potência na geração de EROs não é alta o suficiente para induzir a cascata de apoptose em culturas de mioblastos nas fluências avaliadas em nosso estudo. Nessas fluências, o laser infravermelho induziu efeitos benéficos, como o aumento na viabilidade celular na menor fluência (10 J/cm²) e redução de células apoptóticas na maior fluência (70 J/cm²).

Foi observado um aumento da necrose em culturas de mioblastos expostos ao laser infravermelho de baixa potência na menor fluência (10 J/cm²) no grupo com concentração de 2% de SFB (Figura 21). Este efeito poderia estar relacionado com as EROs induzidas pelo laser, que podem ser tóxicas dependendo da fluência do laser utilizada, como Migliario et al., (2014) sugeriram. Isso poderia ser benéfico para células viáveis, pois, com a eliminação de células quase não viáveis, células viáveis poderiam ter mais nutrientes prontos para usar e a taxa de multiplicação celular poderia ser aumentada. Na verdade, nas mesmas condições de cultura e fluência do laser foi observada aumento na viabilidade celular (Fig 18). Karu (1989) mostraram que em culturas de células, existem subpopulações de células que apresentam características diferentes, que são modificadas quando expostas ao laser de baixa potência. Assim, é possível que o aumento de células necróticas em culturas de mioblastos 24 h após a exposição a laser de infravermelho ocorra devido ao baixo aumento de EROs, mesmo que

esse aumento não tenha sido significativo (Figura 19). Por outro lado, a viabilidade celular aumentou 48 e 72h após a exposição ao laser. É possível que, no momento da análise (24 h após a exposição laser), a concentração de EROs diminuiu e o aumento de EROs induzida pelo laser não foi detectável pela técnica utilizada.

Em culturas de mioblastos a necrose pode ocorrer devido a um ataque inicial de EROs, o que poderia acontecer antes da diminuição da geração de EROs induzida por laser, eliminando células quase não viáveis, e depois disso (48 a 72 h), a bioestimulação induzida pelo laser pode ser observada. Portanto, no momento da análise, os níveis de EROs poderia ser menores atuando benéficamente em células viáveis (efeito de bioestimulação) e causando a morte celular por necrose de células quase não viáveis resultantes de eventos prévios (imediatamente após a exposição ao laser). A viabilidade celular, necrose ou apoptose é observada de acordo com o momento da análise realizada ou dependendo da sub-população celular acessada pela técnica utilizada.

Isso poderia explicar a aceleração do reparo tecidual em lesões musculares. A exposição ao laser de baixa potência com baixas fluências poderia estimular a eliminação de células não viáveis por inflamação levando à recuperação de células viáveis. É possível que a eliminação de células quase não viáveis por indução de necrose poderia permitir que as células musculares saudáveis tivessem um ambiente mais favorável (como mais nutrientes, fatores de proliferação, fornecimento de oxigênio) para a sua recuperação.

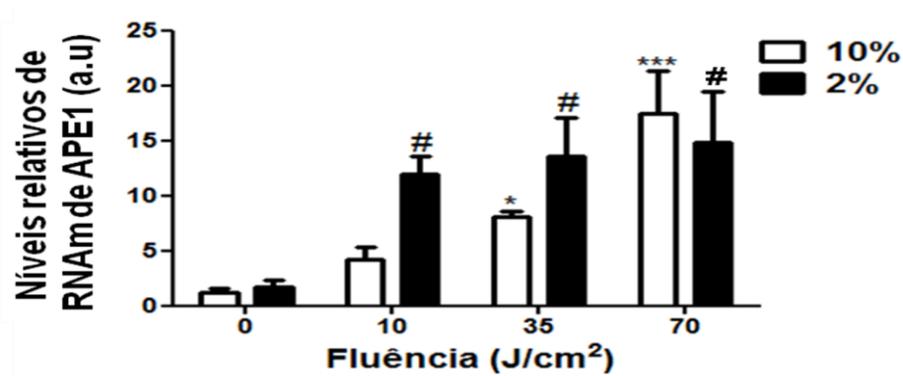
4.2 Estudo 2: A exposição ao laser de baixa potência altera a expressão de RNA mensageiro de genes envolvidos no reparo de danos oxidativos no DNA e na estabilidade genômica em mioblastos

4.2.1 Resultados

Após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis relativos de RNAm do gene APE1 nos grupos com concentração de 10% de SFB, mas apenas nas maiores fluências avaliadas (35 e 70 J/cm²). Nas culturas com 2% de SFB, os níveis relativos de RNAm do gene APE1 aumentou

significativamente ($p < 0,05$) em todas as fluências, quando comparada ao grupo controle com concentração de 2% de SFB não irradiado (Figura 22).

Figura 22 - Níveis relativos de RNAm do gene APE1 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo

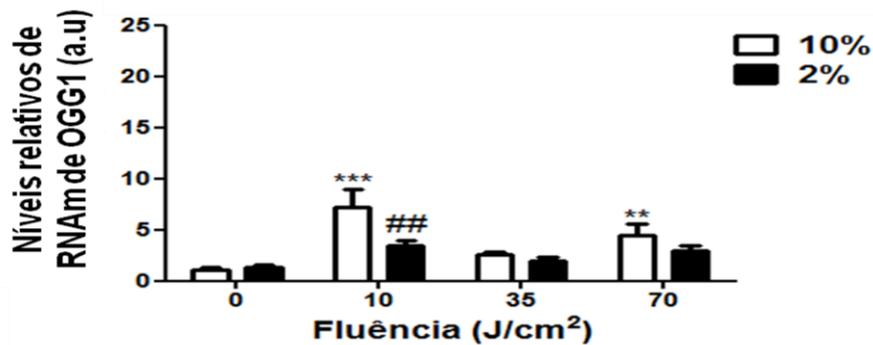


Legenda: Foi utilizado GAPDH como padrão interno para a normalização. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle com 10% de SFB. (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle com 2% de SFB.

Fonte: A autora, 2016.

Para confirmar os efeitos induzidos pelo laser sobre os mecanismos de reparo por excisão de base os níveis relativos de RNAm do gene OGG1 foi avaliada (Figura23). Um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis relativos de RNAm do gene OGG1 foi observado em mioblastos com 10% de SFB expostos às fluências de 10 e 70 J/cm^2 , bem como em mioblastos com 2% de SFB expostos ao laser infravermelho na menor fluência (10 J/cm^2), quando comparados aos respectivos controles não irradiados.

Figura 23 - Níveis relativos de RNAm do gene OGG1 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo

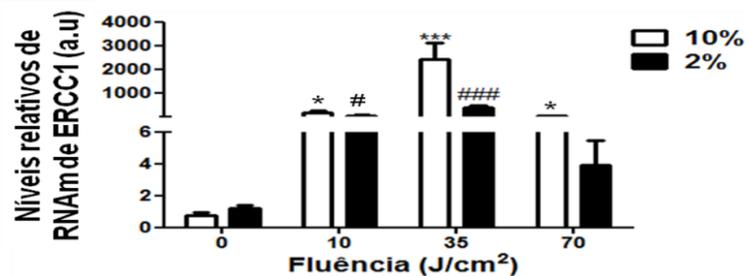


Legenda: Foi utilizado GAPDH como padrão interno para a normalização. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle com 10% de SFB. (##) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo com 2% de SFB.

Fonte: A autora, 2016.

As Figuras 24 e 25 mostram os dados dos níveis relativos de RNAm de genes relacionados ao reparo por excisão de nucleotídeos em mioblastos após a irradiação com laser infravermelho de baixa potência. Os resultados mostraram aumento significativo nos níveis relativos do gene ERCC1 nos grupos com 10% de SFB em todas as fluências (10, 35 e 70J/cm²), quando comparado ao grupo controle com 10% de SFB não irradiado. Nos grupos com concentração de 2% de SFB irradiados com laser infravermelho houve aumento significativo dos níveis relativos do gene ERCC1 apenas nas menores fluências (10 e 35 J/cm²) (Figura 24).

Figura 24 - Níveis relativos de RNAm do gene ERCC1 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo

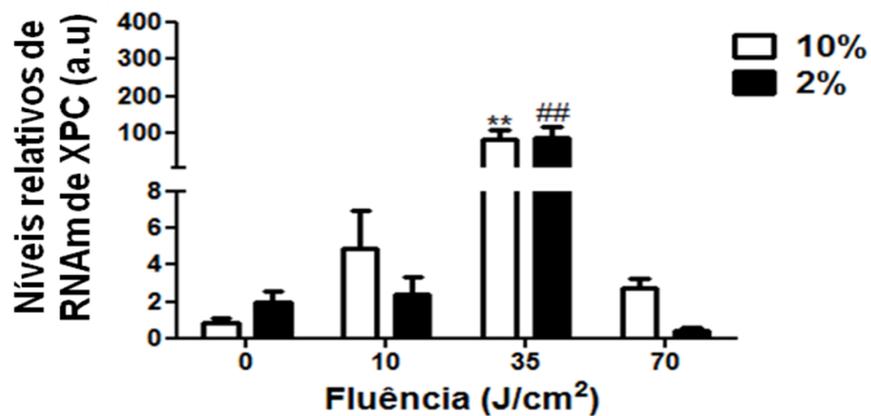


Legenda: Foi utilizado GAPDH como padrão interno para a normalização. (*) p<0,05 e (***) p<0,001 quando comparado ao grupo controle com 10% de SFB. (#) p<0,05 e (###) p<0,001 quando comparado ao grupo com 2% de SFB não irradiado.

Fonte: A autora, 2016.

Dados dos níveis relativos do RNAm do gene XPC mostraram um aumento significativo em mioblastos irradiados nas concentrações de 2% e 10% de SFB apenas na fluência de 35 J/cm², quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Figura 25).

Figura 25 - Níveis relativos de RNAm do gene XPC em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo

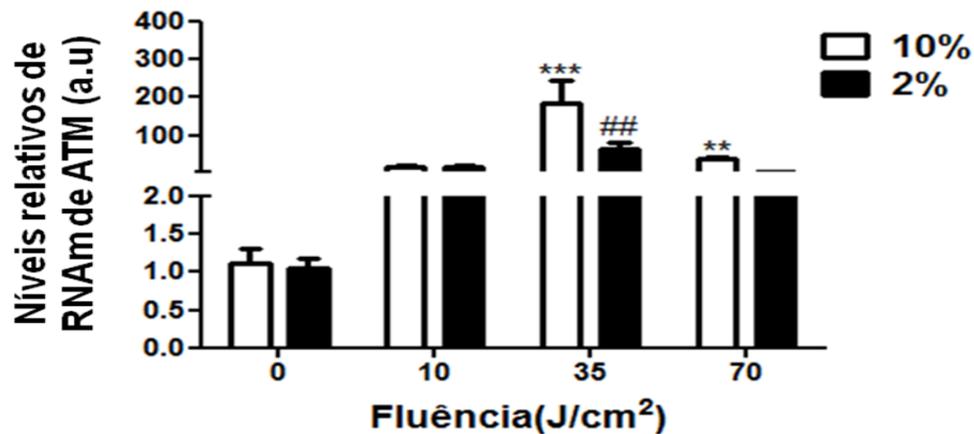


Legenda: Foi utilizado GAPDH como padrão interno para a normalização. (**) p<0,01 quando comparado ao grupo com 10% de SFB não irradiado. (##) p<0,01 quando comparado ao grupo 2% de SFB não irradiado.

Fonte: A autora, 2016.

Também foi avaliado os níveis relativos de RNAm de genes relacionados com a estabilidade do genoma. A exposição ao laser infravermelho aumentou significativamente ($p < 0,01$) os níveis relativos do RNAm do gene ATM nos em mioblastos em culturas com concentração de 10% de SFB nas fluências de 35 e 70 J/cm^2 . Na concentração de 2% de SFB houve um aumento nos níveis relativos do gene ATM apenas no grupo irradiado com 35 J/cm^2 , quando comparado ao respectivo grupo controle não irradiado (Figura 26).

Figura 26 - Níveis relativos de RNAm do gene ATM em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo

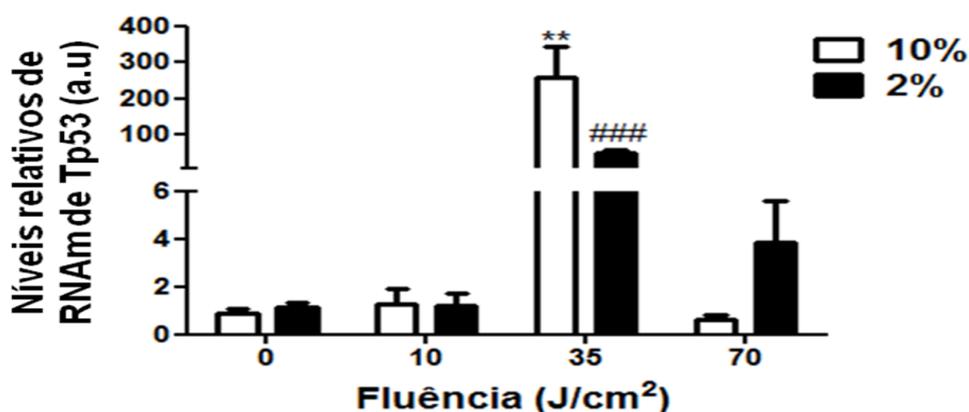


Legenda: Foi utilizado GAPDH como padrão interno para a normalização. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle com 10% de SFB. (##) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle com 2% de SFB.

Fonte: A autora, 2016.

Um aumento significativo ($p < 0,01$) dos níveis relativos de RNAm do gene Tp53 foi observada em mioblastos expostos ao laser com fluência de 35 J/cm^2 com 10% de SFB. Similarmente, os níveis relativos de RNAm do gene Tp53 em mioblastos aumentou significativamente nos grupos com 2% de SFB irradiados com 35 J/cm^2 (Figura 27).

Figura 27 - Níveis relativos de RNAm do gene Tp53 em mioblastos duas horas após exposição ao laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão contínuo



Legenda: Foi utilizado GAPDH como padrão interno para a normalização. (**) $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle com 10% de SFB. (###) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo 2% de SFB não irradiado.

Fonte: A autora, 2016.

4.2.2 Discussão

Embora existam muitas evidências no que diz respeito aos efeitos bioestimulatórios induzidos por lasers de baixa potência, poucos estudos abordam os efeitos bioestimulatórios do laser em genes relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA e à estabilidade genômica.

Níveis elevados de EROs levam ao estresse oxidativo em células e a exposição crônica a situações de estresse, que aumentam as EROs intracelular e podem ser prejudiciais para genomas causando mudanças diretas e indiretas na molécula de DNA (COOKE et al., 2003). Essas mudanças também são induzidas pela exposição a agentes exógenos, como radiação ionizante (ANURANJANI; BALA, 2014) e não-ionizantes (SERGIO et al., 2012), fármacos (WELLS et al., 2009) e metais tóxicos (LIU et al., 2009). O REB ocorre através da excisão de

bases danificadas no DNA por uma classe de enzimas conhecidas como DNA glicosilases (OGG1, por exemplo) que reconhece e retira a base modificada, dando origem a um sítio abásico (HAZRA et al., 2007). Os sítios abásicos são processados pela APE1, que retira a terminação 5' fosfodiéster ligada ao site AP, formando o grupo 3' hidroxila e o grupo 5'-2'-desoxirribose fosfato (PARK et al., 2014). Vários estudos foram realizados para avaliar a expressão dos genes APE1 e OGG1 em diferentes tecidos utilizando a terapia com laser de baixa potência. TRAJANO et al., (2014) avaliaram os níveis relativos de RNAm dos genes APE1 e OGG1 em pele queimada exposta ao laser vermelho de baixa potência (660 nm, 20 J/cm², 100 mW) e mostraram que 10 dias após a lesão, ocorreu redução nos níveis relativos de RNAm do gene APE1 e aumento nos níveis relativos de RNAm do gene OGG1. De Souza da Fonseca et al., (2013) avaliaram a os níveis relativos de RNAm do gene APE1 1 h após a irradiação com laser infravermelho de baixa potência (830 nm) em músculo saudável e observaram um aumento nos níveis relativos de RNAm do gene APE1, a 1, 5 e 10 J/cm², e um aumento nos níveis relativos de RNAm do gene OGG1 na fluência de 10 J/cm². Nossos resultados mostraram um aumento nos níveis relativos de RNAm do gene APE1 nos grupos 10% de SFB após exposição a 35 e 70 J/cm², bem como de todas as fluências avaliadas nos grupos com 2% de SFB após a irradiação. Além disso, um aumento nos níveis relativos de RNAm do gene OGG1 foi verificado nas fluências de 10 e 70 J/cm², nos grupos com 10% de SFB e na fluência de 10 J/cm² nos grupos com 2% de SFB. Sugerimos que 2 h após a exposição ao laser, os níveis relativos de RNAm do gene OGG1 estão retornando aos níveis basais, que ocorre após reconhecimento e clivagem da base danificada. Alternativamente, isso pode ocorrer através da ação de outras glicosilases e, neste momento, o reparo do DNA ocorre pela ação da APE1.

O reparo do DNA por excisão de nucleotídeos envolve quatro etapas: (1) reconhecimento do dano; (2) incisão em ambos os lados da lesão e excisão do fragmento de nucleotídeo contendo o dano; (3) incisão acima e abaixo da lesão por endonucleases e (4) ligação e síntese do DNA (QIU et al., 2014). A proteína XPC reconhece os danos no DNA e se liga a proteína HR23B formando o complexo estável XPC-HR23B. O complexo XPC-HR23B é o primeiro componente de proteína que reconhece e se liga a sítios que contém danos no DNA (FOMINA et al., 2015). O complexo ERCC1-XPF forma uma endonuclease essencial que é responsável pela incisão na cadeia de DNA, no nucleotídeo 5' danificado (MCNEIL; MELTON, 2012). Em um estudo em animais com pele queimada foi observado que o laser vermelho de baixa potência (660 nm, 20 J/cm², 100 mW) reduz os níveis relativos

do RNAm do gene XPC após 10 dias (TRAJANO et al., 2014). Fonseca et al., (2014) observaram, 1 h após a irradiação com laser infravermelho de baixa potência (808 nm), um aumento nos níveis relativos de RNAm do gene XPC em 25, 50 e 100 J/cm² em pele de ratos *Wistar*. Nossos resultados mostraram um aumento nos níveis relativos de RNAm dos genes ERCC1 e XPC nos grupos com 10% e 2% SFB na fluência de 35 J/cm² (Figura 24 e 25), mas os níveis relativos de RNAm do gene aumentou também em todas as fluências avaliadas na concentração de 10% de SFB e na fluência de 10J/cm² na concentração de 2% de SFB. Dados dos níveis relativos de RNAm do gene ERCC1 confirmam os dados obtidos pelos níveis relativos de RNAm do gene XPC. Nossos achados com os níveis relativos do RNAm do gene XPC sugerem que os efeitos bioestimulatórios de lasers de baixa potência ocorrem em fluências (ou doses) ótimas. De fato, doses mais baixas não causam nenhum efeito, enquanto que altas doses causam a inibição de efeitos induzidos pela radiação laser (HUANG et al., 2012). Sugerimos que baixas fluências não alteram os níveis relativos de genes relacionados ao reparo por excisão de nucleotídeos em mioblastos e que altas fluências causam inibição dos efeitos induzidos pelo laser. Também, as condições de estresse não alteram os níveis relativos relacionados com este mecanismo de reparo do DNA. Outros estudos demonstraram que os efeitos do laser infravermelho de baixa potência dependem das condições de cultura das células (CANUTO et al., 2013; SERGIO et al., 2013).

O produto do gene Tp53 desempenha um papel crucial na resposta celular a vários tipos de estresse e sua expressão aumenta significativamente em resposta a condições de estresse, como danos no DNA, comprometimento da síntese de RNA e depleção de nucleotídeos (MIRZAYANS et al., 2012). Uma vez ativada, esta proteína pára o ciclo celular ou induz apoptose por mecanismos de transcrição dependentes e independentes. Além disso, o produto do gene Tp53 regula os *checkpoints* G1/S e G2/M (LAVIN; GUEVEN, 2006). A proteína ATM regula o *checkpoint* G1/S pela fosforilação da Tp53, liderando a regulação transcricional dos genes alvo, incluindo p21Cip1. Isso medeia a interrupção do ciclo celular nos *gaps* G1/S ou G2/M (DICHT; PAULL, 2012), reduzindo a capacidade da Tp53 para ligar ao MDM2, estabilizando e aumentando sua atividade (ZHAO et al., 2009; BROOHAKER; XU, 2014). Após a exposição à radiação ionizante, a Tp53 desempenha um papel importante no *checkpoint* G1/S que requerem ação da ATM, tais como em células deficientes em ATM. (CHAUDHARY; AL-BARADIE, 2014). Além disso, estudos com radiação não-ionizante (radiação ultravioleta) mostrou que animais com deficiência de Tp53 têm uma alta propensão para o desenvolvimento de tumores (CUI et al., 2007; CHEN et al., 2014). No entanto, não há

estudos avaliando os níveis relativos relacionados à estabilidade genômica após irradiação com laser de baixa potência. Observamos um aumento nos níveis relativos do RNAm do gene Tp53 em mioblastos após exposição ao laser na fluência de 35 J/cm² nas concentrações de 10% e 2% de SFB e um aumento nos níveis relativos do RNAm do gene ATM nas fluências de 35 e 70 J/cm² em 10% de SFB, bem como na fluência de 35 J/cm² em 2% de SFB (Figura 26 e 27). Embora a ativação de ATM e Tp53 esteja ligada a vários tipos de câncer, um aumento na expressão gênica de ATM e Tp53 pela ação do laser infravermelho de baixa potência pode proteger os mioblastos. Isso poderia levar ao reparo de danos no DNA, contribuindo para a estabilidade genômica e talvez esse pudesse ser um efeito da bioestimulação induzida pelos lasers nessas doses.

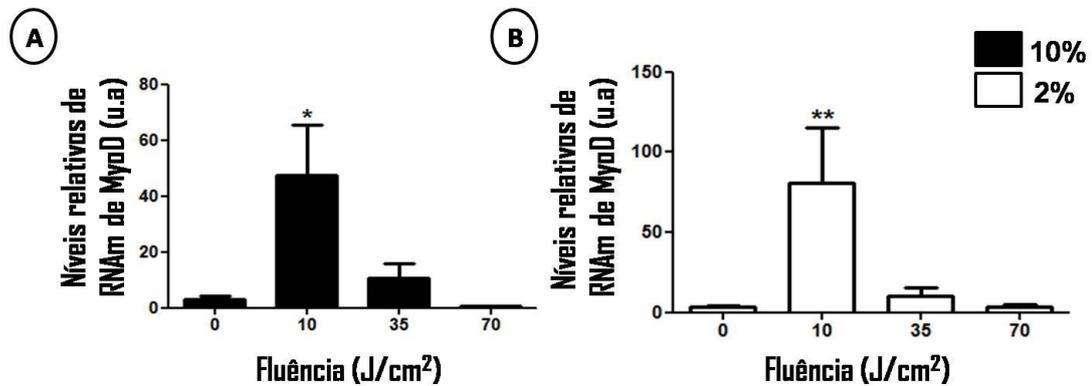
Os dados deste estudo sugerem que fluências ótimas devem ser obtidas na terapia com lasers de baixa potência para induzir a alteração nos níveis relativos relacionados ao reparo de danos oxidativos no DNA e à estabilidade genômica. A proteção e a integridade do genoma poderia ser a base dos efeitos bioestimulatórios dos lasers de baixa potência em fluências, potências e modo de emissão terapêuticos.

4.3 Estudo 3: Laser infravermelho de baixa potência modula os níveis relativos de RNAm de genes de reparo muscular e de estabilidade de cromossomos em mioblastos

4.3.1 Resultados

Na Figura 28 estão apresentados resultados dos níveis relativos de RNAm do gene MyoD após a exposição a laser infravermelho de baixa potência em células C2C12 nas concentrações de 10% e 2% de SFB. Os dados nesta figura mostram que os níveis relativos do gene MyoD foi significativamente aumentada ($p < 0,05$) após a exposição ao laser na menor fluência avaliada (10 J/cm²) em células C2C12 na concentração de 10% de SFB (Figura 28a) e na concentração de 2% de SFB (Figura 28a), quando comparados aos seus respectivos controles não irradiados.

Figura 28 - Níveis relativos de RNAm do gene MyoD em mioblastos 2 h após a exposição a laser infravermelho de baixa potência em 10% e 2% de SFB

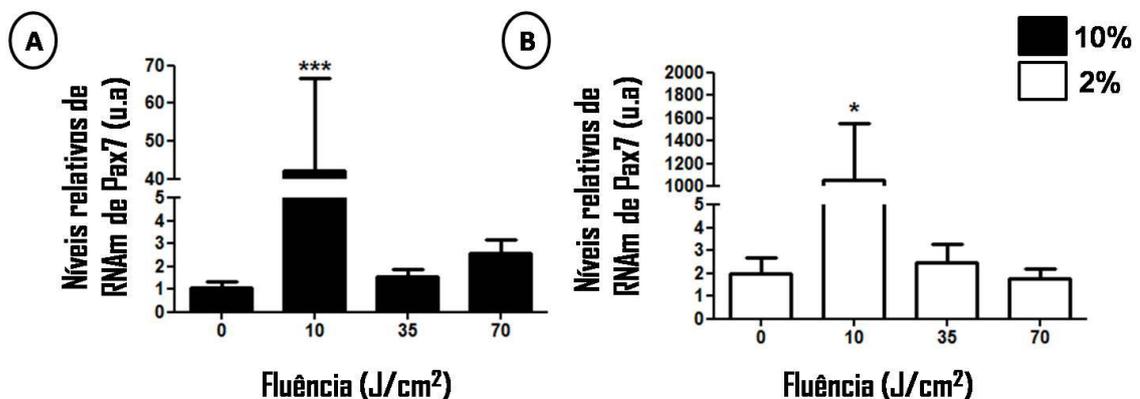


Legenda: GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. (*) p < 0,05 e (**) p < 0,01 em comparação com respectivos grupos controle (não irradiados).

Fonte: A autora, 2016.

Para confirmar os efeitos da exposição ao laser infravermelho de baixa potência na miogênese, os níveis relativos de RNAm do gene Pax7 também foram avaliados em culturas de células C2C12 com concentração de 10% e 2% de SFB (Figura 29). De forma similar aos resultados dos níveis relativos de RNAm do gene MyoD, os níveis relativos de RNAm do gene Pax7 aumentaram significativamente (p < 0,05) após a exposição ao laser na menor fluência em células C2C12 em culturas com 10% de SFB (Figura 29a) e com 2% de SFB (Figura 29b), quando comparados aos respectivos controles não irradiados.

Figura 29 - Níveis relativos de RNAm do gene Pax7 em mioblastos 2 h após a exposição a laser infravermelho de baixa potência em 10% e 2% de SFB

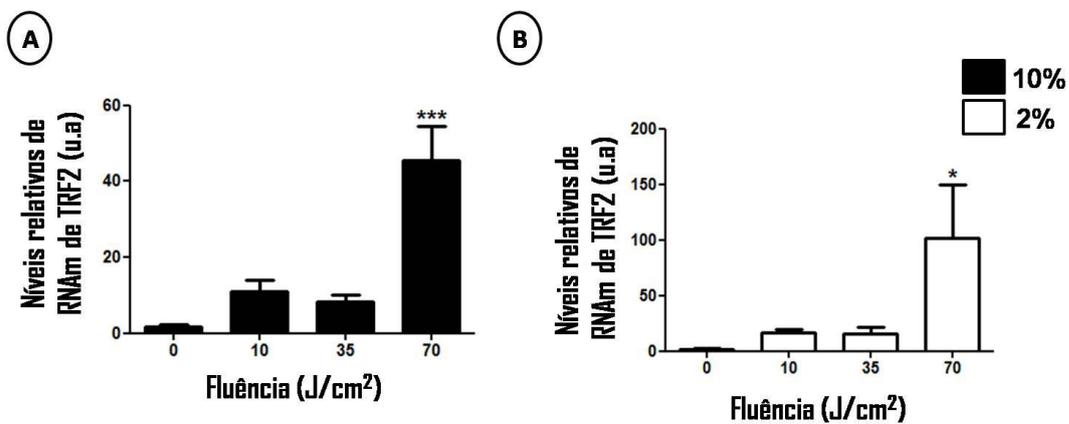


Legenda: GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. (*) p < 0,05 e (***) p < 0,001 em comparação com respectivos grupos controle (não irradiados).

Fonte: A autora, 2016.

A Figura 30 mostra os níveis relativos de RNAm do gene TRF2 após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência em células C2C12 em culturas com 10% e 2% de SFB. Os níveis relativos de RNAm do gene TRF2 aumentaram significativamente ($p < 0,05$) após a exposição ao laser na maior fluência (70 J/cm^2) em células C2C12 em culturas com 10% e 2% de SFB (Figura 30a e 30b, respectivamente), quando comparados aos seus respectivos controles não irradiados.

Figura 30 - Níveis relativos de RNAm do gene TRF2 em mioblastos 2 h após a exposição a laser infravermelho de baixa potência em 10% e 2% de SFB

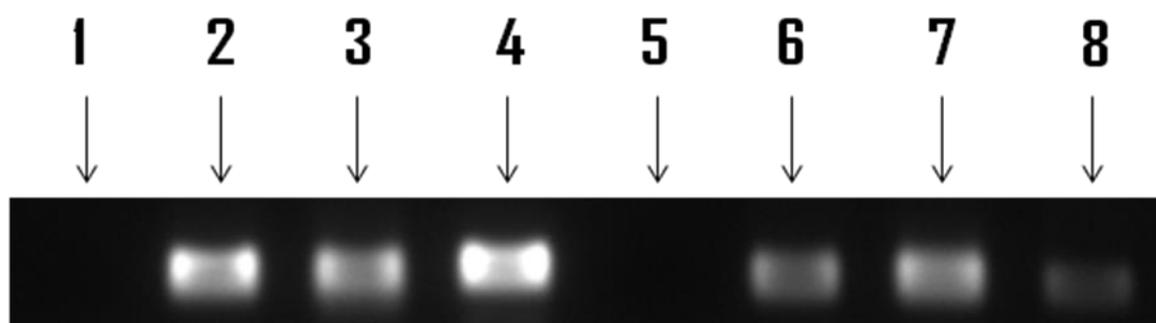


Legenda: GAPDH foi usado como padrão interno para normalização. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$ em comparação com respectivos grupos controle (não irradiados).

Fonte: A autora, 2016.

A Figura 31 é uma fotografia de gel de agarose após a eletroforese de transcritos do gene TRF1 de células C2C12 expostas ao laser infravermelho de baixa potência em diferentes fluências em culturas com 10% e 2% de SFB. A fotografia indica que a exposição ao laser induz a transcrição de RNAm do gene TRF1 em células C2C12, tanto em culturas com 10%, como em culturas com 2% de SFB, em todas as fluências avaliadas.

Figura 31 - Fotografia de gel de agarose após eletroforese de transcritos do gene TRF1 em mioblastos expostos a laser infravermelho de baixa potência em culturas com 10% e 2% de SFB



Legenda: **1:** Controle 10% de SFB; **2:** 10% de SFB irradiado com 10 J/cm²; **3:** 10% de SFB irradiado com 35 J/cm²; **4:** 10% de SFB irradiado com 70 J/cm²; **5:** controle 2% de SFB; **6:** 2% de SFB irradiado com 10 J/cm²; **7:** 2% de SFB irradiado com 35 J/cm²; **8:** 10% de SFB irradiado com 70 J/cm².

Fonte: A autora, 2016.

4.3.2 Discussão

A terapia com laser de baixa potência é um tratamento eficaz e seguro, cujos efeitos bioestimulatórios causam benefícios em vários tipos de células e tecidos (MARQUES et al., 2004; WALTER et al., 2015; TRAJANO et al., 2016b). No entanto, não há estudos que avaliaram possíveis efeitos do laser no reparo do tecido muscular associado à estabilidade dos cromossomos. Para este propósito, os níveis relativos de RNAm de genes relacionados ao reparo de lesões musculares e à estabilidade dos cromossomos foram avaliados neste estudo.

Os mioblastos ativados expressam MyoD e Pax7, entre outros fatores (WANG et al., 2015). A MyoD está relacionada à regulação de células satélites e à remoção de mioblastos do ciclo celular para iniciar a miogênese (ASSIS et al., 2013; MESQUITA-FERRARI et al.,

2015). A Pax7 é um marcador quantificável para células satélites em estado ativado e quiescente, sendo essencial para o desenvolvimento e sobrevivência dessas células (RELAIX; ZAMMIT, 2012; MOTOHASHI; ASAKURA, 2014). A interação entre os produtos dos genes MRF e PAX parece ser importante para auto-renovação das células satélites (ZAMMIT et al., 2006). Durante a regeneração muscular, células satélites são distinguidas pela expressão das proteínas MyoD e Pax7. As células em estado quiescente apresentam a expressão da Pax7 aumentada e a expressão da MyoD diminuída; no estado de proliferação, a expressão de Pax7 e MyoD estão aumentadas; e as células em estado de diferenciação miogênica têm a expressão da Pax7 reduzida e a expressão da MyoD aumentada (MOTOHASHI; ASAKURA, 2014).

Existem vários estudos que relataram os efeitos bioestimulatórios do laser na expressão da MyoD, entretanto, os resultados são controversos e nenhum estudo tem associado a expressão da MyoD à expressão da Pax7 após a exposição ao laser. Rodrigues et al., (2013a) mostraram aumento dos níveis relativos do RNAm do gene MyoD devido à exposição ao laser em animais lesionados após 14 dias (660 nm, 20 mW, 10 J/cm²). Outro estudo mostrou aumento da expressão do gene MyoD em animais lesionados e irradiados com laser 4 dias após a lesão (808 nm, 30 mW, 180 J/cm²) (ASSIS et al., 2013). Rodrigues et al (2013b) relataram também aumento na expressão do gene MyoD 14 e 21 dias após a irradiação com laser vermelho (660 nm, 10 e 50 J/cm²). Brunelli et al., (2014) demonstraram que o laser infravermelho (780 nm, 10 até 50 J/cm²) aumenta a expressão do gene MyoD em animais lesionados 7 dias após a exposição. No entanto, Mesquita-Ferrari et al., (2015) não observaram qualquer efeito 24, 48 ou 72 h após a exposição com laser infravermelho (780 nm, 10 mW, 5 J/cm²) na expressão do gene MyoD em células C2C12. Pertille et al., (2012), utilizando laser infravermelho (830nm, 30mW, 4 J/cm²), não observaram alterações na expressão do RNAm do gene MyoD após 7 e 21 dias em animais lesionados. Além disso, SILVA et al., (2012) não observaram nenhuma alteração na expressão do gene MyoD em animais lesionados 8 dias após a exposição ao laser infravermelho (904 nm, 1,5 e 3 J, 5 mW).

Nossos resultados mostraram que o laser infravermelho (808 nm, 10 J/cm², 100 mW) aumenta os níveis relativos de RNAm dos genes MyoD (Figura 28a, b) e Pax7 (Figura 29a, b), sugerindo possivelmente que esta fluência causa proliferação de células satélites. Curiosamente, não parece haver diferença se a célula está em estado normal ou em condições estressantes porque os níveis relativos do RNAm dos genes MyoD e Pax7 está aumentada em células expostas ao laser infravermelho em culturas com 10% e 2% de SFB. Mesquita-Ferrari

et al., (2015) não observaram mudanças na expressão do gene MyoD em células C2C12 irradiadas com 5 J/cm² após 24, 48 e 72 h. Isso pode ter ocorrido porque a terapia com laser de baixa potência atua apenas em doses ideais, uma vez que altas doses podem ser tóxicas e baixas doses insuficientes (HUANG et al., 2011). Sugerimos que o laser em condições ideais pode ser benéfico mesmo para as células em condições normais. Além disso, doses mais altas não foram capazes de alterar os níveis relativos de RNAm dos genes MyoD e Pax7.

Nas células humanas, os genes TRF1 e TRF2 estão localizados no fim dos cromossomos e contribuem para proteção e manutenção dos telômeros (SMOGORZEWSKA et al., 2000). A TRF1 e a TRF2 atuam como um regulador negativo do comprimento do telômero quando tem sua expressão aumentada em camundongos e humanos (MARTÍNEZ; BLASCO, 2010). O encurtamento de telômeros está associado ao envelhecimento no músculo esquelético (PONSOT et al., 2012). Apesar das células satélites terem capacidade proliferativa e contribuírem para a manutenção do comprimento dos telômeros, há redução do comprimento dos telômeros nessas células durante as duas primeiras décadas de vida devido ao aumento na massa muscular. Entretanto, os telômeros permanecem estáveis durante o estágio adulto (DECARY et al., 1997). A capacidade de reabilitação está relacionada ao comprimento dos telômeros no músculo lesado (COLLINS et al., 2003).

Os resultados deste estudo mostram que os níveis relativos de RNAm do gene TRF2 não está alterada após a exposição ao laser nas menores fluências (10 e 35 J/cm²), sugerindo que o laser infravermelho não induz a estabilidade dos telômeros. Contudo, na maior fluência do laser (70 J/cm²), os níveis relativos do RNAm do gene do TRF2 está aumentada nas concentrações de 2% e 10% de SFB (Figura 30a, b). Os efeitos da exposição ao laser infravermelho na estabilização dos telômeros foram confirmados pela avaliação da expressão do RNAm do gene TRF1. De fato, a expressão do RNAm do gene TRF1 em células C2C12 não irradiadas é muito baixo e, mesmo após dois procedimentos de amplificação realizados por RT-qPCR, não foram obtidos transcritos detectáveis (Figura 31, 1 e 5). No entanto, os níveis relativos do RNAm do gene TRF1 é obtida em células C2C12 após as exposições em todas as fluências do laser, apesar dos níveis relativos do RNAm serem ligeiramente menores nas células com concentração reduzida de SFB (2% de SFB) (Figura 31, 6-8).

TRF1 e TRF2 protegem contra a ativação da resposta ao dano no DNA e instabilidade de telômeros (GALATI et al., 2015). TRF1 e TRF2 parecem ser mediadores importantes da integridade do T-loop e sua interrupção poderia levar a respostas aos danos no DNA a jusante (PITMANN et al., 2013). A perda de TRF2 ativa a via ATM quinase, levando ao aumento na

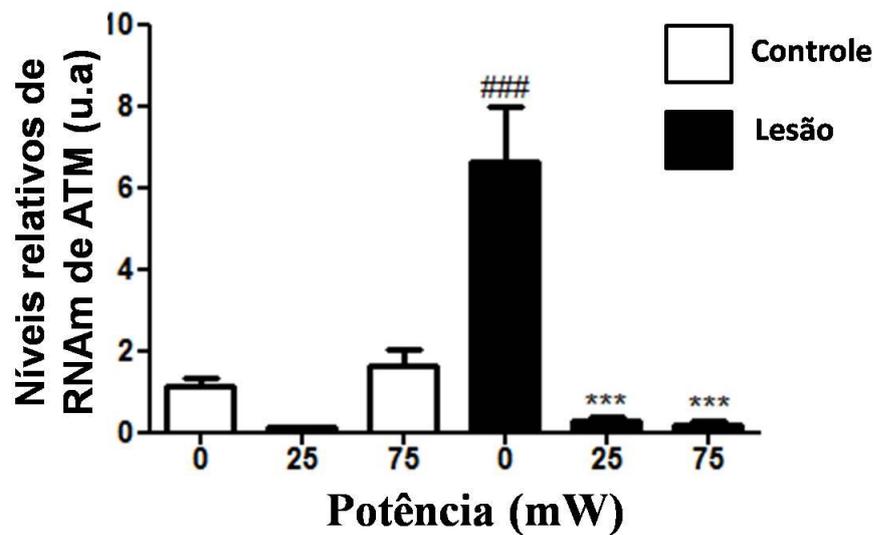
regulação de Tp53 e à interrupção do *gap* G1/S mediada pela proteína p21, a supressora de tumor Tp53 também está relacionada à resposta ao encurtamento de telômeros (DE LANGE, 2005). No entanto, estudos relataram que a regulação positiva de TRF1 e TRF2 foi associada ao câncer de pulmão (NAKANISHI et al., 2003) e ao carcinoma de células renais (PAL et al., 2015). Por outro lado, esses genes tiveram redução da expressão em células hematopoiéticas malignas (YAMADA et al., 2002) e no câncer de mama (SAITO et al., 2002). Nas células humanas, o aumento na expressão do gene TRF1 leva ao encurtamento de telômeros e o aumento na expressão do gene TRF2 na pele de camundongos leva a defeitos no reparo por excisão de nucleotídeos, aumento do câncer de pele e envelhecimento prematuro (MUÑOZ et al., 2009). No músculo esquelético, a regulação transcricional de TRF1 e TRF2 poderia responder a insultos patológicos (doenças) ao invés de estímulos fisiológicos (exercícios, por exemplo) (LAYE et al., 2012). Contudo, estudos relataram que o exercício voluntário crônico regula negativamente a expressão do gene TRF1 e isso sugere que, no músculo esquelético, o complexo telomérico é regulado de forma exclusiva, quando comparado a outros tecidos (LUDLOW et al., 2012b).

4.4 Estudo 4: Efeitos da fotobiomodulação (FBM) nos níveis de RNA mensageiro dos genes de estabilidade genômica e manutenção de telômeros em músculo lesionado

4.4.1 Resultados

Na Figura 32 estão apresentados resultados dos níveis relativos de RNAm do gene ATM no músculo tibial anterior de ratos *Wistar* após o procedimento de FBM. Os níveis relativos de RNAm do gene ATM no grupo lesionado aumentou significativamente após a exposição ao laser, quando comparada ao grupo controle ($p < 0,001$), mas nos grupos lesionados e irradiados (25mW e 75mW), os níveis relativos de RNAm do gene ATM foi significativamente reduzida ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo lesionado (Figura 32).

Figura 32 - Níveis relativos do RNAm do gene ATM em músculo lesionado de ratos *Wistar* após fotobiomodulação em diferentes potências

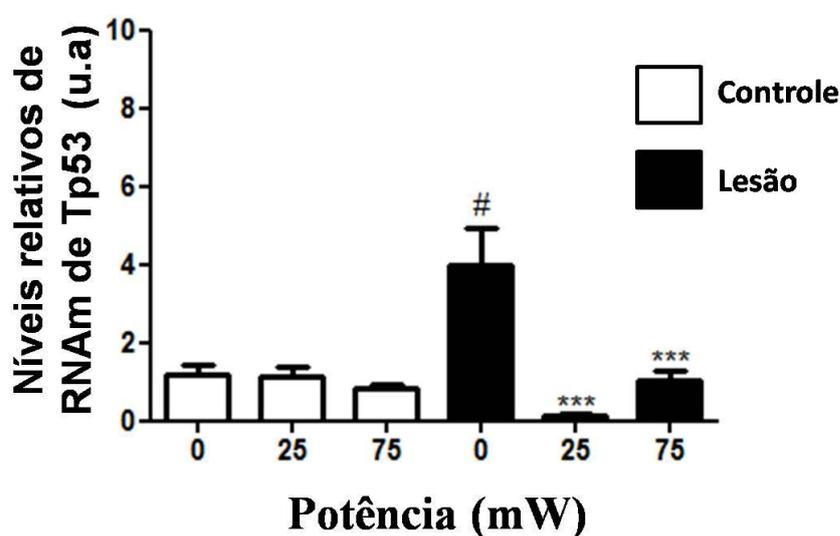


Legenda: (###) $p < 0.001$ grupo lesão comparado com respectivo grupo controle não irradiado. (***) $p < 0.001$ grupo lesão 25mW e 75mW quando comparado com o grupo lesão não irradiado.

Fonte: A autora, 2017.

Para confirmar os efeitos induzidos pelo laser sobre os níveis relativos dos genes de estabilidade genômica, foram avaliados os níveis relativos de RNAm do gene Tp53 (Figura 33). Um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis relativos do RNAm do gene Tp53 foi obtido no músculo tibial anterior do grupo lesionado, quando comparado com o grupo controle não irradiado. Nos grupos lesionados e irradiados (25mW e 75mW), os níveis relativos de RNAm do gene Tp53 foram significativamente reduzidos ($p < 0,001$), quando comparada com o grupo lesionado.

Figura 33 - Níveis relativos de RNAm do gene Tp53 em músculo lesionado de ratos *Wistar* após fotobiomodulação em diferentes potências

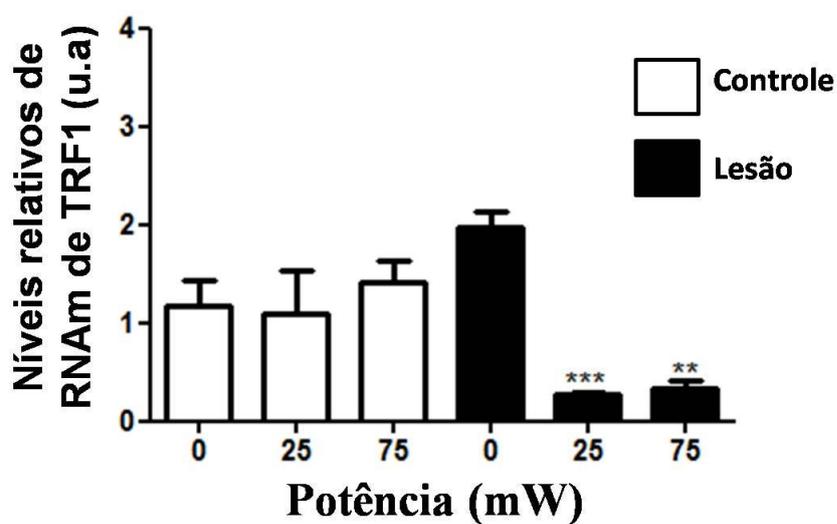


Legenda: (#) $p < 0,05$ grupo lesão comparado com respectivo grupo controle não irradiado. (***) $p < 0,001$ grupos lesão 25mW e 75mW quando comparado com o grupo lesão.

Fonte: A autora, 2017.

Na Figura 34 estão apresentados resultados dos níveis relativos de RNAm do gene TRF1 do músculo tibial anterior de ratos *Wistar* após o procedimento de FBM. Os dados nesta figura indicam redução significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) dos níveis relativos de RNAm do gene TRF1 no músculo lesionado exposto ao laser em 25mW e 75mW, quando comparado com o grupo lesionado não irradiado.

Figura 34 - Níveis relativos de RNAm do gene TRF1 em músculo lesionado de ratos *Wistar* após fotobiomodulação em diferentes potências

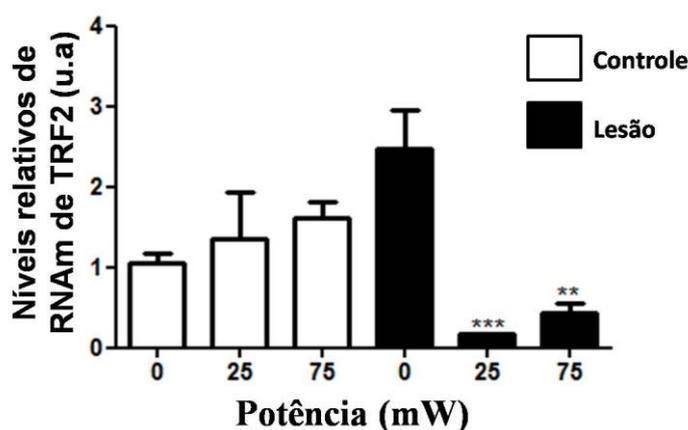


Legenda: (***) $p < 0,001$ grupo lesão 25mW quando comparado com o grupo lesão e (**) $p < 0,01$ grupo lesão 75mW, quando comparado com o grupo lesão.

Fonte: A autora, 2017.

Os dados dos níveis relativos do RNAm do gene TRF2 confirmaram os dados obtidos para o gene TRF1 uma vez que houve redução significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) dos níveis relativos de RNAm do gene TRF2 do músculo lesionado exposto ao laser nas potências de 25mW e 75mW, quando comparado com o grupo lesionado não irradiado (Figura 35).

Figura 35 - Níveis relativos de RNAm do gene TRF2 em músculo lesionado de ratos *Wistar* após fotobiomodulação em diferentes potências.



Legenda: (***) $p < 0,001$ grupo lesão 25mW quando comparado com o grupo lesão e (**) $p < 0,01$ grupo lesão 75mW quando comparado com o grupo lesão.

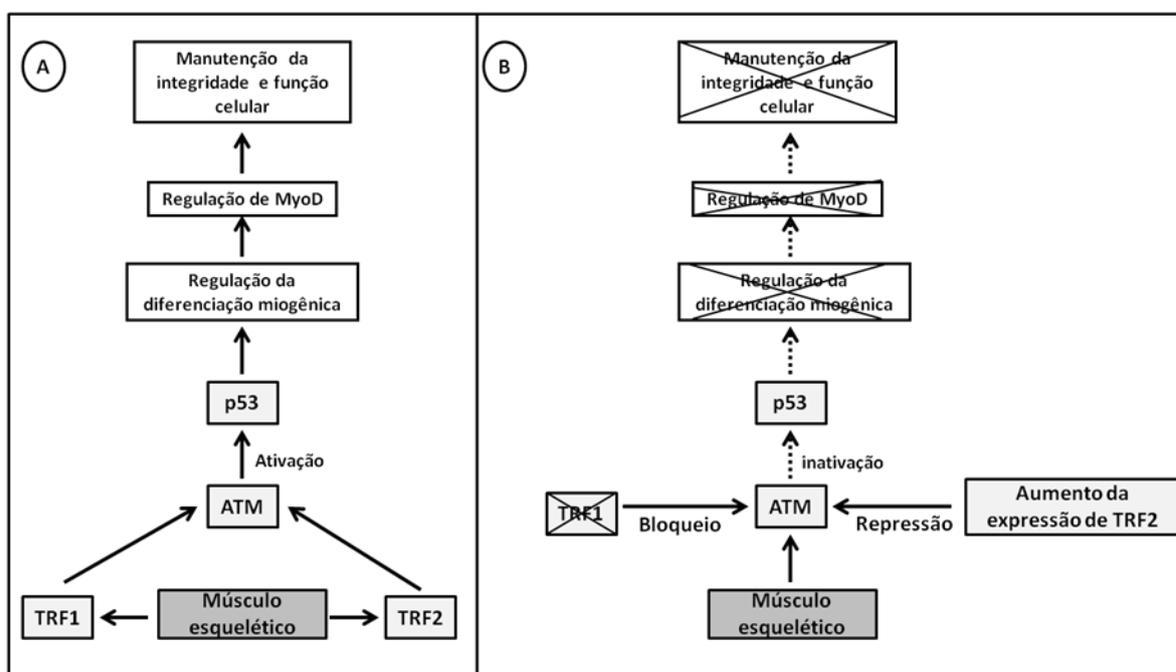
Fonte: A autora, 2017.

4.4.2 Discussão

Os lasers de baixa potência induzem efeitos bioestimulatórios causando benefícios em diferentes tecidos (MARQUES et al., 2004; MIGLIARIO et al., 2014; WALTER et al., 2015). No entanto, não há estudos que avaliaram os possíveis efeitos do laser sobre a estabilidade genômica e na manutenção de telômeros em tecidos lesionados. Este estudo avaliou os níveis relativos do RNA mensageiro através de RT-qPCR. O RT-qPCR é uma técnica padrão-ouro para os níveis relativos de genes quando ocorre uma normalização apropriada (HO-PUN-CHEUNG et al., 2012). Assim, vários estudos já avaliaram os níveis relativos de RNA mensageiro em mioblastos (TRAJANO et al., 2016a, 2016c), pele saudável (CANUTO et al., 2016; SERGIO et al., 2016; GUEDES DE ALMEIDA et al., 2017), músculo esquelético saudável (CANUTO et al., 2016; SERGIO et al., 2016; GUEDES DE ALMEIDA et al., 2017) e células de câncer de mama humano (CANUTO et al., 2017).

Os genes ATM, Tp53, TRF1 e TRF2 estão relacionados à proteção dos tecidos musculares, mas o mecanismo do efeito protetor das proteínas dos genes TRF1 e TRF2 ainda não são inteiramente claros e estudos adicionais são necessários (LAYE et al., 2012; LUDLOW et al., 2014). YANG et al., (2015) mostraram que o produto do Tp53 se liga diretamente e regula a transcrição da miogenina, um fator regulador miogênico que desempenha um papel importante na fase final da diferenciação muscular. Foi proposto um diagrama para explicar a participação dos genes ATM, P53, TRF1 e TRF2 no reparo muscular (Figura 36).

Figura 36 - Representação esquemática da participação dos genes ATM, Tp53, TRF1 e TRF2 na proteção do músculo esquelético



Legenda: A) TRF1 e TRF2 atuam na ATM, que regula a ação da Tp53. B) A revogação do aumento de TRF1 ou TRF2 regula a ATM, evitando a ação protetora da Tp53.

Fonte: A autora, 2017.

Os resultados deste estudo mostram que o laser infravermelho (904nm, 3 J/cm² por irradiação, 25mW e 75mW, 4 irradiações totais) reduz os níveis relativos do RNAm dos genes ATM e Tp53 no grupo lesionado (Figura 32 e 33). Em condições normais, a proteína Tp53 é mantida em níveis baixos (MENDONZA et al., 2014). Os níveis de Tp53 são regulados pela ubiquitinação e degradação mediada pela proteína MDM2 (MENG et al., 2014). As condições de estresse provocam modificações pós-tradução na proteína Tp53, levando ao seu acúmulo no núcleo e a ativação bioquímica (MIRZAYANS et al., 2012). A ativação da proteína Tp53 é

mediada pela atividade da proteína ATM (CARROLL et al., 2015) e, quando ativada, regula diferentes respostas celulares, como os *checkpoints* do ciclo celular, apoptose e senescência, para manter a integridade do genoma (RIBEIRO et al., 2016). A ATM desempenha múltiplos papéis na ativação de vias de transdução de sinal e na regulação de enzimas de modificação de cromatina (com ou sem danos no DNA) (ZHANG et al., 2007). A redução da ATM e da Tp53 após a irradiação do músculo esquelético dos grupos lesionados mostrou que a FBM altera os níveis relativos do RNAm dos genes de estabilidade genômica em condições de estresse e que esse efeito poderia ser parte da resposta celular induzida pela FBM nos tecidos lesionados.

A TRF1 e a TRF2 desempenham um papel importante na estrutura do *loop*-T que está diretamente vinculado à região de cadeia dupla dos telômeros (PAL et al., 2015). Além disso, a ligação da TRF1 e da TRF2 aos telômeros é essencial para garantir a proteção contra resposta aos danos no DNA e sistemas de reparo no DNA (GALATI et al., 2015). A redução da expressão da TRF1 causa bloqueio da interação ATM-TRF1, que leva ao não recrutamento da proteína Tp53 (PATEL et al., 2015). A TRF2 inibe a ATM que impede a resposta aos danos no DNA em telômeros seguido de rearranjos cromossômicos (DIOTTI; LOAYZA, 2011). No entanto, como a TRF2 está especificamente alojada em telômeros e permanece lá quando os danos no DNA são induzidos, a TRF2 pode atuar como um inibidor específico da ATM (KARLSEDER et al., 2004). Um aumento na expressão da TRF2 resulta em uma ligeira redução dos níveis da proteína Tp53, além de inibir os níveis da ATM (KARLSEDER et al., 2004). A resposta do telômero disfuncional é caracterizada pelo acúmulo de componentes de danos no DNA (DIOTTI; LOAYZA, 2011). Nossos resultados mostram redução dos níveis relativos de RNAm dos genes TRF1 e TRF2 após o procedimento de FBM no músculo esquelético de grupos lesionados (904nm, 3 J/cm², 25mW e 75mW). Ao contrário dos níveis relativos de RNAm dos genes da ATM e Tp53, os níveis relativos de RNAm dos genes TRF1 e TRF2 em grupos lesionados não foi diferente do grupo controle não irradiado. Isso pode ser explicado considerando que nos grupos lesionados não ocorre proteção contra danos no DNA pela TRF1 e pela TRF2 porque o pequeno aumento dos níveis dos genes TRF1 e TRF2 não são suficientes para reduzir os níveis de Tp53 e ATM. No entanto, a FBM reduz os níveis relativos de ATM, Tp53, TRF1 e TRF2, sugerindo que a FBM altera o reparo no DNA danificado nos tecidos lesionados.

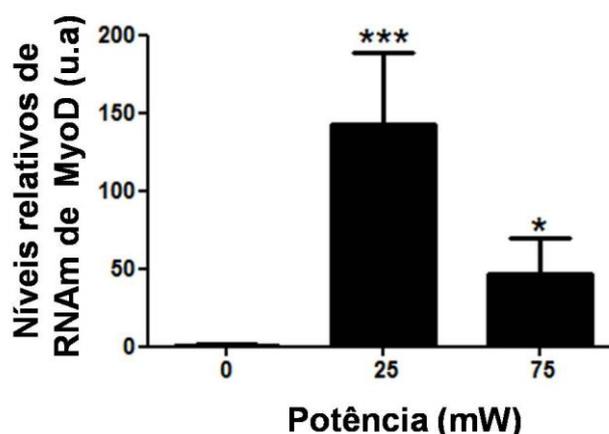
Tomados em conjunto, esses resultados reforçam que o reparo de danos oxidativos no DNA e a estabilidade genômica podem ser parte dos efeitos da FBM nos tecidos biológicos (TRAJANO et al., 2014; SERGIO et al., 2015).

4.5 Estudo 5: Laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão pulsada altera os níveis de RNA mensageiro de genes de reparo muscular dependente da potência em ratos *Wistar*

4.5.1 Resultados

Na Figura 37 estão apresentados resultados dos níveis relativos de RNAm do gene MyoD no músculo tibial anterior de ratos *Wistar* após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência. A expressão relativa de RNAm do gene MyoD no músculo do grupos lesionados e irradiados com laser a 25 e 75mW foi significativamente aumentada ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), quando comparado ao grupo lesionado.

Figura 37 - Níveis relativos de RNAm do gene MyoD em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências

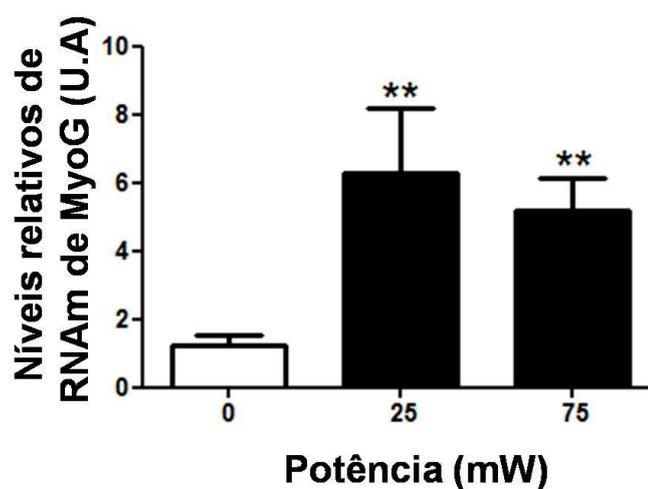


Legenda: (***) $p < 0,001$ grupo lesão 25mW comparado ao grupo lesão. (*) $p < 0,05$ grupo lesão 75mW quando comparado com o grupo lesão.

Fonte: A autora, 2017.

Os níveis relativos de RNA mensageiro do gene MyoG também foram avaliados em músculo anterior tibial anterior (Figura 38). Foi observado aumento significativo ($p < 0,01$) dos níveis relativos de RNAm do gene MyoG no músculo tibial anterior nos grupos lesionados e irradiados com laser a 25 e 75 mW, quando comparados com o grupo lesionado.

Figura 38 - Níveis relativos de RNAm do gene MyoG em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.

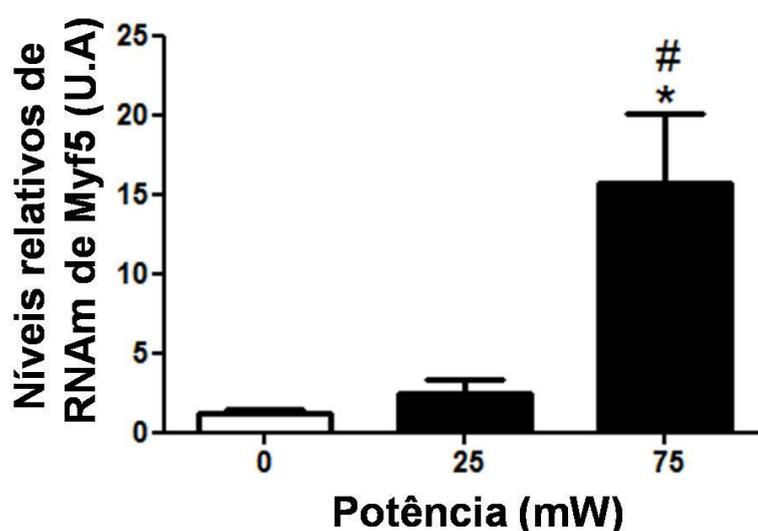


Legenda: (**) $p < 0,01$ grupo lesão 25mW quando comparado com o grupo lesão e (**) $p < 0,01$ grupo lesão 75mW quando comparado com o grupo lesão.

Fonte: A autora, 2017.

Na Figura 39 estão apresentados resultados dos níveis relativos de RNAm do gene Myf5 no músculo tibial anterior de ratos *Wistar* após exposição ao laser infravermelho de baixa potência. Os dados nesta figura indicam aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis relativos de RNAm do gene Myf5 no músculo lesionado e irradiado com laser a 75 mW, quando comparado com o grupo lesionado e o com grupo lesionado e irradiado com laser a 25 mW.

Figura 39 - Níveis relativos de RNAm do gene Myf5 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências

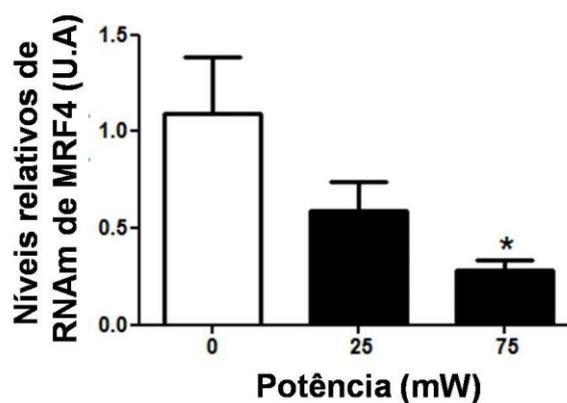


Legenda: (#) $p < 0,05$ grupo lesão 75mW comparado com grupo lesão. (*) $p < 0,05$ grupo lesão 75mW quando comparado com o grupo lesão 25mW.

Fonte: A autora, 2017.

Os níveis relativos de RNAm do gene MRF4 após a exposição ao laser infravermelho no músculo tibial anterior foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida apenas no grupo lesionado e irradiado com laser a 75 mW, quando comparado com o grupo lesionado (Figura 40).

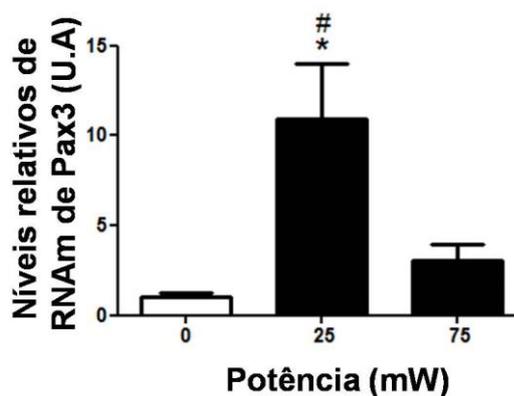
Figura 40 - Níveis relativos de RNAm do gene MRF4 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências



Legenda: (*) $p < 0,05$ grupo lesão 75mW quando comparado com o grupo lesão.
Fonte: A autora, 2017.

Os níveis relativos de RNAm do gene Pax3 após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência no músculo tibial anterior aumentou significativamente no grupo lesionado e irradiado com laser a 25 mW ($p < 0,05$ e $p < 0,05$), quando comparado com o grupo lesionado e quando comparado com o grupo lesionado e irradiado com laser a 75 mW (Figura 41).

Figura 41 - Níveis relativos de RNAm do gene Pax3 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências

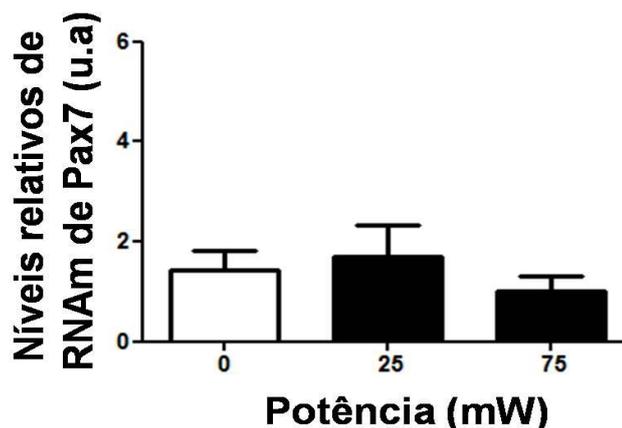


Legenda: (#) $p < 0,05$ grupo lesão 25mW quando comparado com o grupo lesão e (*) $p < 0,05$ grupo lesão 25mW quando comparado com o grupo lesão 75mW.

Fonte: A autora, 2017.

Os dados dos níveis relativos de RNAm do gene Pax7 não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos lesionados e irradiados com laser a 25 e a 75 mW e o grupo lesionado (Figura 42).

Figura 42 - Níveis relativos de RNAm do gene Pax7 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências.



Fonte: A autora, 2017.

4.5.2 Discussão

A terapia com laser de baixa potência tem efeitos positivos sobre o reparo do tecido muscular porque reduz a dor (TAHERI et al., 2016), modula o processo inflamatório (MANTÍNEO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016), aumenta a formação de novas miofibrilas (NACANO et al., 2009), causa angiogênese (IYOMASA et al., 2009; NACANO et al., 2009) e ativa células satélites (NACANO et al., 2009).

A ativação das células satélites depende da expressão de fatores regulatórios miogênicos e de Pax3 e Pax7 (SEGALÉS et al., 2016). A expressão dos fatores regulatórios miogênicos é regulada pelas proteínas Pax3 e Pax7 e ambas ligam e regulam a expressão dos genes MyoD e Myf5 (WANG; RUDNICKI, 2011), enquanto MyoD e Myf5 são considerados fatores envolvidos na determinação de células miogênicas, MyoG e MRF4 estão mais associadas com a diferenciação terminal e a homeostase das miofibras (SINGH; DILWORTH, 2013).

Entretanto, os níveis relativos dos RNAm desses genes ainda não foi avaliada em conjunto e os resultados têm sido controversos devido a diferenças nas condições da

exposição ao laser. Além disso, os efeitos de lasers em diferentes potências e em modo de emissão pulsado ainda não foram avaliados, não deixando claro o efeito do laser de baixa potência sobre os níveis relativos desses genes durante o processo de reparo muscular. Assim, este estudo avaliou a via de reparo muscular após lesão muscular por criolesão usando protocolos terapêuticos indicados no guia do equipamento laser em diferentes potências e em modo de emissão pulsada para verificar se a terapia com laser de baixa potência altera os níveis de RNA mensageiro de genes relacionados ao reparo de lesão muscular.

Os resultados deste estudo mostraram que o laser infravermelho de baixa potência aumenta os níveis relativos de RNAm dos genes MyoD e MyoG nos grupos lesionados e irradiados para ambas potências (25mW e 75mW). Os níveis relativos de RNAm do gene Myf5 aumentou apenas no grupo lesionado e irradiado com 75mW. Também, os níveis relativos de RNAm de MRF4 reduziram apenas neste grupo (75mW). Não houve alteração nos níveis de RNAm do gene Pax7. Entretanto, os níveis relativos de RNAm do gene Pax3 aumentaram apenas no grupo lesionado e irradiado com 25mW.

Em músculo sadio, as células satélites estão em estado de repouso (PERRY; RUDNICK, 2000), mas após uma lesão muscular, essas células são ativadas pela expressão dos genes Pax7 e Myf5. Quando a migração e o estágio de diferenciação começam, a MyoD é expressa e a expressão de Myf5 é mantida (nessa fase já não há expressão de Pax7) (ZANOU; GAILLY, 2013). Nossos resultados mostram que a exposição ao laser infravermelho de baixa potência altera os níveis relativos de RNAm do gene MyoD no músculo tibial anterior irradiado com laser em diferentes potências (25 e 75 mW), mas não altera os níveis de RNAm do gene Pax7. Durante a regeneração muscular, as células satélites podem ser distinguidas com base na expressão de Pax7 e MyoD (BEAUDRY et al., 2016). As células Pax7 (+)/MyoD (-) estão em estado de repouso, as células Pax7 (+)/MyoD (+) estão no estado de proliferação e as células Pax7 (-)/ MyoD(+) estão passando por diferenciação miogênica, seguida pela fusão celular para gerar miofibras multinucleadas (MOTOHASHI; ASAKURA, 2014). Nossos resultados sugerem que, 5 dias após a lesão muscular, as células satélites estão em estado de fusão em miotubos para ambos os grupos irradiados a laser. Estes resultados concordam com aqueles de ASSIS et al., (2013), que mostraram essa exposição ao laser infravermelho de baixa potência (808 nm) altera a expressão da MyoD após criolesão em uma fluência de 180 J/cm². BRUNELLI et al., (2014) observaram que os animais expostos ao laser infravermelho (780 nm), em fluências de 10 e 50 J/cm², possuem imunomarcadores de MyoD em concentrações maiores 7 dias após a criolesão. Outro estudo usando laser vermelho (660

nm) mostrou um aumento na expressão de MyoD após a exposição ao laser com a fluência de 50 J/cm^2 (RODRIGUES et al., 2013b). Mais recentemente ALVES et al (2016) relataram que animais lesionados e expostos ao laser infravermelho (780 nm , 10 J/cm^2) apresentaram aumento na expressão do gene MyoD. Além disso, os níveis de RNAm do gene Pax7 são aumentados em células C2C12 após exposição ao laser infravermelho de baixa potência na fluência de 10 J/cm^2 (TRAJANO et al., 2016b).

A proliferação de mioblastos é caracterizada pela expressão de Myf5/MyoD e genes que regulam a progressão do ciclo celular, enquanto a expressão do gene Pax7, que é um marcador de células satélites é progressivamente silenciado (DILWORTH; BLAIS, 2011). No entanto, MyoD e Myf5 ainda são expressos após a proliferação (PERRY; RUDNICK, 2011). Nossos resultados mostram aumento dos níveis relativos de RNAm do gene Myf5 em músculo tibial anterior lesionado e irradiado com laser na potência de 75 mW . Resultados semelhantes foram relatados por MORAIS et al., (2017), que observaram aumento da expressão do gene Myf5 no músculo lesionado exposto ao laser vermelho (660 nm , $14,7 \text{ J/cm}^2$, 35 mW). Nossos resultados sugerem que os efeitos do laser no reparo da lesão muscular dependem da potência, porque os níveis relativos de RNA do gene Myf5 nos animais lesionados e irradiados com laser a 25 mW são reduzidos nesse grupo indicando que o laser, nestas condições, induz a maturação precoce em miofibras.

MyoG e MRF4 estão relacionados à diferenciação terminal e homeostase de miofibras (SINGH; DILWORTH, 2013). Nossos resultados mostraram aumento dos níveis relativos de RNAm do gene MyoG em animais lesionados e irradiados com lasers em ambas as potências (25 e 75 mW) e redução dos níveis relativos de RNAm do gene MRF4 apenas em animais irradiados com laser na maior potência (75 mW). Efeitos do laser nos níveis de RNAm do gene MyoG têm sido controversos, com alguns estudos mostrando tanto aumento (ASSIS et al., 2013; BRUNELLI et al., 2014) quanto diminuição (RODRIGUES et al., 2013b; DE FREITAS et al., 2015) dos níveis de MyoG após a exposição ao laser, enquanto outros autores não relataram nenhuma alteração (ALVES et al., 2016; MORAES et al., 2017). Não há estudos que avaliaram os efeitos do laser nos níveis relativos de RNAm do gene MRF4. Nossos resultados sugerem que o estágio de maturação se inicia mais rápido no músculo tibial anterior do grupo lesionado e irradiado com laser a 25 mW do que naqueles irradiados com laser a 75 mW , o que confirma os resultados dos níveis relativos de RNAm do gene Myf5.

A proteína Pax3 desempenha um papel fundamental durante a miogênese do músculo esquelético em embriões (RELAIX; ZAMMIT, 2006). Durante a fase adulta, esta proteína é

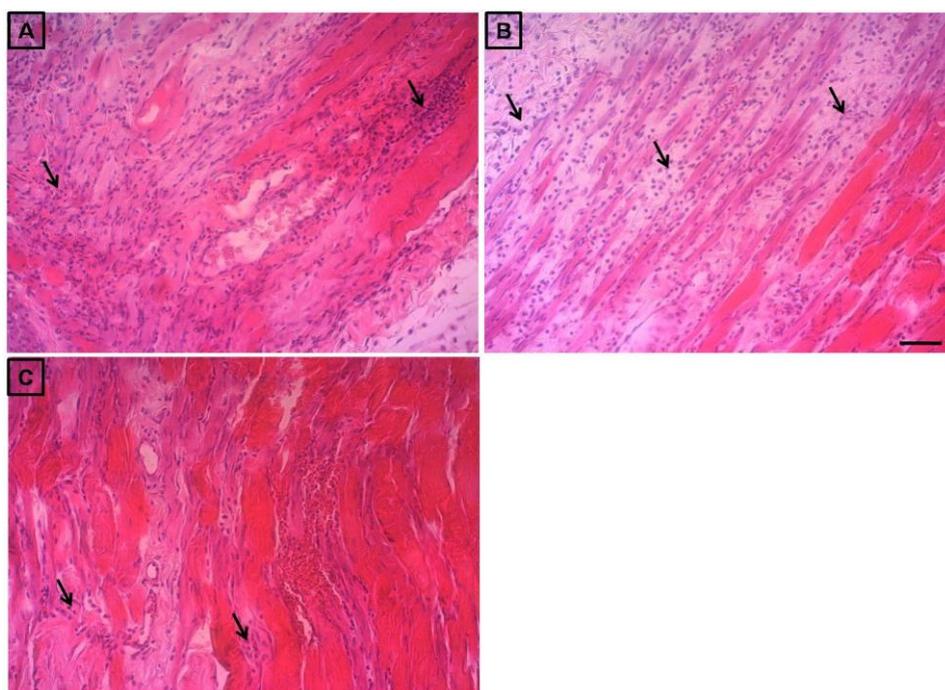
expressa apenas em alguns músculos de mamíferos, como o diafragma (BUCKINGHAM; RELAIX, 2015). Curiosamente, os níveis relativos de RNAm do gene Pax3 aumentou no músculo tibial anterior no grupo lesionado e irradiado com laser a 25 mW (Figura 41). HYATT et al., (2008) mostraram que os níveis de RNAm dos genes Pax3 e Pax7 aumentam rapidamente em resposta à sobrecarga no músculo esquelético de ratos adultos e que esse aumento precede qualquer alteração nos níveis de RNAm do gene MyoD, indicando que Pax3 e Pax7 coordenam a expressão de fatores regulatórios miogênicos. A expressão da Pax3 muda apenas em certos tipos de tecido muscular em fase adulta. Neste estudo, os níveis relativos de RNA do gene Pax3 aumentaram apenas no grupo onde houve aceleração no processo de reparo muscular. Sugerimos que o aumento dos níveis relativos de RNAm do gene Pax3 pode ser indicativo de modulação dos fatores regulatórios miogênicos nos grupos irradiados com 25 mW, o que contribuiria para um melhor processo de reparo neste grupo.

4.6 Estudo 6: Laser infravermelho de baixa potência em modo de emissão pulsado modula os níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias favorecendo a aceleração do processo de reparo de lesão muscular

4.6.1 Resultados

Na fotomicrografia é possível observar a presença de infiltrado inflamatório no grupo controle lesionado (Figura 43a). O infiltrado inflamatório também está presente, semelhante ao grupo controle lesionado, no grupo lesionado e irradiado com 25mW (Figura 43b). Entretanto, no grupo lesionado e irradiado com 75mW é possível observar uma redução do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo controle lesionado e ao grupo irradiado com 25mW (Figura 43c).

Figura 43 - Fotomicrografia de músculo tibial anterior lesionado de ratos *Wistar* após exposição ao laser de baixa potência corado com Hematoxilina e Eosina

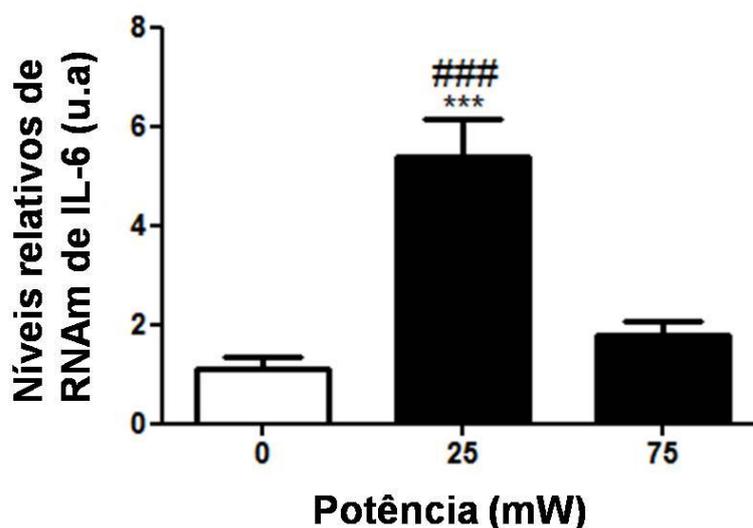


Legenda: A) Grupo controle lesionado; B) Grupo lesionado e irradiado com 25mW e C) Grupo lesionado e irradiado com 75mW. As setas pretas indicam a presença de infiltrado inflamatório. Aumento de 20X. Barra de 50 μ m. Coloração em H;E.

Fonte: A autora, 2017.

Na Figura 44 estão apresentados os valores dos níveis relativos de RNAm do gene IL-6 do músculo tibial anterior de ratos *Wistar* após a exposição ao laser infravermelho. Os níveis relativos de RNAm do gene IL-6 no grupo lesionado e irradiado com 25mW aumentou significativamente ($p < 0.001$) após a exposição ao laser quando comparado ao grupo controle lesionado e ao grupo lesionado e irradiado com 75mW ($p < 0.001$).

Figura 44 - Níveis relativos de RNAm do gene IL-6 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências

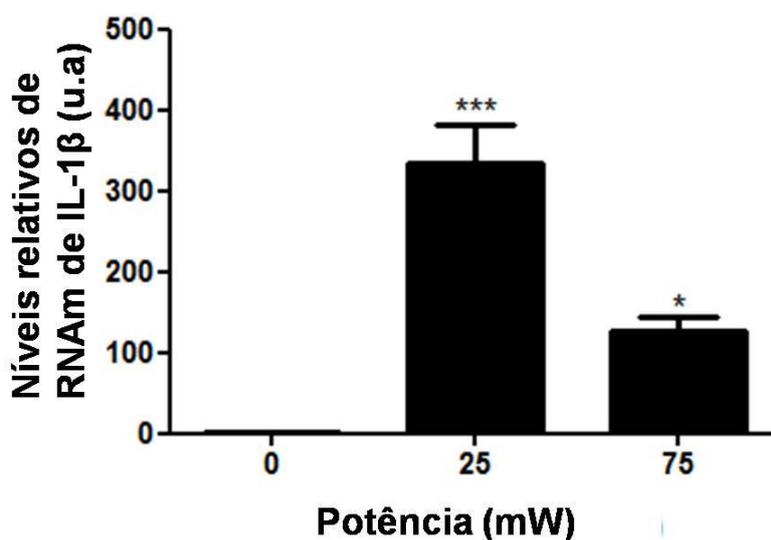


Legenda: (###) $p < 0,001$ grupo lesionado e irradiado com 25mW quando comparado com o grupo lesionado e irradiado com 75mW e (***) $p < 0,001$ grupo lesionado e irradiado com 25mW quando comparado com o grupo controle lesionado.

Fonte: A autora, 2017.

Para confirmar os efeitos induzidos pelo laser nos genes pró-inflamatórios, foi avaliado também os níveis relativos de RNAm do gene de IL-1 β (Figura 45). Foi observado aumento significativo ($p < 0,001$) dos níveis relativos de RNAm do gene IL-1 β no grupo lesionado e irradiado com 25mW quando comparado com o grupo controle lesionado. Também, no grupo lesionado e irradiado com 75mW foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis relativos da IL-1 β quando comparado ao grupo controle lesionado.

Figura 45 - Níveis relativos de RNAm do gene IL-1 β em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências

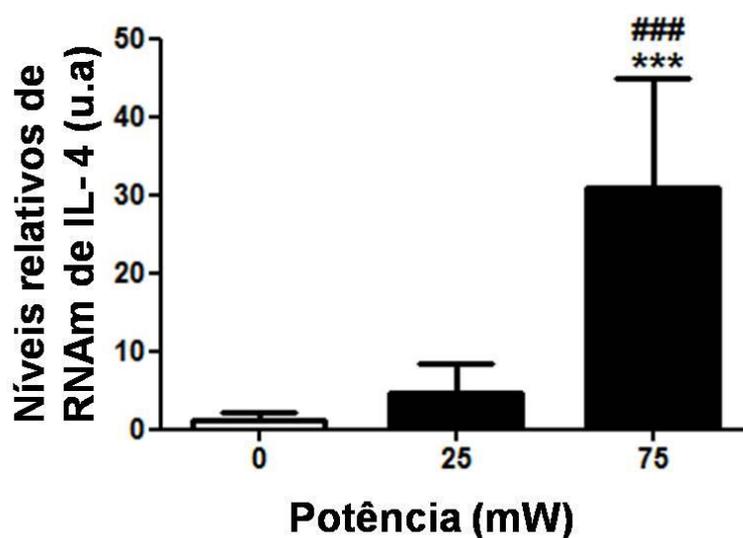


Legenda: (***) $p < 0,001$ grupo lesionado e irradiado com 25mW quando comparado com o grupo controle lesionado e (*) $p < 0,05$ grupo lesionado e irradiado com 75mW quando comparado com o grupo controle lesionado.

Fonte: A autora, 2017.

Na Figura 46 estão apresentados os valores dos níveis relativos de RNAm do gene IL-4 do músculo tibial anterior de ratos *Wistar* após a exposição ao laser infravermelho. Os dados nesta figura indicam aumento significativo dos níveis relativos de RNAm do gene IL-4 no músculo lesionado exposto ao laser a 75mW quando comparado com o grupo controle lesionado ($p<0.001$) e com o grupo lesionado e irradiado com 25mW ($p<0.001$).

Figura 46 - Níveis relativos de RNAm do gene IL-4 em músculo lesionado após fotobiomodulação em diferentes potências

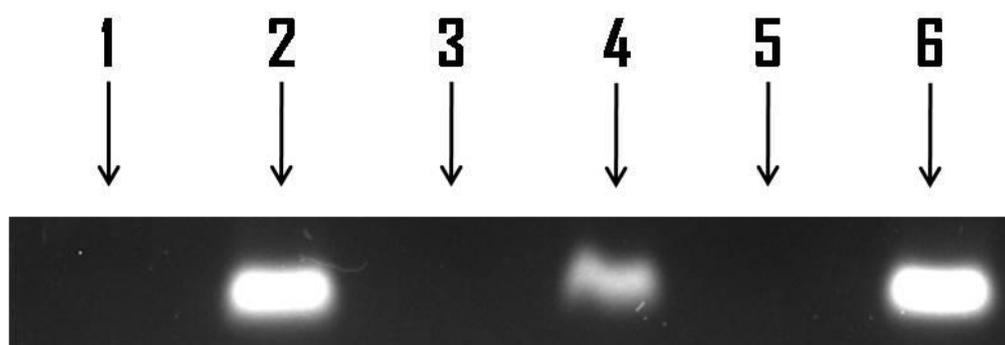


Legenda: (***) $p<0,001$ grupo lesionado e irradiado com 75mW quando comparado com o grupo controle lesionado e (###) $p<0,001$ grupo lesionado e irradiado com 75mW quando comparado com o grupo lesionado e irradiado com 25mW.

Fonte: A autora, 2017.

A Figura 47 é uma fotografia de gel de agarose após a eletroforese de produtos de amplificação por RT-qPCR do gene IL-10 do músculo tibial anterior de ratos *Wistar* expostos ao laser infravermelho de baixa potência. A fotografia indica que a exposição ao laser não altera os níveis de transcritos do gene IL-10 em músculo lesionado, tanto na potência de 25mW, quanto na potência de 75mW, quando comparado aos níveis de transcritos do gene normalizador (GAPDH).

Figura 47 - Fotografia de gel de agarose após eletroforese de produtos de amplificação por RT-qPCR do gene IL-10 em músculo tibial anterior de ratos *Wistar* lesionados expostos ao laser de baixa potência



Legenda: **1:** IL-10- grupo controle lesionado; **2:** GAPDH- grupo controle lesionado; **3:** IL-10- grupo lesionado e irradiado com 25mW; **4:** GAPDH- grupo lesionado e irradiado com 25mW; **5:** IL-10- grupo lesionado e irradiado com 75mW; **6:** GAPDH- grupo lesionado e irradiado com 75mW.

Fonte: A autora, 2017.

4.6.2 Discussão

O laser de baixa potência tem efeitos benéficos em diferentes tipos de processos inflamatórios. Já foi observado que a exposição ao laser reduz o número de células inflamatórias (FIÓRIO et al., 2013) e da proteína IL-6 (SILVEIRA et al., 2016b) em pele queimada de ratos, reduz os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-6) na inflamação da cápsula articular (PALLOTTA et al., 2012) e reduz o número de células inflamatórias em tendinite induzida por trauma mecânico (CASALECHI et al., 2013). No músculo, já foi observado que o laser de baixa potência reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6) e aumenta os níveis de citocinas antiinflamatórias (IL-10) (SILVEIRA et al., 2016a).

Entretanto, foi demonstrado que a presença de citocinas inflamatórias em lesões musculares é importante para ativar fatores reguladores miogênicos responsáveis pelo reparo de lesões musculares (ALVES et al., 2016).

Num estudo prévio, publicado por nosso grupo com os mesmos parâmetros físicos utilizados neste estudo, foi demonstrado que o laser infravermelho de baixa potência acelera o reparo de lesões musculares na potência de 25mW porque altera a expressão de fatores miogênicos (MyoD, Myf5, MyoG, MRF4) (TRAJANO et al., 2017). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se a expressão de fatores miogênicos, que favorecem o reparo de lesões musculares, está relacionada com a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias utilizando laser infravermelho pulsado de baixa potência (904nm).

Os resultados deste estudo sugerem que a exposição ao laser de baixa potência reduz o infiltrado inflamatório após a irradiação no grupo lesionado e irradiado com a maior potência (Figura 43c), aumenta os níveis relativos de RNAm do gene IL-6 no grupo lesionado e irradiado com 25mW (Figura 44) e aumenta os níveis de RNAm do gene IL-1 β em ambos os grupos irradiados (Figura 45). Os níveis relativos de RNAm do gene IL-4 aumentaram apenas no grupo irradiado com a maior potência (Figura 46) e não foi observada expressão de RNAm do gene IL-10 nos grupos avaliados (Figura 47).

As análises histológicas mostraram que apenas a exposição ao laser infravermelho na maior potência reduz o infiltrado inflamatório. RIZZI et al., (2006) demonstrou que a exposição ao laser infravermelho (904nm, 45mW, 5J/cm², em modo contínuo de emissão) reduz o infiltrado inflamatório 7 dias após lesão muscular por contusão. Outro estudo utilizando a criolesão como modelo de lesão muscular demonstrou que a exposição ao laser infravermelho de baixa potência (780nm, 40mW, 10J/cm²) também reduz infiltrado inflamatório no músculo lesionado (ALVES et al., 2014b). Os resultados apresentados nesses estudos estão de acordo com nossos resultados e reforçam o potencial anti-inflamatório do laser de baixa potência no reparo de lesões musculares.

Tem sido demonstrado que os níveis de IL-6 estão reduzidos em músculos lesionados após exposição ao laser de baixa potência (MANTINEO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016a; TOMAZONI et al., 2017). Diferente desses estudos, nossos resultados sugerem aumento nos níveis relativos de RNAm do gene IL-6 em músculos expostos ao laser infravermelho na potência de 25mW. OTIS e colaboradores (2014) avaliaram a expressão de IL-6 após indução de lesão muscular com cloreto de bário durante 30 dias e observaram aumento nos níveis de IL-6 cinco dias após a lesão. Tem sido observado que a IL-6 desempenha um papel

importante na regulação da proliferação e regeneração celular do músculo esquelético (BELIZÁRIO et al., 2016). De fato, num estudo recente foi demonstrado que a exposição ao laser de baixa potência após a criolesão aumenta os níveis de IL-6 após 14 dias (ALVES et al., 2016). Em nosso estudo, os resultados sugerem aumento de IL-6 após cinco dias. Essa diferença poderia ser explicada devido à diferença nos parâmetros físicos do laser utilizados entre os dois estudos. Neste caso, sugerimos que o aumento da IL-6 cinco dias após a lesão favorece a aceleração do reparo muscular porque induz a expressão de fatores de regulação miogênicos em músculos expostos ao laser infravermelho na potência de 25mW, como foi também observado num estudo prévio (TRAJANO et al., 2017).

A exposição ao laser de baixa potência reduz os níveis de IL-1 β após contusão e criolesão (ASSIS et al., 2012; FERNANDES et al., 2013; MANTINEO et al., 2014; TOMAZONI et al., 2017). Nossos resultados sugerem aumento nos níveis relativos de RNAm do gene IL-1 β em ambos os grupos lesionados e irradiados (25mW e 75mW). Tem sido demonstrado que a IL-1 β aumenta a proliferação de células precursoras musculares (OTIS et al., 2014). Também a IL-1 β aumenta a expressão de RNAm de IL-6, que está relacionada com a proliferação de fatores miogênicos (LUO et al., 2003). Sugerimos que o aumento dos níveis relativos de RNAm da IL-1 β resulta em aumento da expressão de IL-6 e favorece a aceleração do reparo do músculo esquelético em animais irradiados com laser na potência de 25mW e que, embora tenha ocorrido um aumento nos níveis relativos de RNAm do gene IL-1 β em animais irradiados com laser na potência de 75mW, esse aumento não foi suficiente para elevar os níveis de IL-6 e favorecer o reparo muscular nestes animais.

Embora tenha sido demonstrado que a IL-1 β e a IL-6 têm papel importante no reparo de lesões musculares, é importante salientar que isso deve ocorrer no momento correto durante o processo de reparo muscular. De fato, nossos resultados sugerem que o aumento dos níveis de RNAm dessas citocinas foi benéfico. Entretanto, isso não quer dizer que o aumento dessas citocinas possa favorecer o reparo em qualquer momento da lesão muscular, que neste caso ocorreu no quinto dia após a lesão. Isso explicaria porque em outros estudos, que avaliaram os efeitos do laser após diferentes tempos da indução da lesão muscular, foi observada redução dos níveis dessas citocinas (ASSIS et al., 2012; FERNANDES et al., 2013, MANTINEO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016a; TOMAZONI et al., 2017). Nestes casos pode ter ocorrido uma redução na expressão de IL-6 e IL-1 β , uma vez que estas citocinas já tinham sido aumentadas e já tinham favorecido o processo de reparo muscular. Desta forma sua redução, em um momento posterior, também é um efeito benéfico do laser, uma vez que

um aumento exacerbado nos níveis de IL-6 pode ser prejudicial, pois causa atrofia muscular (HADDAD et al., 2005; KUROSAKA; MACHIDA, 2013).

A IL-4 foi usada como fármaco para tratamento de doenças inflamatórias em modelo experimental, também tem sido sugerido que terapias que atuam no aumento das concentrações de IL-4 em tecidos podem ser usadas no tratamento de inflamação (WOODWARD et al., 2010). Durante o reparo do músculo esquelético foi demonstrado que a IL-4 regula a fusão de miotubos *in vivo* e *in vitro* (HOURSLEY et al., 2003). Mais recentemente foi demonstrado que a IL-4 é secretada para ativar fatores fibro/adipogênicos (FAPs) (HEREDIA et al., 2013). Os FAPs estão associados à regeneração muscular e são ativados durante a lesão muscular, atuando geralmente em sinergia com as células satélites para promover regeneração muscular eficaz (PHELPS et al., 2016). Esse é o primeiro estudo a avaliar os níveis de RNAm de IL-4 após a exposição ao laser infravermelho de baixa potência em músculos lesionados. Dados do nosso estudo sugerem aumento nos níveis de RNAm da IL-4 apenas em músculos lesionados e irradiados com laser infravermelho na potência de 75mW. É possível que este efeito favoreça o reparo muscular, uma vez que nesses animais, os níveis de RNAm de IL-6 não aumentaram e que também o aumento dos níveis de RNAm de IL-4 favoreça a redução do infiltrado inflamatório.

A função primária da IL-10 é a supressão de citocinas pró-inflamatórias e macrófagos M1. Entretanto, a IL-10 também pode ativar macrófagos do fenótipo M2c (VILLALTA et al., 2011). Os macrófagos podem desempenhar diferentes papéis durante o processo inflamatório, tal que, no início da inflamação, o fenótipo M1 é expressado e libera citocinas pró-inflamatórias, sendo responsável pela defesa do organismo, e em seguida pode ocorrer alteração para o fenótipo M2, o que promove a cicatrização e o reparo muscular (DA SILVA et al., 2015). De fato, a administração de IL-10 após lesão muscular leva à interrupção de macrófagos M1 e promoção de macrófagos M2, resultando em crescimento e regeneração de miofibras. A ablação *in vivo* de IL-10 pode perturbar a transição de macrófagos M1 para M2 e diminuir o crescimento da fibra (COSTAMAGNA et al., 2015). Foi demonstrado que a IL-10 é necessária para o crescimento normal e a regeneração muscular após a lesão, mas isso não significa que aumentar os níveis de IL-10 resulta em um melhor reparo do músculo lesionado (DENG et al., 2012). Isso pode ocorrer porque o intervalo de tempo em que a IL-10 pode promover a regeneração é curto e, caso não ocorra no momento correto, pode causar um atraso na programação miogênica (COSTAMAGNA et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que a exposição ao laser de baixa potência aumenta os níveis de IL-10 (SILVEIRA et al., 2016; MORAES et al., 2017). Embora a IL-10 seja importante durante o processo de reparo muscular, seus níveis estão aumentados nos três primeiros dias após a lesão, ocorrendo declínio sete dias após a lesão (NOVAK et al., 2015). Embora alguns estudos tenham demonstrado que a exposição ao laser aumenta os níveis de IL-10 também após sete dias, esses estudos utilizaram modelo experimental e parâmetros físicos do laser diferentes daqueles utilizados em nosso estudo. Dessa forma, sugerimos que embora a expressão de IL-10 seja importante durante o reparo muscular, no momento avaliado em nosso estudo (5 dias após a lesão) os níveis de IL-10 já estariam reduzidos, tal que não foi possível de detectar a presença de transcritos do gene da IL-10 através da qRT-PCR.

CONCLUSÕES:

- a) embora os níveis de espécies reativas de oxigênio não tenham sido alterados, a exposição ao laser de infravermelho de baixa potência afeta a viabilidade celular, apoptose e necrose em culturas de mioblastos, dependendo da fluência do laser e das condições de cultura destas células (Estudo 1);
- b) a irradiação com laser, em fluências terapêuticas, modula a níveis relativos de RNAm de genes relacionados com o reparo de danos no DNA em culturas mioblastos em condições normais e de estresse, sugerindo que a estabilidade genômica poderia fazer parte dos efeitos bioestimulatórios induzidos pela terapia com laser de baixa potência em músculos lesionados (Estudo 2);
- c) o laser infravermelho de baixa potência modula os níveis relativos de RNAm de genes relacionados ao reparo muscular e a manutenção de telômeros em mioblastos em condições normais e em condições de estresse (Estudo 3);
- d) a fotobiomodulação altera os níveis relativos de RNAm de genes relacionados à estabilidade genômica e a manutenção de telômeros no músculo esquelético lesionado de ratos *Wistar* (Estudo 4);
- e) a exposição ao laser infravermelho de baixa potência, em modo de emissão pulsada, poderia acelerar o processo de reparo muscular, alterando os níveis relativos de RNAm de genes de fatores regulatórios miogênicos e da Pax 3 e Pax7 (Estudo 5);
- f) o laser infravermelho de baixa potência em diferentes potências e em modo de emissão pulsado modula os níveis relativos de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias após criolesão e isso pode ser um dos efeitos da FBM envolvidos na aceleração do processo de reparo do músculo esquelético (Estudo 6);

REFERÊNCIAS

ABBOTTS, R., MADHUSUDAN, S. Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer. **Cancer Treat Rev**, v.36, n.5, p.425-35, Aug. 2010.

ALEXANDER, A. et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.107, n.9, p.4153-4158, Mar. 2010.

ALVES, A. N. et al. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review. **Am. J Phys. Med. Rehabil**, v.93, n.12, p.1073-1085, Dec. 2014a.

ALVES, A. N. et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. **Lasers Med Sci**, v.29, n.2, p.813-821, Mar. 2014b.

ALVES, A. N. et al. Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci**, v.31, n.4, p.679-685, 2016.

ANDRES, S. N. et al. Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends. **Environ Mol Mutagen**, v.56, n.1, p.1-21, 2015.

ANURANJANI, BALA, M. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines - implication in modification of radiation damage. **Redox Biol**, v.2, p.832-846, 2014.

ARSENIS, N. C. et al. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. **Oncotarget**, v.8, n.27, p.45008-45019, July 2017.

ASSIS, L. et al. Low-level laser therapy (808nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Surg Med**. v.44, n.9, p.726-735, Nov. 2012.

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 Med Sci**, v.28, n.3, p.947-955, May 2013.

ASSIS, L. et al. Investigation of the Comparative Effects of Red and Infrared Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. **J Phys Med Rehabil**, v.95, n.7, p.525-534, July 2016.

BAGNATO, V. S. Laser: e suas aplicações em ciências e tecnologia. **São Paulo**: Livraria da Física, 2008.

BAKKENIIST, C.J., KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and mider dissociation. **Nature**, v.421, n.6922, p.499-506, Jan. 2003.

- BAOGE, L. et al. Treatment of skeletal muscle injury: a review. **ISRN Orthop**, v.2012, p.1-8, Apr. 2012.
- BARBERI, L. et al. Age-dependent alteration in muscle regeneration: the critical role of tissue niche. **Biogerontology**, v.14, n.3, p.273-292, June 2013.
- BARBIERI, E.; SESTILI, P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. **J Signal Transduct**, v.2012, p.982794, 2012.
- BARBOZA, L. L. et al. Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on Escherichia Coli cultures. **Braz J Med Biol Res**, v.48, n.10, p.945-952, Oct. 2015.
- BARD, S.; GOLDBERG, D. J. Laser History, Physics, and Safety. **Aesthet Dermatol**, v.1, p.1-17, 2014.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods Mol Biol**, v.1170, p.29-40, 2014.
- BARZILAI A.; YAMAMOTO K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair (Amst)**, v.3, n.8-9, p.1109-1115, Aug./Sept. 2004.
- BEAUDRY, M. et al. Regulation of myogenesis by environmental hypoxia. **J Cell Sci**, v.129, n.15, p.2887-2896, 2016.
- BELIZÁRIO, J. E. et al. Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. **Springerplus**, v.5, p.619, May 2016.
- BESSON, A.; DOWDY, S. F.; ROBERTS, J. M. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. **Dev. Cell**, v.14, n.2, p.159-169, Feb. 2008.
- BIANCHI, A.; SHORE, D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. **Mol. Cell**, v.31, n.2, p.153-165, July 2008.
- BOITEUX, S.; COSTE, F.; CASTAING, 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 Radic Biol Med**, v.107, p.179-201, June 2017.
- BOOHAKER, R. J.; XU, B. The versatile functions of ATM kinase. **Biomed J**, v.37, n.1, p.3-9, 2014.
- BOU SAADA, Y. et al. Control of DNA integrity in skeletal muscle under physiological and pathological conditions. **Cell Mol Life Sci**, v. 74, n.19, p.3439-3449, Apr. 2017.
- BOWDEN, N. A. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? **Cancer Lett**, v.346, n.2, p.163-71, May. 2014.
- BRANDMAIER, A.; HOU, S.Q.; SHEN, W.H. Cell Cycle Control by PTEN. **J Mol Biol**, v.429, n.15, p.2265-2277, July 2017.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n., p.297-308, Apr. 2008.

BRUNELLI, R. M. et al. The effects of 780-nm low level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. **Lasers Med Sci**, v.29, n.1, p.91-96, 2014.

BUCKINGHAM, M.; RELAIX, F. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. **Semin Cell Dev Biol**, v.44, p.115-125, 2015.

BUNOUT, D. et al. Relationship between protein and mitochondrial DNA oxidative injury and telomere length and muscle loss in healthy elderly subjects. **Arch Gerontol Geriatr**, v.48, n.3, p.335-339, May/June 2009.

BURATTINI, S. et al. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. **Eur J Histochem**, v.48, n.3, p.223-233, 2004.

CADET, J.; DAVIES, K.J.A. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. **Free Radic Biol Med**, v.107, p.2-12, June 2017.

CANUTO, K. S. et al. DNA repair in bacterial cultures and plasmid DNA exposed to infrared laser for treatment of pain. **Laser Phys Lett**, v.10, n.6, p. 065606, 2013.

CANUTO, K. S. et al. Low-level lasers affect uncoupling protein gene expression in skin and skeletal muscle tissues. **Laser Phys**, v.26, n.3, p.035601, 2016.

CANUTO, K. S. et al. Low-level lasers on microRNA and uncoupling protein 2 mRNA levels in human breast cancer cells. **Laser Phys**, v.27, n.6, p.065601, 2017.

CARTER, R. J.; PARSONS, J. L. Base Excision repair, a pathway regulated by posttranslational modifications. **Mol Cell Biol**, v.36, n.10, p.1426-1437, May 2016.

CARNERO, A. et al. Loss-of-function genetics in mammalian cells: the p53 tumor suppressor model. **Nucleic Acids Res**, v.28, n.11, p.2234-2241, June 2000.

CARROLL, B.; DONALDSON, J.C.; OBEID, L. Sphingolipids in the DNA damage response. **Adv Biol Regul**, v.58, p.38-52, 2015.

CARVALHO, A. F. et al. The low-level laser on acute myositis in rats. **Acta Cir Bras**, v.30, n.12, p.806-811, 2015.

CASALECHI, H. L. et al. Analysis of the effect of phototherapy in model with traumatic Achilles tendon injury in rats. **Lasers Med Sci**, v.29, n.3, p.1075-1081, May 2014.

CAVALCANTI, T. M. et al. Knowledge of the physical properties and interaction of laser with biological tissue in dentistry. **An Bras Dermatol**, v.86, n.5, p.955-990, Sept./Oct. 2011.

CERDEIRA, C. D. et al. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **J Biophotonics**, v.9, n.11-12, p.1180-1188, Dec. 2016.

- CHAVES, M. E. et al. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **An Bras Dermatol**, v.89, n.4 , p.616-23, July/Aug. 2014.
- CHAN, T. A. et al. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. **Genes Dev**, v.14, n.13, p.1584-1588, July 2000.
- CHAUDHARY, M. W., AL-BARADIE, R.S. Ataxia-telangiectasia: future prospects. **Appl Clin Genet**, v.7, p.159-167, 2014.
- CHEN, H., WENG, Q. Y., FISHER, D. E. UV signaling pathways within the skin. **J Invest Dermatol**, v.134, n.8, p.2080-2085, 2014.
- CHENG, Q., CHEN, J. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. **Cell cycle**, v.9, n.3, p.472-478, Feb. 2010.
- COLLINS, M. et al. Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres. **Med Sci. Sports Exerc**, v.35, n.9, p.1524-1528, 2003.
- CONTRERAS-MUÑOZ, P. et al. Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combined. **Am J Sports Med**, v.45, n.9, p.2131-2141, July 2017.
- COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB J**, v.17, n.10, p.1195-1214, 2003.
- COSTAMAGNA, D. et al. Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis. **Mediators Inflamm**, v.2015, p. 805172, 2015.
- CUI, R., et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. **Cell**, v.128, n.5, p. 853-864, 2007.
- CURTIS, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nat Rev Cancer**, v.12, n.12, p.801-817, Dec. 2012.
- DĄBROWSKA, N.; WICZKOWSKI, A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. **Adv Clin Exp Med**, v.26, n.1, p.155-166, Jan./Feb. 2017.
- DAI, S. et al. Stimulation of calcium overload and apoptosis by sonodynamic therapy combined with hematoporphyrin monomethyl ether in C6 glioma cells. **Oncol Lett**, v.8, n.4, p.1675-1681, 2014.
- DALEY, J. M. et al. The endonuclease IV family of apurinic/apyrimidinic endonucleases. **Mutat Res**, v.705, n.3, p.217-227, Dec. 2010.
- DANTAS, E. M. et al. Efeito Antiálgico do Laser AsGaAl na Punção anestésica. *Rev. Cir. Traumatol.* **Buco-Maxilo-Fac**, v.11, n.2, p.75-82, Apr./June 2011.
- DANTAS, E. M. et al. Tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical com laser de baixa potência – revisão de literatura. **Odontol Clín Cient**, v.12, n.1, p.7-11, 2013.

DA SILVA, M. D. et al. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. **Mol Neurobiol**, v.51, n.1, p.19-31, 2015.

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

DA SILVA SERGIO, L. P. et al. Low Intensity Infrared Laser Effects on *Escherichia coli* Cultures and Plasmid DNA. **J Clin Exp Dermatol Res**, v.3, p.166, 2013.

DE ALMEIDA, P. et al. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? **Lasers Med Sci**, v.29, n.2, p.653-658, Mar. 2014.

DECARY, S. et al. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. **Hum Gene Ther**, v.8, n.12, p. 1429-1438, 1997.

DE FREITAS, C. E. et al. High Final Energy of Low-Level Gallium Arsenide Laser Therapy Enhances Skeletal Muscle Recovery without a Positive Effect on Collagen Remodeling. **Photochem Photobiol**, v.91, n.4, p. 957-965, 2015.

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

DE MELO, C. A. et al. Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle. **Lasers Med Sci**, v.31, n.3, p.531-538, Apr.2016.

DENG, B. et al. Interleukin-10 triggers changes in macrophages phenotype that promote muscle growth and regeneration. **J Immunol**, v.189, n.7, p.3669-3680, Oct.2012.

DIAZ DE BARBOZA, G. et al. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. **World J Gastroenterol**, v.23, n.16, p.2841-2853, Apr. 2017.

DITCH, S., PAULL, T. T. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. **Trends Biochem Sci**, v.37, n.1, p. 15-22, 2012.

DILLENBURG, C. S. et al. Laser phototherapy triggers the production of reactive oxygen species in oral epithelial cells without inducing DNA damage. **J Biomed Opt**, v.19, n.4, p.048002, Apr. 2014.

DILWORTH, F. J.; BLAIS, A. Epigenetic regulation of satellite cell activation during muscle regeneration. **Stem Cell Res Ther**, v.2, n.2, p.18, 2011.

DIOTTI, R.; LOAYZA, D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. **Nucleus**, v.2, n.2, p.119-135, Mar./Apr. 2011.

DOKSANI, Y.; DE LANGE, T. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.6, n.12, p.a016576, Dec. 2014.

DOMINGUES-FARIA, C. et al. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. **Ageing Res Rev**, v.26, p.22-36, Mar. 2016.

DONATI, B.; VALENTI, L. Telomeres, NAFLD and Chronic Liver Disease. **Int J Mol Sci**, v.17, n.3, p.383, Mar. 2016.

DUBE, A. et al. He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage. **Radiat Environ Biophys**, v.40, n.1, p. 77-82, Mar. 2001.

EDUARDO, F. P. et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. **Lasers Surg Med**, v.39, n.4, p.365-372, 2007.

ENGEL, K. W.; KHAN, I.; ARANY, P. R. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. **J Biophotonics**, v.9, n.11-12, p.1148-1156, Dec. 2016.

ENWEMEKA, C. S. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. **Photomed Laser Surg**, v.27, n.3, p.387-393, June 2009.

EVANS, C. H.; HUARD, J. Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. **Nat Rev Rheumatol**, v.11, n.4, p.234-242, 2015.

FAKHARZADEH, S. S.; TRUSKO, S. P.; GEORGE, D. L. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. **EMBO J**, v.10, n.6, p. 1565-1569, June 1991.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci**, v.5, n.2, p.58-62, 2014.

FERNANDES, K. P. et al. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci**, v.28, n.3, p.1043-1046, May 2013.

FERREIRA, M. P. et al. Effect of low-energy galliumaluminum- arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. **Photomed Laser Surg**, v.27, n.6, p.901-906, Dec. 2009.

FIÓRIO, F.B. et al. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers Med Sci**, v. 29, n.1, p.313-319, May 2013.

FOMINA, E. E. et al. Y-box binding protein 1 (YB-1) promotes detection of DNA bulky lesions by XPC-HR23B factor. **Biochemistry (Mosc)**, v.80, n.2, p. 219-227, 2015

FONSECA, A. S. et al. Low Intensity Infrared Laser Induces Filamentation in *Escherichia coli* Cells. **Laser Phys**, v.21, p.1829–1837, Oct. 2011.

FONSECA, A. S. et al. Low Intensity Infrared Laser Effects on *Escherichia coli* Cultures and Plasmid DNA. **Laser Phys**, v.22, n.10, p.1635-1641, Oct. 2012.

FONSECA, A. S. et al. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. **Lasers Med Sci**, v.28, n.4, p.1077-1084, 2013.

FONSECA, A. S. et al. Low intensity infrared laser affects expression of oxidative DNA repair genes in mitochondria and nucleus. **Laser Phys**, v.24, n.11, p.115605, 2014.

FONSECA, A. S. et al. Nucleotide excision repair pathway assessment in DNA exposed to low-intensity red and infrared lasers. **Braz J Med Biol Res**, v.48, n.10, p.929-938, Oct. 2015a.

FONSECA, A. S. et al. Low-intensity red and infrared lasers on XPA and XPC gene expression. **Laser Phys Lett**, v.11, n.9, p.045603, July 2015b.

FRANCK, P.; HENDERSON, P.W.; ROTHHAUS, K.O. Basics of Lasers: History, Physics, and Clinical Applications. **Clin Plast Surg**, v.43, n.20, p.505-513, 2016.

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, n.1, p.25-35, Jan. 2012.

GALATI, A. et al. TRF1 and TRF2 binding to telomeres is modulated by nucleosomal organization. **Nucleic Acids Res**, v.43, n.12, p.5824-5837, 2015.

GANNON, H. S.; WODA, B. A.; JONES, S. N. ATM phosphorylation of Mdm2 Ser394 regulates the amplitude and duration of the DNA damage response in mice. **Cancer Cell**, v.21, n.5, p.668-679, May 2012.

GAO, X., XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **J Biomed Sci**, v.16, p.4, Jan. 2009.

GARCEZ, A. S., NUNES, S. C., RIBEIRO, M. S. **Aplicações clínicas do laser em baixa intensidade para a biomodulação e terapia fotodinâmica**. São Paulo: Artes Médicas. 2008. p.576-591.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia em cores. **Elsevier**, 2007.

GOBBINI, E. et al. Telomere uncapping at the crossroad between cell cycle arrest and carcinogenesis. **Mol Cell Oncol**, v.1, n.1., p.e29901, July 2014.

GOLLOSHI, R.; SANDERS, J. T.; MCCORD, R. P. Genome organization during the cell cycle: unity in division. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v.9, n.5, 2017.

GOPALAKRISHNAN, K. et al. Hydrogen peroxide induced genomic instability in nucleotide excision repair-deficient lymphoblastoid cells. **Genome Integr**, v.1, n., p.16, Dec. 2010.

GUEDES DE ALMEIDA, L. et al. TP53 and ATM mRNA expression in skin and skeletal muscle after low-level laser exposure. **J Cosmet Laser Ther**, v.19, n.4, p.227-231, 2017.

HADDAD, F. et al. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. **J Appl Physiol (1985)**, v.98, n.3, p.911-917, Mar.2005.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, v.4, n.3, p.337-361, 2017.

HAO, D. et al. Calcium overload and in vitro apoptosis of the C6 glioma cells mediated by sonodynamic therapy (hematoporphyrin monomethyl ether and ultrasound). **Cell Biochem Biophys**, v.70, n.2, p.1445–1452, 2014.

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

HALL, J. E. Guyton & Hall tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2011.

HE, B.; LU, N.; ZHOU, Z. Cellular and Nuclear Degradation during Apoptosis. **Curr Opin Cell Biol**, v.21, n.6, p.900-912, Dec.2009.

HEREDIA, J. E. et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. **Cell**, v.153, n.2, p.376-388, Apr. 2013.

HEU, F. et al. Effect of low level laser therapy on blood flow and oxygen- hemoglobin saturation of the foot skin in healthy subjects: a pilot study. **Laser Ther**, v.22, n.1, p.21-30, 2013.

HINDS, P. W. et al. Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. **Mol Cell Biol**, v.7, n.8, p.2863-2869, 1987.

HO-PUN-CHEUNG, A. et al. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization. **BMC Mol Biol**, v.10, p.31, 2009.

HOURELD, N. N. Shedding light on a new treatment for diabetic wound healing: a review on phototherapy. **Scientific World Journal**, v.2014, p.398412, 2014.

HORSLEY, V. et al. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. **Cell**, v. 113, n. 4, p. 483-494, 2003.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose Response**, v. 9, n.4, p.602–618, 2011.

HYATT, J.P. et al. PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. **Muscle Nerve**, v.38, n.1, p.861-866, 2008.

IVANCICH, M. et al. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. **Antioxidants (Basel)**, v.6, n.1, p.pii: E15, 2017.

IYOMASA, D. M. et al. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the gerbil. **Micron**, v.40, n.4, p.413-418, 2009.

- Jl, L. L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. **Exp Gerontol**, v.42, n.7, p.582-593, July 2007.
- JIA, P.; HER, C.; CHAI, W. DNA Excision Repair at Telomeres. **DNA Repair (Amst)**, v.36, p.137-145, 2015.
- JOYCE, K.M., DOWNES, C. S., HANNIGAN, B. M. Radioadaptation in Indian muntjac fibroblast cells induced by low intensity laser irradiation. **Mutat Res**, v.435, n.1, p.35-42, 1999.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. **Guanabara Koogan**, 2004.
- KADI, F. et al. The effects of regular strength training on telomere length in human skeletal muscle. **Med Sci. Sports Exerc**, v.40, n.1, p.82-87, Jan. 2008.
- KARLSEDER, J. et al. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. **PLoS Biol**, v.2, n.8, p.E240, 2004.
- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v.56, n.5, p.691-704, 1989.
- KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation. **Int J Radiat Biol**, v.65, n.6, p.691-697, 1994.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v.432, n.7015, p.316-323, Nov. 2004.
- KIBE, T.; ZIMMERMANN, M.; DE LANGE, T. TPP1 Blocks an ATR-Mediated Resection Mechanism at Telomeres. **Mol Cell**, v.61, n.2, p.236-246, Jan. 2016.
- 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. **J Photochem Photobiol B**, v.60, n.2-3, p.136-142, July 2001.
- KOHLI, R.; GUPTA, P. K. Irradiance dependence of the He-Ne laser-induced protection against UVC radiation in E. coli strains. **J Photochem Photobiol B**, v.69, n.3, p.161-167, Mar. 2003.
- KOSAKOWSKA, M. et al. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus and antioxidant enzymes. **J Muscle Res Cell Motil**, v.36, n.6, p.377-393, 2015.
- KUROSAKA, M.; MACHIDA, S. Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated by induction of the JAK2/STAT3 signalling pathway through cyclin D1 targeting. **Cell Prolif**, v.46, n.4, p.365-373, Aug. 2013.
- LAGERWERF, S. et al. DNA damage response and transcription. **DNA Repair (Amst)**, v.10, n.7, p.743-750, July 2011.
- LANE, D. P. Cancer: p53, guardian of the genome. **Nature**, v.558, n.6381, p.15-6, July 1992.

- LAVIN, M. F.; GUEVEN, N. The complexity of p53 stabilization and activation. **Cell Death Differ**, v.13, n.6, p.941-950, 2006.
- LAYE, M. J. et al. Increased shelterin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and skeletal muscle following an ultra-long-distance running event. **J Appl Physiol (1985)**, v.112, n.5, p.773-781, 2012.
- LEE, Y. H. et al. Prevention of oxidative stress-induced apoptosis of C2C12 myoblasts by a Cichorium intybus root extract. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.77, n.2, p.375-377, 2013.
- LEHMANN, A. R. DNA polymerases and repair synthesis in NER in human cells. **DNA Repair (Amst.)**, v.10, n.7, p.730-733, July 2011.
- LI, M.; WILSON, D. M. 3RD. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. **Antioxid Redox Signal**, v.20, n.4, p.678-707, Feb. 2014.
- LIU, J.; QU, W.; KADIISKA M.B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v.238, n.3, p. 209-214, 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4 , p.402-408, Dec. 2001.
- LOMBARD, D. B. et al. DNA repair, genome stability and aging. **Cell**, v.120, n.4, p. 497–512, Feb. 2005.
- LU, J.; LIU, Y. Deletion of ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast. **EMBO J**, v.29, n.2, p.398-409, Jan. 2010.
- LUDLOW, A. T. et al. Exercise alters mRNA expression of telomere-repeat binding factor 1 in skeletal muscle via p38 MAPK. **J Appl Physiol (1985)**, v.113, n.11, p.1737-1746, Dec. 2012a.
- LUDLOW, A.T. et al. Chronic exercise modifies age-related telomere dynamics in a tissue-specific fashion. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.67, n.9, p.911-926, 2012b.
- LUDLOW, A.T. et al. Telomere shorten in response to oxidative stress in mouse skeletal muscle fibers. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.69, n.7, p.821-830, 2014.
- LUND, T. C., GRANGE, R. W., LOWE, D. A. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. **Muscle Nerve**, v.36, n.3, p.387-390, 2007.
- LUO, G. et al. IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.284, n.5, p.R1249-R1254, 2003.
- MACIEJOWSKI, J.; DE LANGE, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.18, n.3, p.175-186, Mar. 2017.

- MACKEY, A. L. et al. Activation of satellite cells and the regeneration of human skeletal muscle are expedited by ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory medication. **FASEB J**, v.30, n.6, p.2266-2281, June 2016.
- MCNEIL, E.M.; MELTON, D.W. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. **Nucleic Acids Res**, v.40, n. 20, p. 9990-10004, 2012.
- MADLENER, S. et al. Essential role for mammalian apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease Ape1/Ref-1 in telomere maintenance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, n.44, p.17844-17849, 2013.
- MAFFULLI, N. et al. Muscle injuries: a brief guide to classification and management. **Transl Med UniSa**, v.12, p.14-18, 2014.
- MAIA, M. L. et al. Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. **J Appl Oral Sci**, v.20, n.6, p.594-602, Nov./Dec. 2012.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.3, p.153–166, Mar. 2009.
- MANDAL, P. Potential biomarkers associated with oxidative stress for risk assessment of colorectal cancer. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.390, n.6, p.557-565, June 2017.
- MANTINEO, M.; PINHEIRO, J.P.; MORGADO, A.M. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. **J Biomed Opt**, v.19, n.9, p.98002, 2014.
- MARTÍNEZ, P.; BLASCO, M.A. Role of shelterin in cancer and aging. **Aging Cell**, v.9, n.5, p.653-666, 2010.
- MARTEIJN, J. A. et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.15, n.7, p.465-481, July 2014.
- MARQUES, M.M. et al. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v.34, n.3, p.260-265, 2004.
- MASOUMIPOOR, M. et al. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. **Lasers Med Sci**, v.29, n.5, p.1593-1598, 2014.
- MEEK, D. The p53 response to DNA damage. **DNA Repair (Amst)**, v.3, n.8-9, p.1049-1056, Aug./Sept. 2004.
- MELIS, J. P.; VAN STEEG, H.; LUIJTEN, M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. **Antioxid Redox Signal**, v.18, n.18, p.2409-2419, June 2013.

- MENDOZA, M.; MANDANI, G.; MOMAND, J. The MDM2 gene family. **Biomol Concepts**, v.5, n.1, p.9-19, 2014.
- MENG, X. et al. MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v.74, n.24, p.7161-7167, 2014.
- MENONI, H. et al. Chromatin associated mechanisms in base excision repair - nucleosome remodeling and DNA transcription, two key players. **Free Radic Biol Med**, v.107, p.159-169, June 2017.
- MESQUITA-FERRARI, R. A. et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. **Lasers Med Sci**, v.26, n.3, p.335-340, 2011.
- 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. **Lasers Med Sci**, v.30, n. 8 p.2209-2013, 2015.
- MIGLIARIO, M. et al. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. **Lasers Med Sci**, v.29, n.4, p.1463-1467, 2014.
- MIRZAYANS, R. et al. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. **J Biomed Biotechnol**, v.12, p.170325, 2012.
- MORAIS, S.R. et al. Strength training prior to muscle injury potentiates low-level laser therapy (LLLT)-induced muscle regeneration. **Lasers Med Sci**, v.32, n. 2, p.317-325, 2017.
- MORGAN, S. E.; KASTAN, M. B. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. **Adv Cancer Res**, v.71, p.1-25, 1997.
- MOTOHASHI, N., ASAKURA, K. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. **Front Cell Dev Biol**, v.2, n.1, 2014.
- MU, H. et al. Nucleotide Excision Repair Lesion-Recognition Protein Rad4 Captures a Pre-Flipped Partner Base in a Benzo[a]pyrene-Derived DNA Lesion: How Structure Impacts the Binding Pathway. **Chem Res Toxicol**, v.30, n.6, p.1344-1354, June 2017.
- MUELLER-WOHLFAHRT, H. W. et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: the Munich consensus statement. **Br J Sports Med**, v.47, n.6, p.342-350, 2013.
- MUNOZ, P. et al. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. **Nat Genet**, v.37, n.10, p.1063-1071, Oct. 2005.
- MUÑOZ, P. et al. TRF1 controls telomere length and mitotic fidelity in epithelial homeostasis. **Mol Cell Biol**, v.29, n.6, p.1608-1625, 2009.
- NACANO, J. et al. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Exp Physiol**, v.94, n.9, p.1005-1015, 2009.

NACCARATI, A. et al. Mutations and polymorphisms in TP53 gene – an overview on the role in colorectal cancer. **Mutagenesis**, v.27, n.2, p.211-218, 2012.

NAKANISHI, K. et al. Expression of mRNAs for telomeric repeat binding factor (TRF)-1 and TRF2 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. **Clin Cancer Res**, v.9, n.3, p.1105-1111, 2003.

NADERLINGER, E., HOLZMANN, K. Epigenetic Regulation of Telomere Maintenance for Therapeutic Interventions in Gliomas. **Genes (Basel)**, v.8, n.5, p.pii: E145, May 2017.

NOVAK, M. L. et al. Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury. **J Pathol**, v.232, n.3, p.344-355, Feb. 2014.

OLINER, J. D. et al. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. **Nature**, v.362, n.6423, p.857-860, 1993.

ØSTHUS, I. B. et al. Telomere length and long-term endurance exercise: does exercise training affect biological age? A pilot study. **PLoS One**, v.7, n.12, p.e52769, 2012.

OTIS, J. S. et al. Pro-inflammatory mediation of myoblast proliferation. **PLoS One**, v.19, n.9, p.e92363, Mar. 2014.

PAL, D. et al. Overexpression of telomere binding factors (TRF1 & TRF2) in renal cell carcinoma and their inhibition by using SiRNA induce apoptosis, reduce cell proliferation and migration in vitro. **PLoS One**, v.10, n.3, p. e0115651, 2015.

PALLOTTA, R.C. et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, v.27, n.1, p.71-78, Jan. 2012.

PARSONS, J. L., DIANOV, G. L. Co-ordination of base excision repair and genome stability. **DNA Repair (Amst)**, v.12, n.5, p.326-333, 2013.

PATEL, T. N. et al. Shelterin proteins and cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.16, n.8, p.3085-3090, 2015.

PARIKH, D. et al. Telomeres are partly shielded from ultraviolet-induced damage and proficient for nucleotide excision repair of photoproducts. **Nat Commun**, v.6, p.8214, 2015.

PARK, J. S. et al. Human AP endonuclease 1: a potential marker for the prediction of environmental carcinogenesis risk. **Oxid Med Cell Longev**, v.2014, p.730301, 2014.

PERRY, R.L.; RUDNICK, M.A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. **Front Biosci**, v.5, p.D750- D757, 2000.

PERTILLE, A.; MACEDO, A. B.; OLIVEIRA, C. P. Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. **Rev Bras Fisioter**, v.16, n.6, p.495-501, 2012.

PHELPS, M.; STUELSATZ, P.; YABLONKA-REUVENI, Z. Expression profile and overexpression outcome indicate a role for β Klotho in skeletal muscle fibro/adipogenesis. **FEBS J**, v.283, n.9, p.1653-1668, 2016.

PIETSCH, E. C.; HUMBEY, O.; MURPHY, M. E. Polymorphisms in the p53 pathway. **Oncogene**, v.25, n.11, p.1602-1611, Mar. 2006.

PITMAN, R. T.; WOJDYLA, L.; PURI, N. Mechanism of DNA damage responses induced by exposure to an oligonucleotide homologous to the telomere overhang in melanoma. **Oncotarget**, v.4, n.5, p.761-771, 2013.

PONSOT, E.; LEXELL, J.; KADI, F. Skeletal muscle telomere length is not impaired in healthy physically active old women and men. **Muscle Nerve**, v.37, n.4, p.467-472, 2008.

PONSOT, E. et al. Telomere length and regulatory proteins in human skeletal muscle with and without ongoing regenerative cycles. **Exp Physiol**, v.97, n.6, p. 774-784, 2012.

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

QIU, J. et al. Attenuated NER expressions of XPF and XPC associated with smoking are involved in the recurrence of bladder cancer. **PLoS One**, v.9, n.12, p.e115224, 2014.

QUIÑONES, J. L.; DEMPLE, B. When DNA repair goes wrong: BER-generated DNA-protein crosslinks to oxidative lesions. **DNA Repair (Amst)**, v.44, p.103-109, 2016.

RAE, D. E. et al. Skeletal muscle telomere length in healthy, experienced, endurance runners. **Eur J Appl Physiol**, v.109, n.2, p.323-330, 2010.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v.24, n.5, p.981-990, 2012.

RELAIX, F.; ZAMMIT, P. S. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. **Development**, v.139, n.16, p.2845-2856, 2012.

RENAULT, V. et al. Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. **Aging Cell**, v.1, n.2, p.132-139, Dec. 2002.

RIBEIRO, B. G. et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. **Lasers Surg Med**, v.47, p.571-578, 2015.

RIBEIRO, B. G. et al. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. **Plos One**, v.11, n.4, p.e0153618, 2016.

RIBEIRO, C. J. et al. Chemical Variations on the p53 Reactivation Theme. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.9, n.2, p.pii: E25, 2016.

RICE, C. et al. Structural and functional analysis of the human POT1-TPP1 telomeric complex. **Nat Commun**, v.8, p.14928, 2017.

- RIZZI, C. F. et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers Surg Med**, v.38, n.7, p.704-713, 2006.
- ROBERTSON, A. B. et al. DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci**, v.66, n.6, p.981-993, Mar. 2009.
- RODRIGUES, N. C. et al. Effects of 660 nm low level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. **J Rehabil Res Dev**, v.50, n.7, p.985-996, 2013a.
- RODRIGUES, N. C. et al. Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, v.120, p.29-35, 2013b.
- RODRIGUES, N. C. et al. Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. **Braz J Phys Ther**, v.18, n.5, p.395-401, 2014.
- ROOS, C. et al. The effects of a low-intensity red laser on bacterial growth, filamentation and plasmid DNA. **Laser Phys**, v.23, n.7, p.075602, 2013.
- ROY, J. et al. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. **FASEB J**, v.31, n.9, p.3729-3745, 2017.
- SAITO, K. et al. Gene expression for suppressors of telomerase activity (telomeric-repeat binding factors) in breast cancer. **Jpn J Cancer Res**, v.93, n.3, p.253-258, 2002.
- SAMPATHI, S.; CHAI, W. Telomere replication: poised but puzzling. **J Cell Mol Med**, v.15, n.1, p.3-13, Jan. 2011.
- SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene**, v.28, n.33, p.2925-2939, 2009.
- SCHUCH, A. P. et al. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radic Biol Med**, v.107, p.110-124, June 2017.
- SEGALÉS, J.; PERDIGUEIRO, E.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Regulation of Muscle Stem Cell Functions: A Focus on the p38 MAPK Signaling Pathway. **Front Cell Dev Biol**, v.4, p. 91, 2016.
- SELBY, C. P. Mfd Protein and Transcription-Repair Coupling in Escherichia coli. **Photochem Photobiol**, v.93, n.1, p.280-295, Jan. 2017.
- SERGIO, L. P. S. et al. Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red Laser. **J Clin Exp Dermatol Res**, v. 3, p.166, 2012.
- SERGIO, L. P. et al. Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. **Photochem Photobiol Sci**, v.12, n.5, p.930-935, 2013.

SERGIO, L. P. et al. DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. **Lasers Surg Med**, v.47, n.4, p.361-368, 2015.

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

SERVANT, G. et al. The Nucleotide Excision Repair Pathway Limits L1 Retrotransposition. **Genetics**, v.205, n.1, p.139-153, Jan. 2017.

SHACKELFORD, R. E. et al. The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. **J Biol Chem**, v.276, n.24, p.21951-21959, June 2001.

SHAFIROVICH, V.; GEACINTOV, N. E. Removal of oxidatively generated DNA damage by overlapping repair pathways. **Free Radic Biol Med**, v.107, p.53-61, June 2017.

SHEFER, G. et al. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci**, v.115, p.1461-1469, 2002.

SHI, D.; GU, W. Dual roles of MDM2 in the regulation of p53. **Genes Cancer**, v.3, n.3-4, p.240-248, Mar. 2012.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.3 p.155-168, Mar. 2003.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.14, n.4, p.197-210, 2013.

SILVEIRA, P. C. et al. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. **Free Radic Res**, v.50, n.5, p.503-513, 2016a.

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, 2016b.

SILVA, L. H. et al. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damage by crotoxin. **Lasers Med Sci**, v.27, n.5, p.993-1000, 2012.

SINGH, K.; DILWORTH, F. J. Differential modulation of cell cycle progression distinguishes members of the myogenic regulatory factor family of transcription factors. **FEBS J**, v.280, n.17, p.3991-4003, 2013.

SINGH, S. et al. Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, n.1, p. E129-38, Jan. 2014.

SMITH, C. et al. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. **Sports Med**, v.38, n.11, p.947-969, 2008.

SMOGORZEWSKA, A. et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. **Mol Cell Biol**, v.20, n.5, p.1659-1668, 2000.

SPIVAK, G. Nucleotide excision repair in humans. **DNA Repair (Amst)**, v.36, p.13-18, 2015.

SOUZA, J. D.; GOTTFRIED, C. Muscle injury: review of experimental models. **J Electromyogr Kinesiol**, v.23, n.6, p.1253-1260, 2013.

SOUZA, N.H. et al. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. **Braz J Phys Ther**, v. 18, n.4, p.306–314, 2014.

SUGITANI, N. et al. XPA: A key scaffold for human nucleotide excision repair. **DNA Repair (Amst)**, v.44, p.123-135, 2016.

TAHERI, P.; VAHDATPOUR, B.; ANDALIB, S. Comparative study of shock wave therapy and Laser therapy effect in elimination of symptoms among patients with myofascial pain syndrome in upper trapezius. **Adv Biomed Res**, v.5, p.138, 2016.

TALHAOUI, I. et al. Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. **Free Radic Biol Med**, v.107, p.266-277, June 2017.

TAN, R.; LAN, L. Guarding chromosomes from oxidative DNA damage to the very end. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v.48, n.7, p.617-622, July 2016.

TATMATSU-ROCHA, J. C. et al. Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. **J Photochem Photobiol B**, v.164, p.96-102, Nov. 2016.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v.20, n.15, 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.

TING, A. P. et al. Telomere attrition and genomic instability in xeroderma pigmentosum type-b deficient fibroblasts under oxidative stress. **J Cell Mol Med**, v.14, n.1-2, p.403-416, Jan. 2010.

TOMAZONI, S. S. et al. Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats-part 2: biochemical aspects. **Lasers Med Sci**, v.32, n.8, p.1879-1887, 2017.

TONG, A. S. et al. ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres. **Cell Rep**, v.13, n.8, p.1633-1646, Nov. 2015.

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

- 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 Phys Lett**, v.13, n.7, p.075601, 2016a.
- TRAJANO, L. A. S. N. et al. Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. **Lasers in Medical Science**, v.31, n.5, p.841-848, July 2016b.
- TRAJANO, L. A. S. N. et al. Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts. **Lasers Med Sci**, v.31, n.6, p.1161-1167, 2016c.
- TRAJANO, L. A. S. N. et al. Pulsed low-level infrared laser alters mRNA levels from muscle repair genes dependent on power output in *Wistar* rats. **Laser Phys Lett**, v.14, n.10, p.105603, 2017.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.
- VENTURELLI, M. et al. Cellular aging of skeletal muscle: telomeric and free radical evidence that physical inactivity is responsible and not age. **Clin Sci (Lond)**, v.127, n.6, p.415-421, 2014.
- VILLALTA, S. A. et al. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Hum Mol Genet**, v.20, n.4, p.790-805, 2011.
- VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**, v.137, n.3, p.413-431, 2009.
- WALKER, J. R.; ZHU, X. D. Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. **Mech Ageing Dev**, v.133, n.6, p.421-434, June 2012.
- WALTER, C.; PABST, A. M.; ZIEBART, T. Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: an in vitro study. **Biomed Rep**, v.3, n. 1 p.14-18, 2015.
- WANG, Z. et al. Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. **PLoS genetics**, v.6, n.5, p.e1000951, 2010.
- WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells, the engines of muscle repair. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.13, n.2, p.127-133, 2011.
- WANG, Y. et al. Effects of Pax3 and Pax7 expression on muscle mass in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*). **Genet Mol Res**, v.14, n.3, p.11495-11504, 2015.
- WANG, L. J. et al. Sensing telomerase: From in vitro detection to in vivo imaging. **Chem Sci**, v.8, n.4, p. 2495-2502, 2017.

WELLS, P. G. et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci**, v.108, n.1, p.4-18,2009.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.2, p.95-107, 2009.

WILLIS, J. et al. APE2 is required for ATR-Chk1 checkpoint activation in response to oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, n.26, p.10592-10597, June 2013.

WOODWARD, E. A. et al. The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). **Immunology**, v.131, n.1, p.118-127, 2010.

WOOTTON, M. et al. Telomerase alone extends the replicative life span of human skeletal muscle cells without compromising genomic stability. **Hum Gene Ther**, v.14, n.15, p. 1473-1487, 2003.

YALÇIN, Z.; SELENZ, C.; JACOBS, J. J. L. Ubiquitination and SUMOylation in telomere maintenance and dysfunction. **Front Genet**, v.8, p.67, 2017.

YAMADA, K. et al. Decreased gene expression for telomeric-repeat binding factors and TIN2 in malignant hematopoietic cells. **Anticancer Res**, v. 22, n. 2B, p.1315-1320, 2002.

YANG, Z. J. et al. p53 suppresses muscle differentiation at the myogenin step in response to genotoxic stress. **Cell Death Differ**, v.22, n.4, p. 560-573, 2015.

YIN, K. et al. Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway in vitro. **PLoS One**, v.12, n.6, p.e0179175, June 2017.

YIN, K. et al. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Dev**, v.26, n.10, p.762-775, 2017.

YONEZU, T.; KOGURE, S. The effect of low-level laser irradiation on muscle tension and hardness compared among three wavelengths. **Laser Ther**, v.22, n.3, p. 201-207, 2013.

ZAMMIT, P. S. et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci**, v.119, p.1824-1832, 2006.

ZANOÛ, N.; GAILLY, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. **Cell Mol Life Sci**, v.70, n.21, p.4117-4130, 2013.

ZHANG, P.; DILLEY, C.; MATTSON, M.P. DNA damage responses in neural cells: Focus on the telomere. **Neuroscience**, v.145, n.4, p.1439-1448, 2007.

ZHAO, Y.; CHEN, X. Q.; DU, J. Z. Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation. **J Zhejiang Univ Sci B**, v.10, n.5, p.404-410, 2009.

ZHAO, X. et al. Cell cycle-dependent control of homologous recombination. **Acta Biochim Biophys Sin**, v.48, n.8, p. 655-668, 2017.

ZHU, X. D. et al. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. **Mol Cell**, v.12, n.6, p.1489-1498, 2003.

ZHU, Q.; WANI, A. A. Nucleotide excision repair: finely tuned molecular orchestra of early pre-incision events. **Photochem Photobiol**, v.93, n.1, p.166-177, Jan. 2017.

APÊNDICE A - Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser (Estudo 1)

Lasers Med Sci
DOI 10.1007/s10103-016-1909-8



ORIGINAL ARTICLE

Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser

Larissa Aleksandra da Silva Neto Trajano^{1,2} · Camila Luna da Silva¹ · Simone Nunes de Carvalho¹ · Erika Cortez¹ · André Luiz Mencalha² · Adenilson de Souza da Fonseca^{2,3,4} · Ana Carolina Stumbo¹

Received: 28 May 2015 / Accepted: 8 February 2016
© Springer-Verlag London 2016

Abstract Low-level infrared laser is considered safe and effective for treatment of muscle injuries. However, the mechanism involved on beneficial effects of laser therapy are not understood. The aim was to evaluate cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser at therapeutic fluences. C2C12 myoblast cultures at different (2 and 10 %) fetal bovine serum (FBS) concentrations were exposed to low-level infrared laser (808 nm, 100 mW) at different fluences (10, 35, and 70 J/cm²) and evaluated after 24, 48, and 72 h. Cell viability was evaluated by WST-1 assay; reactive oxygen species (ROS), apoptosis, and necrosis were evaluated by flow cytometry. Cell viability was decreased at the lowest FBS concentration. Laser exposure increased the cell viability in myoblast cultures at 2 % FBS

after 48 and 72 h, but no significant increase in ROS was observed. Apoptosis was decreased at the higher fluence and necrosis was increased at lower fluence in myoblast cultures after 24 h of laser exposure at 2 % FBS. No laser-induced alterations were obtained at 10 % FBS. Results show that level of reactive oxygen species is not altered, at least to those evaluated in this study, but low-level infrared laser exposure affects cell viability, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures depending on laser fluence and physiologic conditions of cells.

Keywords Apoptosis · Cell viability · Reactive oxygen species · Low-level lasertherapy · Myoblast · Necrosis

Introduction

Muscle injury results from direct and indirect causes. Direct causes include falls, lacerations, crushing, freezing, and bruises, while indirect causes are the result of a pathological process, ischemia, or neurological dysfunction [1]. Repair of injured muscle can occur slow and inappropriately leading to an incomplete functional recovery, which in turn causes recurrent injury and/or scar tissue formation. Therapies are used to preserve muscle function and improve repair, regeneration, and prevention of fibrosis [2]. For this propose, low-level laser therapy (LLLT) is considered a safe and effective approach for treatment of a variety of diseases and injuries [3]. Experimental studies have shown beneficial effects of LLLT accelerating the repair process in the muscle lesion [4]. A number of positive effects have been reported on tissue submitted to LLLT, as decreasing of inflammatory processes involving MMP2 activity, improvement of repair process, and organization and distribution of collagen in skeletal muscle [5]. LLLT increases secretion of

✉ Adenilson de Souza da Fonseca
adnfonseca@ig.com.br

¹ Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Professor Manuel de Abreu 444, PAPC, 3º andar, Maracanã, Rio de Janeiro 20551-170, Brazil

² Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca, 94, Rio de Janeiro 20211-040, Brazil

⁴ Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, Rio de Janeiro 20550-900, Brazil

regulatory myogenic factor (MyoD) and stimulates expression of pro-angiogenic factors, as vascular endothelial growth factor (VEGF) in experimental models [6]. Also, LLLT reduces the expression of TNF- α and transforming growth factor β (TGF- β) [7], interleukin-1 β [4], and malondialdehyde generation and increases the levels of superoxide dismutase [8].

C2C12 are myoblast cells derived from mouse satellite cells, and myoblast C2 subclones differentiate spontaneously after removal of fetal bovine serum (FBS) being used to study cell proliferation and muscle differentiation [9]. Cell cultures at low concentrations of FBS are also used to mimic muscle injury [9]. This model is based on the fact that the injured areas suffer ischemia and lack of nutrients and oxygen immediately after injury [10]. Cells in low serum concentrations could present similar responses to those in tissues during initial post-traumatic phase [11].

LLLT produces a shift in cell redox potential, modulating the cellular redox state, which could activate or inhibit signaling pathways [12]. Studies have shown that the LLLT increases the generation of reactive oxygen species (ROS) and these chemicals are considered second messengers involved in regulation of various pathological signs involved in control cell proliferation, differentiation, and apoptosis [13, 14]. Apoptosis occurs in multicellular organisms and is a strategy to elimination of the senescent cells during development of an organism, tissue homeostasis, and pathological processes [15]. Oxidizing agents could damage mitochondria and cause apoptosis via the mitochondrial signaling pathway [16]. Necrosis is another process of cell death characterized by loss of integrity of plasma membrane and induction of inflammation at the surrounding tissue [17]. Although apoptosis and necrosis are mediated by distinct pathway, the same insult leads to either apoptosis or necrosis depending on its intensity [18]; this occurs due overlap between these two processes [19]. It is suggested that apoptosis and necrosis have a shared network biochemical, described as "apoptosis-necrosis continuum," and low availability of caspases and intracellular ATP could convert an ongoing apoptosis process in a necrosis process [19]. Apoptosis and necrosis are regulated by TNF- α , Fas-associated protein with death domain, and ROS [20, 21].

Despite studies have demonstrated applications of LLLT to treat diseases in different biological tissues, there are doubts about the mechanisms involved in its action, as well as whether adverse effects could attenuate its beneficial effects. Thus, this study evaluated the cell viability, ROS generation, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. Doses used in this study were those recommended in clinical protocols for treatment of muscle injury.

Experimental

Low-level laser

A therapeutic low-level infrared (808 nm) laser (Photon Lase III, AsGaAl), purchased from D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brazil), with emission in continuous wave was used in this study.

Cell culture

C2C12 myoblast cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Sigma-Aldrich), supplemented with 1, 2, 5, or 10 % fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 10,000 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin, 5 mg/ml garanycin, and 0,006 mg/ml amphotericin B in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C.

Low-level infrared laser irradiation procedure

Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, centrifuged (1500 rpm, 10 min, 4 °C), resuspended in DMEM-F12 medium, and counted in Neubauer chamber. After that, aliquots of cell suspension were divided into equal volumes in microtubes (1.5 ml) and centrifuged (1500 rpm, 5 min, 4 °C), and PBS was added without resuspension (1 ml), maintaining the cells on the microtube conical bottom (0.13 cm²) to laser irradiation procedure: 10 J/cm² (0.2 J, 808 nm, 100 mW, 2 s in the continuous emission mode), 35 J/cm² (0.9 J, 808 nm, 100 mW, 9 s in the continuous emission mode), and 70 J/cm² (1.9 J, 808 nm, 100 mW, 19 s in the continuous emission mode). After laser exposure, PBS was removed and the cells were resuspended in DMEM-F12 medium and plated in 96-well plates for cell viability assay or in 24-well plates for flow cytometry assays. For flow cytometry, 1.5×10^5 cells were plated for assays after 24 h, 1.0×10^5 cells for assays after 48 h, and 5.7×10^4 cells for assays after 72 h.

Cell viability assay

Standard WST-1 assay was performed to determine the number of viable cells. This assay is based on living cell capacity to convert red tetrazolium salt into dark red formazan, which can be photometrically quantified. C2C12 cells were plated in 96-well ELISA plates with amount of cells specific for each day: 1.0×10^4 cells were plated in each well when the assays were carried out after 24 h, 9.0×10^3 cells for assays after 48 h, and 8.0×10^3 cells for assays after 72 h. Cell number was adjusted at each day according cell amount at each cell culture time, and cell number used was according standard WST-1 assay. WST-1 assay was performed according to manufacturer

protocol (Roche, Mannheim, Germany). C2C12 cells were incubated with WST-1 (2 μ l for well) and maintained at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere for 60 min, protected from light, and read at wavelengths of 450 and 630 nm in a microplate reader (Celer, Minas Gerais, Brazil). The relative number of viable cells was expressed as a percentage of the cells not exposed to laser. Experiments were performed four times.

Reactive oxygen species and death analysis

Percentages of apoptotic and necrotic cells were determined by analysis of phosphatidylserine externalization and membrane integrity with double staining using Annexin V PE and 7-AAD (BD Pharmingen, USA). Intracellular reactive oxygen species was evaluated by analysis of peroxide-dependent oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Life technologies, OR, USA), which permit to detect hydrogen peroxide, peroxy radical, including both alkylperoxy and hydroperoxy radicals, and peroxy nitrite anion. Briefly, after trypsinization, cells were resuspended in PBS and cell concentration was adjusted at 1.0×10^5 cells/ml according cytometer device. Annexin V PE and 7-AAD or H₂DCFDA were added, and samples were incubated for 15 and 10 min in the dark, respectively. After each procedure, the samples were analyzed in a flow cytometer (BD Accuri™ C6) and 10,000 events were considered.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed to verify possible statistical differences followed by Tukey post-test. Kolmogorov-Smirnov test was performed to verify normality distribution of the data. $p < 0.05$ was considered as the less significant level. InStat Graphpad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

Results

Cell viability in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser

WST-1 assay is a practical, fast, and inexpensive experimental procedure that has been successfully used to determine cell viability [22, 23]. By this assay, living cells convert red tetrazolium salt into dark red formazan, which can be quantified by spectrophotometric measurements and used to determine cell viability [24]. Cell viability in C2C12 myoblast cultures was evaluated by this assay

at different FBS concentrations (Fig. 1). Cell viability was significantly ($p < 0.05$) reduced at 24, 48, and 72 h in myoblast cultures at the lowest FBS concentrations (5, 2, and 1 %) when compared to cultures in 10 % FBS (Fig. 1a–c, respectively).

Effects of low-level infrared laser exposure on cell viability were evaluated in myoblast cultures at the middle (2%) and at the higher (10 %) FBS concentration. Exposure to infrared laser not significantly ($p > 0.05$) altered the cell viability in myoblast cultures in 10 % FBS after 24, 48, and 72 h (Fig. 2a–c, respectively). Cell viability was not significantly ($p > 0.05$) altered in myoblast cultures after 24 h of infrared laser exposure at all fluences and FBS concentrations evaluated (Fig. 2a). However, cell viability at 2 % FBS was significantly ($p < 0.05$) increased after 48 and 72 h of laser exposure at the lower fluence (10 J/cm²; Fig. 2b, c, respectively). No significant ($p > 0.05$) alteration on cell viability was observed in myoblast cultures exposed to infrared laser at the highest fluences (35 and 70 J/cm²), both in 2 and 10 % FBS concentrations.

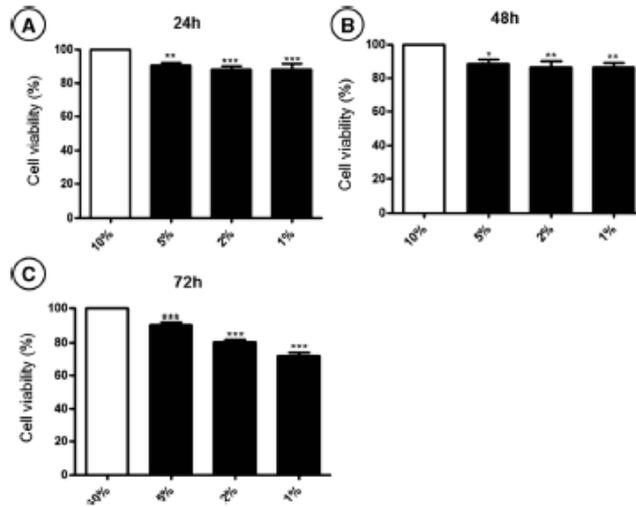
Reactive oxygen species in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser

To assess ROS generation, myoblasts were exposed to low-level infrared laser and labeled with H₂DCFDA. Data in Fig. 3 show that laser exposure did not significantly ($p > 0.05$) induce alteration on ROS levels in myoblast cultures in 2 and 10 % FBS at all laser fluences evaluated. Despite not significant, a fluence-dependent increase in ROS levels was observed 24 h after laser exposure in cultures in both 2 and 10 % FBS (Fig. 3a). No alteration was verified on myoblast ROS levels after 48 and 72 h of low-level infrared laser exposure (Fig. 3b, c, respectively).

Apoptosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser

Apoptosis in myoblast cultures was assessed by Annexin V PE labeling. Twenty-four hours after laser exposure, no significant ($p > 0.05$) alteration on percentage of apoptotic cells was observed in myoblast cultures in both 2 and 10 % FBS for all laser fluences evaluated (Fig. 4a). Similarly, no significant alteration on apoptosis was observed 48 h after laser exposure in both 2 and 10 % FBS (Fig. 4b). However, after 48 h, percentage of apoptotic cells increased, but not significantly, in cultures in 2 % FBS exposed to infrared laser at the higher fluence (70 J/cm²; Fig. 4b). After 72 h, percentage of apoptotic cells was significantly ($p < 0.05$) reduced in cultures exposed to infrared laser at the higher fluence (70 J/cm²) in 2 % FBS (Fig. 4c).

Fig. 1 Cell viability in myoblast cultures at different fetal bovine serum concentrations. * $p < 0.05$ when compared to 10 % FBS, ** $p < 0.01$ when compared to 10 % FBS, *** $p < 0.001$ when compared to 10 % FBS. **a** Myoblast cultures after 24 h; **b** myoblast cultures after 48 h; **c** myoblast cultures after 72 h



Necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser

Percentage of necrotic cells was significantly ($p < 0.05$) increased in myoblast cultures after 24 h of laser exposure at the fluence of 10 J/cm^2 in 2 % FSB (Fig. 5). After 48 and 72 h of laser exposure, necrotic cells in myoblasts cultures exposed to infrared laser were similar to those observed in controls (not exposed to laser; Fig. 5b, c, respectively).

Discussion

The effects of LLLT on various types of biological tissues have been reported, including pain relief [25], improvement of blood circulation [26], and accelerating of tissue regeneration [27]. LLLT was observed to reduce muscle fatigue, improve flexibility, accelerate the regeneration of injured muscle tissue, and contribute to pain relief in athletes [28]. Therapeutic protocols based on low-level laser have been

Fig. 2 Cell viability in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. **a** Myoblast cultures after 24 h of laser exposure; **b** myoblast cultures after 48 h of laser exposure; **c** myoblast cultures after 72 h of laser exposure. ** $p < 0.01$ when compared to control at 10 % FBS, *** $p < 0.001$ when compared to control at 10 % FBS, * $p < 0.05$ when compared to control at 2 % FBS, ** $p < 0.01$ when compared to control at 2 % FBS

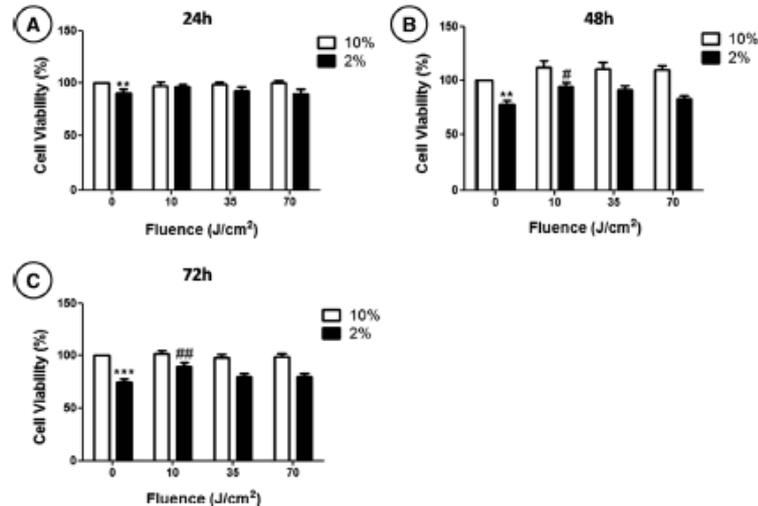
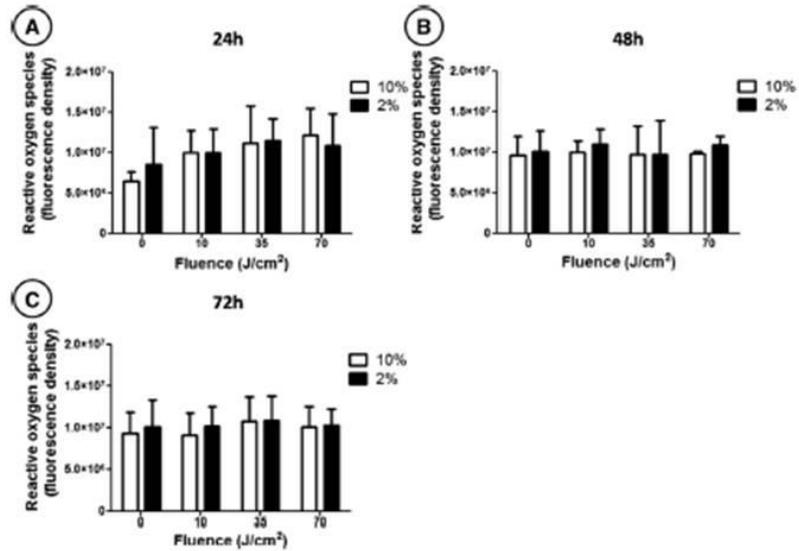


Fig. 3 Reactive oxygen species in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. **a** Myoblast cultures after 24 h of laser exposure; **b** myoblast cultures after 48 h of laser exposure; **c** myoblast cultures after 72 h of laser exposure



widely used obtaining beneficial effects on treatment of various diseases. Despite that, differences on laser devices and physical parameters (fluence ranges, powers, and emission modes) make difficult the comparison between the studies and the determination of accurate value of these parameters. This could increase the laser-induced beneficial effects, as well as decrease possible adverse effects, which could make LLLT innocuous. In fact, some authors reported absence of LLLT efficacy at different physical parameters [7, 11].

Ferreira and co-workers [11] and Mesquita-Ferrari and co-workers [7] showed that the low-level infrared and red lasers did not increase cell viability in fibroblast cultures in 5 % FBS at fluences of 3.8, 6.3, and 10 J/cm^2 . Initially, our research evaluated cell viability in myoblast cultures in different FBS concentrations, and the results showed reduction of cell viability in these cultures in lowest FBS concentrations (Fig. 1).

Based on these results and from other authors [7, 11], a low (2 %) and a normal (10 %) FBS concentration were used for evaluation of laser-induced effects on myoblast cultures. This

Fig. 4 Percentage of apoptotic cells in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. **a** Myoblast cultures after 24 h of laser exposure; **b** myoblast cultures after 48 h of laser exposure; **c** myoblast cultures after 72 h of laser exposure. * $p < 0.05$ when compared to 2 % FBS

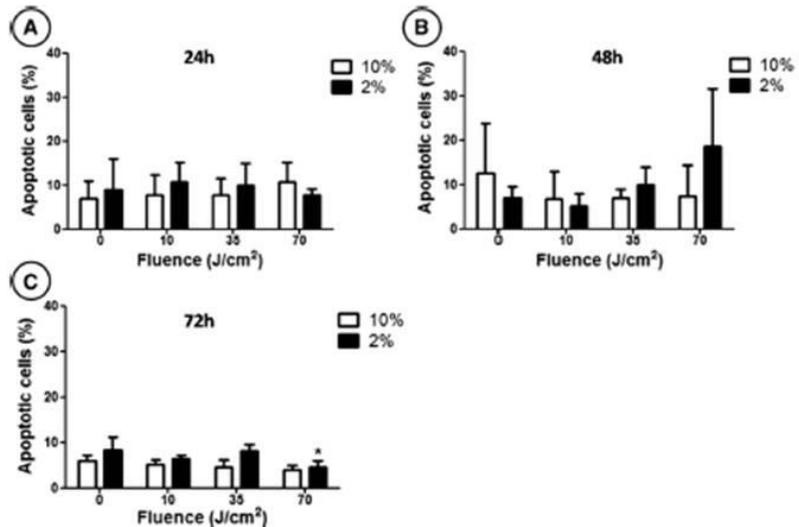
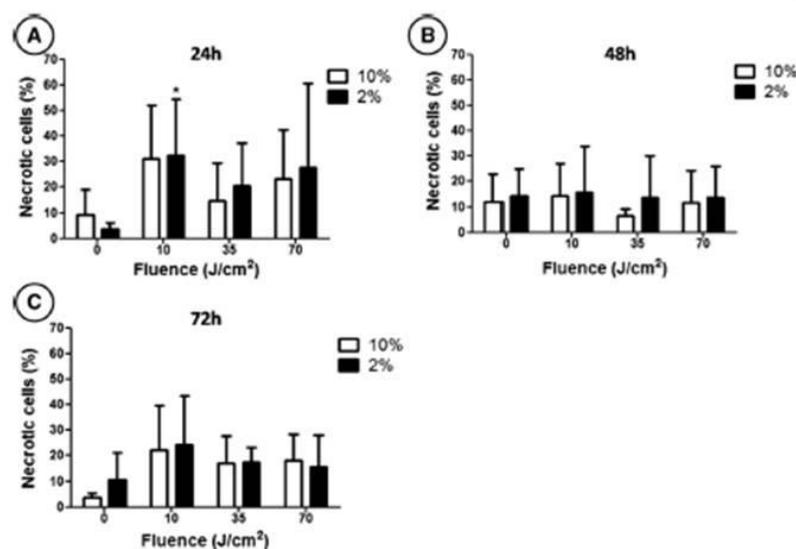


Fig. 5 Percentage of necrotic cells in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. **a** Myoblast cultures after 24 h of laser exposure; **b** myoblast cultures after 48 h of laser exposure; **c** myoblast cultures after 72 h of laser exposure. * $p < 0.05$ when compared to control at 2 % FBS



low FBS concentration was chosen because the lowest FBS concentrations (1 %, for example) induce cell differentiation in C2C12 cultures [9].

Myoblast cultures in 2 % FBS present increased cell viability after 48 and 72 h of exposure to low-level infrared laser at the lower fluence (10 J/cm²). Interestingly, after 24 h of laser exposure, as well as at the highest fluences (35 and 70 J/cm²) and in normal FBS concentration (10 %), low-level infrared laser did not alter the cell viability in myoblast cultures (Fig. 2). These results reinforce that low-level laser effects are depending on physiological condition of cells. In fact, increase on cell viability could be because myoblast cultures in 2 % FBS are in stressful conditions and low-level infrared laser could induce biostimulation effect increasing the cell viability. Moreover, laser-induced beneficial effect is increased on cultures 48 and 72 h after laser exposure in 2 % FBS. In the highest FBS concentrations (5 and 10 %, for example), this effect could be not detectable because cell viability is high. Our results are in line of other authors [29] that showed increase of cell viability in Vero cultures 24, 48, and 72 h after exposure to low-level infrared laser at similar fluences in 2 % FBS. Also, macrophages cultures exposed to infrared laser present increased cell viability 3 days after laser exposure [30].

LLLT could induce no beneficial effects on biological tissues whether insufficient or high laser fluences are applied, suggesting that an optimal fluence must be used to obtain. In fact, biostimulation effect could not occur whether highest doses are applied and an opposite inhibition effect could be induced [31]. Data in our study suggest that low-level infrared laser at 35 and 70 J/cm² are high to induce biostimulation in

myoblast C2C12 cultures in both low and normal FBS concentrations.

Energy is absorbed by endogenous photosensitizers during treatment with LLLT altering intracellular ROS levels, which modify redox-sensitive proteins involved in cell proliferation and differentiation [12]. In our study, no significant difference in ROS levels was observed 24, 48, or 72 h after laser exposure (Fig. 3). However, a fluence-dependent increase of ROS levels occurs 24 h after laser exposure in myoblast cultures in both 2 and 10 % FBS. Others authors demonstrated that infrared laser (904 nm) blocks effects of ROS in injured muscle tissue at 5 J/cm² [32]. Discrepancies within this study could be explained by wavelength (808 nm) and fluence (10, 35, and 70 J/cm²) used in our study. Also, in our study, ROS were assessed by H₂DCFDA assay. This assay does not evaluate all reactive oxygen species (singlet oxygen is not detected), as well as reactive nitrogen species are not assessed. In addition, the increase of ROS levels could be a fast phenomenon and return to baseline before 24 h, but enough to cause an improvement of cell viability in myoblast cultures exposed to infrared laser at 10 J/cm². In fact, ROS at low concentrations act as intracellular second messenger while at the highest concentrations could induce toxic effects, such as lipid peroxidation and cell death [33]. Moreover, oxidative stress baseline could be high in myoblast cultures after 48 h, and exposure to low-level infrared laser could not induce a detectable increase on intracellular ROS levels.

Apoptosis is regulated by several factors, including ROS, such as alteration on intracellular redox status induced by some endogenous and exogenous agents. These agents cause damages in mitochondria leading to apoptosis, in which

mitochondrial signaling pathways are involved [16]. Lee and co-workers [34] showed that myoblast cultures exposed to hydrogen peroxide present increase of apoptotic cells. A study with I28 cells showed that low-level laser (632.8 nm, 4.5 mW) increases anti-apoptotic bcl-2 protein and reduces apoptotic bax protein [10]. In our study, apoptosis is not altered in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser at the lowest fluences evaluated (10 J/cm^2 and 35 J/cm^2) in both FBS concentration (2 and 10 %, respectively). However, there was a reduction of apoptosis at the higher laser fluence (70 J/cm^2) evidencing the protective effect of laser. A hypothesis to explain these results is that low-level infrared laser action on ROS generation is not high enough to induce apoptosis cascade in myoblasts cultures at laser fluences evaluated in our study. At these fluences, infrared laser could induce beneficial effects, as increase on the cell viability at the lower fluence (10 J/cm^2) and reduction of apoptosis at higher fluence (70 J/cm^2) (Fig. 2).

Increase on necrosis was observed in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser at the lower fluence (10 J/cm^2) in 2 % FBS (Fig. 5). This effect could be related to laser-induced ROS, which could be toxic depending on laser dose, as Migliario and collaborators have been suggested [12]. This could be beneficial to viable cells since, with the elimination of quasi non-viable cells, viable cells could have more nutrients ready to use and the cellular multiplication rate could be increased. In fact, at the same culture conditions and laser fluence was observed increase on cellular viability (Fig. 2). Karu and co-workers [35] showed that in cell cultures, there are cell subpopulations presenting different characteristics, which are modified when exposed to low-level lasers. Thus, it is possible that the increase of necrotic cells in myoblast cultures 24 h after low-level infrared laser exposure is due to low increase of ROS, despite ROS levels were not significantly increased (Fig. 3). On the other hand, cell viability 48 and 72 h following laser exposure is increased. It is possible that at the moment of analysis (24 h after laser exposure), ROS concentration is decreased and the laser-induced ROS increase is not detectable by technique used. Moreover, singlet oxygen is not detected by H_2DCFDA assay. Necrosis in myoblast cultures could be by early ROS attack, which could occur before decrease of laser-induced ROS generation, eliminating quasi non-viable cells, and after that (48 to 72 h), laser-induced biostimulation could be observed. Thus, at the moment of analysis, ROS level could be smaller acting beneficially on viable cells (biostimulation effect) and cellular death by necrosis of quasi non-viable cells resulting from previous event (immediately after laser exposure). Cell viability, necrosis, or apoptosis is observed according to the moment of analysis performed or depending on the cell subpopulation accessed by the technique used.

This could explain the accelerating of tissue repair in injured muscles. Low-level laser exposure at low fluences could

stimulate both elimination of non-viable cells by inflammatory machinery and recovery of viable cells. It is possible that elimination of quasi non-viable cells by necrosis induction could allow healthy muscle cells to have an environment more favorable (as more nutrients, proliferating factors, oxygen supply) to recovery.

Conclusions

Level of reactive oxygen species is not altered, at least to those evaluated in this study, but low-level infrared laser exposure affects cell viability, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures depending on laser fluence and physiologic conditions of cells.

Acknowledgments This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

References

- Prisk V, Huard J (2003) Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histol Histopathol* 18:1243–1256
- Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM (2009) Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide* 21:157–163
- Rola P, Doroszko A, Derkacz A (2014) The Use of Low-Level Energy Laser Radiation in Basic and Clinical Research. *Adv Clin Exp Med* 23:835–842
- de Freitas CE, Bertaglia RS, Vechetti Júnior JJ, Mareco EA, Salomão RA, de Paula TG, Nai GA, Carvalho RF, Pacagnelli FL, Dal-Pai-Silva M (2015) High Final Energy of Low-Level Gallium Arsenide Laser Therapy Enhances Skeletal Muscle Recovery without a Positive Effect on Collagen Remodeling. *Photochem Photobiol* 91(4):957–965
- Alves AN, Fernandes KP, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquita-Ferrari RA (2013) Modulating effect of low level laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 29: 813–821
- Vatanserver F, Rodrigues NC, Assis LL, Peviani SS, Durigan JL, Moreira FM, Hamblin MR, Parizotto NA (2012) Low intensity laser therapy accelerates muscle regeneration in aged rats. *Photonics Lasers Med* 1:287–297
- Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP (2011) Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 26:335–340
- Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ (2009) Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg* 27:863–869
- Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E (2004) C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem* 48:223–233
- Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O (2002) Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell

- cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 115:1461–1469
11. Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP (2009) Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg* 27:901–906
 12. Farivar S, Malekshahi T, Shiari R (2014) Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci* 5:58–62
 13. Migliaro M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F (2014) Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci* 29:1463–1467
 14. Gao X, Xing D (2009) Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci* 16:4–20
 15. Chen J, Zhao Y, Liu Y (2014) The role of nucleotides and purinergic signaling in apoptotic cell clearance - implications for chronic inflammatory diseases. *Front Immunol* 5:656–665
 16. Dai S, Xu C, Tian Y, Cheng W, Li B (2014) Stimulation of calcium overload and apoptosis by sonodynamic therapy combined with hematoporphyrin monomethyl ether in C6 glioma cells. *Oncol Lett* 8:1675–1681
 17. Maki Y, Akimoto J, Hiranuma M, Fujiwara Y (2014) Effect of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy on cell death modalities in human glioblastoma T98G cells. *J Toxicol Sci* 39: 821–827
 18. Higuchi Y (2004) Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med* 8:455–464
 19. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495–516
 20. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 1757:1371–1387
 21. Ciru ML, Aw TY (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749–762
 22. Broekman MM, Roelofs HM, Wong DR, Kerstholt M, Leijten A, Hoenjens F, Peters WH, Wanten GJ, de Jong DJ (2015) Allopurinol and 5-aminosalicylic acid influence thiopurine-induced hepatotoxicity in vitro. *Cell Biol Toxicol* 31:161–171
 23. Palanki R, Arora S, Tyagi N, Rusu L, Singh AP, Palanki S, Carter JE, Singh S (2015) Size is an essential parameter in governing the UVB-protective efficacy of silver nanoparticles in human keratinocytes. *BMC Cancer* 15:636
 24. El-Khatib M, Tepe C, Senger B, Dibue-Adjei M, Riemenschneider MJ, Stummer W, Steiger HJ, Cornelius JF (2015) Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of human meningioma: an in vitro study on primary cell lines. *Int J Mol Sci* 16:9936–48
 25. Maia ML, Bonjardim LR, Quintans Jde S, Ribeiro MA, Maia LG, Conti PC (2012) Effect of low-level laser therapy on pain levels in patients with temporomandibular disorders: a systematic review. *J Appl Oral Sci* 20:594–602
 26. Heu F, Forster C, Namer B, Dragu A, Lang W (2013) Effect of low-level laser therapy on blood flow and oxygen-hemoglobin saturation of the foot skin in healthy subjects: a pilot study. *Laser Ther* 22: 21–30
 27. Rodrigues NC, Assis L, Fernandes KR, Magri A, Ribeiro DA, Brunelli R, Abreu DC, Renno AC (2013) Effects of 660 nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. *J Rehabil Res Dev* 50:985–996
 28. Yonezu T, Kogure S (2013) The effect of low-level laser irradiation on muscle tension and hardness compared among three wavelengths. *Laser Ther* 22:201–207
 29. Eduardo FP, Melnert DU, Monezi TA, Zzell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM (2007) Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 34:365–372
 30. Souza NH, Ferrari RA, Silva DF, Nunes FD, Bussadori SK, Fernandes KP (2014) Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther* 18:306–314
 31. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR (2011) Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 9:602–618
 32. Rodrigues NC, Brunelli R, Abreu DC, Fernandes K, Partzotto NA, Renno AC (2014) Morphological aspects and Cox-2 expression after exposure to 780-nm laser therapy in injured skeletal muscle: an in vivo study. *Braz J Phys Ther* 18:395–401
 33. Hao D, Song Y, Che Z, Liu Q (2014) Calcium overload and in vitro apoptosis of the C6 glioma cells mediated by sonodynamic therapy (hematoporphyrin monomethyl ether and ultrasound). *Cell Biochem Biophys* 70:1445–1452
 34. Lee YH, Kim DH, Kim YS, Kim TJ (2013) Prevention of oxidative stress-induced apoptosis of C2C12 myoblasts by a Cichorium intybus root extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:375–377
 35. Karu T (1989) Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 56:691–704

APÊNDICE B- Low-level laser irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts (Estudo 2)

IOP Publishing | Astro Ltd

Laser Physics Letters

Laser Phys. Lett. 13 (2016) 075601 (6pp)

doi:10.1088/1612-2011/13/7/075601

Low-level laser irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts

L A S N Trajano¹, L P S Sergio², C L Silva¹, L Carvalho¹, A L Mencialha²,
A C Stumbo¹ and A S Fonseca^{2,3}

¹ Laboratório de Pesquisa em Células Tronco, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

² Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

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

E-mail: adnfonseca@yahoo.com.br

Received 8 April 2016, revised 29 April 2016

Accepted for publication 30 April 2016

Published 26 May 2016



CrossMark

Abstract

Low-level lasers are used for the treatment of diseases in soft and bone tissues, but few data are available regarding their effects on genomic stability. In this study, we investigated mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts exposed to low-level infrared laser. C2C12 myoblast cultures in different fetal bovine serum concentrations were exposed to low-level infrared laser (10, 35 and 70 J cm⁻²), and collected for the evaluation of DNA repair gene expression. Laser exposure increased gene expression related to base excision repair (8-oxoguanine DNA glycosylase and apurinic/apyrimidinic endonuclease 1), nucleotide excision repair (excision repair cross-complementation group 1 and xeroderma pigmentosum C protein) and genomic stabilization (ATM serine/threonine kinase and tumor protein p53) in normal and low fetal bovine serum concentrations. Results suggest that genomic stability could be part of a biostimulation effect of low-level laser therapy in injured muscles.

Keywords: DNA repair, genomic stabilization, laser therapy, myoblast, muscle

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Muscle injuries are the most common type of injury during participation in sport and can occur through direct trauma, such as laceration, strain and contusion, or indirect damage, as ischemia and neurological dysfunction [1, 2]. Regeneration of muscle damage can be slow, resulting in atrophy, pain and contractures [3, 4]. About 30% of professional level athletes present a high recurrence rate of muscle strain injuries [3].

Laser biostimulation effects have been shown in various cell types, such as fibroblasts, keratinocytes, osteoblasts and mesenchymal stem cells [5–8]. Low-level laser therapy (LLLT) promotes skeletal muscle regeneration in animal models and human beings, increasing the number of muscle fibers [9], angiogenesis [10] and the formation of myotubes [11]. Also, LLLT reduces the inflammatory phase and accelerates the proliferation phase of muscle tissue repair [12]. For these purposes, low-level infrared lasers have shown effectiveness,

and wavelength and dose choice in laser-based clinical protocols can be justified by refractive index, which allows determination of the maximum therapeutic dose on biological tissues [13].

Laser radiation at low fluences has benefits when applied on tissues under stress conditions [14]. Also, non-coherent quasi-monochromatic radiation could have similar effects to those emitted by light-emitting diodes (LEDs), despite radiation-induced alterations in cell functions depending on cell size, which is considered the discrimination threshold of the radiation coherence property [15]. In an *in vitro* model, stress is caused by variation in the serum concentration, inducing the reduction in cell growth rate and these cells are considered as those in a muscle injury [16, 17]. For this proposal, C2C12 myoblast cultures under low serum concentration have been used as an *in vitro* muscle injury model [18–20]. This experimental model is based on the fact that the injured area suffers ischemic lesion leading to a lack of nutrients and oxygen. Cells subjected to low serum concentration mimic cells in an injured tissue in the initial phase [20].

Although the LLLT has beneficial effects on cells, potential adverse effects on the cells and on DNA after exposure have been reported [8, 21]. DNA damage is an unwanted effect, which could be induced by laser radiation. However, as the LLLT benefits are based on biostimulatory effects, a genotoxic effect could occur if inadequate laser doses are used [22]. On the other hand, DNA repair and genomic stability is crucial to normal cell functions and DNA repair is part of the cellular strategies to survive under physiological and at pathological conditions. Then, cell survival could be improved if LLLT induces DNA repair mechanisms and could be an important component of the biostimulation effect induced by LLLT. However, this is a disputed point and few studies are available regarding potential effects of LLLT on DNA repair and genomic stability.

Thus, our aim was to investigate mRNA expression from genes involved in base excision and nucleotide excision repair and genomic stabilization in myoblasts exposed to low-level infrared laser. Laser fluence, power and emission mode were used according to clinical protocols.

2. Material and methods

2.1. Low-level laser

A therapeutic low-level infrared (808 nm) laser (Photon Lase III, AsGaAl), purchased from D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brazil), with emission in continuous wave mode at 100 mW output power was used in this study.

2.2. Cell culture

Mouse C2C12 myoblast cultures were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Sigma-Aldrich), supplemented with 2% or 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 10000 U ml⁻¹ penicillin, 10 mg ml⁻¹ streptomycin, 5 mg ml⁻¹

garamycin and 0.006 mg ml⁻¹ amphotericin B in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C.

2.3. Low-level infrared laser irradiation procedure

The cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, centrifuged (1500 rpm, 4 °C, 10 min), reconstituted in DMEM-F12 medium and the cell number determined in a Neubauer chamber. After that, aliquots of cell suspension were divided into equal volumes in microtubes (1.5 ml), centrifuged (1500 rpm, 4 °C, 5 min) and PBS was added (1 ml) without reconstitution, and the pellet was submitted to laser exposure procedure: 10 J cm⁻² (0.2 J, 808 nm, 100 mW, 2 s in the continuous emission mode), 35 J cm⁻² (0.9 J, 808 nm, 100 mW, 9 s in the continuous emission mode) and 70 J cm⁻² (1.9 J, 808 nm, 100 mW, 19 s in the continuous emission mode). After laser exposure, the PBS was removed and the C2C12 myoblast cultures were reconstituted in DMEM-F12 medium and plated in bottles of 25 cm² for 2 h before total RNA extraction.

2.4. Total RNA extraction

C2C12 myoblast cultures were centrifuged (1500 rpm, 4 °C, 5 min) 2 h after reconstitution in microcentrifuge flex tubes, supernatant was discarded, and TRIzol[®] reagent was added and centrifuged (12000 rpm, 4 °C, 10 min). The supernatants were transferred to other tubes, chloroform was added, the mixtures were centrifuged (12000 rpm, 4 °C, 15 min), the aqueous phases were transferred to other tubes, and isopropanol was added. After incubation (room temperature, 15 min), the mixtures were centrifuged (12000 rpm, 4 °C, 10 min), the supernatants were discarded, and the precipitate was washed with ethanol-DEPC (80% ethanol, DEPC 0.1%) solution and centrifuged. The supernatants were withdrawn and the total RNA was reconstituted in water-DEPC (0.1%) solution and stored (–80 °C).

2.5. Complementary DNA synthesis

The RNA concentration and purity were determined on a spectrophotometer by calculating the optical density ratio at a 260/280 nm wavelength ratio. Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using a two-step cDNA synthesis kit (Promega, USA). Four micrograms of RNA were reverse-transcribed into cDNA using GoScript[™] reverse transcriptase (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol, using a 20 µl total reaction. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR) was performed using 5 µl of GoTaq qPCR Master Mix (Promega) for a 10 µl final volume containing 50 ng of cDNA. For the determination of the initial relative quantity of cDNA, the samples were amplified with apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1), 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1), xeroderma pigmentosum C protein (XPC), ATM serine/threonine kinase (ATM), tumor protein p53 (P53) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

primers. The reactions were run on an Applied Biosystems 7500 RT-qPCR machine (Applied Biosystems, USA). The mixtures were initially denatured at 94 °C for 10 min. The PCR consisted of 40 cycles under the following conditions: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and an extension period at 72 °C for 30 s. Melt-curve analyses were performed for all genes, and specificity, as well as integrity, of the PCR products was confirmed by the presence of a single peak. The relative expression was normalized by levels of the reference gene (GAPDH). Duplicate CT values were analyzed in Microsoft Excel (Microsoft) using the comparative CT ($2 - \Delta\Delta CT$) method [23].

2.6. Statistical analysis

Data were reported as mean \pm standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed to verify possible statistical differences followed by the Tukey post-test. The Kolmogorov–Smirnov test was performed to verify the normality distribution of the data. $p < 0.05$ was considered as the less significant level. InStat Graphpad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA.)

3. Results

3.1. Effects of low-level infrared laser exposure on APE1 and OGG1 mRNA expression

APE1 mRNA relative expression after exposure to low-level infrared laser in myoblasts in 10% FBS was significantly ($p < 0.05$) increased after laser exposure at the highest fluences evaluated (35 and 70 J cm⁻²) and, in 2% FBS, APE1 mRNA relative expression was significantly increased ($p < 0.05$) at all laser fluences compared to their respective controls (figure 1(A)). To confirm the laser-induced effects on DNA base repair mechanisms, OGG1 mRNA relative expression was evaluated (figure 1(B)). A significant ($p < 0.01$) increase of OGG1 mRNA relative expression was obtained in myoblasts in 10% FBS exposed to laser at 10 and 70 J cm⁻², as well as in myoblasts in 2% FBS exposed to laser at lower fluence (10 J cm⁻²), when compared to their respective controls.

3.2. Effects of low-level infrared laser exposure on ERCC1 and XPC mRNA expression

Figure 2(A) shows the ERCC1 mRNA relative expression data in myoblasts after low-level infrared laser irradiation. These data indicate a significant ($p < 0.001$) increase of ERCC1 mRNA expression in myoblasts exposed to laser radiation at all fluences evaluated in 10% and 2% FBS, at the lowest fluences when compared to their respective controls. Data from XPC mRNA relative expression showed a significant ($p < 0.01$) increase of expression of this mRNA in myoblasts in 10% and 2% FBS at only 35 J cm⁻² laser radiation compared to their respective controls (figure 2(B)).

3.3. Effects of low-level infrared laser exposure on ATM and p53 mRNA expression

ATM mRNA relative expression after irradiation with low-level infrared laser in myoblasts increased significantly ($p < 0.01$) in 10% FBS concentration at 35 and 70 J cm⁻² laser fluences. In 2% FBS concentration, the laser exposure at 35 J cm⁻² also significantly ($p < 0.01$) increased the ATM mRNA relative expression when compared to the respective control group (figure 3(A)). A significant ($p < 0.01$) increase of p53 mRNA relative expression was obtained in myoblasts exposed to laser at 35 J cm⁻² in 10% FBS. Similarly, p53 mRNA relative expression in myoblasts significantly ($p < 0.001$) increased after 35 J cm⁻² laser fluence in 2% FBS (figure 3(B)).

4. Discussion

Although there are many evidences with regard to the bio-stimulatory effects induced by low-level lasers, few studies are available that address the bioestimulatory laser effects to genes related to DNA repair and genomic stabilization.

High levels of reactive oxygen species (ROS) lead to oxidative stress in cells and chronic exposure to stress situations, which increase intracellular ROS, and could be harmful to genomes causing direct and indirect changes in a DNA molecule [24]. These changes are also induced by exposure to exogenous agents, such as ionizing [25] and non-ionizing radiation [26], drugs [27] and toxic metals [28]. Base excision repair (BER) is achieved via the excision of damaged DNA bases by a class of enzymes known as glycosylases DNA (OGG1, for example) that recognizes and cleaves hydrolytically the modified base, giving rise to an abasic site [29]. The abasic sites are processed by APE1, which cleaves the 5'-phosphodiester linked to the AP site, giving a 3'-hydroxyl group and phosphate 5'-2'-deoxyribose group [30]. Several studies have been conducted to evaluate APE1 and OGG1 mRNA expression in different tissues using LLLT. Trajano and co-workers [31] evaluated the APE1 and OGG1 mRNA expression in burned skin exposed to low-level infrared laser (660 nm, 20 J cm⁻², 100 mW) and observed 10 d after the skin was burned, reduced levels of APE1 and increased levels of OGG1 mRNA expression. De Souza da Fonseca and co-workers [32] evaluated the APE1 mRNA expression 1 h after irradiation with low-level infrared laser (830 nm) in healthy muscle and observed an increase in APE1, at 1.5 and 10 J cm⁻², and an increase in OGG1 mRNA expression at 10 J cm⁻² laser fluence. Our results show an increase in APE1 mRNA expression in 10% FBS after 35 and 70 J cm⁻², as well as after all laser fluences evaluated in 2% FBS (figure 1(A)). Also, an increase in OGG1 mRNA expression was verified at 10 and 70 J cm⁻², in 10% FBS, and at 10 J cm⁻² laser fluence, in 2% FBS (figure 1(B)). We suggest that 2 h after laser irradiation, OGG1 mRNA expression is returning to the baseline level, which occurs after recognition and cleavage of the modified base. Alternatively, this could occur through the action of other glycosylases and, at this time, DNA repair occurs by APE1.

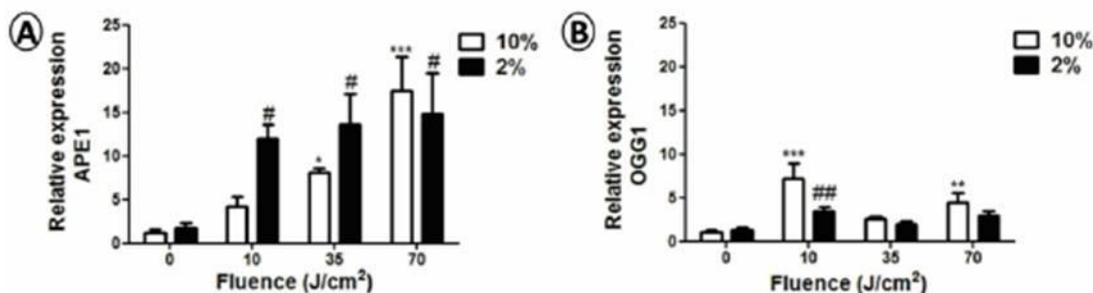


Figure 1. APE1 mRNA relative expression (A) and OGG1 mRNA relative expression (B) in myoblasts 2h after exposure to low-level infrared laser in continuous wave emission mode. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ when compared to the control in 10% FBS. (#) $p < 0.05$ and (##) $p < 0.01$ when compared to the control in 2% FBS.

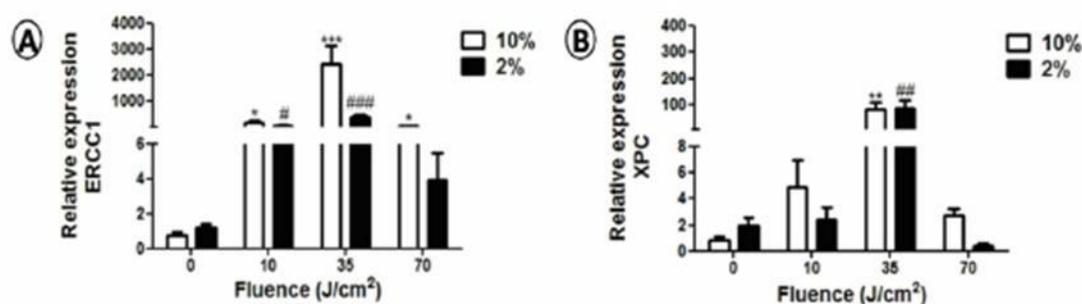


Figure 2. ERCC1 mRNA relative expression (A) and XPC mRNA relative expression (B) in myoblasts 2h after exposure to low-level infrared laser in continuous wave emission mode. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ when compared to the control in 10% FBS. (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$ and (###) $p < 0.001$ when compared to the control in 2% FBS.

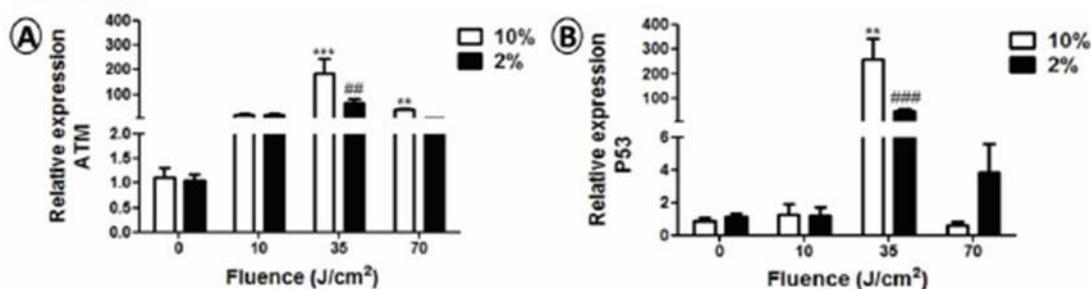


Figure 3. ATM mRNA relative expression (A) and p53 mRNA relative expression (B) in myoblasts 2h after exposure to low-level infrared laser in continuous wave emission mode. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ when compared to 10% FBS. (##) $p < 0.01$ and (###) $p < 0.001$ when compared to 2% FBS.

DNA repair by nucleotide excision base (NER) involves four steps: (1) recognition of the damage; (2) incision on both sides of the injury and excision of the nucleotide fragment containing the damage; (3) incision above and below the lesion by endonucleases and (4) binding and synthesis of the DNA [33]. XPC protein recognizes DNA damage, and binds HR23B protein forming a stable complex XPC-HR23B. XPC-HR23B complex is the first protein component that recognizes and binds to damaged sites [34]. ERCC1-XPF complex forms an essential endonuclease, which is responsible for incision in the DNA chain at 5' damaged nucleotide [35]. During a study in animal burned skin, XPC mRNA expression is reduced 10 d after low-level

red laser irradiation (660 nm, 20 J cm⁻², 100 mw) [31]. Fonseca and co-workers [36] observed, 1h after low-level infrared laser (808nm) irradiation, an increase in XPC mRNA expression at 25, 50 and 100 J cm⁻² in *Wistar* rat skin. Our results showed an increase in ERCC1 and XPC mRNA relative expression in 10% and 2% FBS at 35 J cm⁻² laser fluence (figures 2(A) and (B), respectively), but ERCC1 mRNA relative expression is increased at all laser fluences evaluated in 10% FBS and at 10 J cm⁻² in 2% FBS. Data from ERCC1 mRNA relative expression confirm the data obtained from XPC mRNA relative expression. Our findings with XPC mRNA relative expression suggest that beneficial effects of low-level lasers occur at optimal fluences

(or doses) LLLT. In fact, low doses do not cause any effects, but high doses cause the inhibition of laser-induced effects [37]. We suggest that low fluences do not alter nucleotide excision repair gene expression in myoblasts and high fluences cause the inhibition of laser-induced effects on nucleotide excision repair. Also, stress conditions do not alter the gene expression related to this DNA repair mechanism. Other studies demonstrated that low-level infrared laser effects depend on the physiological condition of the cells [38, 39].

p53 plays a crucial role in cellular response to various types of stress and its expression significantly increases in response to stress, such as DNA damage, RNA synthesis impairment and nucleotide depletion [40]. Once activated, this protein stops the cell cycle or induces apoptosis by dependent and independent transcription mechanisms. Moreover, p53 regulates the G1/S and G2/M checkpoints [41]. The ATM protein regulates checkpoint G1/S by p53 phosphorylation, leading to transcriptional regulation of the target genes, including p21Cip1. This mediates cell cycle arrest at the G1/S or G2/M phase [42] reducing the ability of p53 to bind MDM2, stabilizing and increasing its activity [43, 44]. After exposure to ionizing radiation, p53 plays an important role in checkpoint G1/S requiring ATM action, such as in ATM-deficient cells, where this checkpoint is injured [45]. Also, studies with non-ionizing radiation (ultraviolet light) showed that p53-deficient animals have a high propensity for developing tumors [46, 47]. However, there is no study evaluating the gene expression related to genomic stabilization after low-level laser irradiation. We observed an increase in p53 mRNA relative expression in myoblasts after 35 J cm⁻² laser fluence in 10% and 2% FBS and an increase of ATM mRNA relative expression at 35 and 70 J cm⁻² in 10% FBS, as well as at 35 J cm⁻² in 2% FBS (figures 3(B) and (A), respectively). Although the activation of ATM and p53 is linked to various cancers, an increase in ATM and p53 gene expression induced by low-level infrared laser irradiation could protect myoblasts. This could repair DNA damage, contributing to genomic stability and precipitating a possible laser-induced biostimulation effect at these doses.

Data in this study suggest that optimal fluences should be obtained in LLLT to induce alteration of gene expression related to DNA repair and genomic stabilization. The protection and integrity of genomes could be on the basis of a biostimulation effect induced by low-level lasers at therapeutic fluences, powers and emission mode.

5. Conclusions

Our research shows that laser irradiation at therapeutic fluences changes mRNA expression related to DNA repair in myoblast cultures in normal and stressful conditions, suggesting that genomic stabilization could be part of a biostimulation effect induced by low-level laser therapy in injured muscles.

Acknowledgments

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

References

- [1] Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day C S, Bosch P, Vogt M, Fu F H, Moreland M S and Huard J 2000 *J. Bone Joint Surg. Br.* **82** 131
- [2] Baoge L, Van Den Steen E, Rimbaut S, Philips N, Witvrouw E, Almqvist K F, Vanderstraeten G and Vanden Bossche L C 2012 *ISRN Orthop.* **2012** 689012
- [3] Rodrigues N C, Assis L, Fernandes K R, Magri A, Ribeiro D A, Brunelli R, Abreu D C and Renno A C 2013 *J. Rehabil. Res. Dev.* **50** 985
- [4] Fernandes K P, Alves A N, Nunes F D, Souza N H, Silva J A Jr, Bussadori S K and Ferrari R A 2013 *Lasers Med. Sci.* **28** 1043
- [5] Marques M M, Pereira A N, Fujihara N A, Nogueira F N and Eduardo C P 2004 *Lasers Surg. Med.* **34** 260
- [6] Walter C, Pabst A M and Ziebart T 2015 *Biomed. Rep.* **3** 14
- [7] Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M and Reno F 2014 *Lasers Med. Sci.* **29** 1463
- [8] Wu Y H, Wang J, Gong D X, Gu H Y, Hu S S and Zang H 2012 *Lasers Med. Sci.* **27** 509
- [9] Alves A N, Fernandes K P, Melo C A, Yamaguchi R Y, França C M, Teixeira D F, Bussadori S K, Nunes F D and Mesquita-Ferrari R A 2014 *Lasers Med. Sci.* **29** 813
- [10] Assis L, Moretti A I, Abrahão T B, de Souza H P, Hamblin M R and Parizotto N A 2013 *Lasers Med. Sci.* **28** 947
- [11] Brunelli R M, Rodrigues N C, Ribeiro D A, Fernandes K, Magri A, Assis L, Parizotto N A, Cliquet A Jr, Renno A C and Abreu D C 2014 *Lasers Med. Sci.* **29** 91
- [12] Rodrigues N C, Brunelli R, Abreu D C, Fernandes K, Parizotto N A and Renno A C 2014 *Braz. J. Phys. Ther.* **18** 395
- [13] Gonchukov S A and Lazarev Yu B 2003 *Laser Phys.* **13** 749
- [14] Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro R A, Guidugli-Neto J and Jaeger M M 2001 *Lasers Surg. Med.* **29** 179
- [15] Budagovsky A V 2005 *Kvant. Electron.* **35** 369
- [16] Eduardo F P, Mehnert D U, Monezi T A, Zzell D M, Schubert M M, Eduardo C P and Marques M M 2007 *Lasers Surg. Med.* **39** 365
- [17] Azevedo L H, de Paula Eduardo F, Moreira M S, de Paula Eduardo C and Marques M M 2006 *Lasers Med. Sci.* **21** 86
- [18] Ferreira M P, Ferrari R A, Gravalos E D, Martins M D, Bussadori S K, Gonzalez D A and Fernandes K P 2009 *Photomed. Laser Surg.* **27** 901
- [19] Mesquita-Ferrari R A, Ribeiro R, Souza N H, Silva C A, Martins M D, Bussadori S K and Fernandes K P 2011 *Indian J. Exp. Biol.* **49** 423–8
- [20] Mesquita-Ferrari R A, Alves A N, de Oliveira Cardoso V, Artilhaireiro P P, Bussadori S K, Rocha L A, Nunes F D and Fernandes K P 2015 *Lasers Med. Sci.* **38** 2209
- [21] Mbene A B, Houreld N N and Abrahamse H J 2009 *Photochem. Photobiol.* **84** 131
- [22] Sergio L P, Silva A P, Amorim P F, Campos V M, Magalhães L A, de Paoli F and de Souza da Fonseca A 2015 *Lasers Surg. Med.* **47** 361
- [23] Livak K J and Schmittgen T D 2001 *Methods* **25** 402
- [24] Cooke M S, Evans M D, Dizdaroglu M and Lunec J 2003 *FASEB J.* **17** 1195
- [25] Anuranjani and Bala M 2014 *Redox Biol.* **28** 832
- [26] Sergio L P S, Marciano R S, Polignano G A C, Guimarães O P, Geller M, Paoli F and Fonseca A S 2012 *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* **3** 1
- [27] Wells P G, McCallum G P, Chen C S, Henderson J T, Lee C J, Perstin J, Preston T J, Wiley M J and Wong A W 2009 *Toxicol. Sci.* **108** 4
- [28] Liu J, Qu W and Kadiiska M B 2009 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238** 20
- [29] Hazra T K, Das A, Das S, Choudhury S, Kow Y W and Roy R 2007 *DNA Repair* **6** 470

- [30] Park J S, Kim H L, Kim Y J, Weon J I, Sung M K, Chung H W and Seo Y R 2014 *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014** 730301
- [31] Trajano E T, Mencialha A L, Monte-Alto-Costa A, Pôrto L C and de Souza da Fonseca A 2014 *Lasers Med. Sci.* **29** 1953
- [32] de Souza da Fonseca A, Mencialha A L, Araújo de Campos V M, Ferreira Machado S C, de Freitas Peregrino A A, Geller M and de Paoli F 2013 *Lasers Med. Sci.* **28** 1077
- [33] Qiu J, Wang X, Meng X, Zheng Y, Li G, Ma J, Ye G, Li Y and Li J 2014 *PLoS One* **9** e115224
- [34] Fomina E E, Pestryakov P E, Maltseva E A, Petruseva I O, Kretov D A, Ovchinnikov L P and Lavrik O I 2015 *Biochemistry (Mosc)* **80** 219
- [35] McNeil E M and Melton D W 2012 *Nucleic Acids Res.* **40** 9990
- [36] Fonseca A S, Magalhães L A G, Mencialha A L, Ferreira-Machado S C, Geller M and Paoli F 2014 *Laser Phys. Lett.* **11** 095601
- [37] Huang Y Y, Sharma S K, Carroll J and Hamblin M R 2011 *Dose Response* **9** 602
- [38] Canuto K S, Sergio L P S, Marciano R S, Guimarães O R, Polignano G A C, Geller M, Paoli F and Fonseca A S 2013 *Laser Phys. Lett.* **10** 065606
- [39] Sergio L P, Marciano Rda S, Teixeira G R, Canuto Kda S, Polignano G A, Guimarães O R, Gelles M, de Paoli F and da Fonseca Ade S 2013 *Photochem. Photobiol. Sci.* **12** 930
- [40] Mirzayans R, Andrais B, Scott A and Murray D 2012 *J. Biomed. Biotechnol.* **2012** 170325
- [41] Lavin M F and Gueven N 2006 *Cell Death Differ.* **13** 941
- [42] Ditch S and Paull T T 2012 *Trends Biochem. Sci.* **37** 15
- [43] Zhao Y, Chen X Q and Du J Z 2009 *J. Zhejiang. Univ. Sci. B* **10** 404
- [44] Boohaker R J and Xu B 2014 *Biomed. J.* **37** 3
- [45] Chaudhary M W and Al-Baradie R S 2014 *Appl. Clin. Genet.* **7** 159–67
- [46] Cui R et al 2007 *Cell* **128** 85
- [47] Chen H, Weng Q Y and Fisher D E 2014 *J. Invest. Dermatol.* **134** 2080

APÊNDICE C- Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts (Estudo 3)

Lasers Med Sci (2016) 31:1161–1167
DOI 10.1007/s10103-016-1956-1



ORIGINAL ARTICLE

Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts

Larissa Alexandra da Silva Neto Trajano¹ · Ana Carolina Stumbo¹ · Camila Luna da Silva¹ · Andre Luiz Mencialha² · Adenilson S. Fonseca^{2,3}

Received: 18 February 2016 / Accepted: 2 May 2016 / Published online: 25 May 2016
© Springer-Verlag London 2016

Abstract Infrared laser therapy is used for skeletal muscle repair based on its biostimulative effect on satellite cells. However, shortening of telomere length limits regenerative potential in satellite cells, which occurs after each cell division cycle. Also, laser therapy could be more effective on non-physiologic tissues. This study evaluated low-level infrared laser exposure effects on mRNA expression from muscle injury repair and telomere stabilization genes in myoblasts in normal and stressful conditions. Laser fluences were those used in clinical protocols. C2C12 myoblast cultures were exposed to low-level infrared laser (10, 35, and 70 J/cm²) in standard or normal (10 %) and reduced (2 %) fetal bovine serum concentrations; total RNA was extracted for mRNA expression evaluation from muscle injury repair (MyoD and Pax7) and chromosome stabilization (TRF1 and TRF2) genes by real time quantitative polymerization chain reaction. Data show that low-level infrared laser increases the expression of MyoD and Pax7 in 10 J/cm² fluence, TRF1 expression in all fluences, and TRF2 expression in 70 J/cm² fluence in both 10 and 2 % fetal bovine serum. Low-level infrared laser increases

mRNA expression from genes related to muscle repair and telomere stabilization in myoblasts in standard or normal and stressful conditions.

Keywords Low level laser · MyoD · Pax7 · TRF1 · TRF2

Introduction

Regeneration of skeletal muscle is a coordinated and highly complex process attributed to presence of satellite cells, precursor cells responsible for repair and regeneration of adult skeletal muscle [1]. Satellite cells are activated and differentiated during muscle injury repair and characterized by their ability to reverse quiescence and self-renewal, which are important to sustain tissue regeneration during several damage cycles [2]. This process is regulated through coordinated expression of myogenic regulatory factors, such as MyoD, Myf5, myogenin, and MRF4 [3]. Among these factors, MyoD is crucial for satellite cell activation and proliferation [4]. Paired-box (Pax) transcription factor bears a key role as myogenesis regulator and studies have suggested that Pax7 participates in self-renewal mechanism [5]. Also, satellite cells have a common phase of Pax7 and MyoD coexpression, which occurs before self-renewal or differentiation process [6].

Regenerative potential of human satellite cells is limited due to shortening of telomere length after each cell division cycle [7]. Telomeres are repetitions of short non-coding DNA sequences located at the ends of chromosomes, whose function is preventing chromosome degradation and fusion with neighboring chromosomes during mitosis [8]. Their three-dimensional structure is stabilized by telomere-binding proteins (TBP), as telomeric repeat binding factors (TRF1 and TRF2) [9]. Studies have reported the relationship between

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

¹ Laboratório de Pesquisa em Células Tronco, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

² Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, 4º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551030, Brazil

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

regeneration events and telomere shortening in skeletal muscle [10], and satellite cell regeneration ability is indirectly determined by telomere length [11].

TRF1 is related to telomere lengths by telomerase modulating and affecting the mitotic progression [12]. TRF2 is a telomere-binding protein important for telomere end protection and it binds directly to duplex telomeric (TTAGGG), which repeats and stabilizes the T-loop structure [13]. TRF2 regulates telomere protection and telomere length and interacts with DNA repair proteins involved in chromosome instability syndromes, leading to premature aging and increased cancer risk [14]. Also, TRF2 acts as a negative regulator of telomere length when overexpressed in mice and humans [15].

Low-level laser therapy (LLLT) has shown beneficial effects on muscle repair process in inflammatory phase by reducing levels of IL- β and inflammatory cells [16, 17]. In repair phase, LLLT increases VEGF, MyoD, and myogenin levels [18, 19] and attenuates fibrosis by reducing TGF- β 1, TGF- β , and collagen levels [17, 18, 20]. Muscle injury is mimicked in cell culture using low concentrations of fetal bovine serum (FBS) [21]. After muscle injury, lesioned areas suffer ischemia and hence lack of oxygen and nutrients; cells in low serum concentration could have a similar response to injured tissue during the initial injury phase [22].

Although beneficial effects of LLLT have been reported on muscle injuries, there is no study reporting effects of low-level lasers on chromosome stability and gene expression. Thus, the aim of this study was to evaluate low-level infrared laser exposure effects on mRNA expression from muscle injury repair and telomere stabilization genes in myoblasts in normal and stressful conditions. Laser fluences were those used in clinical protocols suggested in laser device guide for treatment of muscle injury.

Experimental

Low-level laser

A therapeutic low-level infrared (808 nm) laser (Photon Lase III, AsGaAl), purchased from D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brazil), with continuous wave emission and output power at 100 mW, is used in this study.

Cell culture

Mouse C2C12 myoblast cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Sigma-Aldrich), supplemented with 2 or 10 % FBS (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 10,000 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin, 5 mg/ml garamycin, and 0.006 mg/ml

amphotericin B in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C.

Low-level infrared laser irradiation procedure

Cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, centrifuged (1500 rpm, 4 °C, 10 min), reconstituted in DMEM-F12 medium, and cell number determined in Neubauer chamber. After that, cell suspension aliquots were divided into equal volumes in microtubes (1.5 ml), centrifuged (1500 rpm, 4 °C, 5 min), and then PBS was added (1mL) without reconstitution and pellet submitted to laser exposure procedure: 10 J/cm² (0.3 J, 808 nm, 100 mW, 3 s in the continuous emission mode), 35 J/cm² (1.1 J, 808 nm, 100 mW, 11 s in the continuous emission mode), and 70 J/cm² (2.2 J, 808 nm, 100 mW, 22 s in the continuous emission mode). Handpiece was a single-tip with removable fiber waveguide (1-mm radius fiber) static and immediately on top of the cell pellet. After laser irradiation, PBS was removed and cells were reconstituted in DMEM-F12 medium and plated in 25 cm² flasks for 2 h before analysis.

Total RNA extraction

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

Complementary DNA synthesis

RNA concentration and purity were determined on a spectrophotometer by calculating optical density ratio at a 260/280-nm wavelength ratio. Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using a two-step cDNA synthesis kit (Promega, USA). Four micrograms of RNA were reverse-transcribed into cDNA using GoScript[™] reverse transcriptase (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol, using a 20 μ l total reaction. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using 5 μ l of GoTaq qPCR Master Mix (Promega) for a 10 μ l final volume containing 50 ng of cDNA. For cDNA initial relative quantity determination, samples were amplified with MyoD, paired-box transcription factor (Pax), telomeric repeat binding factors (TRF1 and TRF2), and glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (GAPDH) primers. Reactions were run on an Applied Biosystems 7500 RT-qPCR machine (Applied Biosystems, USA). Mixtures were initially denatured at 94 °C for 10 min. The PCR consisted of 40 cycles at the following conditions: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and an extension period at 72 °C for 30 s. Melt curve analyses were performed for all genes, and specificity as well as integrity of the PCR products were confirmed by presence of a single peak. Relative expression was normalized by levels of the reference gene (GAPDH). Duplicate CT values were analyzed in Microsoft Excel (Microsoft) using comparative CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method [23].

Agarose gel electrophoresis of TRF1 Transcript

TRF1 transcript was ascertained by agarose gel electrophoresis after second amplification by RT-PCR. TRF1 transcript samples were mixed with DNA dye and loading buffer (0.25 % xylene cyanol, 0.25 % bromophenol blue and glycerol in water) and applied in a 2 % agarose horizontal gel electrophoresis chamber (Biosystem, São Paulo, Brazil) in tris-acetate-EDTA buffer (pH 8.0, 7 V/cm). Transcript samples were viewed under fluorescence using an ultraviolet trans-illumination system (Biosystem, São Paulo, Brazil); afterwards, gel was digitalized (Kodak Digital Science 1d, EDAS 120, Manaus, Amazonia, Brazil).

Statistical analysis

Data were reported as mean \pm standard deviation. The one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed to determine possible statistical differences followed by Tukey posttest. Kolmogorov-Smirnov test was performed to check normality distribution of data. $p < 0.05$ was considered as the less significant level. InStat GraphPad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

Results

Effects of low-level infrared laser exposure on MyoD mRNA expression

Figure 1 shows MyoD mRNA relative expression after exposure to low-level infrared laser in C2C12 cells in 10 % and 2 % FBS concentrations. Data in this figure show that MyoD levels were significantly increased ($p < 0.05$) after laser exposure at lower fluence evaluated (10 J/cm^2) in C2C12 cells in 10 % FBS (Fig. 1a), and in 2 % FBS (Fig. 1b) when compared to their respective non-irradiated controls.

Effects of low-level infrared laser exposure on Pax7 mRNA expression

To confirm exposure effects to low-level infrared laser on myogenesis, Pax7 mRNA relative expression was also evaluated in C2C12 cells in 10 % and 2 % FBS (Fig. 2). Similar to MyoD mRNA, Pax7 mRNA levels were significantly increased ($p < 0.05$) after laser exposure at the lower laser fluence in C2C12 cells in 10 % FBS (Fig. 2a) and 2 % FBS (Fig. 2b) when compared to their respective non-irradiated controls.

Effects of low-level infrared laser exposure on TRF2 mRNA expression

Figure 3 shows TRF2 mRNA relative expression after exposure to low-level infrared laser in C2C12 cells in 10 % and 2 % FBS. TRF2 mRNA levels were significantly increased ($p < 0.05$) after laser exposure at higher fluence (70 J/cm^2) in C2C12 cells in 10 % FBS (Fig. 3a) and 2 % FBS (Fig. 3b) when compared to their respective non-irradiated controls.

Effects of low-level infrared laser exposure on TRF1 mRNA expression

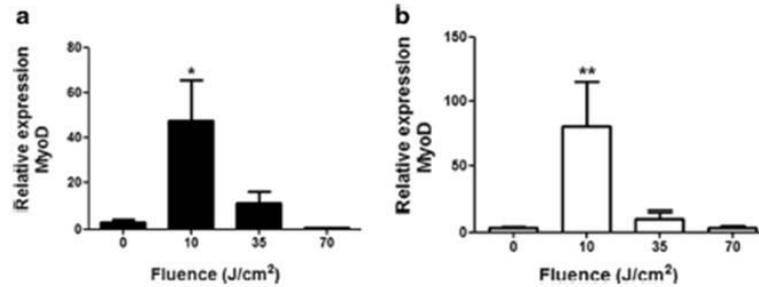
Figure 4 is a photograph of agarose gel after electrophoresis of TRF1 transcripts from C2C12 cells exposed to low-level infrared laser at different fluences in 10 % and 2 % FBS. This photograph indicates that laser exposure induces expression of mRNA from TRF1 gene in C2C12 cells in both 10 % and 2 % FBS at all fluences evaluated.

Discussion

LLLT is an effective and safe treatment whose biostimulatory effects have caused benefits in various cell and tissues types [24–26]. However, there is no study evaluating possible effects of laser on tissue repair and chromosomal stability. For this purpose, mRNA expression related to muscle injury repair and chromosome stabilization were evaluated in this study.

Activated skeletal myoblasts express MyoD and Pax7, among other factors [27]. MyoD is related to regulation of satellite cells and removal of myoblasts from cell cycle to initiate myogenesis [1, 18]. Pax7 is a quantifiable marker for satellite cells in both activated and quiescent state and essential for the development and survival of these cells [6, 28]. Interaction between the MRF and PAX genes seems to be important for self-renewal of satellite cells [29]. During muscle regeneration, satellite cells are distinguished by MyoD and Pax7 protein expression. Cells in quiescent state present increased Pax7 expression and decreased MyoD expression, while cells in proliferating state present increased Pax7 and

Fig. 1 MyoD mRNA relative expression in myoblasts 2 h after exposure to low-level infrared laser in **a** 10 % and **b** 2 % fetal bovine serum. GAPDH was used as internal standard for normalization. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ when compared to respective control groups (non-irradiated)



MyoD expressions, and cells undergoing myogenic differentiation present decreased Pax7 expression and increased MyoD expression [28].

Although there are several studies reporting biostimulatory effects of laser in MyoD expression, laser action on MyoD expression has not yet been well established and no study has associated MyoD expression with Pax7 after LLLT. Rodrigues and coworkers [30] showed upregulation of MyoD expression due to LLLT in injured animals after 14 days (660 nm, 20 mW, 10 J/cm²). Another study showed MyoD expression increase in injured animals irradiated with laser 4 days after injury (808 nm, 30 mW, 180 J/cm²) [18]. Rodrigues and coworkers [19] reported also MyoD expression increase 14 and 21 days after irradiation with red laser (660 nm, 10 and 50 J/cm²). Brunelli and coworkers [31] demonstrated that infrared laser (780 nm, 10 up to 50 J/cm²) increases MyoD expression in injured animals 7 days after irradiation. However, Mesquita-Ferrari and coworkers [1] did not observe any effect 24, 48, or 72 h after infrared laser irradiation (780 nm, 10 mW, 5 J/cm²) on MyoD expression in C2C12 cells. Pertille [32], using infrared laser (830 nm, 30 mW, 4 J/cm²), observed no changes in MyoD expression after 7 and 21 days in injured animals. Also, Silva [33] observed no changes in MyoD expression in injured animals 8 days after infrared laser irradiation (904 nm, 1.5 and 3 J, 5 mW).

Our results showed that infrared laser (808 nm, 10 J/cm², 100 mW) increases both MyoD (Fig. 1a, b) and Pax7 mRNA

expression (Fig. 2a, b), suggesting possibly that this dose is causing proliferation of satellite cells. Interestingly, there seems to be no difference whether the cell is in normal or stressful conditions because MyoD and Pax7 expression is increased in cells exposed to infrared laser in 10 % and 2 % FBS. Mesquita-Ferrari and coworkers [1] observed no changes in MyoD expression in C2C12 cells irradiated with 5 J/cm² after 24, 48, and 72 h. This may have occurred due to low-level laser therapy acting only at optimal doses, high doses being toxic and low doses being insufficient [34]. We suggest that laser in optimal conditions may be beneficial even for cells in normal conditions. Also, higher doses were not able to alter MyoD and Pax7 mRNA expression.

In human cells, TRF1 and TRF2 genes are located at chromosome ends and contribute to telomeric DNA protection and maintenance [35]. TRF1 and TRF2 recruit and coordinate non-shelterin enzymatic activities capable of processing unusual joint intermediates at telomeres [9]. TRF1 and TRF2 acts as a negative regulator of telomere length when overexpressed in mice and humans [15]. Telomere shortening is associated with aging in skeletal muscle [10]. Although the proliferative capacity and initial telomere length of satellite cells decrease during the first two decades of life due to increase in muscle mass, telomeres remain stable during adult stage [36]. Rehabilitation capacity is related to telomere length in injured muscle [11].

Our research shows that TRF2 mRNA expression is not altered at lowest laser fluences (10 and 35 J/cm²), suggesting

Fig. 2 Pax7 mRNA relative expression in myoblasts 2 h after exposure to low-level infrared laser in **a** 10 % and **b** 2 % fetal bovine serum. GAPDH was used as internal standard for normalization. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ when compared to respective control groups (non-irradiated)

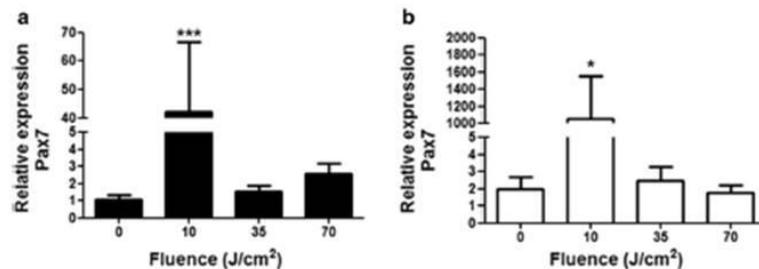
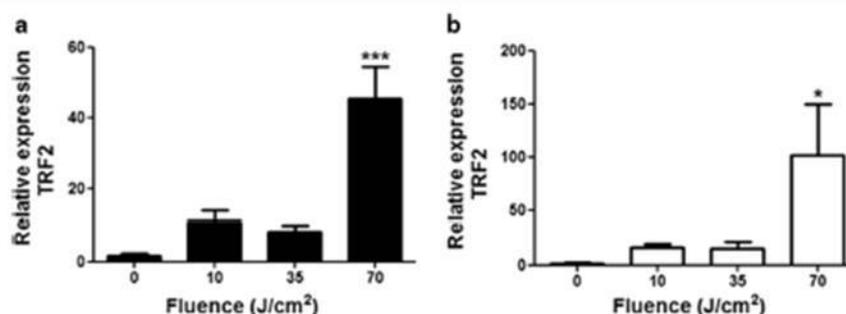


Fig. 3 TRF2 mRNA relative expression in myoblasts 2 h after exposure to low-level infrared laser in a 10 % and b 2 % fetal bovine serum. GAPDH was used as internal standard for normalization. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ when compared to respective control groups (non-irradiated)



that infrared laser does not induce telomere stability. However, at higher laser fluence (70 J/cm²), TRF2 mRNA is increased in both normal and reduced fetal bovine serum concentration (Fig. 3a, b). Effects of infrared laser radiation on telomere stability were confirmed by TRF1 mRNA expression evaluation. In fact, TRF1 mRNA in non-irradiated C2C12 cells is very low and, even after two amplification procedures performed by RT-PCR, no detectable transcripts were obtained (Fig. 4, lanes 1 and 5). However, TRF1 mRNA expression is obtained in C2C12 cells after all laser fluence exposures despite expression of this mRNA being slightly smaller in cells with reduced fetal bovine serum concentration (2 % FBS) (Fig. 4, lanes 6–8).

TRF1 and TRF2 protect against DNA damage response activation and telomere instability [9]. TRF1 and TRF2 appear to be key mediators of T-loop integrity and their disruption could lead to downstream DNA damage responses [37]. Loss of TRF2 activates the ATM kinase pathway, leading to p53 upregulation and a p21-mediated G1/S arrest, tumor suppressor p53 is also implicated in response to telomere shortening [38]. However, studies have reported that TRF1 and TRF2 upregulation have been associated with lung cancer [39] and renal cell carcinoma [40]. Conversely, these genes were found to be downregulated in malignant hematopoietic cells [41] and breast cancer [42]. In human cells, the TRF1 overexpression leads to telomere shortening and TRF2 overexpression in mice skin leads to defective nucleotide excision repair (NER), increased skin cancer, and premature aging [43]. In

skeletal muscle, transcriptional regulation of TRF1 and TRF2 could respond to pathological insults (diseases) rather than to physiological stimuli (exercises, for example) [44]. However, studies reported that chronic voluntary exercise negatively regulates TRF1 gene expression and this suggests that, in skeletal muscle, the telomere complex is uniquely regulated when compared to other tissues [45].

Conclusions

In summing up, low-level infrared laser modulates mRNA expression from genes related to muscle repair and telomere stabilization in myoblasts in standard or normal and stressful conditions.

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

References

- Mesquita-Ferrari RA, Alves AN, de Oliveira CV, Artibeiro PP, Bussadori SK, Rocha LA, Nunes FD, Fernandes KP (2015) Low-level laser irradiation modulates cell viability and creatine kinase activity in C2C12 muscle cells during the differentiation process. *Lasers Med Sci* 30:2209–2013. doi:10.1007/s10103-015-1715-8
- Buono R, Vantaggiato C, Pisa V, Azzoni E, Bassi MT, Brunelli S, Sciorati C, Clementi E (2012) Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP. *Stem cells* 30:197–209. doi:10.1002/stem.783
- Koopman R, Ly CH, Ryall JG (2014) A metabolic link to skeletal muscle wasting and regeneration. *Front Physiol* 5:32. doi:10.3389/fphys.2014.00032, eCollection 2014
- Hyatt JP, McCall GE, Kander EM, Zhong H, Roy RR, Huey KA (2008) PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve* 38:861–866. doi:10.1002/mus.21006
- Shi X, Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 20:1692–708
- Relaix F, Zammit PS (2012) Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 139:2845–2856. doi:10.1242/dev.069088

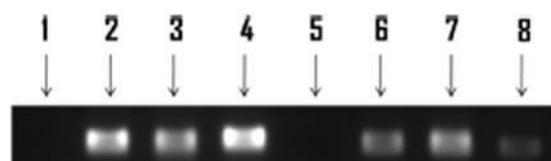


Fig. 4 Photograph of agarose gel after electrophoresis of TRF1 transcript amplification in myoblasts exposed to low-level infrared laser in 10 % and 2 % fetal bovine serum (FBS). 1: Control 10 % FBS; 2: 10 % FBS irradiated with 10 J/cm²; 3: 10 % FBS irradiated with 35 J/cm²; 4: 10 % FBS irradiated with 70 J/cm²; 5: control 2 %; 6: 2 % FBS irradiated with 10 J/cm²; 7: 2 % FBS irradiated with 35 J/cm²; 8: 2 % FBS irradiated with 70 J/cm²

7. Duijnsveld BJ, Bigot A, Beemakker KG, Portillo DM, Raz V, van der Heide HJ, Visser CP, Chaouch S, Mamchaoui K, Westendorp RG, Mouly V, Butler-Browne GS, Nelissen RG, Maier AB (2011) Regenerative potential of human muscle stem cells in chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 13:R207. doi:10.1186/ar3540
8. Mucciardi G, Galli A, Barresi V, Mucciardi M, Aguenouz M, Infrerra A, Magno C (2014) Telomere instability in papillary bladder urothelial carcinomas: comparison with grading and risk of recurrence. *Indian J Urol* 30:245–251. doi:10.4103/0970-1591.134241
9. Galati A, Micheli E, Alicata C, Ingegnere T, Cicconi A, Pusch MC, Giraud-Panis MJ, Gilson E, Cacchione S (2015) TRF1 and TRF2 binding to telomeres is modulated by nucleosomal organization. *Nucleic Acids Res* 43:5824–5837. doi:10.1093/nar/gkv507
10. Ponsot E, Echaniz-Laguna A, Delis AM, Kadi F (2012) Telomere length and regulatory proteins in human skeletal muscle with and without ongoing regenerative cycles. *Exp Physiol* 97:774–784. doi:10.1113/expphysiol.2011.063818
11. Collins M, Renault V, Grobler LA, St Clair Gibson A, Lambert M, Wayne Derman E, Butler-Browne GS, Noakes TD, Mouly V (2003) Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres. *Med Sci Sports Exerc* 35:1524–1528
12. Edwards DN, Orren DK, Machwe A (2014) Strand exchange of telomeric DNA catalyzed by the Werner syndrome protein (WRN) is specifically stimulated by TRF2. *Nucleic Acids Res* 42:7748–7761. doi:10.1093/nar/gku454
13. Saquilabon Cruz GM, Kong X, Silva BA, Khatibzadeh N, Thai R, Berns MW, Yokomori K (2015) Femtosecond near-infrared laser microirradiation reveals a crucial role for PARP signaling on factor assemblies at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res*
14. Blanco R, Muñoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA (2007) Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 21:206–220
15. Martínez P, Blasco MA (2010) Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell* 9:653–666. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00596.x
16. Fernandes KP, Alves AN, Nunes FD, Souza NH, Silva JA Jr, Bussadori SK, Ferrari RA (2013) Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci* 28:1043–1046. doi:10.1007/s10103-012-1233-x
17. Alves AN, Fernandes KP, Melo CA, Yamaguchi RY, França CM, Teixeira DF, Bussadori SK, Nunes FD, Mesquita-Ferrari RA (2014) Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci* 29:813–821. doi:10.1007/s10103-013-1428-9
18. Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, de Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA (2013) Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Med Sci* 28:947–955. doi:10.1007/s10103-012-1183-3
19. Rodrigues NC, Brunelli R, de Araújo HS, Parizotto NA, Renno AC (2013) Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. *J Photochem Photobiol B* 120:29–35. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.002
20. Luo L, Sun Z, Zhang L, Li X, Dong Y, Liu TC (2013) Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci* 28:725–734. doi:10.1007/s10103-012-1133-0
21. Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Cursi R, Luchetti F, Falcieri E (2004) C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morphofunctional characterization. *Eur J Histochem* 48:223–233
22. Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O (2002) Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* 115:1461–1469
23. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method Methods* 25:402–408
24. Alessandra da Silva Neto Trajano L, da Silva CI, de Carvalho SN, Cortez E, Mencialha AL, De Souza da Fonseca A, Stumbo AC (2016) Cell viability, reactive oxygen species, apoptosis, and necrosis in myoblast cultures exposed to low-level infrared laser. *Lasers in Medical Science*
25. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP (2004) Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 34:260–265
26. Walter C, Pabst AM, Ziebart T (2015) Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: an in vitro study. *Biomed Rep* 3:14–18
27. Wang Y, Zhang RP, Zhao YM, Li QQ, Yan XP, Liu JY, Gou H, Li L (2015) Effects of Pax3 and Pax7 expression on muscle mass in the Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*). *Genet Mol Res* 14:11495–11504. doi:10.4238/2015.September.28.1
28. Motohashi N, Asakura A (2014) Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol* 2:1. doi:10.3389/fcell.2014.00001
29. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR (2006) Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci* 119:1824–1832
30. Rodrigues NC, Assis L, Fernandes KR, Magri A, Ribeiro DA, Brunelli R, Abreu DC, Renno AC (2013) Effects of 660 nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. *J Rehabil Res Dev* 50:985–996. doi:10.1682/JRRD.2012.08.0147
31. Brunelli RM, Rodrigues NC, Ribeiro DA, Fernandes K, Magri A, Assis L, Parizotto NA, Cliquet A Jr, Renno AC, Abreu DC (2014) The effects of 780-nm low level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. *Lasers Med Sci* 29:91–96. doi:10.1007/s10103-013-1277-6
32. Perille A, Macedo AB, Oliveira CP (2012) Evaluation of muscle regeneration in aged animals after treatment with low-level laser therapy. *Rev Bras Fisioter* 16:495–501
33. Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, Liebano RE, Miyabara EH (2012) GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by cryotoxin. *Lasers Med Sci* 27:993–1000. doi:10.1007/s10103-011-1031-x
34. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR (2011) Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 9:602–618. doi:10.2203/dose-response.11-009.Hamblin
35. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20:1659–1668
36. Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, Butler-Browne GS (1997) Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 8:1429–1438
37. Pitman RT, Wajdyła L, Puri N (2013) Mechanism of DNA damage responses induced by exposure to an oligonucleotide homologous to the telomere overhang in melanoma. *Oncotarget* 4:761–771
38. de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19:2100–2110
39. Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E, Koering CE, Gilson E (2003) Expression of mRNAs for telomeric repeat binding factor (TRF)-1 and TRF2 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 9:1105–1111
40. Pal D, Sharma U, Singh SK, Kakkar N, Prasad R (2015) Over-expression of telomere binding factors (TRF1 & TRF2) in renal cell carcinoma and their inhibition by using siRNA induce apoptosis,

- reduce cell proliferation and migration in vitro. *PLoS One* 10: e0115651. doi:10.1371/journal.pone.0115651
41. Yamada K, Yagihashi A, Yamada M, Asanuma K, Moriai R, Kobayashi D, Taji N, Watanabe N (2002) Decreased gene expression for telomeric-repeat binding factors and TIN2 in malignant hematopoietic cells. *Anticancer Res* 22:1315–1320
42. Saito K, Yagihashi A, Nasu S, Izawa Y, Nakamura M, Kobayashi D, Taji N, Watanabe N (2002) Gene expression for suppressors of telomerase activity (telomeric-repeat binding factors) in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 93:253–258
43. Muñoz P, Blanco R, de Carcer G, Schoeffner S, Benetti R, Flores JM, Malumbres M, Blasco MA (2009) TRF1 controls telomere length and mitotic fidelity in epithelial homeostasis. *Mol Cell Biol* 29:1608–1625. doi:10.1128/MCB.01339-08
44. Laye MJ, Solomon TP, Karstoft K, Pedersen KK, Nielsen SD, Pedersen BK (2012) Increased shelterin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and skeletal muscle following an ultra-long-distance running event. *J Appl Physiol* (1985) 112:773–781. doi:10.1152/jappphysiol.00997.2011
45. Ludlow AT, Witkowski S, Marshall MR, Wang J, Lima CJ, Guth LM, Spangenburg EE, Roth SM (2012) Chronic exercise modifies age-related telomere dynamics in a tissue-specific fashion. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67:911–926. doi:10.1093/geron/ gls002

APÊNDICE D- Low-level infrared laser at different powers protects muscle injury against DNA damage (Estudo 4)

Lasers in Medical Science

Low-level infrared laser at different powers protects muscle injury against DNA damage
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	LIMS-D-16-00566R1	
Full Title:	Low-level infrared laser at different powers protects muscle injury against DNA damage	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	DNA; gene expression; laser; muscle; Wistar rats.	
Corresponding Author:	Adenilson Fonseca, Ph.D. Universidade do Estado do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade do Estado do Rio de Janeiro	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Larissa Alexsandra da Silva Neto Trajano Eduardo Tavares Lima Trajano Luiz Philippe da Silva Sergio Adilson Fonseca Teixeira Andre Luiz Mencialha Ana Carolina Stumbo Adenilson Fonseca, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FAPERJ	PHD Andre Luiz Mencialha Dr. Adenilson Fonseca
Abstract:	<p>Muscle injuries are the most prevalent type of injury in sports. A great number of athletes have relapsed in muscle injuries not being treated properly. Phobiomodulation (PBM) therapy is an inexpensive and safe technique with many benefits in muscle injury treatment. However, little has been explored about the infrared laser effects on DNA and telomeres in muscle injuries. Thus, the aim of this study was to evaluate PBM effects on mRNA relative levels from genes related to telomere and genomic stabilization in injured muscle. Wistar male rats were randomly divided into six groups: control, laser 25mW, laser 75mW, injury, injury laser 25mW and injury laser 75mW. PBM was performed with 904nm, 3J/cm² at 25mW or 75mW. Cryoinjury was induced by two applications of a metal probe cooled in liquid nitrogen directly on the tibialis anterior muscle. After euthanasia, skeletal muscle samples were withdrawn and total RNA extracted for evaluation of mRNA expression from genomic (ATM and p53) and chromosome stabilization (TRF1 and TRF2) genes by real time quantitative polymerization chain reaction. Data show that PBM reduces the mRNA expression from ATM and p53, as well reduces mRNA expression from TRF1 and TRF2 at 25mW and 75mW in injured skeletal muscle. In conclusion, PBM alters mRNA relative levels from genes related to genomic and telomere stabilization in injured skeletal muscle.</p>	

APÊNDICE E- Pulsed low-level infrared laser alters mRNA levels from muscle repair genes dependent on power output in *Wistar* rats (Estudo 5)

IOP Publishing | Astro Ltd

Laser Physics Letters

Laser Phys. Lett. 14 (2017) 105603 (6pp)

<https://doi.org/10.1088/1612-202X/aa829f>

Letter

Pulsed low-level infrared laser alters mRNA levels from muscle repair genes dependent on power output in *Wistar* rats

L A S N Trajano¹, E T L Trajano², A M C Thomé³, L P S Sergio³,
A L Mencalha³, A C Stumbo¹ and A S Fonseca^{3,4}

¹ Laboratório de Pesquisa em Células Tronco, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, 20551030, Brazil

² Laboratório de Biomorfologia e Patologia Experimental, Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas em Saúde, Universidade Severino Sombra, Avenida Expedicionário Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, Rio de Janeiro, 27700000, Brazil

³ Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro, 20551030, Brazil

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

E-mail: adnfonseca@yahoo.com.br

Received 1 June 2017

Accepted for publication 27 July 2017

Published 21 September 2017



CrossMark

Abstract

Satellite cells are present in skeletal muscle functioning in the repair and regeneration of muscle injury. Activation of these cells depends on the expression of myogenic factor 5 (Myf5), myogenic determination factor 1 (MyoD), myogenic regulatory factor 4 (MRF4), myogenin (MyoG), paired box transcription factors 3 (Pax3), and 7 (Pax7). Low-level laser irradiation accelerates the repair of muscle injuries. However, data from the expression of myogenic factors have been controversial. Furthermore, the effects of different laser beam powers on the repair of muscle injuries have been not evaluated. The aim of this study was to evaluate the effects of low-level infrared laser at different powers and in pulsed emission mode on the expression of myogenic regulatory factors and on Pax3 and Pax7 in injured skeletal muscle from *Wistar* rats. Animals that underwent cryoinjury were divided into three groups: injury, injury laser 25 mW, and injury laser 75 mW. Low-level infrared laser irradiation (904 nm, 3 J cm⁻², 5 kHz) was carried out at 25 and 75 mW. After euthanasia, skeletal muscle samples were withdrawn and the total RNA was extracted for the evaluation of mRNA levels from the MyoD, MyoG, MRF4, Myf5, Pax3, and Pax7 gene. Pax 7 mRNA levels did not alter, but Pax3 mRNA levels increased in the injured and laser-irradiated group at 25 mW. MyoD, MyoG, and MYf5 mRNA levels increased in the injured and laser-irradiated animals at both powers, and MRF4 mRNA levels decreased in the injured and laser-irradiated group at 75 mW. In conclusion, exposure to pulsed low-level infrared laser, by power-dependent effect, could accelerate the muscle repair process altering mRNA levels from paired box transcription factors and myogenic regulatory factors.

Keywords: laser therapy, muscle, myogenic factor, RT-qPCR, *Wistar* rats

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

1. Introduction

Muscle injuries can occur directly resulting from lacerations or contusions and indirectly through degenerative diseases [1]. Muscle injuries are the cause of 10% up to 55% of all injuries in sport [2]. Satellite cells are adult stem cells present in the skeletal muscle, whose function is to repair and regenerate damaged myofibers [3]. Satellite cells are in a quiescent state until activated by stimuli caused by muscle injury [4]. Quiescent and activated proliferative states of these cells can be differentiated by the expression of specific genes during the muscle injury [5].

Cell cycle and lineage specification of satellite cells are described and regulated by transcription factors, such as the paired box transcription factor 7 (Pax7) [6]. During skeletal muscle development, each muscle contains resident muscle cells, which can either differentiate into muscle fibers or remain as proliferating progenitors. These cells express Pax 3 and 7, which are essential for the myogenic potential and survival of the progenitor cells [7].

Upon injury, the Pax7 gene product induces the expression of myogenic regulatory factors (MRF) genes, as myogenic factor 5 (Myf5) and myogenic determination factor 1 (MyoD) [5, 6]. Also, satellite cells identify and regulate the function of other regulatory myogenic factors, as myogenin (MyoG) and myogenic regulatory factor 4 (MRF4) [8]. MyoG and MRF4 gene products promote the differentiation of satellite cells into myotubes [9].

letes, but also in non-athletes. Low-level laser therapy (LLLT) is a simple and noninvasive technique used for the treatment of pain, the inflammatory process, and tissue injuries [10, 11]. LLLT has beneficial effects on various cell and tissue types, such as fibroblasts [12, 13], osteoblasts [10], and epithelial cells [14]. Also, studies have shown the effects of LLLT on myoblast cultures [15–17] and muscle tissue [18–23].

However, although there are studies that evaluate the effects of low-level lasers on myoblast cultures and muscle tissue, there is no study evaluating the expression of all myogenic regulatory factors and paired box transcription factors related to muscle tissue repair after cryoinjury. Also, no study was carried out to evaluate the effect of different laser powers in pulsed emission mode on muscle tissue repair.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of low-level infrared laser at different powers and in pulsed emission mode on the expression of myogenic regulatory factors and on Pax3 and Pax7 in the injured skeletal muscle from *Wistar* rats. Laser wavelength, fluence, emission mode, and powers were those suggested in the laser device guide.

2. Materials and methods

2.1. Low-level laser

A therapeutic low-level infrared (904 nm) laser (FLUENCE, GaAs), purchased from HTM Indústria de Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda (São Paulo, Brazil), in pulsed wave emission mode (5 kHz) was used in this study.

2.2. Animals

Adult male *Wistar* rats (body weight 250–300 g and 3–4 months of age) were maintained in a controlled environment with six animals per cage, and normal light/dark cycle conditions (12 h light/12 h dark; lights on at 6:00 a.m.). The animals had free access to water and food and the ambient temperature was kept at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. Experiments were conducted in accordance with the Institutional Committee of Animal Care (Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro), protocol CEUA/024/2014.

2.3. Cryoinjury procedure

Cryoinjury was caused by the application of a frozen iron bar on tibialis anterior muscle of animals previously anesthetized with ketamine (80 mg kg^{-1}) and xylazine (10 mg kg^{-1}). Tibialis anterior muscle was surgically exposed and a cylindrical iron bar (3 mm diameter), frozen in liquid nitrogen, was placed on the muscle for 10 s. After a 30 s interval, the procedure was repeated and the skin was sutured, as described by Assis and co-workers [20].

2.4. Low-level infrared laser-irradiation procedure

Wistar male rats (3–4 months, 250–300 g, $n = 15$, 5 animals for each group) were randomly divided into three groups: (1) injury—injured and not irradiated; (2) injury 25 mW—injured and irradiated at 25 mW; (3) injury 75 mW—injured and irradiated at 75 mW. The muscles were irradiated by scanning immediately after injury and for the following three days and then euthanized on the 5th day after injury, totaling four irradiation procedures. The parameters used were indicated by the equipment and are described below: 25 mW (0.5 J, 904 nm, 3 J cm^{-2} , 0.36 W cm^{-2} , 38 s in the pulsed-wave emission mode and 6.9 mm^2 of beam spot) and 75 mW (0.5 J, 904 nm, 3 J cm^{-2} , 1.10 W cm^{-2} , 13 s in the pulsed emission mode and 6.9 mm^2 of beam spot).

2.5. Total RNA extraction

On the 5th day after injury, tissue samples from tibialis anterior muscle were withdrawn, TRIzol[®] reagent was added and samples were crushed in microcentrifuge flex tubes, centrifuged (1500 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 min). Supernatants were transferred to other tubes, chloroform was added, the mixtures were centrifuged (12000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min), the aqueous phases were transferred to other tubes, and isopropanol was added. After incubation (room temperature, 15 min), the mixtures were centrifuged (12000 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min), the supernatants were discarded, and the precipitate was washed with ethanol-DEPC (80% ethanol, DEPC 0.1%) solution and centrifuged. Supernatants were withdrawn and the total RNA was reconstituted in water-DEPC (0.1%) solution and stored ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.6. Complementary DNA synthesis

RNA concentration and purity were determined on a spectrophotometer by calculating the optical density ratio at a 260/280 nm wavelength ratio. Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out using a two-step cDNA synthesis kit (Promega, USA). Four micrograms of RNA were reverse-transcribed into cDNA using GoScript™ reverse transcriptase (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol, using a 20 μ l total reaction. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using 5 μ l of GoTaq qPCR Master Mix (Promega) for a 10 μ l final volume containing 50 ng of cDNA. For determination of the initial relative quantity of cDNA, samples were amplified with paired box transcription factor 3 and 7 (Pax3 and Pax7), myogenic factor 5 (Myf5), myogenic determination factor 1 (MyoD), myogenin (MyoG), myogenic regulatory factor 4 (MRF4), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers. Reactions were run on an Applied Biosystems 7500 RT-qPCR machine (Applied Biosystems, USA). The mixtures were initially denatured at 94 °C for 10 min. The PCR consisted of 40 cycles under the following conditions: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and an extension period at 72 °C for 30 s. Melt curve analyses were performed for all genes, and the specificity, as well as integrity, of the PCR products were confirmed by the presence of a single peak. Relative expression was normalized by levels of the reference gene (GAPDH). Duplicate cycle threshold (CT) values were analyzed in Microsoft Excel (Microsoft) using the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method [24].

2.7. Statistical analysis

Data were reported as mean \pm standard deviation. The one-way analysis of variance test was performed to verify possible statistical differences followed by the Tukey post-test. The Kolmogorov–Smirnov test was performed to verify the normality distribution of the data. $p < 0.05$ was considered as the less significant level. InStat Graphpad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Effects of low-level infrared laser exposure on MyoD and Myogenin mRNA levels

Figure 1 shows the mRNA relative expression from the MyoD gene in injured tibialis anterior muscle from *Wistar* rats after exposure to low-level infrared laser. MyoD mRNA relative expression in muscle from the injury group irradiated with lasers at 25 and at 75 mW was significantly increased ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) when compared to that from the injury group.

mRNA relative expression from the MyoG gene was also evaluated in injured tibialis anterior muscle (figure 2). A significant ($p < 0.01$) increase of MyoG mRNA relative

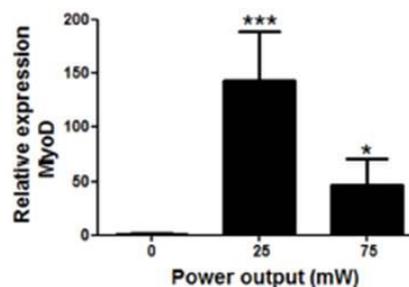


Figure 1. MyoD mRNA relative expression in muscle injury after exposure to low-level infrared laser at different powers. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (***) $p < 0.001$ injury group 25 mW when compared with the injury group. (*) $p < 0.05$ injury group 75 mW when compared with the injury group. Black columns represent injured and irradiated groups. White columns represent injured groups not irradiated.

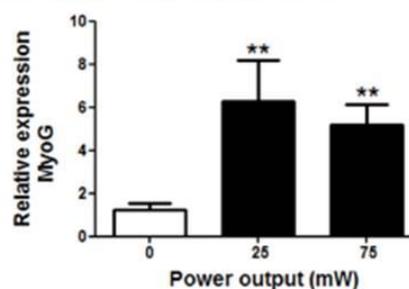


Figure 2. MyoG mRNA relative expression in muscle injury after exposure to low-level infrared laser at different powers. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (**) $p < 0.01$ injury group 25 mW when compared with the injury group. (**) $p < 0.01$ injury group 75 mW when compared with the injury group. Black columns represent injured and irradiated groups. White columns represent injured groups not irradiated.

expression was obtained in tibialis anterior muscle from both injury groups irradiated with laser at 25 and at 75 mW when compared with that from the injury group.

3.2. Effects of low-level infrared laser exposure on Myf5 and MRF4 mRNA levels

Figure 3 shows the mRNA relative expression from the Myf5 gene in injured tibialis anterior muscle from *Wistar* rats after exposure to low-level infrared laser. Data in this figure indicate significant ($p < 0.05$) increase of Myf5 mRNA expression in injured muscle irradiated with laser at 75 mW when compared with that from the injury group and the injured group irradiated with laser at 25 mW.

MRF4 mRNA relative expression after exposure to low-level infrared laser in injured tibialis anterior muscle was significantly ($p < 0.05$) reduced only in the injury group irradiated with laser at 75 mW when compared with the injury group (figure 4).

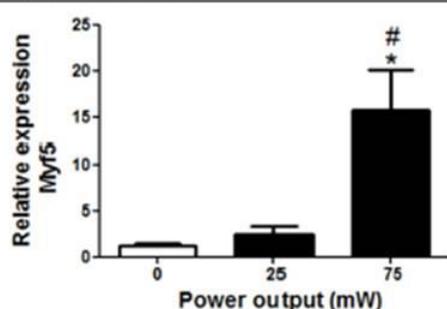


Figure 3. Myf5 mRNA relative expression in muscle injury after exposure to low-level infrared laser at different powers. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (*) $p < 0.05$ injury group 75 mW when compared with the injury group. (#) $p < 0.05$ injury group 75 mW when compared with the injury group 25 mW. Black columns represent the injured and irradiated groups. White columns represent the injured groups not irradiated.

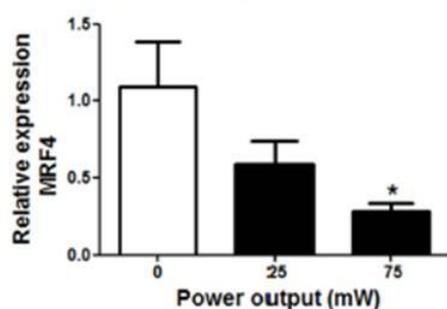


Figure 4. MRF4 mRNA relative expression in muscle injury after exposure to low-level infrared laser at different powers. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (*) $p < 0.05$ injury group 75 mW when compared with the injury group. Black columns represent the injured and irradiated groups. White columns represent the injured groups not irradiated.

3.3. Effects of low-level infrared laser exposure on Pax3 and Pax7 mRNA levels

mRNA relative expression from the Pax3 gene after exposure to low-level infrared laser in injured tibialis anterior muscle increased significantly in the injury group irradiated with laser at 25 mW ($p < 0.05$ and $p < 0.05$) when compared with the injury group and injury group irradiated with laser at 75 mW (figure 5).

Data from the Pax7 mRNA relative expression did not show significant difference ($p > 0.05$) between the injury group irradiated with laser at 25 and at 75 mW and the injury group (figure 6).

4. Discussion

LLLT has positive effects on muscle tissue and muscle repair, because it reduces pain [25], modulates the inflammatory process [26–28], increases the formation of new myofibrils [29], causes angiogenesis [29, 30], increases the number of cells, and activates satellite cells [29].

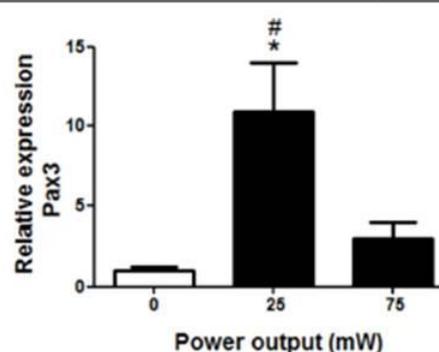


Figure 5. Pax3 mRNA relative expression in muscle injury after exposure to low-level infrared laser at different powers. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (*) $p < 0.05$ injury group 25 mW when compared with the injury group. (#) $p < 0.05$ injury group 25 mW when compared with the injury group 75 mW. Black columns represent the injured and irradiated groups. White columns represent the injured groups not irradiated.

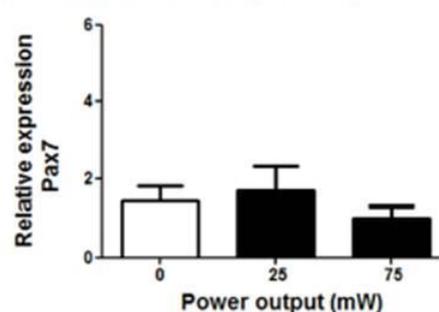


Figure 6. Pax7 mRNA relative expression in muscle injury after exposure to low-level infrared laser at different powers. GAPDH was used as the internal standard for normalization. No difference was observed. Black columns represent the injured and irradiated groups. White columns represent the injured groups not irradiated.

Satellite cell activation depends on the expression of myogenic regulatory factors and paired box transcription factor [31]. The expression of the myogenic regulatory factors is regulated by Pax3 and Pax7 and both bind and regulate the expression of MyoD and Myf5 [32]. While MyoD and Myf5 are considered factors involved in the determination of myogenic cells, MyoG and MRF4 are more closely associated with the terminal differentiation and homeostasis of myofibers [33].

However, the expression of these genes has not been evaluated together and the results have been controversial due to differences in laser irradiation conditions. Moreover, the effects of lasers at different powers and in pulsed-wave emission mode have not been evaluated yet, making unclear the effects of low-level lasers on the expression of these genes during the muscle repair process. Thus, this study evaluated the muscle repair pathway after muscle injury by cryolesion using therapeutic protocols indicated in the laser device guide at different powers and in pulsed-wave emission mode to verify whether LLLT alters mRNA levels from genes related to muscle injury.

In a normal muscle state, the satellite cells are in the quiescent state [34], but after injury, these cells are activated by the expression of Pax 7 and Myf5. When the migration and differentiation stage begins, Pax7 is not expressed and MyoD is expressed, while Myf5 expression is retained [35]. Our results show that LLLT alters the mRNA levels from the MyoD gene in injured tibialis anterior muscle irradiated with laser at both 25 and 75 mW, but does not alter the mRNA levels from the Pax7 gene. During muscle regeneration, satellite cells can be distinguished based on Pax7 and MyoD protein expression [36]. Pax7(+)/MyoD(-) cells are in the quiescent state, Pax7(+)/MyoD(+) cells are in the proliferating state, and Pax7(-)/MyoD(+) cells are undergoing myogenic differentiation, followed by cell fusion to generate multinucleated myofibers [37]. Our results suggest that, 5 d after muscle injury, the satellite cells are in a state of fusion into myotube for both laser irradiated groups. These results agree with those from Assis and co-workers [20], who showed that exposure to low-level infrared laser (808 nm) alters the MyoD expression after cryolesion at a fluence of 180 J cm^{-2} . Brunelli and co-workers [22] observed that animals exposed to infrared laser (780 nm), at 10 and 50 J cm^{-2} , have immunomarkers of MyoD at greater concentrations 7 d after cryolesion. Another study using red laser (660 nm) showed an increase of the MyoD expression after laser irradiation at 50 J cm^{-2} [21]. More recently, Alves and co-workers [38] reported that in animals injured and exposed to infrared laser (780 nm, 10 J cm^{-2}) presented increased MyoD expression. Also, the mRNA levels from the Pax7 gene are increased in C2C12 cells after exposure to low-level infrared laser at 10 J cm^{-2} [39].

The proliferation myoblast is characterized by the expression of Myf5/MyoD and genes that regulate cell-cycle progression, while the satellite cell marker Pax7 gene expression is progressively silenced [40]. However, MyoD and Myf5 are still expressed after proliferation [34]. Our results show an increase of Myf5 in injured and laser-irradiated tibialis anterior muscle at a power of 75 mW. Similar results were reported by Moraes and co-workers [41], who observed increased Myf5 expression in injured muscle exposed to red laser (660 nm, 14.7 J cm^{-2} , 35 mW). Our results suggest that the effects of the laser on muscle repair depends on the power, because the expression of Myf5 in the irradiated and injured animals with laser at 25 mW is reduced to the levels of those in injured, indicating that this laser induces early maturation in myofibers.

MyoG and MRF4 are related to the terminal differentiation and homeostasis of myofibers [33]. Our results showed an increase of mRNA levels from the MyoG gene in injured and irradiated animals with lasers at both powers (25 and 75 mW) and a reduction of mRNA levels from the MRF4 gene only in animals irradiated with laser at the higher power (75 mW). Laser effects on the mRNA levels from the MyoG gene have been controversial, with some studies showing both an increase [20, 22] and decrease [21, 42] of the MyoG expression after laser irradiation, while other authors reported no change [38, 41]. There are no studies evaluating the laser effects on the mRNA levels from the MRF4 gene. Our results suggest that the maturation stage initiates faster in tibialis

anterior muscle injured and irradiated with laser at 25 mW than those irradiated with laser at 75 mW, which confirms the results of the mRNA levels from the Myf5 gene (figure 3).

Pax3 plays a key role during skeletal myogenesis in embryos [43]. During the adult phase, this gene is expressed only in some mammalian muscles, such as those of the diaphragm [44]. Interestingly, the mRNA levels from the Pax3 gene increase in tibialis anterior muscle after injury and irradiation with laser at 25 mW (figure 5). Hyatt and co-workers [45] showed that the mRNA levels from the Pax3 and Pax7 genes rapidly increase in response to overload in adult rat skeletal muscle and that this increase precedes any change in the mRNA levels from the MyoD expression gene, indicating that Pax3 and Pax7 coordinate the expression of MRFs. The expression of Pax3 changes only in certain types of muscle tissue in adult phase. In this study, the expression of Pax3 increased only in the group where there was acceleration in the muscle repair process. We suggest that the increase in the Pax3 expression may have modulated MRFs in the 25 mW group, contributing to a better repair process in this group.

5. Conclusion

Exposure to pulsed low-level infrared laser, by power-dependent effect, could accelerate the muscle repair process altering the mRNA levels from paired box transcription factors and myogenic regulatory factors.

Acknowledgments

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

References

- [1] Souza J D and Gottfried C 2013 *J. Electromyogr. Kinesiol.* **23** 1253
- [2] Laumonier T and Menetrey J 2016 *J. Exp. Orthop.* **3** 15
- [3] Li Y and Diworth F J 2016 *Cell Stem Cell* **18** 162
- [4] Qahar M, Takuma Y, Mizunoya W, Tatsumi R, Ikeuchi Y and Nakamura M 2016 *FEBS Open Bio.* **6** 529
- [5] Fujimaki S, Machida M, Wakabayashi T, Asashima M, Takemasa T and Kuwabara T 2016 *Stem Cells Int.* **2016** 7619418
- [6] Farup J, De Lisio M, Rahbek S K, Bjerre J, Vendelbo M H, Boppart M D and Vissing K 2015 *J. Appl. Physiol.* **119** 1053
- [7] Lagha M, Kormish J D, Rocancourt D, Manceau M, Epstein J A, Zaret K S and Relaix F 2008 *Genes Dev.* **22** 1828
- [8] Harding R L, Halevy O, Yahav S and Velleman S G 2016 *Physiol. Rep.* **4** e12770
- [9] Pertille A, Moura K F, Matsumura C Y, Ferretti R, Ramos D M, Petri A C, Oliveira P C and Silva C A 2016 *Braz. J. Biol.* **77** 83
- [10] Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M and Renò F 2016 *Lasers Med. Sci.* **29** 1463
- [11] Martignago C C, Oliveira R F, Pires-Oliveira D A, Oliveira P D, Pacheco Soares C, Monzani P S and Poli-Frederico R C 2015 *Lasers Med. Sci.* **30** 203

- [12] Hawkins D H and Abrahamse H 2006 *Lasers Surg. Med.* **38** 74
- [13] Chen A C, Arany P R, Huang Y Y, Tomkinson E M, Sharma S K, Kharkwal G B, Saleem T, Mooney D and Yull F E 2011 *PLoS One* **6** e22453
- [14] Eduardo F P, Mehnert D U, Monezi T A, Zezell D M, Schubert M M, Eduardo C P and Marques M M 2007 *Lasers Surg. Med.* **39** 365
- [15] Ferreira M P, Ferrari R A, Gravalos E D, Martins M D, Bussadori S K, Gonzalez D A and Fernandes K P 2009 *Photomed. Laser Surg.* **27** 901
- [16] Mesquita-Ferrari R A, Ribeiro R, Souza N H, Silva C A, Martins M D, Bussadori S K and Fernandes K P 2011 *Indian J. Exp. Biol.* **49** 423
- [17] Mesquita-Ferrari R A, Alves N A, de Oliveira Cardoso V, Artibeiro P P, Bussadori S K, Rocha L A, Nunes F D and Fernandes K P 2015 *Lasers Med. Sci.* **30** 2209
- [18] Pertille A, Macedo A B and Oliveira C P 2012 *Rev. Bras. Fisioter.* **16** 495
- [19] Silva L H, Silva M T, Gutierrez R M, Conte T C, Toledo C A, Aoki M S, Liebano R E and Miyabara E H 2012 *Lasers Med. Sci.* **27** 993
- [20] Assis L, Moretti A L, Abrahão T B, de Souza H P, Hamblin M R and Parizotto N A 2013 *Lasers Med. Sci.* **28** 947
- [21] Rodrigues N C, Brunelli R, de Araújo H S, Parizotto N A and Renno A C 2013 *J. Photochem. Photobiol. B* **120** 29
- [22] Brunelli R M, Rodrigues N C, Ribeiro D A, Fernandes K, Magri A, Assis L, Parizotto N A, Cliquet A, Renno A C and Abreu A D 2014 *Lasers Med. Sci.* **29** 91
- [23] Ribeiro B G, Alves A N, Dos Santos L A, Cantero T M, Fernandes K P, Dias Dda S, Bernardes N, de Angelis K and Mesquita-Ferrari R A 2016 *PLoS One* **15** e0153618
- [24] Livak K J and Schmittgen T D 2001 *Methods* **25** 402
- [25] Taheri P, Vahdatpour B and Andalib S 2016 *Adv. Biomed. Res.* **5** 138
- [26] Silveira P C, Dda Scheffer L, Glaser V, Remor A P, Pinho R A, Aguiar Junior A S and Latini A 2016 *Free Radic. Res.* **50** 503
- [27] Carvalho A F, Sousa P F, Feitosa M C, Coelho N P, Barros E M, Feitosa V C and Arisawa E A 2015 *Acta Cir. Bras.* **30** 806
- [28] Mantineo M, Pinheiro J P and Morgado A M 2014 *J. Biomed. Opt.* **19** 98002
- [29] Nacano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M and Yoshimura T 2009 *Exp. Physiol.* **94** 1005
- [30] Iyomasa D M, Garavelo I, Iyomasa M M, Watanabe I S and Issa J P 2009 *Micron* **40** 413
- [31] Segalés J, Perdiguciro E and Muñoz-Cánoves P 2016 *Front. Cell Dev. Biol.* **4** 91
- [32] Wang Y X and Rudnicki M A 2011 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13** 127
- [33] Singh K and Dilworth F J 2013 *FEBS J.* **280** 3991
- [34] Perry R L and Rudnick M A 2000 *Front. Biosci.* **5** 750
- [35] Zancou N and Gailly P 2013 *Cell Mol. Life Sci.* **70** 4117
- [36] Beaudry M, Hidalgo M, Launay T, Bello V and Darribère T 2016 *J. Cell Sci.* **129** 2887
- [37] Motohashi N and Asakura A 2014 *Front. Cell Dev. Biol.* **2** 1
- [38] Alves A N, Ribeiro B G, Fernandes K P, Souza N H, Rocha L A, Nunes F D, Bussadori S K and Mesquita-Ferrari R A 2016 *Lasers Med. Sci.* **31** 679
- [39] da Silva Neto Trajano L A, Stumbo A C, da Silva C L, Mencialha A L and Fonseca A S 2016 *Lasers Med. Sci.* **31** 1161
- [40] Dilworth F J and Blais A 2011 *Stem. Cell Res. Ther.* **19** 18
- [41] Morais S R et al 2017 *Lasers Med. Sci.* **32** 317
- [42] de Freitas C E, Bertaglia R S, Vechetti Júnior I J, Mareco E A, Salomão R A, de Paula T G, Nai G A, Carvalho R F, Pacagnelli F L and Dal-Pai-Silva M 2015 *Photochem. Photobiol.* **91** 957
- [43] Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A and Buckingham M 2006 *J. Cell Biol.* **172** 91
- [44] Buckingham M and Relaix F 2015 *Semin. Cell Dev. Biol.* **44** 115
- [45] Hyatt J P, McCall G E, Kander E M, Zhong H, Roy R R and Huey K A 2008 *Muscle Nerve* **38** 861

APÊNDICE F- Low Power Lasers on Genomic Stability (artigo de revisão)

Manuscript Details

Manuscript number	JPHOTOBIOLOG_2017_1163
Title	Low Power Lasers on Genomic Stability
Article type	Short review

Abstract

Exposure of cells to genotoxic agents cause modifications in DNA, resulting in alterations in the genome. To reduce genomic instability, cells have DNA damage responses in which DNA repair proteins remove these lesions. Excessive free radicals cause DNA damages, which are repaired by base excision repair and nucleotide excision repair pathways. When non-oxidative lesions occur, genomic stability is maintained through checkpoints in which the cell cycle stops and DNA repair occurs. Telomere shortening is related to the development of various diseases, such as cancer. Low power lasers are used for treatment of a number of diseases, but also they are suggested to cause DNA damages at sub-lethal levels and alter transcript levels from DNA repair genes. This review focuses on genomic and telomere stabilization modulation as possible targets to improve therapeutic protocols based on low power lasers. Several studies have been carried out to evaluate the laser-induced effects on genome and telomere stabilization suggesting that exposure to these lasers modulates DNA repair mechanisms, telomere maintenance and genomic stabilization. Although the mechanisms are not well understood yet, low power lasers could be effective against DNA harmful agents by induction of DNA repair mechanisms and modulation of telomere maintenance and genomic stability.

Keywords	Base excision repair, Genomic stability, Low power laser, Nucleotide excision repair, Telomere.
Corresponding Author	Adenilson Fonseca
Corresponding Author's Institution	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Order of Authors	Larissa Trajano, Luiz Philippe Sergio, Ana Carolina Stumbo, ANDRE MENCALHA, Adenilson Fonseca
Suggested reviewers	Lucia Formigli, Beatriz Modenutti, Hsin-Su Yu, Khageswar Sahu, Mohamed El Batanouny

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

COVER LETTER.doc [Cover Letter]

Highlights.doc [Highlights]

Low Power Lasers on Genomic Stability.doc [Manuscript File]

FIGURE 1.JPG [Figure]

FIGURE 2.JPG [Figure]

FIGURE 3.JPG [Figure]

FIGURE 4.JPG [Figure]

FIGURE 5.JPG [Figure]

FIGURE 6.JPG [Figure]

FIGURE 7.JPG [Figure]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

APÊNDICE G- Genomic stability and telomere regulation in skeletal muscle tissue (artigo de revisão)

Elsevier Editorial System(tm) for Life
Sciences
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Genomic stability and telomere regulation in skeletal muscle tissue

Article Type: Review article

Keywords: DNA repair; free radicals; genome; skeletal muscle; telomere

Corresponding Author: Dr. Adenilson Souza Fonseca, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

First Author: Larissa Alexsandra S Trajano, MSc

Order of Authors: Larissa Alexsandra S Trajano, MSc; Eduardo T Trajano, PhD; Marco Aurélio S Silva, PhD; Ana Carolina Stumbo, PhD; Andre Luiz Mencialha, PhD; Adenilson Souza Fonseca, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Muscle injuries are common, especially in sports and cumulative trauma disorder, and their repair is influenced by the formation of free radicals, which cause damages in lipids, proteins and DNA. Oxidative DNA damages are repaired by base excision repair and the nucleotides excision repair, ensuring the telomeric and genomic stability. There are few studies on this topic in skeletal muscle cells. This review focuses on base excision repair and nucleotide excision repair, telomere regulation and how telomeric stabilization influences in healthy muscle, injured muscle, exercise and its relationship with aging. In skeletal muscle, genomic stabilization and telomere regulation seem to play an important role in tissue health, influencing muscle injury repair. Thus, therapies targeting mechanisms of DNA repair and telomeric regulation could be new approaches for improving repair and prevention of skeletal muscle injuries in young and old people.

Suggested Reviewers: Stephane Walrand PhD
Unité de Nutrition Humaine, Clermont Université
Stephane.Walrand@clermont.inra.fr
Expertise on aging.

Harry Steeg PhD
Laboratory for Health Protection Research, National Institute for Public Health and the Environment
harry.van@rivm.nl
Expertise on DNA repair.

Mario Marotta PhD
Leitat Foundation, Leitat Technological Center
mmarotta@leitat.org
Expertise on muscle healing.