



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Programa de Pós-Graduação em Biociências

Keila da Silva Canuto

Avaliação dos efeitos de *lasers* de baixa potência nos níveis de mRNAs de genes desacopladores e de microRNAs

Rio de Janeiro

2017

Keila da Silva Canuto

**Avaliação dos efeitos de *lasers* de baixa potência nos níveis de mRNAs de genes
desacopladores de proteínas e de microRNAs**

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

Orientador: Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca

Rio de Janeiro

2017

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

C235 Canuto, Keila da Silva.
Avaliação dos efeitos de *lasers* de baixa potência nos níveis de mRNAs de genes desacopladores de proteínas e de microRNAs / Keila da Silva Canuto. – 2017.
66 f.

Orientador: Adenilson de Souza da Fonseca

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Terapia a laser de baixa intensidade – Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Neoplasias da mama. 4. Proteínas de Desacoplamento Mitocondrial. I. Fonseca, Adenilson de Souza da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.314

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Keila da Silva Canuto

**Avaliação dos efeitos de *lasers* de baixa potência nos níveis de mRNAs de genes
desacopladores de proteínas e de microRNAs**

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

Aprovada em 15 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

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

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

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

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, marido e irmã que me acompanham desde o início da minha jornada. Aos queridos amigos pelos momentos de companheirismo e descontração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a vida, proteção e sabedoria e coragem para que eu conseguisse realizar minha pós-graduação durante todos esses anos.

Aos meus pais, Israel Soares Canuto e Cleide Canuto que tanto me apoiaram. A minha irmã, Lais da Silva Canuto pelo companheirismo, a meu marido Marcelo Passos Nogueira pela força, carinho e apoio todos os dias.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, em especial Luiz Philipe Sérgio pela companhia no trajeto durante todo esse período, Juliana Rodrigues, Ísis Salviano e Adilson que tanto somaram ao meu conhecimento, e contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Professor Doutor Adenilson de Souza da Fonseca por aceitar a me orientar durante essa etapa, pela proposta de trabalho, por me incentivar a crescer profissionalmente e incentivar a continuação da carreira científica e acadêmica. Também agradeço ao Professor Doutor Andre Luiz Mencialha por sempre estar disposto a ajudar e acrescentar ao conhecimento científico.

Ao Professor Eduardo Matos Nogueira pela colaboração, ensinamentos e por disponibilizar seu laboratório de Biologia Molecular na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro para a realização de parte dos experimentos para a construção da minha dissertação.

Finalmente, agradeço o suporte da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Quanto mais você ler,
mais irá aprender.
Quanto mais você aprender,
mais lugares diferentes irá visitar.

Dr. Seuss

RESUMO

CANUTO, Keila da Silva. **Avaliação dos efeitos de *lasers* de baixa potência nos níveis de mRNAs de genes desacopladores de proteínas e de microRNAs.** 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

Lasers de baixa potência são utilizados diariamente por profissionais da área da saúde para diversos fins. Comprimento de onda, frequência, fluências e modo de emissão são determinantes para as respostas fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas dos *lasers* de baixa potência. Sugere-se, contudo, que *lasers* de baixa potência aumentam a produção de radicais livres, que podem reagir com biomoléculas importantes, como o DNA. Também, tem sido sugerido que radicais livres atuam como segundo mensageiros na sinalização intracelular nas respostas biológicas. Células sob estresse apresentam mecanismos de defesa contra essas espécies químicas para evitar efeitos não desejáveis. As proteínas desacopladoras (UCPs) fazem parte desses mecanismos de proteção, minimizando os efeitos dos radicais livres nas mitocôndrias. Contudo, os níveis relativos dessas proteínas podem ser alterados em níveis pós-transcricionais ou pós-traducionais. Os microRNAs são mediadores pós-transcricionais que podem atuar na regulação gênica. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar os níveis relativos de UCP2 e UCP3 na pele e no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar*, bem como os de UCP2 e mir-15a e mir-106b em culturas de células de câncer de mama expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em diferentes fluências. Foi realizada a extração de RNA de tecidos e células, a síntese de cDNA e primeira fita de RNA para a realização da RT-qPCR, respectivamente, dos genes das proteínas desacopladoras e microRNAs. Dados nesse estudo sugerem que os níveis relativos de mRNA de UCP2 e UCP3 são diferentemente alterados na pele e no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar* expostos aos *lasers* de baixa potência. Tal alteração é dependente do comprimento de onda e também da fluência, sugerindo um efeito de bioestimulação que levaria a resistência das células expostas aos *lasers*. No entanto, em culturas de células de câncer de mama humana expostas aos *lasers* de baixa potência, os níveis relativos do mir-15a e do mir-106b que não se alteraram, mas os de mRNA da UCP2 aumentaram.

Palavras-chave: microRNA. Proteína Desacopladora. Ratos *Wistar*. Câncer de mama.

ABSTRACT

CANUTO, Keila da Silva. **Evaluation of low-level *lasers* in uncoupling proteins mRNA levels and microRNAs.** 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2017.

Low power *lasers* are used daily by professionals in healthy field. Wavelength, frequency, fluence and mode of emission are determinant to low power *lasers* photochemistry, photophysical and photobiological responses. However, these *lasers* may increase the production of free radicals, which could interact with important biomolecules, such as DNA. It has been suggested that free radicals are involved in biological responses acting as second messengers in intracellular signaling processes. Stressed cells present mechanisms of defense against these chemical species to avoid unwanted effects. Uncoupling Proteins (UCPs) are part of protective mechanism to minimize effects of free radical generation in mitochondria. The relative level of these proteins could be altered in post-transcriptional or post-translational levels. The microRNAs are mediators of post-transcriptional gene relative level. So, this work aimed to evaluate relative levels of UCP2 and UCP3 mRNAs in skin and skeletal muscle in *Wistar* rats, and evaluate UCP2 mRNA and mir-15a and mir-106b in MDA-MB-231 cells exposed to red and infrared low level *lasers* in different fluences. Cells' RNA was withdrawn and cDNA synthesis and miRNA first strand was performed to perform RT-qPCR of UCP2 and UCP3 mRNA and miRNAs. Data in this study suggest that UCP2 and UCP3 mRNA are not equally altered in both skin and skeletal muscle in *Wistar* rats exposed to low power *lasers*. This alteration is wavelength and fluence-dependent, suggesting a bioestimulation effect that could make cells more resistant to *lasers* exposure. However, breast cells exposed to low power *lasers*, mir-15a and mir-106b that had no alteration, however, relative levels of UCP2 mRNA increased.

Keywords: microRNA. Uncoupling Protein. *Wistar* rats. Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação ilustrativa do espectro eletromagnético.....	18
Figura 2 –	Esquema representativo dos processos de absorção, emissão espontânea e emissão estimulada	20
Figura 3 –	Esquema representativo da constituição do equipamento <i>laser</i>	21
Figura 4 –	Esquemático representativo das interações da luz <i>laser</i> com o tecido	24
Figura 5 –	Esquema representativo da Fosforilação oxidativa e desacoplamento	27
Figura 6 –	Esquema representativo da biogênese dos miRNAs	31
Figura 7 –	Esquema representativo da regulação pós transcricional	32
Figura 8 –	Níveis relativos de mRNA de UCP2 em pele de ratos <i>Wistar</i> após a exposição ao <i>laser</i> de baixa potência em diferentes fluências	42
Figura 9 –	Níveis relativos de mRNA de UCP3 em pele de ratos <i>Wistar</i> após a exposição ao <i>laser</i> de baixa potência em diferentes fluências	43
Figura 10 –	Níveis relativos de mRNA de UCP2 em tecido muscular esquelético de ratos <i>Wistar</i> após a exposição ao <i>laser</i> de baixa potência em diferentes fluências	44
Figura 11 –	Níveis relativos de mRNA de UCP3 em tecido muscular esquelético de ratos <i>Wistar</i> após a exposição ao <i>laser</i> de baixa potência em diferentes fluências	45
Figura 12 –	Níveis relativos de mir-106b em células MDA-MB-231 após a exposição ao <i>laser</i> vermelho de baixa potência em diferentes fluências	46
Figura 13 –	Níveis relativos de mir-15a em células MDA-MB-231 após a exposição ao <i>laser</i> vermelho de baixa potência em diferentes fluências	46
Figura 14 –	Níveis relativos de mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231 após a exposição ao <i>laser</i> vermelho de baixa potência em diferentes fluências	47
Figura 15 –	Níveis relativos de mir-106b em células MDA-MB-231 após a exposição ao <i>laser</i> infravermelho de baixa potência em diferentes fluências	48
Figura 16 –	Níveis relativos de mir-15a em células MDA-MB-231 após a exposição ao <i>laser</i> infravermelho de baixa potência em diferentes fluências	48
Figura 17 –	Níveis relativos de mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231 após a exposição ao <i>laser</i> infravermelho de baixa potência em diferentes fluências .	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	<i>Actin Beta</i> (Beta Actina)
AGO	<i>Argonaute</i>
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
DEPC	diethylpyrocarbonate
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DROSHA	<i>Drosha ribonuclease III</i>
EXP5	<i>Exportin 5</i> (Exportina 5)
FADH	<i>flavin adenine dinucleotide</i> (flavina-adenina dinucleótido)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
GDP	guanosina-difosfato
GUSB	<i>Glucuronidase beta</i> (Beta Glucoronidase)
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
Lin-4	<i>Lineage deficiente-4</i>
Lin-14	<i>Lineage deficiente-14</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i> (RNA longo não codificante)
Maser	<i>Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação)
miRNA	microRNA
ncRNA	<i>non-coding RNA</i> (RNA não codificante)
RNA _m	<i>Messenger RNA</i> (Ácido ribonucleico mensageiro)
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (Dinucleótido de nicotinamida e adenina)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
piRNA	<i>piwi-interacting RNA</i>
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase por Transcrição reversa)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
siRNA	<i>Short interfering RNA</i> (RNA pequeno de interferência)
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> (pequeno RNA nuclear)
TFRC	<i>Transferrin receptor</i> (Receptor transferrina)
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i> (Proteína desacopladora 1)
UCP2	<i>Uncoupling protein 2</i> (Proteína desacopladora 2)
UCP3	<i>Uncoupling protein 3</i> (Proteína desacopladora 3)
UCP4	<i>Uncoupling protein 4</i> (Proteína desacopladora 4)
UCP5	<i>Uncoupling protein5</i> (Proteína desacopladora 5)

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1	<i>Laser</i> e sua origem.....	17
1.2	Princípios e propriedades do <i>laser</i>	19
1.2.1	<u>Emissão estimulada</u>	19
1.2.2	<u>Constituição do equipamento <i>laser</i></u>	20
1.3	Características da radiação <i>laser</i>	22
1.4	<i>Lasers</i> de baixa potência e suas aplicações em saúde	22
1.4.1	<u>Terminologias e medidas</u>	22
1.4.2	<u>Interação entre o tecido biológico e a radiação <i>laser</i></u>	23
1.4.3	<u>Aplicações da radiação <i>laser</i> de baixa potência em saúde</u>	24
1.5	Efeitos biológicos dos <i>lasers</i> de baixa potência	24
1.6	Proteínas Desacopladoras (UCPs)	26
1.6.1	<u>Fosforilação oxidativa</u>	26
1.6.2	<u>As diferentes UCPs</u>	27
1.6.2.1	Proteína desacopladora 1 (UCP1).....	28
1.6.2.2	Proteína desacopladora 2 (UCP2).....	28
1.6.2.3	Proteína desacopladora 3 (UCP3).....	29
1.6.2.4	Proteína desacopladora 4 (UCP4).....	29
1.6.2.5	Proteína desacopladora 5 (UCP5).....	30
1.7	MicroRNAs (miRNAs)	30
1.7.1	<u>Biogênese dos miRNAs</u>	31
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	Objetivos gerais	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	<i>Lasers</i> de baixa potência	35
3.2	Avaliação da expressão de RNAs mensageiros em ratos <i>Wistar</i>	35
3.2.1	<u>Animais</u>	35
3.2.2	<u>Escolha dos genes para o estudo</u>	35
3.2.3	<u>Procedimento experimental e parâmetros do tratamento</u>	36

3.2.4	<u>Extração de RNA total</u>	36
3.2.5	<u>Síntese de cDNA.....</u>	37
3.3	Avaliação da expressão de RNA mensageiro e microRNAs em células MDA-MB-231.....	37
3.3.1	<u>Escolha dos miRNAs para o estudo.....</u>	37
3.2.2	<u>Irradiação de cultura de células MDA-MB-231.....</u>	38
3.3.3	<u>Extração de RNA total.....</u>	39
3.3.4	<u>Síntese de cDNA e RT-qPCR a partir de mRNA de culturas de célula de câncer de mama.....</u>	39
3.3.5	<u>Síntese de microRNA e RT-qPCR a partir de mRNA de culturas de célula de câncer de mama.....</u>	40
3.4	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Efeitos da radiação <i>laser</i> de baixa potência na pele e no tecido muscular esquelético de ratos <i>Wistar</i>.....	42
4.1.1	<u>Efeitos da radiação <i>laser</i> de baixa potência nos níveis relativos de mRNA de UCP2 e UCP3 na pele</u>	42
4.1.2	<u>Efeitos da radiação <i>laser</i> de baixa potência nos níveis relativos de mRNA de UCP2 e UCP3 no tecido muscular esquelético.....</u>	44
4.2	Efeitos da radiação <i>laser</i> de baixa potência em cultura de células MDA-MB-231.....	46
4.2.1	<u>Efeitos da radiação <i>laser</i> vermelha de baixa potência nos níveis relativos de mir-15a, mir-106b e mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231.....</u>	46
4.2.2	<u>Efeitos da radiação <i>laser</i> infravermelho de baixa potência nos níveis relativos de mir-15a, mir-106b e mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231.....</u>	47
5	DISCUSSÃO.....	50
5.1	Efeitos da radiação <i>laser</i> de baixa potência na pele e no tecido muscular esquelético de ratos <i>Wistar</i>.....	50
5.2	Efeitos da radiação <i>laser</i> de baixa potência em cultura de células MDA-MB-231.....	52
	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	APÊNDICE - Low-level <i>lasers</i> affect uncoupling protein gene expression in	

skin and skeletal muscle tissues.....	61
---------------------------------------	----

INTRODUÇÃO

Lasers (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) são utilizados em diferentes protocolos clínicos e apresentam características específicas como a emissão monocromática, coerente e colimada da luz (O'SHEA, CALLEN, RODES, 1978). Tais equipamentos podem ser distinguidos pelo modo de emissão, comprimento de onda, fluência e potencia (NIEMZ, 2007). Essas propriedades são importantes para a determinação dos efeitos fotofísicos, fotoquímicos e respostas fotobiológicas (KARU, 2003).

Os efeitos dos *lasers* de baixa potência têm sido associados a modificações no metabolismo celular, aumentando DNA e síntese de proteínas (KARU, 2003). Esses efeitos dependem não só de parâmetros físicos, mas também das condições fisiológicas das células e tecidos irradiados (HUANG, LU, KAO, 2012; FONSECA *et al*, 2013).

Estudos recentes sugerem que radicais livres estão envolvidos em efeitos biológicos dos *lasers* de baixa potência, atuando como segundos mensageiros em processos de sinalização intracelular (MIGLIARIO *et al*, 2014). Porém, radicais livres podem reagir com biomoléculas causando modificações funcionais e efeitos celulares (KIM, 2002). Radicais livres induzidos por *lasers* podem desbalancear as defesas celulares contra tais radicais, causando efeitos não desejáveis nos tecidos e células irradiadas, alterando funções de biomoléculas importantes, como o DNA (FUJIMOTO *et al*, 2012; MIGLIARIO *et al*, 2014).

As células possuem diferentes mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. Entre estas, as proteínas desacopladoras (UCPs) pertencem a uma superfamília de transportadores mitocondriais e atuam reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo de fosforilação oxidativa (HO *et al*, 2012). Entretanto, os mecanismos de regulação dessas proteínas desacopladoras ainda não são claros. Tal regulação pode estar relacionada a mecanismos pós-transcricionais ou pós-transducionais (YU *et al*, 2016).

MicroRNAs (miRNAs) pertencem a uma classe de RNAs pequenos, não codificantes conservados durante a evolução. Evidências recentes têm demonstrado que a regulação pós-transcricional da expressão gênica pode ser mediada por microRNAs (BARCISZEWSKI, 2003; OBERNOSTERER, 2006). Programas pós-transcricionais controlados por miRNAs afetam diversos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento e diferenciação celular, apoptose, respostas imunes e metabolismo celular (SINGH & MO, 2013).

Apesar do aumento de estudos sobre seus mecanismos de ação, os níveis de mRNAs de genes de proteínas desacopladoras e os níveis de miRNAs ainda não são bem compreendidos em tecidos biológicos e em culturas de células expostos à radiação *laser* de baixa potência.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Laser* e sua origem:

A luz está presente desde muito antes da origem da vida. O livro de Gênesis descreve que o primeiro elemento a ser criado foi a luz “E disse Deus: Haja luz, e houve luz”(BÍBLIA, Gênesis, 1, 1-5), elemento comum que levou ao desenvolvimento da Teoria do Big Bang, proposta inicialmente por George Gamow (1904-1968) e Georges Lemaître (1894-1966), em que o universo teria sido originado a partir de uma grande explosão de luz (referencia a ser colocada). Desde a origem do universo, o planeta vem sendo banhado pela luz (BERTOLOTTI, 2005). A luz solar utilizada na fotossíntese por vegetais e cianobactérias permitiu que, por meio da expansão de oxigênio atmosférico, os seres que habitavam o planeta evoluíssem.

Hipócrates (460a.C.–377a.C.) prescrevia banhos de luz com o intuito de ajudar pacientes com depressão. Ele defendia que a luz solar era capaz de mudar o humor dos gregos. Em 1670 foi publicado *Traité de la Lumière* (do português, Tratado sobre a luz) por Christiaan Huygens, em que descreve sobre a teoria ondulatória da luz, além de explicar fenômenos como a refração e a reflexão. Em seu tratado, Huygens defende o caráter ondulatório da luz fazendo uma analogia com as ondas sonoras no ar, que são mecânicas e longitudinais (HUYGENS, 1920). Isaac Newton (1643-1727), em 1704 caracterizou a luz como um fluxo de partículas (NEWTON, 1704). Niels Finsen Ryberg (1860-1904), ganhador do prêmio Nobel, foi o idealizador do uso da luz como terapia, ao descrever um tratamento utilizando radiação luminosa concentrada para tratar *Lupus vulgaris*, um tipo de tuberculose cutânea (MOLLER *et al.*, 2005).

Porém, é Albert Einstein (1879-1955), em 1917, em seu trabalho intitulado “*Zur Quantum Theories der Strahlung*”(do português, Teoria quântica da Radiação), que descreve um átomo excitado em um espaço vazio faria uma transição do estado mais alto, para o mais baixo de energia, chamando esse processo de emissão espontânea, ainda ele discute a existência de uma inversão de população entre os níveis de energia dentro do sistema atômico, em que foi possível perceber a amplificação estimulada da radiação, aonde a emissão da

radiação eletromagnética estimulada tem a mesma frequência (comprimento de onda) e fase (coerência) da radiação incidente (EINSTEIN, 1917).

Em 1953, Charles Townes, baseando-se na idéia de Einstein, construiu um equipamento em que a radiação podia ser amplificada através de gás de amônia (TOWNES, 1995). Esse equipamento foi nomeado *MASER* (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), futuramente este levaria à criação do *Laser*.

O primeiro *Laser* foi construído 1960 por Theodore H. Maiman, usando rubi como meio emissor, que era estimulado através da energia fornecida por lâmpada *flashes* (MAIMAN, 1960).

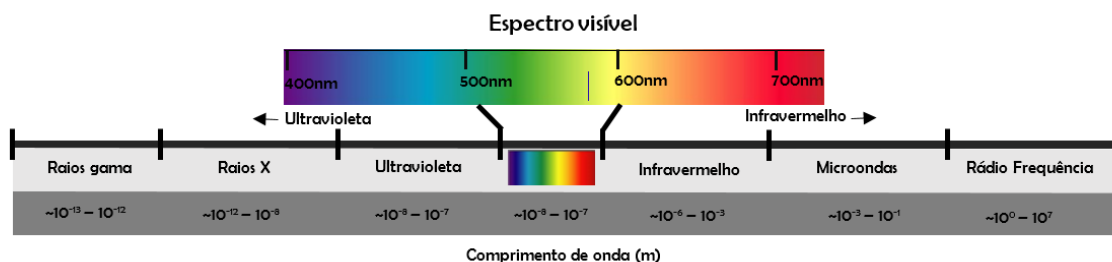
Laser é um acrônimo para “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”. Apesar do primeiro emissor ter sido criado em 1960, a primeira vez em que o acrônimo foi citado foi em 1957 por Gordon Gould em seus manuscritos, que geraram 30 anos de batalha judicial pelos direitos de patente do *laser* (TAYLOR, 2000).

A década de 1960 foi marcada pela construção de diferentes *lasers*. Em 1961, foi construído o *laser ítrio-alumínio garnet* (YAG), em 1962 foi desenvolvido o *laser* de argônio e em 1964 foi desenvolvido o *laser* de CO₂ (GROSS; HERRMANN, 2007)

O *laser* apresenta propriedades únicas, que diferem de outras fontes de luz. A luz emite um único comprimento de onda, radiação monocromática, além disso a luz é colimada, com ondas que estão em fase, dando a característica de coerência à luz *laser*, em consequência da colimação e da coerência, a energia transportada pela radiação é de alta densidade.

As ondas eletromagnéticas são organizadas no Espectro Eletromagnético e são classificadas de acordo com o comprimento de onda e frequência (NOURI, 2012). Na clínica, utiliza-se comprimentos de ondas que estão situados no espectro visível (400-760nm) e infravermelho próximo (760-1400nm) (figura 1) (ALLEMANN; GOLDBERG, 2011).

Figura 1 - Representação ilustrativa do espectro eletromagnético



Fonte: O autor, 2017.

1.2 Princípios e propriedades da radiação *laser*

1.2.1 Emissão estimulada

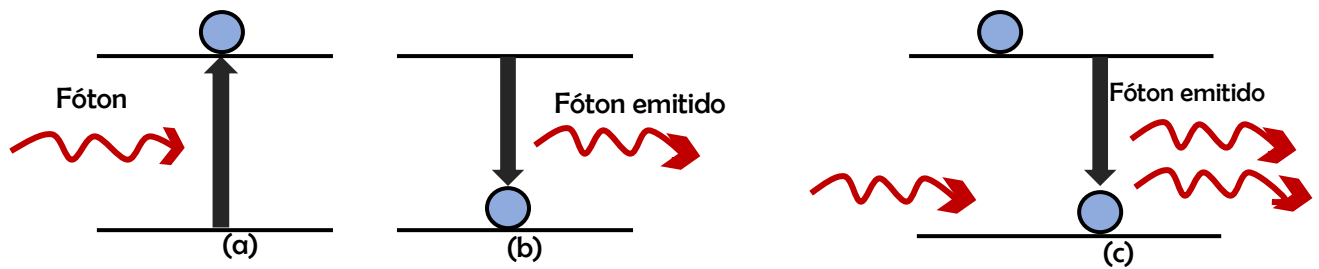
O entendimento de alguns princípios é essencial para compreender como a emissão estimulada é produzida e amplificada.

Um determinado átomo irá permanecer no nível fundamental de energia a menos que uma certa quantidade de energia de uma fonte externa seja transferida para ele, se um fóton incide sobre a matéria, este átomo poderá absorver a energia deste fóton (ou parte dela) e passar para um estado superior de energia (estado excitado ou ativado). A este processo é dado o nome de absorção de energia.

Durante a emissão espontânea, um determinado átomo excitado pode decair de forma espontânea para o nível de energia menor, sem qualquer estímulo externo, retornando ao seu estado fundamental. Durante o decaimento, ocorre a liberação do excesso de energia obtida durante o processo de absorção.

Contudo, existe um terceiro processo fundamental para o funcionamento do *laser*, a emissão estimulada. Átomos e moléculas, quando excitados, apresentam um tempo característico para emissão espontânea. O tempo de duração do estado excitado é importante para a emissão estimulada. Quando um átomo excitado interage com um fóton de mesma energia da transição espontânea, o átomo será estimulado e retornará ao nível mais baixo de energia. Assim, dois fótons irão emergir do sistema juntos, com a mesma energia e na mesma direção. Diz-se que a emissão está em fase, sendo praticamente indistinguíveis (FELICE, 2010; BAGNATO, 2008).

Figura 2 - Esquema dos processos de absorção, emissão espontânea e emissão estimulada



Legenda: (a) absorção; (b) emissão espontânea; (c) emissão estimulada.
Fonte: O autor, 2017.

Com o objetivo de manter a inversão de população (manutenção de uma maior população de átomos no nível mais alto de energia do que nos níveis de menor energia), deve ser fornecida energia ao átomos, e este processo é denominado bombeamento de energia. A exposição à luz de alta intensidade e a passagem de uma corrente elétrica são as formas mais utilizadas para o bombeamento em sistemas *lasers*.

Havendo a inversão de população, o meio poderá emitir radiação eletromagnética através do processo de emissão estimulada, sendo considerado assim um meio amplificador, em que cada fóton de luz estimulará a emissão de dois outros fótons (figura 2).

1.2.2 Constituição do equipamento *laser*

O equipamento emissor do feixe de *laser* é basicamente constituído por um meio emissor, uma fonte de energia externa, um ressonador óptico (ou cavidade óptica), um sistema de entrega composto por fibras óticas, um sistema de resfriamento e um painel de controle.

O meio emissor (ou meio ativo) é um material que, quando estimulado, emite a radiação *laser*. Este pode ser encontrado nos três estados físicos da matéria (sólido, líquido e gasoso). É neste meio emissor que estão os átomos ou moléculas que emitem radiação eletromagnéticas (fótons) através dos saltos entre níveis de energia, a radiação *laser*. Podem ser citados como exemplo os seguintes meios emissores (SVELTO, 2010): O meio sólido geralmente é de cristais ou vidros, como por exemplo rubi, érbio, itérbio, cromo, neomídio, o meio líquido é constituído de corantes como rodamina 6G, fluoresceína, cumarina, estilbeno,

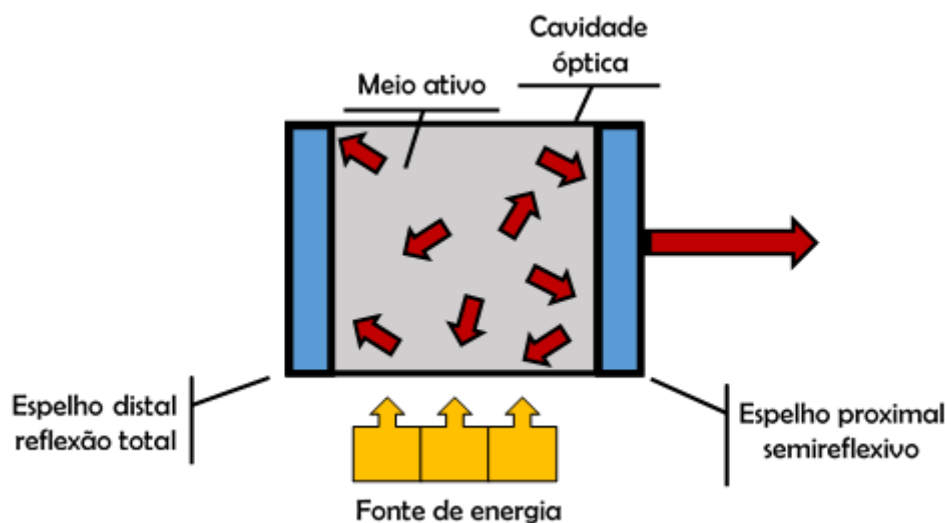
umbeliferona, tetracena, e finalmente o meio gasoso constitui-se de gases, como por exemplo o CO₂, hélio-neônio, argônio, criptônio.

Nos *lasers* semicondutores, o meio emissor é um diodo semicondutor, em geral, formados pela junção de dois materiais distintos, como por exemplo: *GaAs* (*Gallium Arsenide*, do português Arseneto de Gálio) , *AlGaAs* (*Aluminium gallium arsenide*, do português Arseneto de Gálio-Alumínio) e *InGaAs* (*Indium Gallium Arsenide*, do português Arseneto de Índio e Gálio) (KNEEBONE, 2007).

A fonte de energia externa, em geral, é responsável por criar o fenômeno de inversão de população. Para que os elétrons saltem para níveis superiores de energia é preciso fornecer energia e no retorno destes aos níveis inferiores de energia, pode ocorrer a emissão *laser*.

O ressonador óptico (ou cavidade de ressonância) é responsável por fazer com que cada fóton que emerge do meio emissor retorne a este meio e estimule a emissão de outros dois fótons, causando a emissão estimulada. O processo é feito mediante dois espelhos. A radiação *laser* emitida pelo meio ativo é refletida através do eixo do ressonador óptico do *laser*, para tal, dois espelhos são colocados na extremidade do meio ativo, paralelos entre si. Um destes espelhos é totalmente refletivo (espelho distal), enquanto o outro é parcialmente transmissivo (espelho proximal), permitindo que a radiação *laser* escape, constituindo o feixe *laser* (PARKER, 2007) (Figura 3).

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



1.3 Características da radiação *laser*

A radiação *laser* é emitida de maneira organizada e não em um padrão aleatório como as fontes comuns de radiação. A radiação *laser* apresenta as seguintes características (SVELTO, 2010; ALLEMANN; GOLDBERG, 2011): ela é monocromática, uma vez que os fótons emitidos apresentam o mesmo comprimento de onda e energia; ela é coerente, a radiação apresenta coerência de espaço e tempo; a radiação *laser* também é colimada, o feixe *laser* é bem definido e limitado, com pouca divergência. A baixa divergência do feixe de fótons faz com que uma grande quantidade de energia seja depositada em uma pequena área. Sendo assim, a radiação *laser* também apresenta alta densidade de energia. A potência do feixe *laser* é outra característica, uma vez que o feixe é maior que o de fontes convencionais, podendo chegar a ordem de 10^{12} W.

Os *lasers* podem ser classificados em *lasers* de baixa potência (do inglês, *low level lasers*) e *lasers* de alta potência (do inglês, *high level lasers*). *Lasers* de baixa potência não apresentam potencial destrutivo. Apresentam ação fotoquímica (analgesia, anti-inflamatória e bioestimulação). *Lasers* de alta potência apresentam alto poder destrutivo. São cirúrgicos, e tem ação de vaporizar, cortar, fazer a coagulação e esterilização de tecidos (NIEMEZ, 2007)

Lasers ainda podem se diferenciar com relação ao comprimento de onda (frequência) emitido e pelo modo de emissão (contínuo ou pulsado) (NIEMEZ, 2007): A emissão contínua é constituída por um feixe contínuo e sem interrupções, enquanto que a emissão pulsada constitui-se por um feixe intermitente e é emitida por meios emissores que têm a capacidade de armazenar e liberar energia rapidamente.

1.4 *Lasers* de baixa potência e suas aplicações em saúde

1.4.1 Terminologias e medidas

Os seguintes parâmetros são de grande importância para alcançar resultados desejados com a terapia *laser* (PATIL; DHAMI, 2008):

- a) comprimento de onda - é a distância entre duas cristas ou vales consecutivos, geralmente é expressa em nanômetros (nm);
- b) frequência - é o número de ciclos completos por unidade de tempo, expressa em Hertz (Hz);
- c) energia - cada fóton carrega uma quantidade de energia (E), em que $E=hf$, aonde h é a constante de Planck e f é a frequência da radiação. A energia é expressa em Joules (J);
- d) potência - a potência é a quantidade de energia por unidade de tempo, expressa em Watts (W), aonde $1\text{ W} = 1\text{ J/cm}^2$;
- e) fluência ou densidade de energia- é a quantidade de energia por unidade de área, expressa em J/cm^2 ;
- f) densidade de potência – expressa em Watts por área irradiada, expressa em W/cm^2 .
- g) *spot size* – é a área da secção reta do feixe *laser*, expresso em cm^2 .

1.4.2 Interação da radiação *laser* com tecidos biológicos

Quando um feixe *laser* interage com um tecido biológico ele pode ser transmitido, dispersado, refletido ou absorvido em cada camada (Figura. 4) (GOLDBERG, 2013).

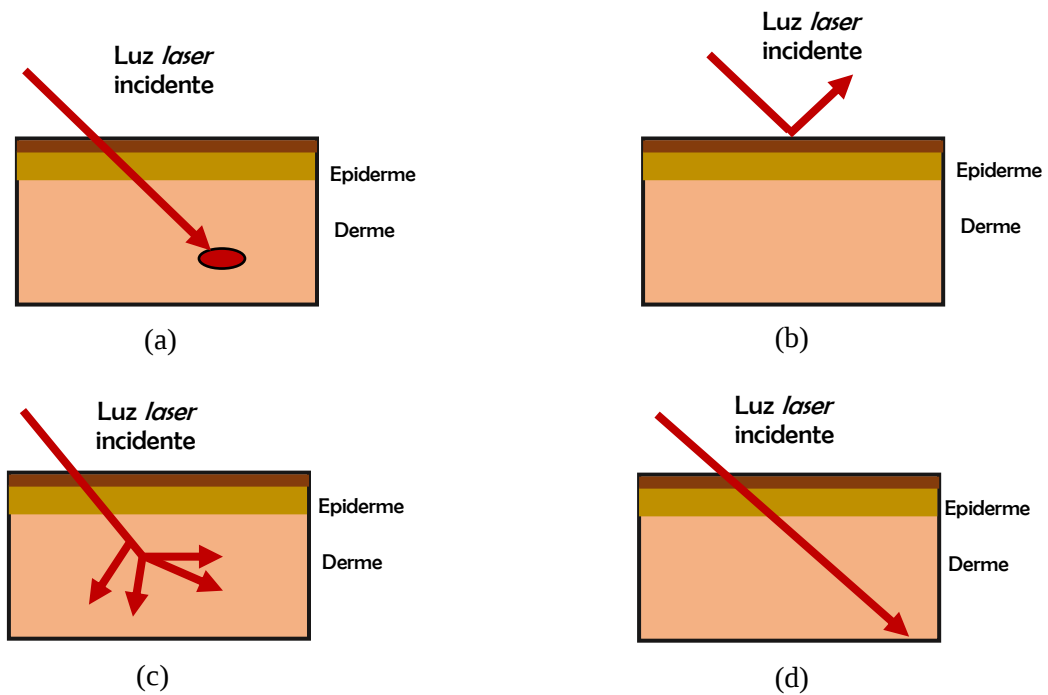
A absorção ocorre de acordo com a lei Grothus-Draper. Para que haja um efeito biológico no tecido, a radiação deve ser absorvida pelo tecido alvo. Ao absorver a radiação, a energia absorvida é transferida para as moléculas alvo. A quantidade de energia absorvida depende do comprimento de onda da radiação e das características da molécula. Quando a radiação não é absorvida, ela é dispersa, refletida ou transmitida.

A reflexão ocorre porque aproximadamente de 4 a 6% da radiação é refletida quando interage com a superfície da pele num ângulo de 90° . As superfícies limpas ou escamosas tendem a refletir mais radiação do que quando aplicado gel ou óleo na pele.

A dispersão acontece quando a radiação se dissipa pelas camadas dos tecidos ao atravessar a superfície da pele. A dispersão ocorre principalmente com radiações de comprimentos de onda menores, e predominantemente na frente de onda. A quantidade de energia dispersa é inversamente proporcional ao comprimento de onda da radiação incidente. A radiação dispersa apresenta direção diferente da luz incidente, que é um fato importante para a distribuição espacial da energia da radiação absorvida.

A transmissão ocorre quando a radiação que não foi absorvida, refletida ou dispersa é transmitida para estruturas mais profundas. A transmissão é importante para *lasers* com comprimento de onda maiores chegarem a estruturas mais profundas.

Figura 4 - Desenho esquemático das interações da luz *laser* com o tecido



Legenda: (a) Absorção; (b) Reflexão; (c) Dispersão; (d) Transmissão.
Fonte: O autor, 2017.

1.5 Efeitos biológicos dos *lasers* de baixa potência

Mitochondrias são consideradas sítios iniciais de ação dos *lasers* de baixa potência em células devido à absorção dessas radiações pela citocromo *c* oxidase (KARU, 2003; TRENKER *et al.*, 2007). O cobre (Cu_A , Cu_B) em diferentes valências na citocromo *c* oxidase são fotoceptores (cromóforos), e parte dos efeitos biológicos dos *lasers* de baixa potência

podem ser explicados pelo fato deste fotoceptor estar envolvido em diferentes respostas celulares (NAKANO *et al.*, 2009).

A absorção da radiação não ionizante de baixa potência em tecidos biológicos é feita mediante cromóforos encontrados na crista mitocondrial. A energia absorvida por esses cromóforos é transformada em energia bioquímica, que desencadeia reações que levam à modulação de funções celulares.

Karu e colaboradores (1999) sugerem que as radiações vermelha e infravermelha de baixa potência podem causar excitação de componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Em um outro trabalho, Karu e seus colaboradores (2005) também evidenciam que a citocromo-c oxidase, também conhecida como complexo IV, rica em íons de cobre, é o fotorreceptor dominante para a absorção das radiações vermelha e infravermelha. A absorção de radiação pela mitocondria aumenta a produção de ATP (adenosina trifosfato), que aumenta na produção de radicais livres, especialmente espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies reativas de oxigênios atuam como sinalizadores celulares, esses efeitos caracterizam os *efeitos primários* dos *lasers* de baixa potência (DYSON, 2006).

Efeitos secundários irão ocorrer em resposta à fotorrecepção. O aumento da produção de ATP muda a permeabilidade da membrana mitocondrial e a proporção Na^+/H^+ , o que aumenta a concentração de Na^+ e a atividade da K^+/ATPase , o que por sua vez interfere no fluxo de cálcio e aumenta a proliferação celular (KARU 2005). Estes efeitos aumentam a taxa de síntese de DNA e RNA, bem como o consumo de oxigênio.

Enquanto que os mecanismos primários e secundários ocorrem em nível celular, *mecanismos terciários* ocorrem em nível sistêmico. Estes são importantes na estimulação do reparo tecidual e no alívio da dor pela fototerapia (DYSON, 2006).

Karu (2010) sugere que a *citocromo c oxidase* não é o único cromóforo estimulado pela radiação *laser* de baixa potência, outras moléculas, como a melanina, porfirinas e flavinas, também são estimuladas pela radiação de baixa potência.

Alguns autores relataram que a liberação de substâncias pré-formadas, tais como histamina, serotonina e bradicinina, podem interferir na produção de prostaglandinas e endorfinas e causarem alterações bioquímicas, que estariam na base dos efeitos antiinflamatório e analgésico dos *lasers* de baixa potência (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Lasers de baixa potência são conhecidos por produzirem analgesia e acelerar a cicatrização de feridas através da bioestimulação. Estes *lasers* são utilizados em protocolos clínicos em Odontologia, Medicina, Fisioterapia, Estética, Medicina Veterinária.

Em geral, *lasers* podem ser utilizados na rotina com o intuito de aliviar a dor, bioestimulação óssea, em protocolos para herpes, afta e hipersensibilidade dentárias. Também é utilizado no tratamento de mucosites, em pós operatórios, no tratamento de pacientes com queimaduras, na drenagem linfática, como ativador de vascularização. Pode ainda ser utilizado na reabilitação de pacientes que sofreram distensão muscular, na redução de processos inflamatórios, e no tratamento de úlceras (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; AWOTIDEBE; INGLIS-JASSIEM; YOUNG, 2015; LIZARELLI, 2010; TRAJANO *et al.*, 2015).

Estudos sugeriram que os *lasers* de baixa potência têm efeitos mais evidentes, ou mais facilmente aferidos, em tecidos biológicos ou em células em condições de estresse. Assim, o efeito vai ser dependente das condições fisiológicas das células e tecidos expostos à radiação (KARU 1998).

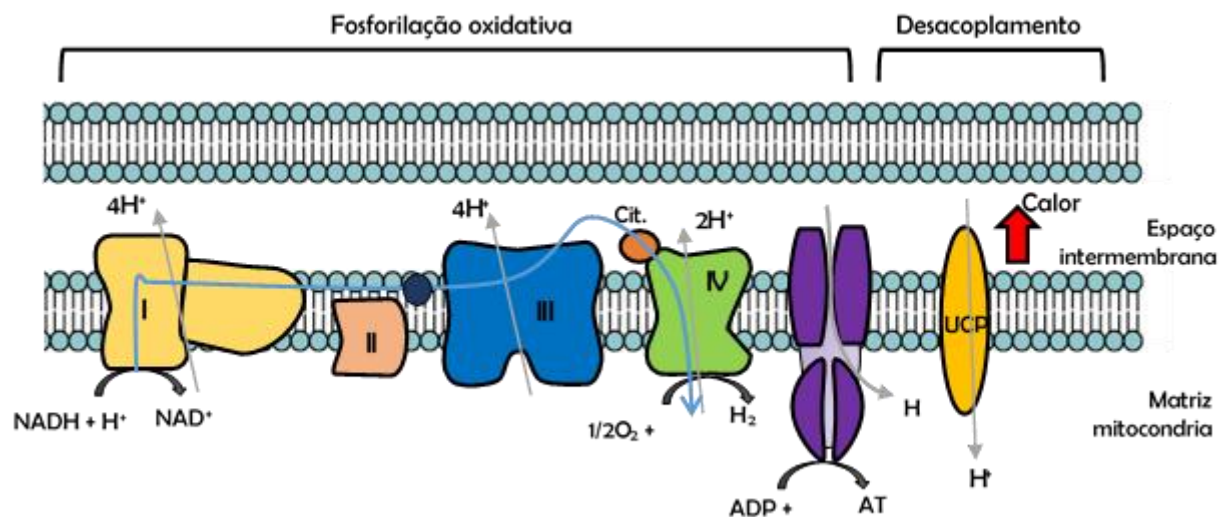
1.6 Proteínas desacopladoras (UCPs)

1.6.1 Fosforilação oxidativa

A mitocôndria é a organela responsável pela respiração celular, bem como pela absorção da luz mediante cromóforos. Ela é formada por duas membranas, sendo uma interna, rica em proteínas, e outra externa, responsável pelo controle do fluxo de íons e metabólitos. Durante a oxidação de lipídios e carboidratos ocorre a produção de CO₂, liberado como subproduto gerando energia na forma de NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo) e FADH₂ (Flavina-Adenina-Dinucleotídeo). Ambos são transferidos para a membrana mitocondrial interna, entrando na cadeia respiratória, como doadores de elétrons. Durante a doação de elétrons, NADH e FADH₂ serão oxidados em NAD⁺ e FADH. Finalmente, ao final da cadeia respiratória o oxigênio molecular é reduzido em H₂O. Ao longo da cadeia respiratória acontece a liberação de energia, onde uma parte será dissipada na forma de calor e a outra será utilizada no transporte de H⁺ da matriz mitocondrial para a região intermembrana. Os prótons têm a tendência a voltar à matriz mitocondrial pela ATP-sintase, sintetizando ATP. Porém mediante esse sistema, alguns prótons podem retornar à matriz mitocondrial

através de algumas proteínas presentes na membrana interna da mitocondria. As chamadas proteínas desacopladoras mitocondriais (do inglês *uncoupling protein* - UCP) conseguem catalisar o desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa, reduzindo o potencial de membrana e, conseqüentemente, a energia proveniente da fosforilação é dissipada na forma de calor (KRAUSS; ZHANG; LOWELL, 2005; ALBERTS *et al.*, 2008) (Figura. 5).

Figura 5 - Esquema representativo da fosforilação oxidativa e desacoplamento



Legenda: Os complexos de I a IV fazem parte dos complexo enzimático da cadeia respiratória. o quinto complexo é o ATPsintase, seguido pela proteína desacopladora.

Fonte: O autor, 2017.

1.6.2 As diferentes UCPs

As UCPs, ao dissiparem energia, podem contribuir para a produção de energia, regulação do metabolismo de ácidos graxos, redução da formação de espécies reativas de oxigênio e regulação de processos dependentes de ATP (AZZU; BRAND, 2010).

Inicialmente as UCPs foram denominadas termogenina ou proteínas de ligação ao GDP (guanosina-difosfato) (NICHOLLS, 2001). Elas estão localizadas na membrana interna

da mitocôndria e fazem parte de uma superfamília de proteínas transportadoras. Em mamíferos existem 5 tipos diferentes de UCPs, que foram enumeradas de acordo com a descoberta:

1.6.2.1 Proteína desacopladora 1 (UCP1)

Também conhecida como termogenina, foi a primeira das proteínas desacopladoras a ser descoberta em 1960 (NICHOLLS, 2001). Apresenta 60% de homologia com as UCPs 2 e 3. Em mamíferos, está presente no tecido adiposo marrom, auxiliando a termogênese, e também a perda de peso. Estudos também apontam a presença de UCP1 em músculos lisos do útero e do aparelho reprodutor masculino (NIBBELINK *et al.*, 2001). Estudos recentes mostram a expressão de UCP1 no timo, porém sua função ainda não está bem estabelecida (CARROLL *et al.*, 2005). O escape de prótons através da UCP1 desacopla o substrato de oxidação de fosforilação de ADP em ATP, proporcionando um consumo mais rápido de oxigênio e aumentando a produção de calor. A condução de prótons pela UCP1 é inibida por purinas em concentrações fisiológicas. Essa inibição é controlada por ácidos graxos liberados do estoque de glicerol intracelular, seguido de ativação adrenérgica em resposta ao frio (BRAND & ESTEVES, 2005)

1.6.2.2 Proteína desacopladora 2 (UCP2)

Pode ser encontrada amplamente no organismo, como nos rins, bexiga, pâncreas, células do sistema nervoso central e em células imunes (PECQUEUR *et al.* 2007). Essa ampla distribuição permite que a UCP2 participe de diversos mecanismos, como por exemplo, a regulação de espécies reativas de oxigênio e regulação de insulina, na imunidade, e está relacionada a algumas doenças como a diabetes melitus e o câncer. Mehta e Li (2009) sugeriram que a UCP2 tem atividade citoprotetora, estimulando a biogênese mitocondrial, previne a morte celular através da redução do potencial de membrana e do fluxo de cálcio para dentro da mitocôndria. Apesar da UCP2 ter ampla expressão em diversos órgãos, a

detecção desta proteína não é proporcional ao nível dos transcritos. A proteína não está presente onde o mRNA é detectado (PECQUEUR *et al.*, 2007).

1.6.2.3 Proteína desacopladora 3 (UCP3)

A UCP3 é bem específica, sendo encontrada apenas nos tecidos muscular esquelético e cardíaco, e em mamíferos, pode ainda ser encontrada no tecido adiposo marrom. A UCP3 apresenta 73% de homologia com a UCP2. Busiello e colaboradores (2015) sugeriram que a ativação da UCP3 pode reduzir espécies reativas de oxigênio, que poderá levar à redução dos danos na mitocôndria, reduzindo o estresse oxidativo. Também foi sugerido que a ativação da UCP3 pode aumentar o desacoplamento mitocondrial e aumentar a taxa de oxidação de ácidos graxos, o que aumenta os níveis metabólicos e reduz o acúmulo de ácidos graxos e seus metabolitos no tecido muscular esquelético. Todos esses fatores poderiam prevenir a obesidade, a resistência de insulina e a diabetes melitus.

1.6.2.4 Proteína desacopladoras 4 (UCP4)

Diferente das demais UCPs, a UCP4 é especificamente expressa no cérebro. Estudos mostraram que a UCP4 é capaz de atuar na homeostase, aumentando a atividade do complexo II mitocondrial em neuroblastomas (HO *et al.*, 2012), auxiliando a oxidação de ácidos graxos. Finalmente a UCP4 aumenta a captação de glicose e altera a produção de ATP da respiração mitocondrial para glicólise (LIU *et al.*, 2006). A UCP4 também tem um papel neuroprotetor, preservando a despolarização mitocondrial (CHU *et al.*, 2009), reduzindo o estresse oxidativo e regulando a homeostase do cálcio e apoptose (WEI *et al.*, 2009). Está relacionada a doenças como esquizofrenia e esclerose múltipla (MOUAFFAK *et al.*, 2011 & SZOLNOKI *et al.*, 2009)

1.6.2.5 Proteína desacopladora 5 (UCP5)

Assim como a UCP4, encontra-se predominantemente no sistema nervoso central, é também conhecida como BMCO1 (*Brain Mitochondrial Carrier protein 1*). Estudos sugeriram que a expressão da UCP5 pode estar relacionada a um possível mecanismo de proteção contra

citotoxicidade oxidativa em células neuronais (HO *et al*, 2006). Nakase e colaboradores (2007) relataram expressão elevada da UCP5 em lesões isquêmicas em pacientes que foram acometidos por acidente vascular cerebral.

1.7 MicroRNAs (miRNA)

RNAs não codificantes (*ncRNAs* do inglês *non coding RNA*), pertencem a uma classe nova de RNAs que são subdivididos em *lncRNA* (*long non coding RNA*, RNA não codificante de cadeia longa) e *small ncRNA* (RNA não codificante de cadeia pequena) (CHOUDHURI, 2010). Essa regulação pode ocorrer em alguns níveis do genoma, como na estrutura da cromatina, segregação de cromossomos, transcrição, processamento de RNA, estabilidade do RNA e translação (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). A classe de pequenos RNAs são divididos em três categorias: siRNA (do inglês *short interfering RNA*), piRNA (do inglês *piwi-interacting RNA*) e miRNA (do inglês *micro RNA*) (CHOUDHURI, 2010). RNAs não codificantes são encontrados apenas em eucariotos.

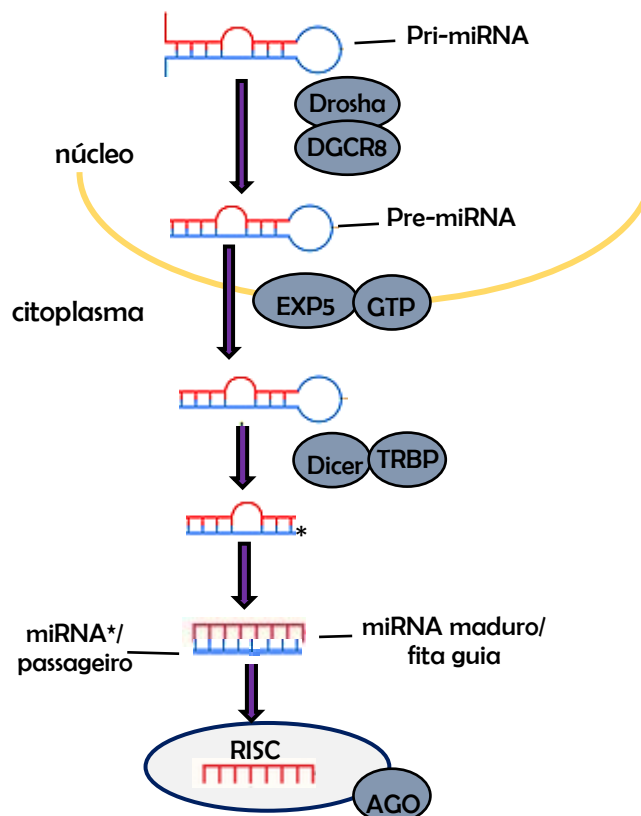
miRNA são RNAs de fita simples que apresentam tamanho de aproximadamente 20-25 nucleotídeos. O primeiro miRNA *lin-4* (do inglês *Lineage-deficient-4*) foi descoberto em 1993 em uma espécie de nematóide, o *Caenorhabditis elegans*. *Lin-4* regulava negativamente o gene *lin-14* (do inglês *Lineage-deficient-14*), ligando na região 3'UTR do mRNA não transcrita (LEE *et al*, 1993). Acreditava-se na época que o microRNA controlava o tamanho larval do nematóide. Hoje estudos apontam que miRNAs participam do controle pós-transcricional, além de serem capazes de regular a estabilidade do mRNA, a formação de heterocromatina e controle translacional (KIM; HAN; SIOMI, 2009)

1.7.1 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs começam a ser produzidos a partir de uma estrutura primária em forma de grampo (*hairpin*), denominada miRNA primário, ou pri-miRNA. Esses pri-miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (RNA poli II). O *hairpin* apresenta na cauda 5' uma 7-metilguanosina e uma cauda 3' poliadenilada. O pri-miRNA é processado dentro do núcleo da célula. Durante o *cropping* (primeira fase de maturação do miRNA), o pri-miRNA é convertido em pre-miRNA (miRNA precursor) pela enzima Drosha, que será responsável pelo corte das extremidades 3' e 5'. Drosha, porém, trabalha juntamente com uma proteína acessória, denominada DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). Esse complexo é

denominado *microprocessador*. Após o processamento da Drosha, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma. Esse transporte é feito pela proteína EXP5 (exportina 5), que forma um complexo de transporte com a proteína nuclear RAN de ligação ao GTP (RAN-GTP) e o pre-miRNA. Ao chegar ao citosol, o GTP é hidrolisado e o pre-miRNA fica livre no citosol. Uma vez no citosol, a alça do *hairpin* do pre-miRNA é clivada pela enzima Dicer, que trabalha juntamente com a proteína TRBP (*TAR-RNA binding protein*), que é uma proteína ligante a RNA de dupla fita, ocorrendo a liberação do duplex de miRNA. O RNA de dupla fita, formado pelo miRNA:miRNA* é capturado pelo complexo RISC (do inglês, *RNA induced silencing complex*), onde as fitas serão separadas. O miRNA*, conhecido como passageiro, será descartado e o outro miRNA, conhecido como guia, será mantido dentro do complexo RISC. A subunidade Argonaute (AGO) é caracterizada por se associar a pequenos RNAs e funciona silenciando genes (Figura 6). A AGO só se torna estável na presença de um miRNA, sendo instáveis quando não ocupadas. Assim, havendo o pareamento perfeito do miRNA, o RNAm será clivado pela AGO do complexo RISC, quando o pareamento é imperfeito, ocorrerá a inibição do processo de tradução do RNAm (Figura 7) (PEREIRA, 2015; BOYD, 2008; CIPOLLA, 2012).

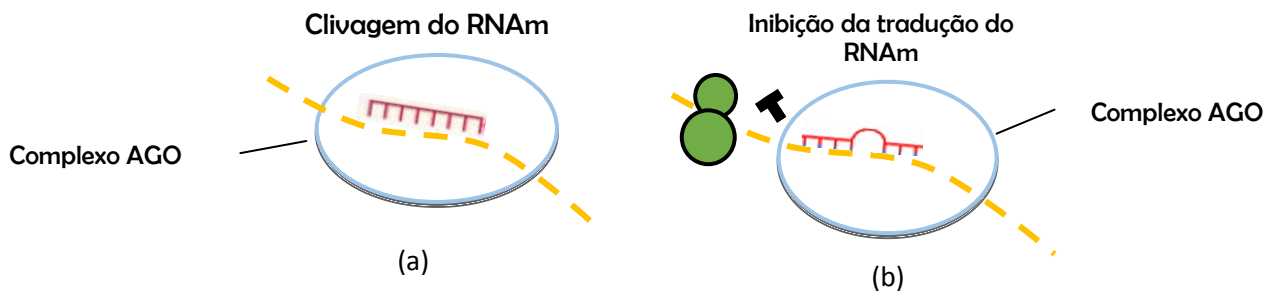
Figura 6 - Esquema representativo da biogênese do miRNA



Legenda: O miRNA inicia sua maturação no interior do núcleo da célula, uma vez formado o Pre-miRNA, este é transportado para o citoplasma celular, dando continuidade a maturação. Ao final, um duplex de miRNA é formado, apresentando um miRNA passageiro e um miRNA maduro, o miRNA passageiro é descartado, enquanto que o miRNA maduro será englobado ao complexo AGO.

Fonte: O autor, 2017.

Figura 7 - Esquema representativo da regulação pós-transcricional



Legenda: (a) Pareamento perfeito do miRNA. (b) Pareamento imperfeito do miRNA.

Fonte: O autor, 2017.

A idéia de que miRNAs são conservados entre espécies, enfatiza a idéia de que estão presentes em processos biológicos essenciais. Aproximadamente 60% dos genes são capazes de serem regulados por miRNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2008). Estudos apontam que miRNAs tem importante papel no desenvolvimento de diversas doenças e são marcadores importantes para o prognóstico, progresso e diagnóstico das mesmas (BLENKIRON; MISKA, 2007). miRNAs têm expressão alterada em doenças, como na epilepsia, no Mal de Alzheimer, na doença de Huntington, na esclerose lateral amiotrófica (ELA), na artrite reumatóide, em doenças inflamatórias intestinais, no diabetes e em diversos tipos de câncers (PEREIRA, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de RNAm dos genes desacopladores de proteínas em tecidos biológicos e em células de câncer de mama, bem como a expressão de miRNAs miR-15a e miR-106b em células de câncer de mama expostas a *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da exposição aos *lasers* vermelho ($\lambda = 660$ nm) e infravermelho ($\lambda = 808$ nm) nos níveis de:

- a) RNAs mensageiros dos genes *UCP2* e *UCP3* na pele e em tecido muscular esquelético de ratos *Wistar*;
- b) RNAs mensageiros dos genes *UCP2* e dos miR-15a e miR-106b em culturas de células MDA-MB-231.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Lasers* de baixa potência

Foram utilizados *lasers* terapêuticos (Photon *Laser* III) vermelho - InGaAlP (660nm) e infravermelho - AsGaAl (808nm) com potência de 100mW no modo contínuo de emissão, nas fluências de 25, 50 e 100J/cm² (D.M.C. Equipamento Ltda, São Paulo, Brasil).

3.2 Avaliação dos níveis de RNAs mensageiros na pele e tecido muscular esquelético de ratos *Wistar*

3.2.1 Animais

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

3.2.2 Escolha dos genes para o estudo

Para esse estudo, foram selecionados os genes da proteína desacopladora 2 (UCP2) e da proteína desacopladora 3 (UCP3). Ambos genes estão relacionados ao controle de espécies reativas de oxigênio. Baseando-se na bibliografia, a escolha priorizou um gene que

apresentasse níveis de expressão global e um outro que apresentasse níveis de expressão mais específicos.

3.2.3 Procedimento experimental e parâmetros do tratamento

Inicialmente, os animais (n=2, para cada controle e tratamento; total = 14) foram submetidos a administração intraperitoneal de tiopental sódico (65 mg/kg), em seguida realizada tricotomia e delimitada uma área de 4 cm² da pele dos membros posteriores, destes 1 cm² para irradiação com os *lasers* vermelho (660nm) e infravermelho (808nm) nas diferentes fluências (25, 50 e 100J/cm²) em modo contínuo de emissão e potência de saída de 100mW, por varredura sobre a pele tricotomizada. Após 24 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e retirados fragmentos da pele e de músculo da região irradiada, cerca de 50 a 100mg dos tecidos, pele e músculo. Os tecidos coletados foram transferidos para microtubos com reagente TRIzol® para posteriormente efetuar a extração de RNA total.

3.2.4 Extração de RNA total

Os fragmentos de tecidos armazenados nos microtubos com reagente TRIzol® (Invitrogen, USA) foram macerados, centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos). Sobrenadante foi transferido para outros tubos, adicionado clorofórmio (CHCl₃) (Merck, Alemanha), misturados e centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 minutos), a fase aquosa foi transferida para outros tubos, e adicionado isopropanol (C₃H₈O) (Merck, Alemanha). 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 - C₂H₅OH, Merck, Alemanha), DEPC 0,1% (deitil pirocarbonato, Merck, Alemanha) 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 DNA complementar e reação em cadeia da polimerase

A concentração de RNA e a pureza foram determinadas em espectrofotômetro pelo cálculo da relação da absorbância em dois comprimentos de onda (260nm/280nm). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o *kit* para síntese de cDNA *two-step* (Promega, EUA). Quatro microgramas de RNA foi transcrito de modo reverso em cDNA usando a transcriptase reversa GoScript™ (Promega, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando um total de 20 µL de reação.

A reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT) foi realizada utilizando 5 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega, EUA) 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 da proteína desaclopadora 2 (UCP2) e da proteína desaclopadora 3 (UCP3) e desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH). As reações correram no equipamento da Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, EUA).

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

3.3 **Avaliação dos níveis de mRNAs e microRNAs em células MDA-MB-231**

3.3.1 Escolha dos miRNAs para o estudo

Para esse estudo foram selecionados dois miRNAs. Baseando-se na bibliografia, o mir-15a foi selecionado por ser um dos miRNAs responsáveis por regular a expressão do gene

desacoplador UCP2 presente nesse estudo. Além disso, o mir-15^a é um dos responsáveis por regular o tamanho, o crescimento e a proliferação celular (MEYER-ROCHOW *et al*, 2010). O mir-106b, apesar de não apresentar na bibliografia alguma relação com os genes desacopladores, ele poderia estar em células tumorais ativando outros mecanismos. Alguns autores relatam que o mir-106b é importante para proliferação de células tumorais, aumento de taxa de metástase (PAN *et al*, 2009).

3.3.2 Irradiação da cultura de células MDA-MB-231

Foram utilizadas culturas de células de câncer de mama, MDA-MB-231. Estas células apresentam perfil de um subtipo de câncer de mama com ausência de marcadores moleculares como o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2, em inglês, *Human Epidermal growth factor Receptor 2*), receptor de estrogênio (ESR, do inglês, *Estrogen Receptor*) e receptor de progesterona (PGR, do inglês, *Progesterone Receptor*), um elevado potencial metastático, além de ser pouco diferenciada, assemelhando-se ao subtipo de câncer de mama mais agressivo e de pior prognóstico (www.atcc.org).

As culturas foram realizadas em estufa com pressão parcial de CO₂ (5%) a 37°C, em meio RPMI 1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, EUA), 2mM de glutamina, 100mg/mL de penicilina G e 100U/mL de estreptomicina.

Para a experimentação, novas culturas foram realizadas até que atingissem densidade de 10.000 células/cm². Antes de proceder a irradiação, as culturas de células foram centrifugadas a temperatura ambiente a 12.000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 50µL de PBS 1x (800 g de NaCl, 20 g de KCl, 144 g Na₂HPO₄ e 24 g de KH₂PO₄; do inglês, *Phosphate Buffered Saline*). O número de células foi estimado por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer com auxílio do azul de tripan 0,4%, que permite identificar e diferenciar as células viáveis que são proficientes na extrusão do corante. Para a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência, 10.000 células/cm² foram separadas em microtubos (1.5 mL) e o pellet foi exposto à radiação vermelha e infravermelha uma única vez em diferentes fluências (25 e 50 J/cm²), no modo contínuo de emissão e na potência de 100mW. Culturas não expostas aos *lasers* foram utilizadas como controle. Após o tratamento, as células foram reconstituídas em meio RPMI 1640, semeadas em placas de meio de cultura com 12 poços e incubadas por 2 horas em estufa com pressão parcial de CO₂ (5%) a 37°C.

3.3.3 Extração de RNA total

Após o período de incubação, foi realizada a extração do RNA total com o auxílio do reagente TRIreagent® (Sigma-Aldrich, USA). Para a extração do RNA, um volume de 500 µL de TRIreagent® (Sigma-Aldrich, USA) foi adicionado a cada amostra, homogenizado e a preparação foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados, após esse período, 100 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha), mais uma vez as preparações foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para outros microtubos de 1,5 µL e 250 µL de isopropanol (Merck, Alemanha) foram adicionados. Após incubação a temperatura ambiente por 15 minutos, as preparações foram centrifugadas a 13.000 rpm a temperatura de 4°C por 60 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados com solução de etanol-DEPC (80% etanol (Merck, Alemanha), 0,1 DEPC (Merck, Alemanha) e centrifugado a 12.000rpm, 4°C por 5 minutos. Os sobrenadante foram descartados e o RNA total foi diluído em solução aquosa de DEPC (0,1%). A concentração de RNA e pureza foi determinada utilizando o equipamento Qubit® Fluometer (Thermo Fisher, USA), utilizando marcador fluorescente específico de RNA. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até a realização da síntese de DNA complementar.

3.3.4 Síntese de cDNA e RT-qPCR a partir de RNAm de culturas de células de câncer de mama

A RT-qPCR foi utilizada para avaliar alterações nos níveis de mRNA do gene de UCP2. Para tal, foi feito um tratamento com a DNaseI (Invitrogen USA) seguindo o protocolo do fabricante para evitar a contaminação com o DNA genômico. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita usando o *kit* de síntese de cDNA *two-step* (Promega, USA). Para tal, 2µg de RNA foi reversamente transcrito em cDNA utilizando o kit GoScript™ de transcriptase reversa (Promega, USA) seguindo o protocolo do fabricante, apresentando no final um total de 20µL de reação.

Cada reação de RT-qPCR foi realizada utilizando 5 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA), num volume total final de 10 µL. Para quantificar o cDNA inicial relativo,

as amostras foram amplificadas. As reações foram realizadas em termociclador Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Alemanha). As análises foram realizadas com auxílio do programa Rotor-Gene 6000 Series Software (Qiagen, Alemanha) em triplicata para cada amostra. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 95°C por 20 segundos, aneladas a 65°C por 20 segundos, havendo um período de extensão de 65°C por 20 segundos. A análise da curva de melt foi feita para cada gene e a especificidade do produto de PCR foi confirmada pela presença de um pico único na curva de *melt*. Os níveis relativos de mRNA foram normalizados como descrito no item 3.2.4, utilizando GUSB, ACTB e TFRC como genes normalizadores.

3.3.5 Síntese da primeira fita do microRNA e RT-qPCR a partir de RNAm de culturas de células de câncer de mama

A síntese da primeira fita de miRNA foi realizada de acordo com o protocolo do *kit* de transcrição reversa de MicroRNA TaqMan® (Applied Biosystems, USA). As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o *kit* de transcrição reversa de MicroRNA TaqMan® (Applied Biosystems, USA) e as sondas TaqMan® has-mir-106 e has-mir-15a (Applied Biosystems, USA), basando-se no protocolo de ensaio de MicroRNA da TaqMan® (Applied Biosystems, USA). Todas as reações foram realizadas em equipamento Applied Biosystems 7500 RT-qPCR (Applied Biosystems, USA), em triplicata para cada amostra. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 15 segundos, aneladas e estendidas a 60°C por 60 segundos. A análise da curva de melt foi realizada para todos os miRNAs avaliados, e o produto específico de PCR foi confirmado pela presença de um único pico na curva de *melt*. Os níveis relativos de miRNA foram normalizados como descrito no item 3.2.4, utilizando o pequeno RNA sinalizador, snRNA U6 (Applied Biosystems, USA) como normalizador.

3.4 **Análise estatística**

Todos os resultados estão apresentados na forma média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados experimentais foi verificada através do teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para o estudo em ratos *Wistar* a comparação entre grupos foi feita através da análise de

variância (ANOVA). Teste *t* foi feito para comparar o grupo infravermelho com o grupo vermelho, e o pós-teste de Bonferroni foi feito para fazer a comparação dos grupos com o grupo controle. Para o estudo em cultura de células MDA-MB-231, foi feito o teste de Kruskal Wallis para determinar possíveis diferenças significativas, seguido do pós-teste de Dunn. Foi considerado $p < 0,05$ como o menor nível de significância. InStat Graphpad software foi utilizado para realizar as análises estatísticas (GraphPad InStat versão 5.0 para Windows, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

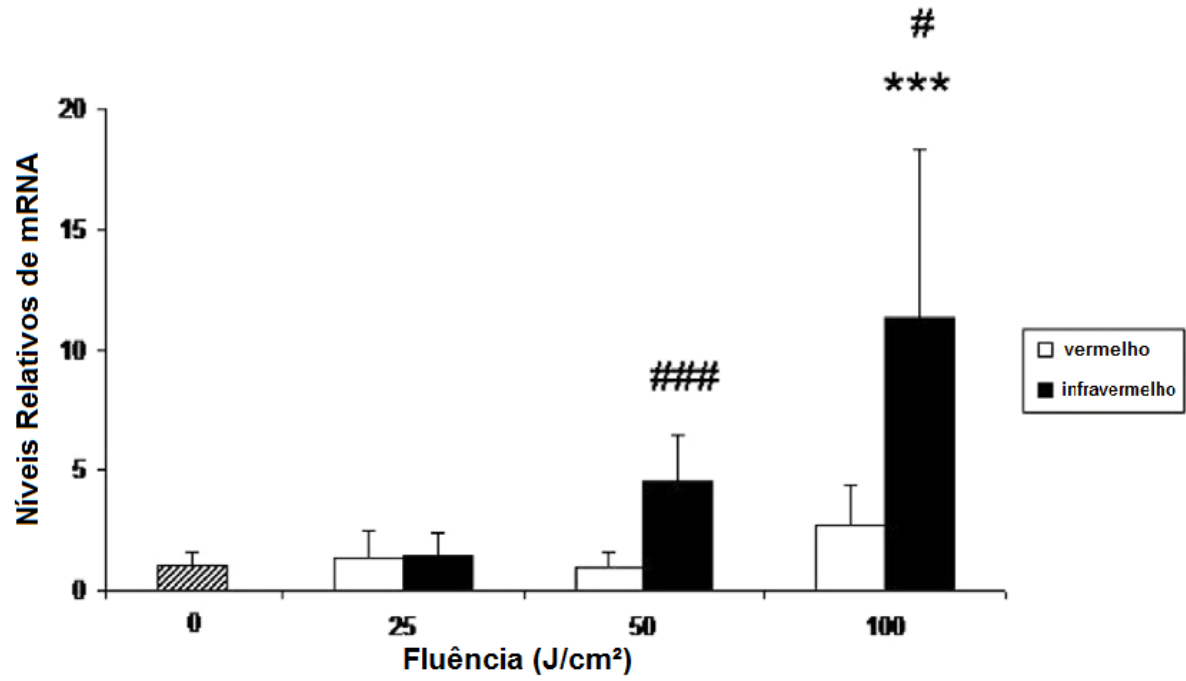
4.1 Efeitos da exposição aos *lasers* de baixa potência na pele e no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar*

4.1.1 Efeitos da exposição ao *lasers* de baixa potência nos níveis relativos de mRNA de UCP2 e UCP3 na pele

A figura 8 mostra o nível relativo de mRNA de UCP2 na pele de ratos *Wistar* expostos aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em diferentes fluências (25, 50 e 100 J/cm²). Os dados nessa figura mostram que para o *laser* infravermelho, os níveis relativos de mRNA da UCP2 para as fluências de 50 e 100, os níveis de RNAm aumentaram aproximadamente 5 ($\pm$) e 10 ($\pm$) vezes comparado as culturas não irradiadas. Enquanto que, para a exposição ao *laser* vermelho, não foi verificado alteração significativa ($p>0,05$) nos níveis de mRNA da UCP2 na pele.

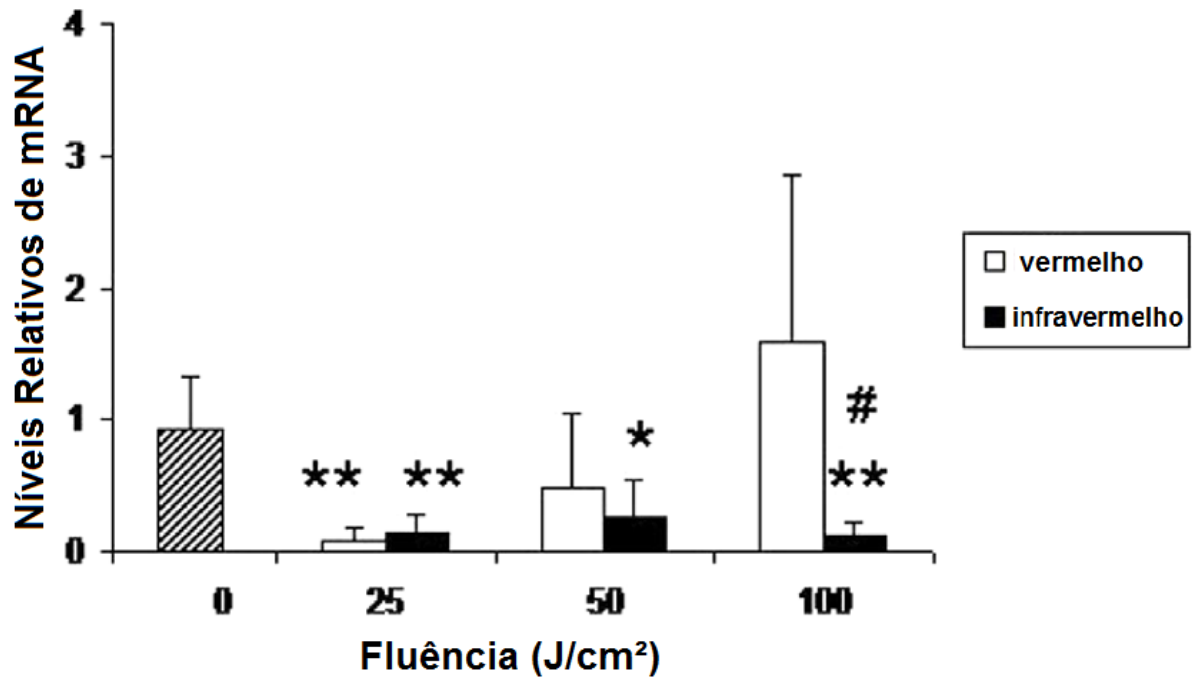
Por outro lado, diferentemente dos resultados obtidos com os níveis de mRNA de UCP2, os níveis relativos de mRNA de UCP3 na pele exposta ao *laser* infravermelho (figura 9), houve redução de 0,8 ($\pm$), 0,6 ($\pm$) e 0,8 ($\pm$) vezes na fluência de 25, 50 e 100, respectivamente ($p>0,05$), enquanto que para a exposição ao *laser* vermelho, os níveis relativos de mRNA da UCP3 na menor fluência (25 J/cm²) reduziram 0,9 vezes em relação as culturas não irradiadas. Na maior fluência (100 J/cm²), os níveis relativos de mRNA da UCP3 foi significativamente diferente ($p<0,05$) na pele exposta aos *lasers* vermelho e infravermelho.

Figura 8 - Níveis relativos de mRNA de UCP2 em pele de ratos *Wistar* após a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em diferentes fluências



Legenda: (***) $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle, (###) $p < 0,001$ quando comparado o grupo infravermelho com o grupo vermelho, (#) $p < 0,05$ quando comparado o grupo infravermelho com o grupo vermelho.

Figura 9 - Níveis relativos de mRNA de UCP3 na pele de ratos *Wistar* após a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em diferentes fluências



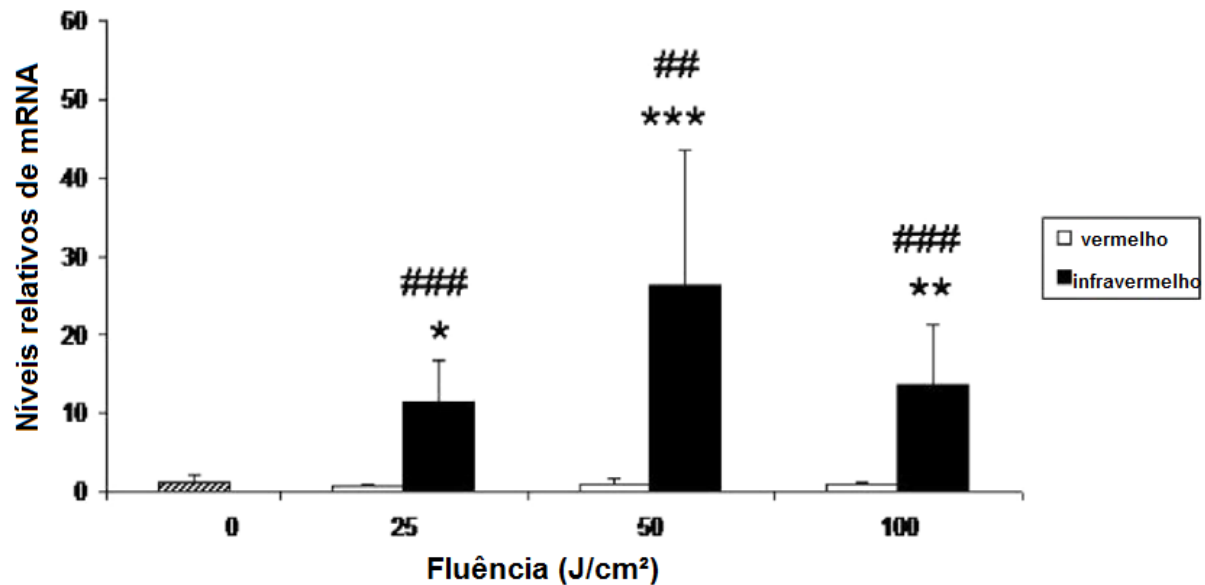
Legenda: (*) $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle, (**) $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle, (#) $p < 0,05$ quando comparado o grupo infravermelho com o grupo vermelho.

4.1.2 Efeitos da exposição aos *lasers* de baixa potência nos níveis relativos de mRNA de UCP2 e UCP3 no tecido muscular esquelético

Os resultados na figura 10 mostram os níveis relativos de mRNA de UCP2 no tecido muscular esquelético exposto aos *lasers* vermelho e infravermelho em diferentes fluências. Não houve alteração significativa nos níveis de RNAm da UCP2 no tecido muscular exposto ao *laser* vermelho. Porém, a exposição ao *laser* infravermelho aumentou significativamente em 15 ($\pm$), 40 ($\pm$) e 20 ($\pm$) vezes ($p < 0,05$) os níveis relativos de mRNA de UCP2 nas fluências de 25, 50 e 100 J/cm², respectivamente comparando com o grupo controle. Entretanto, ao comparar os níveis relativos de expressão em tecido muscular esquelético exposto aos *lasers*

vermelho e infravermelho, houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) ao comparar com o grupo controle.

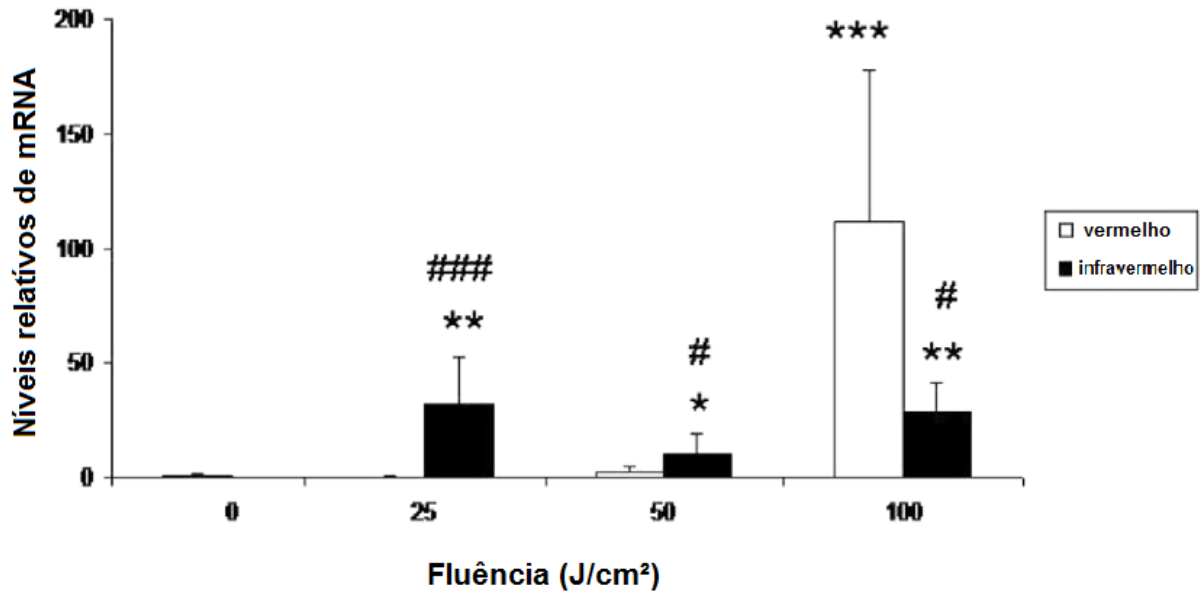
Figura 10 - Níveis relativos de mRNA de UCP2 em tecido muscular esquelético de ratos *Wistar* após a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em diferentes fluências



Legenda: (*) $p > 0,05$ quando comparado com o grupo controle, (**) $p > 0,01$ quando comparado com o grupo controle, (***) $p > 0,001$ quando comparado com o grupo controle, (##) $p > 0,01$ quando comparado o grupo infravermelho com o grupo vermelho, (###) $p > 0,001$ quando comparado o grupo infravermelho com o grupo vermelho.

Na figura 11, os níveis relativos de mRNA de UCP3 em tecido muscular exposto ao *laser* vermelho aumentou aproximadamente 170 vezes ($\pm$) na maior fluência (100 J/cm²) comparada com o grupo controle, enquanto que para a exposição ao *laser* vermelho, os níveis relativos de mRNA da UCP3 comparados com o controle aumentaram significativamente ($p > 0,01$) em aproximadamente 40 ($\pm$), 10 ($\pm$) e 25 ($\pm$) vezes nas fluências de 25, 50 e 100 J/cm² respectivamente. Ao comparar o tecido exposto aos *lasers* vermelho e infravermelho, também houve diferença significativa ($p > 0,001$) em todas as fluências semelhante ao ocorrido com o tecido do grupo controle.

Figura 11 - Níveis relativos de mRNA de UCP3 em tecido muscular esquelético de ratos Wistar após a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em diferentes fluências



Legenda. (##) $p > 0,01$ quando comparado o grupo infravermelho com o grupo vermelho.

4.2 Efeitos da exposição aos *lasers* de baixa potência em cultura de células de câncer de mama

4.2.1 Efeitos da exposição ao *laser* vermelho de baixa potência nos níveis relativos de mir-15a, mir-106b e mRNA da UCP2 em células de câncer de mama

A figura 12 mostra os níveis relativos de mir-106b em culturas de células de câncer de mama expostas ao *laser* vermelho de baixa potência. Os resultados nessa figura mostram que a exposição ao *laser* vermelho não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis de mir-106b nas células MDA-MB-231. De forma semelhante, a exposição ao *laser* vermelho de baixa potência não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis relativos de mir-15a nas mesmas culturas (figura 13).

Figura 12 - Níveis relativos de mir-106b em células MDA-MB-231 após a exposição ao *laser* vermelho de baixa potência em diferentes fluências

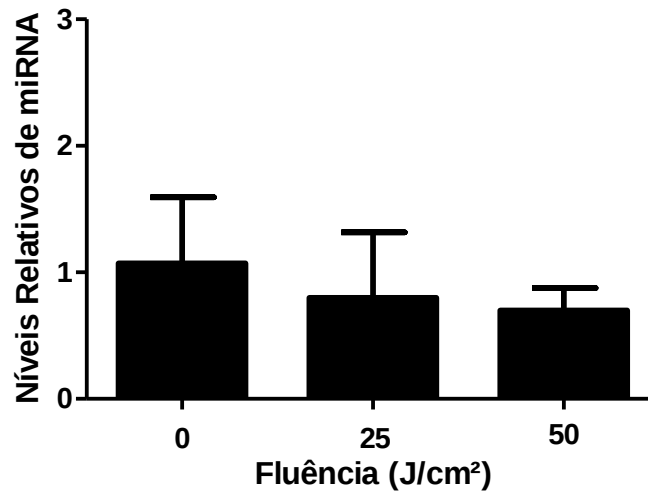
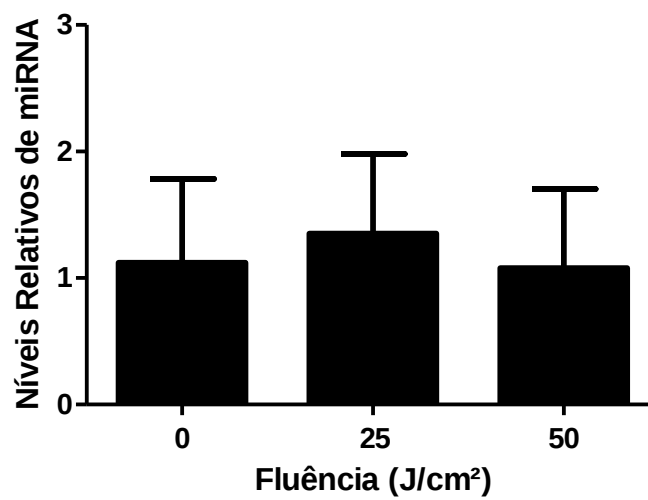
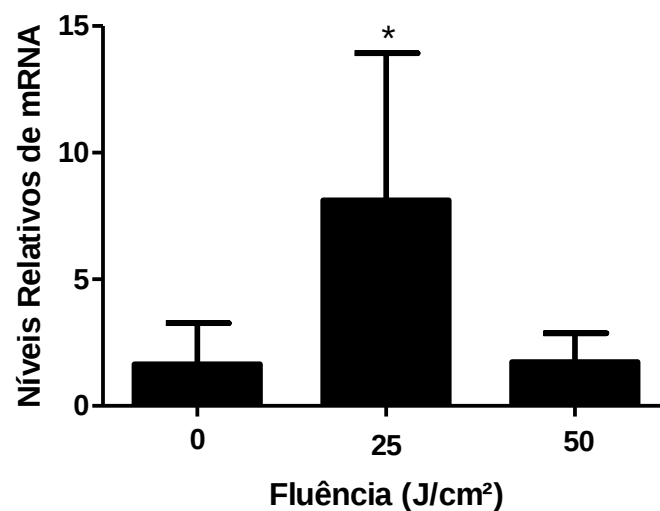


Figura 13 - Níveis relativos de mir-15a em células MDA-MB-231 após a exposição ao *laser* vermelho de baixa potência em diferentes fluências



Diferente dos resultados obtidos com os microRNAs, os níveis de mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231, comparando com o grupo controle, aumentaram 12 vezes ($\pm$) ($p < 0,05$) na fluência de 25 J/cm², após a exposição ao *laser* vermelho de baixa potência (figura 14).

Figura 14 - Níveis relativos de mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231 após a exposição ao *laser* vermelho de baixa potência em diferentes fluências



Legenda: (*) $p > 0,05$ quando comparado com o grupo controle .

4.2.2 Efeitos da exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência nos níveis relativos de mir-15a, mir-106b e mRNA da UCP2 em células de câncer de mama

A figura 15 mostra os níveis relativos de mir-106b em culturas de células de câncer de mama expostas ao *laser* infravermelho. Os resultados nessa figura mostram que a exposição ao *laser* não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis de mir-106b. Do mesmo modo, o *laser* infravermelho não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis relativos de mir-15a em nestas culturas (figura 15).

Figura 15 - Níveis relativos de mir-106b em células MDA-MB-231 após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em diferentes fluências

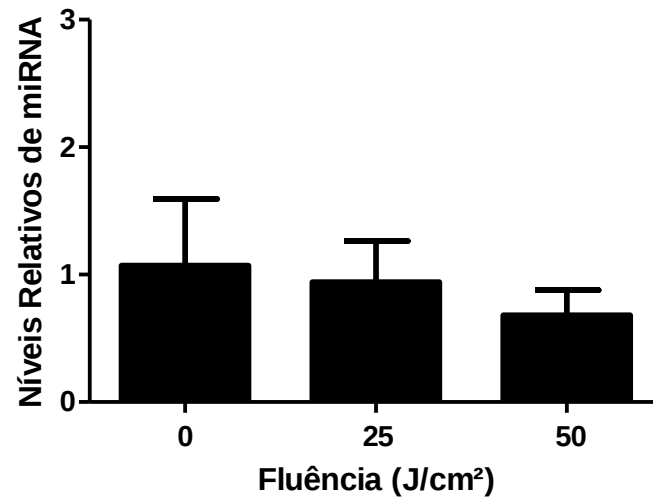
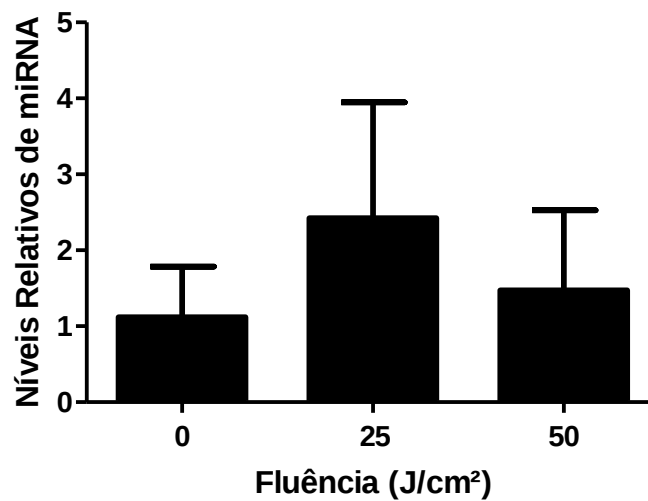
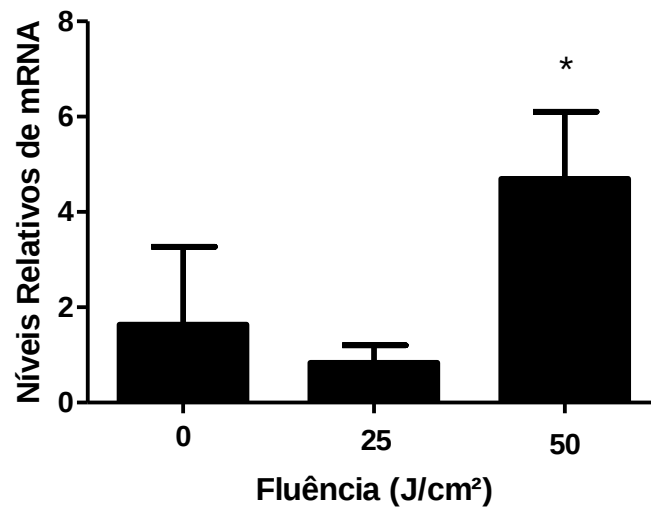


Figura 16 - Níveis relativos de mir-15a em células MDA-MB-231 após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em diferentes fluências



Os níveis relativos de mRNA da UCP2 em culturas de células de câncer de mama por outro lado, a fluência de 50 J/cm², quando comparada com a cultura não irradiada, teve um aumento de aproximadamente 2 vezes ($\pm$) ($p < 0,05$) após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência na fluência de 50 J/cm² (figura 17).

Figura 17 - Níveis relativos de mRNA da UCP2 em células MDA-MB-231 após a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência em diferentes fluências



Legenda: (*) $p > 0.05$ quando comparado com o grupo controle.

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeitos dos *laser* vermelho e infravermelho de baixa potência nos níveis de mRNA de UCP2 e UCP3 na pele e no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar*

Apesar da UCP3 apresentar 72% de homologia com a UCP2 (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000), elas apresentam uma expressão diferenciada nos diferentes tecidos. O desacoplamento da respiração e a dissipação do calor são chaves importantes para que haja um equilíbrio de energia (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000). Quando há um estímulo para desacoplar as proteínas, a energia não é levada à fosforilação de ADP, havendo então geração de calor (SKULACHEV, 1998; LEE *et al.*, 1999). As UCPs não estão restritas à fosforilação oxidativa, elas também estão envolvidas em outros processos celulares como, por exemplo, a produção de radicais livres mitocondriais (MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997).

Uma das funções mais importantes das UCPs é limitar a produção de espécies reativas de oxigênio. Essas proteínas aumentam a proporção de transferência de elétrons e estimulam o consumo de oxigênio, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (LEE *et al.*, 1999). Uma vez que espécies reativas de oxigênio são capazes de danificar o DNA, as proteínas desacopladoras poderiam proteger as células expostas aos *lasers* de baixa potência contra a toxicidade dessas espécies químicas.

Nossos achados sugerem que os níveis de mRNA de UCP2 e UCP3 podem estar alterados nos diferentes tecidos expostos aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência. Na pele, os níveis relativos mRNA de UCP2 aumentaram após a exposição ao *laser* infravermelho (808nm), mas não houve alteração significativa após a exposição ao *laser* vermelho (660nm) (figura 8). No tecido muscular esquelético, não houve alteração significativa após a exposição ao *laser* vermelho porém, a exposição ao *laser* infravermelho altera os níveis do mRNA da UCP2, mesmo na menor fluência avaliada (figura 10). Os efeitos do *laser* infravermelho são mais visíveis em tecidos mais profundos, como o tecido muscular esquelético (NAKANO *et al.*, 2009). Esse fato pode explicar o aumento significativo dos níveis relativos mRNA de UCP após a exposição ao *laser* infravermelho, diferentemente dos resultados obtidos após a exposição ao *laser* vermelho. Esses resultados sugerem efeito dependente do comprimento de onda nos níveis relativos de expressão do mRNA da UCP2.

Estudos prévios mostraram que a exposição ao *laser* infravermelho em baixas fluências poderia reduzir tanto o metabolismo, quanto a produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias (MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997). Esse fato poderia explicar o aumento dos níveis de mRNA da UCP2 tanto na pele, quanto no tecido muscular após a exposição ao *laser* infravermelho.

Esse fato pode explicar o aumento significativo dos níveis relativos mRNA de UCP após a exposição ao *laser* infravermelho, diferentemente dos resultados obtidos após a exposição ao *laser* vermelho. De fato, o *laser* vermelho induz um efeito oposto, reduzindo os níveis relativos de mRNA das UCPs, sugerindo um nítido efeito dependente do comprimento de onda. Estudos prévios mostraram que a exposição ao *laser* infravermelho em baixas fluências poderia reduzir tanto o metabolismo, quanto a produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias (TRAJANO *et al.*, 2015). Esse fato pode explicar a redução do mRNA da UCP2 em ambos músculo e pele após a exposição ao *laser* infravermelho. A figura 9 mostra que os níveis de mRNA da UCP3 na pele são reduzidos após a exposição ao *laser* infravermelho, assim como na menor fluência (25 J/cm²) após a irradiação com o *laser* vermelho. Entretanto, no tecido muscular esquelético, os níveis relativos de mRNA da UCP3 após a irradiação com *laser* infravermelho aumenta para todas as fluências após a irradiação com o *laser* infravermelho (figura 11). Entretanto, para o *laser* vermelho, houve aumento dos níveis de mRNA da UCP3 apenas na maior fluência (100 J/cm²). A maior absorbância da radiação infravermelha no músculo poderia explicar o aumento dos níveis relativos do mRNA da UCP3 no musculo esquelético, como obtido com a UCP2 (figura 10). Tais resultados reforçam que *lasers* de baixa potência afetam diferentemente os níveis relativos dos genes relacionados ao controle da produção de ATP e espécies reativas de oxigênio na mitocôndria.

Por outro lado, apesar do fato do gene da UCP2 ser amplamente expresso em todo o organismo, ele não é uniformemente expresso nos diferentes órgãos (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000). Ainda, o gene da UCP3 é expresso diferentemente no tecido muscular estriado e no tecido muscular cardíaco (BOSS *et al.*, 1997). Além do mais, tanto a pele quanto o tecido muscular poderiam ter fotoceptores específicos que melhorariam a absorção da radiação infravermelha e produção radicais livres, o que alteraria os níveis de mRNA das UCPs. Normalmente, o desacoplamento leva ao consumo de oxigênio pelo complexo IV da mitocôndria, suprimindo a formação de oxigênio (SKULACHEV, 1998). A alta produção de espécies reativas de oxigênio pode causar danos ao DNA mitocondrial, proteínas, peroxidação de fosfolipídios e induzir fatores de transcrição (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000; LEE *et*

al., 1999). Desse modo, a alteração dos níveis de expressão do gene UCP pode fazer parte das respostas de adaptação/prevenção induzidas nas células, provendo às células uma capacidade de sobrevivência aos diversos ambientes ou a ambientes estressantes, como os ambientes presentes em tecidos lesionados. De fato, estudos prévios têm demonstrado que a exposição aos *lasers* de baixa potência pode aumentar a sobrevivência bacteriana em culturas em fase estacionária, mas não em fase exponencial de crescimento, dependendo do mecanismo de reparo de DNA (CANUTO *et al.*, 2013). Ainda, a expressão de genes de reparo do DNA na pele lesionada é dependente da fase de reparo tecidual (TRAJANO *et al.*, 2015).

5.2 Efeitos de *lasers* de baixa potência nos níveis de mRNA de UCP2 e miRNA em culturas de células de câncer de mama

Após a avaliação dos níveis de mRNA de UCPs em na pele e no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar*, foram avaliados os níveis de mRNA da UCP2 em culturas de células de cancer de mama expostas aos *lasers* de baixa potência. Além disso, há dúvidas sobre os efeitos destes *lasers* em nos níveis de mRNA em células cancerígenas. Ainda menos é conhecido sobre a participação dos miRNAs nos efeitos biológicos induzidos pelos *lasers* de baixa potência.

miRNAs apresentam papel importante no controle da expressão gênica, diferenciação celular, proliferação, tumorigênese e apoptose (SUN *et al.*, 2011). Em nível de regulação gênica, miRNAs participam do controle pós-transcricional e são capazes de regular a estabilidade do mRNA, formação de heterocromatina e controle translacional (KIM; HAN; SIOMI, 2009). miRNAs estão envolvidos na iniciação do câncer de mama, bem como na sua progressão e metástase (SINGH & MO, 2013). Assim, estudos sobre efeitos dos *lasers* de baixa potência na expressão de miRNAs em células MDA-MB-231 podem trazer uma melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na fotobiomodulação induzida por estes *lasers* em células cancerígenas. Mir-106b é conhecido por desregular miRNA em câncer de mama humana (LI *et al.*, 2016). Pan e seus colaboradores (2009), relatam que miRNAs da família 106b promovem a proliferação do câncer, aumentam a frequência de metástase e o número de tumores. Nossos resultados mostram que células MDA-MB-231 expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho apresentam alterações nos níveis relativos de miRNA 106b (figuras 12 e 15). Tal resultado pode sugerir efeito positivo, uma vez que a exposição aos

lasers vermelho e infravermelho poderia inibir ou ao menos não induzir metástases de células epiteliais do câncer de mama.

De acordo com Andersen e colaboradores (2010), o mir-15a é capaz de regular o tamanho da célula e sua proliferação (MEYER-ROCHOW *et al*, 2010), além de ter um papel chave nas redes de sinalização de crescimento. Nossos resultados mostram que a exposição aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência também não altera os níveis relativos de mir-15a em células MDA-MB-231 (figuras 13 e 16). Similar ao que foi sugerido para o mir-106b, baixos níveis desse miRNA em células tumorais podem ter efeito positivo, uma vez que o mir-15a é responsável pelo crescimento tumoral e proliferação celular (YU *et al.*, 2010). Por outro lado, estudos têm demonstrado que o aumento dos níveis de mir-15a levam à redução dos níveis de mRNA da UCP2 (SUN *et al.*, 2011). A exposição aos *lasers* de baixa intensidade aumenta os níveis de mRNA da UCP2 na pele e no músculo esquelético de ratos *Wistar* (Figuras 8 a 11). Entretanto, apesar de não haver alteração nos níveis de mir-15a, nossos resultados mostram que células MDA-MB-231 expostas ao *laser* vermelho de baixa intensidade (figura 14) apresentaram aumento nos níveis do mRNA da UCP2 na menor fluência (25 J/cm²), e para a exposição ao *laser* infravermelho de baixa potência, os níveis de mRNA da UCP2 aumentaram na maior fluência (50 J/cm²) (figura 17). Esses resultados sugerem que os níveis de mir-15a não estão relacionados aos níveis de mRNA de UCP2 em células de câncer de mama humana irradiadas com *lasers* vermelho e infravermelho. Ainda, a disfunção mitocondrial tem uma grande relevância na tumorigênese, uma vez que os cânceres são altamente dependentes da função mitocondrial (BOLAND; CHOURASIA; MACLEOD, 2013). Sanchez-Alvarez e colaboradores (2013) relatam ainda a inibição do crescimento tumoral em células de câncer de mama que superexpresssem UCPs. O mRNA da UCP2 tem um papel importante como sensor de estresse oxidativo mitocondrial (DONADELLI *et al.*, 2013), protegendo as células contra a superprodução de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (BRAND & ESTEVES, 2005). Nesse aspecto, nossos resultados estão de acordo com o fato de que espécies reativas de oxigênio estão envolvidas nos efeitos induzidos pelos *lasers* de baixa potência (MIGLIARIO *et al.*, 2014) e reforça a ideia que a exposição a *lasers* de baixa potência aumenta os níveis de mRNA de UCP2 para proteger as células contra os danos oxidativos (CANUTO *et al.*, 2016).

CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que:

Os níveis relativos de mRNA de UCP2 e UCP3 são diferentemente alterados na pele e no tecido muscular esquelético de ratos *Wistar* expostos aos *lasers* de baixa potência.

As alterações nos níveis de mRNA de UCP2 e UCP3 são dependentes do comprimento de onda, porém a alteração nos níveis do mRNA da UCP3 é também dependente da fluência para o *laser* infravermelho.

Os níveis relativos de mir-106b e mir-15a não se alteram, mas os níveis relativos do mRNA da UCP2 aumentam em culturas de células MDA-MB-231 expostas aos *lasers* vermelho e infravermelho de baixa potência em fluências utilizadas em protocolos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the cell**. 5. ed. Nova Iorque: Garland Science, 2008. 1392 p.
- ALLEMANN, I.B.; GOLDBERG, D.J. **Basics in Dermatological Laser Applications**. Basel: Karger, 2011. 200 p.
- ANDERSEN, D.C. *et al.* MicroRNA-15a fine-tunes the level of Delta-like 1 homolog (DLK1) in proliferating 3T3-L1 preadipocytes. **Experimental Cell Research**, [s.l.], v. 316, n. 10, p.1681-1691, 10 jun. 2010.
- ANDRADE, A.G.; LIMA, C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.21-30, mar. 2010.
- AWOTIDEBE, A.W; INGLIS-JASSIEM, G.; YOUNG, T. Low-level laser therapy and exercise for patients with shoulder disorders in physiotherapy practice (a systematic review protocol). **Systematic Reviews**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-6, 30 abr. 2015.
- AZZU, V.; BRAND, Martin D. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.298-307, maio 2010.
- BAGNATO, V.S. **Laser e suas aplicações em Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Livraria da Física, 2008. 88 p.
- BARCISZEWSKI, J. **Non-Coding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine**. [s.l.]: Springer Us, 2003. 292 p.
- BERTOLOTI, M. **The History of the Laser**. Londres: Crc Press, 2005. 316 p.
- BÍBLIA. A. T. Genesis. In: BÍBLIA. Português. **Bíblia sagrada**: contendo o antigo e o novo testamento. Tradução de João Ferreira de Almeida. Rio de Janeiro: Sociedade Bíblica do Brasil, 1966. p.678-686.
- BLENKIRON, C.; MISKA, E. A. miRNAs in cancer: approaches, etiology, diagnostics and therapy. **Human Molecular Genetics**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.R106-R113, abr. 2007.
- BOLAND, M.L.; CHOURASIA, A.H.; MACLEOD, K.F. Mitochondrial Dysfunction in Cancer. **Frontiers in Oncology**, [s.l.], v. 3, p.1-28, 2013.
- BOSS, O. *et al.* Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **Febs Letters**, [s.l.], v. 408, n. 1, p.39-42, 12 maio 1997.
- BOYD, S.D. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. **Laboratory Investigation**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.569-578, 21 abr. 2008.

BRAND, M.D.; ESTEVES, T.C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. **Cell Metabolism**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.85-93, ago. 2005.

BUSIELLO, R.A.; SAVARESE, S.; LOMBARDI, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. **Frontiers in Physiology**, [s.l.], v. 6, p.1-7, 10 fev. 2015.

CANUTO, K.S. *et al.* DNA repair in bacterial cultures and plasmid DNA exposed to infrared *laser* for treatment of pain. **Laser Physics Letters**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.1-8, 8 maio 2013.

CANUTO, K.S. *et al.* Low-level *lasers* affect uncoupling protein gene expression in skin and skeletal muscle tissues. **Laser Physics**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.1-6, 11 fev. 2016.

CARROLL, A.M. *et al.* Identification of a Functioning Mitochondrial Uncoupling Protein 1 in Thymus. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, n. 16, p.15534-15543, 28 jan. 2005.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, [s.l.], v. 136, n. 4, p.642-655, fev. 2009.

CHOUDHURI, S. Small noncoding RNAs: Biogenesis, function, and emerging significance in toxicology. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.195-216, 8 fev. 2010

CHU, A.C.Y. *et al.* Mitochondrial UCP4 attenuates MPP⁺- and dopamine-induced oxidative stress, mitochondrial depolarization, and ATP deficiency in neurons and is interlinked with UCP2 expression. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.810-820, mar. 2009.

CIPOLLA, G.A. Análise de expressão de MicroRNA candidatos à regulação da resposta imune adaptativa em pênfigo foliáceo. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DONADELLI, M. *et al.* UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 71, n. 7, p.1171-1190, 27 jun. 2013.

DYSON, M. Primary, secondary, and tertiary effects of phototherapy: a review. **Proc. of Spie**, [s.l.], v. 6140, p.1-12, 9 fev. 2006.

EINSTEIN A. Zur Quantentheorie der Strahlung. **Physiol Z.** [s.l.], p. 121-128. 1917.

FELICE, E. Shedding light: *laser* physics and mechanism of action. **Phlebology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.11-28, 29 jan. 2010.

FONSECA, A.S. *et al.* DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared *laser*. **Lasers in Medical Science**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.1077-1084, 2 set. 2012.

FRIEDMAN, R.C. *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.92-105, 29 out. 2008.

FUJIMOTO, T. *et al.* Induction of different reactive oxygen species in the skin during various *laser* therapies and their inhibition by fullerene. ***Lasers in Surgery and Medicine***, [s.l.], v. 44, n. 8, p.685-694, 16 ago. 2012.

GAO, C.L. *et al.* UCP4 overexpression improves fatty acid oxidation and insulin sensitivity in L6 myocytes. ***Journal of Bioenergetics and Biomembranes***, [s.l.], v. 43, n. 2, p.109-118, abr. 2011.

GOLDBERG, D. ***Laser Dermatology***. 2. ed. Nova Iorque: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2013. 142 p.

GROSS, A.J.; HERRMANN, T. R. W. History of *lasers*. ***World Journal of Urology***, [s.l.], v. 25, n. 3, p.217-220, 13 jun. 2007.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. *Laser*. In: **Fisioterapia dermatofuncional: fundamentos - recursos - patologias**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 209-222.

HAWKING, S.W; PENROSE, R. The singularities of gravitational collapse and cosmology. ***Proceedings of The Royal Society of London. Series a Mathematical and Physical Sciences***, [s.l.], v. 314, p.529-548, 1970

HO, P.W. *et al.* Knockdown of uncoupling protein-5 in neuronal SH-SY5Y cells: Effects on MPP+-induced mitochondrial membrane depolarization, ATP deficiency, and oxidative cytotoxicity. ***Journal of Neuroscience Research***, [s.l.], v. 84, n. 6, p.1358-1366, 2006.

HO, P.W. *et al.* Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. ***Translational Neurodegeneration***, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-9, 2012.

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

HUYGENS, Christian. ***Traité de la lumière***. Paris: Gauthier-villars Et Cie, 1920. 155 p.

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

KARU, T. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. ***Iubmb Life***, [s.l.], v. 62, n. 8, p.607-610, 28 jul. 2010.

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

KARU, T. **The science of low-power laser therapy**. Londres: Gordon and Breach, 1998.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N.I. Cellular effects of low power *laser* therapy can be mediated by nitric oxide. ***Lasers in Surgery and Medicine***, [s.l.], v. 36, n. 4, p.307-314, 2005.

KIM, V.N.; HAN, J.; SIOMI, M.C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.126-139, fev. 2009.

KIM, Y.S. *Laser Mediated Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species; Implications for Therapy*. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 36, n. 12, p.1243-1250, jan. 2002.

KNEEBONE, W.J. Basic Principles of Low-Level *Laser* Therapy and Clinical Applications for Pain Relief. **Dynamic Chiropractic**, [s.l.], v. 34, n. 18, p.1-7, ago. 2007.

KRAUSS, S.; ZHANG, CY; LOWELL, B.B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.248-261, mar. 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LEE, F.Y.J. *et al.* Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating rat liver. **Hepatology**, [s.l.], v. 29, n. 3, p.677-687, mar. 1999.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.843-854, dez. 1993.

LI, N. *et al.* MicroRNA-106b targets FUT6 to promote cell migration, invasion, and proliferation in human breast cancer. **Iubmb Life**, [s.l.], v. 68, n. 9, p.764-775, 13 ago. 2016.

LIU, D. *et al.* Mitochondrial UCP4 Mediates an Adaptive Shift in Energy Metabolism and Increases the Resistance of Neurons to Metabolic and Oxidative Stress. **Neuromolecular Medicine**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.389-414, 2006.

LIZARELLI, R.F.Z. **Protocolos clínicos odontológicos**. 4. ed. São Carlos: Mm Optics Ltda, 2010. 87 p.

MAIMAN, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**, [s.l.], v. 187, n. 4736, p.493-494, ago. 1960.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne *laser*: Appearance of giant mitochondria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.25-30, mar. 1997.

MEHTA, S.L; LI, P.A. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.1069-1078, 25 fev. 2009.

MEYER-ROCHOW, G.Y. *et al.* MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets. **Endocrine Related Cancer**, Woodlands, v. 17, n. 3, p.835-846, 9 jul. 2010.

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

MOLLER, K.I. *et al.* How Finsen's light cured lupus vulgaris. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.118-124, jun. 2005.

MOUAFFAK, F. *et al.* Association of an UCP4 (SLC25A27) haplotype with ultra-resistant schizophrenia. **Pharmacogenomics**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.185-193, fev. 2011.

NAKANO, J. *et al.* Low-level *laser* irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. **Experimental Physiology**, [s.l.], v. 94, n. 9, p.1005-1015, 14 ago. 2009.

NAKASE, T.; YOSHIDA, Y.; NAGATA, K. Amplified expression of uncoupling proteins in human brain ischemic lesions. **Neuropathology**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.442-447, out. 2007.

NEWTON, I. **Opticks: or, A treatise of the reflections, refractions, inflexions and colours of light. Also, two treatises of the species and magnitude of curvilinear figures.** Londres: Printed for Sam Smith, And Benj. Walford, Printers to The Royal Society, At The Prince's Arms In St. Paul's Church-yard, 1704. 416 p.

NIBBELINK, M. *et al.* Brown Fat UCP1 Is Specifically Expressed in Uterine Longitudinal Smooth Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 276, n. 50, p.47291-47295, 25 set. 2001.

NICHOLLS, D.G. A history of UCP1. **Biochem Soc Trans**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.751-755, nov. 2001.

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

NOURI, K. **Lasers in Dermatology and Medicine.** [s.i.]: Springer-verlag London, 2012. 626 p.

OBERNOSTERER, G. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. **RNA**, [s.l.], v. 12, n. 7, p.1161-1167, 18 maio 2006.

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

PAN, S. *et al.* Tumor Invasion and Metastasis Initiated by mir-106b in Breast Cancer by Targeting BRMS1 and RB. **Cancer Research**, Baltimore, v. 69, n. 24, p.6157-6157, dez 2009.

PARKER, S. Verifiable CPD paper: Introduction, history of *lasers* and *laser* light production. **Bdj**, [s.l.], v. 202, n. 1, p.21-31, 13 jan. 2007.

PATIL, U.A.; DHAMI, L.D. Overview of *lasers*. **Indian J Plast Surg**, [s.l.], v. 41, p.S101-S113, out. 2008.

PECQUEUR, C. *et al.* Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.9-18, 28 ago. 2007.

PEREIRA, T.C. (Org.). **Introdução ao mundo dos microRNAs**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 342 p.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 345, n. 2, p.161-179, 15 jan. 2000.

SANCHEZ-ALVAREZ, R. *et al.* Mitochondrial dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 12, n. 1, p.172-182, jan. 2013.

SINGH, R; MO, YY. Role of microRNAs in breast cancer. **Cancer Biol Ther**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.201-212, mar. 2013.

SKULACHEV, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1363, n. 2, p.100-124, fev. 1998.

SUN, L.L. *et al.* MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.94-100, jan. 2011.

SVELTO, O. **Principles of Lasers**. 5. ed. Nova Iorque: Springer Us, 2010. 620 p.

SZOLNOKI, Z. *et al.* A Homozygous Genetic Variant of Mitochondrial Uncoupling Protein 4 Exerts Protection Against the Occurrence of Multiple Sclerosis. **Neuromolecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.101-105, jun. 2009.

TAYLOR, N. **Laser: the inventor, the Nobel laureate, and the thirty-year patent war**. Nova Iorque: New York : Simon & Schuster, 2000. 304 p.

TOWNES, C.H. **Making Waves**. Nova Iorque: American Institute of Physics, 1995. 224 p.

TRAJANO, E.T.L. *et al.* Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers in Medical Science**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.1297-1304, 7 mar. 2015.

TRENKER, M. *et al.* Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport. **Nature Cell Biology**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.445-452, 11 mar. 2007.

WEI, Z. *et al.* The Brain Uncoupling Protein UCP4 Attenuates Mitochondrial Toxin-Induced Cell Death: Role of Extracellular Signal-Regulated Kinases in Bioenergetics Adaptation and Cell Survival. **Neurotoxicity Research**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.14-29, 25 mar. 2009.

YU, G. *et al.* Dynamic regulation of uncoupling protein 2 expression by microRNA-214 in hepatocellular carcinoma. **Bioscience Reports**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.00335-00335, 8 abr. 2016.

YU, Z. *et al.* MicroRNA, Cell Cycle, and Human Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, [s.l.], v. 176, n. 3, p.1058-1064, mar. 2010.

APÊNDICE – Low-level lasers affect uncoupling protein gene expression in skin and skeletal muscle tissues

Low-level lasers affect uncoupling protein gene expression in skin and skeletal muscle tissues

K S Canuto¹, L P S Sergio¹, F Paoli², A L Mencalha¹ and A S Fonseca^{1,3,4}

¹ Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Boulevard Vinte e Oito de Setembro, 87 fundos, 4º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, 20551030, Brazil

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

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

⁴ Centro de Ciências da Saúde, Centro Universitário Serra dos Órgãos, Avenida Alberto Torres, 111, Teresópolis, Rio de Janeiro, 25964004, Brazil

E-mail: adnfonseca@ig.com.br

Received 2 November 2015

Accepted for publication 29 November 2015

Published 11 February 2016



Abstract

Wavelength, frequency, power, fluence, and emission mode determine the photophysical, photochemical, and photobiological responses of biological tissues to low-level lasers. Free radicals are involved in these responses acting as second messengers in intracellular signaling processes. Irradiated cells present defenses against these chemical species to avoid unwanted effects, such as uncoupling proteins (UCPs), which are part of protective mechanisms and minimize the effects of free radical generation in mitochondria. In this work UCP2 and UCP3 mRNA gene relative expression in the skin and skeletal muscle tissues of Wistar rats exposed to low-level red and infrared lasers was evaluated. Samples of the skin and skeletal muscle tissue of Wistar rats exposed to low-level red and infrared lasers were withdrawn for total RNA extraction, cDNA synthesis, and the evaluation of gene expression by quantitative polymerase chain reaction. UCP2 and UCP3 mRNA expression was differently altered in skin and skeletal muscle tissues exposed to lasers in a wavelength-dependent effect, with the UCP3 mRNA expression dose-dependent. Alteration on UCP gene expression could be part of the biostimulation effect and is necessary to make cells exposed to red and infrared low-level lasers more resistant or capable of adapting in damaged tissues or diseases.

Keywords: biostimulation, free radicals, gene expression, uncoupling proteins, *Wistar* rats

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

1. Introduction

Light therapy is one of the oldest therapeutic methods used by humans [1]. Lasers (light amplification by the stimulated emission of radiation) devices have particular characteristics emitting monochromatic, coherent, and highly collimated intense beams of light [2] that are useful in several clinical procedures. These devices can be distinguished by the

wavelength, frequency, power, fluence, and emission mode [3]. These properties are important for determining photophysical, photochemical, and photobiological responses [1].

A number of clinical protocols based on low-level lasers have been used to treat several diseases in skin and skeletal muscle tissue [4]. The excitation of endogenous chromophores due to the absorption of visible or infrared laser radiation at low fluences leads to the biostimulation effect in biological

tissues [5]. The effects of low-level lasers have been associated with modification to the cellular metabolism, and increasing DNA and protein synthesis [1]. These cellular effects not only depend on laser beam physical parameters (wavelength, emission mode, power, and fluence), they also depend on the physiological conditions of irradiated cells and tissue [6, 7].

Recently, free radicals (reactive oxygen and nitrogen species, for example) have been suggested as being involved in the biological effects of low-level lasers acting as second messengers in intracellular signaling processes [8]. However, free radicals can react with biomolecules causing function modifications and cellular effects [9]. Laser-induced free radicals could unbalance cellular defenses against these chemical species causing unwanted effects in irradiated tissues by the alteration of biomolecular functions, such as DNA [8, 10]. This has been reported in eukaryotic cells [11–15] for lasers of different powers, wavelengths, and fluences. Thus, biological systems must have protection systems against damage caused by free radicals.

UCP (uncoupling proteins) belong to a superfamily of mitochondrial transporters and their activity is proposed as a protective mechanism to minimize the effects of reactive oxygen species during the oxidative phosphorylation process [16]. Mitochondria are the source of power in eukaryotic cells by controlling substrate degradation and high-yield adenosine triphosphate (ATP) production, a process known as oxidative phosphorylation [17]. Five uncoupling proteins have been described in mammal cells [17]. Uncoupling protein 1 (UCP1) is known as being the key component of β -adrenergically controlled nonshivering thermogenesis in brown adipocytes [18]. Uncoupling protein 2 (UCP2) is expressed at many levels in different tissues [16], and its regulation plays a key role in several physiologic or pathologic events, dissipating the proton gradient, in order to decrease reactive oxygen species produced by electron transport [17]. Uncoupling protein 3 (UCP3) is expressed in skeletal muscle and the heart [19, 20] and it is possible that it plays a key role in restricting the production of ATP [21]. Uncoupling protein 4 (UCP4) and Uncoupling protein 5 (UCP5) are expressed in neural tissues [16] involved in mitochondrial membrane potential reduction [22].

Despite low-level laser therapies being based on the biostimulatory effect, which could induce the alteration of mitochondrial free radical generation, there are no studies evaluating the protective or adaptive mechanisms to cells resist to these chemical species, mainly in mitochondria. Thus, in this work UCP2 and UCP3 mRNA gene relative expression was evaluated in the skin and skeletal muscle tissues of Wistar rats exposed to low-level red and infrared lasers.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (body weight 250–300 g and 3–4 months of age) were maintained in a controlled environment. They were housed, six per cage, in 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 24 ± 2 °C. The experiments were conducted in accordance with the Institute Committee of Animal Care (Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro), protocol CEUA/038/2012.

2.2. Low-level lasers

The experimental procedure utilized therapeutic low-level red (660 nm) and infrared (808 nm) lasers (Photon Laser III, AlGaInP, and GaAlAs, respectively), purchased from DMC Equipamentos Ltd (São Paulo, Brazil).

2.3. Reagents

The TRIzol[®] reagent was from Invitrogen (USA); the isopropanol, chloroform, and ethanol were from Merck (Germany); and the diethyl pyrocarbonate (DEPC) was from Sigma (USA).

2.4. Animal experimental procedure

The animals ($n = 4$, for each control and treatments) were anesthetized (sodium pentobarbital 65 mg kg⁻¹, body weight) and trichotomy was carried out on a 4 cm² area of skin. After that, a 1 cm² area on each hind leg was exposed to low-level red and infrared lasers at different fluences (25, 50 and 100 J cm⁻²) in a continuous wave (power of 100 mW), with the laser source at the skin surface. The animals were euthanized 24 h after laser exposure; the samples (50 to 100 mg) of skin and skeletal muscle tissues exposed to lasers were collected and transferred to microcentrifuge flex tubes with the TRIzol[®] reagent for total RNA extraction by standard procedure. The time after laser exposure (24 h) was chosen based on previous studies performed in our laboratory.

2.5. Total RNA extraction

The tissue samples were crushed into microcentrifuge flex tubes with the TRIzol[®] reagent and centrifuged (12,000 g, 4 °C, 10 min). The supernatants were transferred to other tubes, chloroform was added, the mixtures were centrifuged (12,000 g, 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 (12,000 g, 4 °C, 10 min), the supernatants were discarded, and the precipitate was washed with ethanol-DEPC (80%–0.1%) solution and centrifuged. The supernatants were withdrawn, total RNA was reconstituted in DEPC 0.1% solution, and the mixture was stored (–80 °C).

2.6. Complementary DNA synthesis

The RNA concentration and purity were determined on a spectrophotometer by calculating the optical density ratio at a 260 nm/280 nm wavelength ratio. Complementary DNA

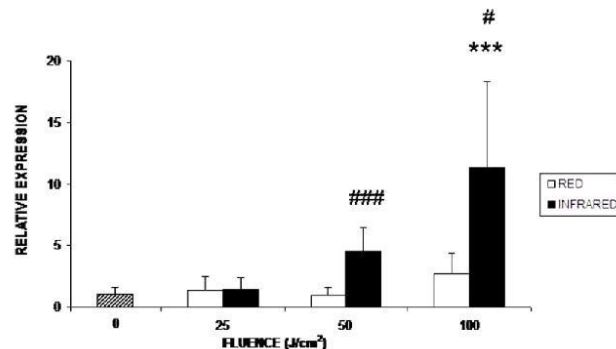


Figure 1. UCP2 mRNA relative expression in skin after exposure to low-level red and infrared lasers at different fluences. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (***) $p < 0.001$ when compared with the control group. (###) $p < 0.001$ when comparing the infrared laser group with the red laser group. (#) $p < 0.05$ when comparing the infrared laser group with the red laser group.

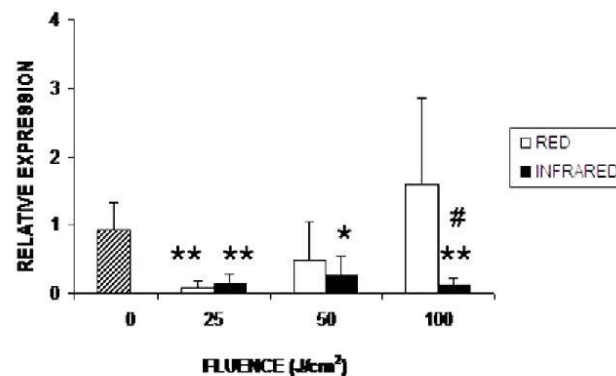


Figure 2. UCP3 mRNA relative expression in skin after exposure to low-level red and infrared lasers at different fluences. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (**) $p < 0.01$ when compared with the control group. (*) $p < 0.05$ when compared with the control group. (#) $p < 0.5$ when comparing the infrared laser group with the red laser group.

(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 total 20 μ l reaction. A real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed using 5 μ l of GoTaq qPCR Master Mix (Promega, USA) for a final volume of 10 μ l volume containing 50ng of cDNA. In order to determine the initial relative cDNA quantity, the samples were amplified with uncoupling protein 2 (UCP2), uncoupling protein 3 (UCP3), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers. The reactions were run on an Applied Biosystems 7500 RT-qPCR machine (Applied Biosystems, USA), in duplicate for each sample. The mixtures were initially denatured at 94 °C for 10 min. The PCR consisted of 40 cycles in 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 analysis was performed for all the genes, and PCR product specificity, as well as integrity, were

confirmed by the presence of a single peak. The relative expression was normalized by reference gene levels (GAPDHs), using non-exposed rats as a control group. The duplicate CT values were analyzed in Microsoft Excel (Microsoft) using the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method [23].

2.7. Statistical analysis

The data are reported as a means $\pm$ standard deviation. A one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed to determine possible statistical differences with $p < 0.05$ as the least significant level. Test t was performed to compare the infrared laser with the red laser groups and a Bonferroni post-test was performed to make a comparison between the groups with control group InStat Graphpad software was used to perform statistical analysis (GraphPad InStat version 5.0 for Windows 8, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

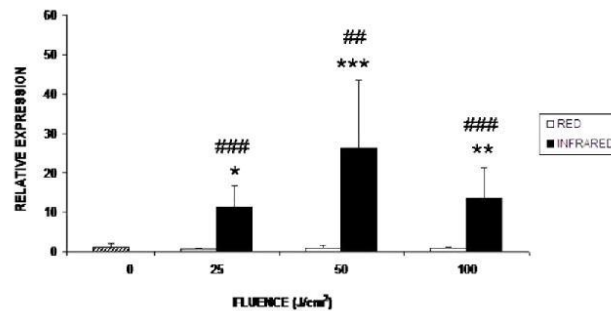


Figure 3. UCP2 mRNA relative expression in skeletal muscle tissue after exposure to low-level red and infrared lasers at different fluences. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (***) $p < 0.001$ when compared with the control group, (**) $p < 0.01$ when compared with the control group, (*) $p < 0.05$ when compared with the control group, (###) $p < 0.001$ when comparing the infrared laser group with the red laser group, (##) $p < 0.01$ when comparing the infrared laser group with the red laser group.

3. Results

3.1. Effects of low-level laser exposure on UCP2 and UCP3 mRNA expression in skin

Figure 1 shows the UCP2 mRNA relative expression in skin exposed to low-level red and infrared lasers at different fluences (25, 50 and 100 J cm⁻²). The data in this figure show that for the infrared laser, the UCP2 mRNA expression increases at a higher fluence (100 J cm⁻²). No significant ($p > 0.05$) alteration of UCP2 mRNA expression was verified in skin after exposure to a low-level red laser, but the relative expressions are significantly ($p < 0.05$) different in skin exposed to red and infrared lasers at the highest fluences (50 and 100 J cm⁻²).

Different from the results obtained with UCP2, the UCP3 mRNA relative expression in skin significantly ($p < 0.05$) decreased in skin exposed to a low-level infrared laser (figure 2). Also, exposure to a red laser at a lower dose (25 J cm⁻²) decreased the UCP3 mRNA relative expression and, at a higher fluence the relative expression of this mRNA was significantly ($p < 0.05$) different in skin exposed to red and infrared lasers.

3.2. Effects of low-level laser exposure on UCP2 and UCP3 mRNA expression in skeletal muscle tissue

The data in figure 3 show the UCP2 mRNA relative expression in skeletal muscle tissue exposed to low-level red and infrared lasers at different fluences. No significant alterations were verified in the UCP2 mRNA expression in muscle tissue exposed to a red laser, but in muscle tissue exposed to a infrared laser a significant ($p < 0.05$) increase in the UCP2 mRNA expression was observed at all the evaluated laser fluences. The UCP2 mRNA relative expression was significantly ($p < 0.01$) different when comparing the skeletal muscle exposed to a red laser with the skeletal muscle exposed to an infrared laser.

Nonetheless, for the UCP3 mRNA relative expression in skeletal muscle tissue, the data show that the expression significantly ($p < 0.001$) increased at a higher fluence for the red laser. For the infrared laser, a significant ($p < 0.05$) increase

in UCP3 mRNA relative expression was obtained in skeletal muscle tissue after laser exposure at all fluences. Also, the UCP3 mRNA relative expression was significantly ($p < 0.05$) different in skeletal muscle exposed to a red laser when compared to skeletal muscle exposed to an infrared laser at all the evaluated fluences.

4. Discussion

Mitochondria are considered as the initial site of low-level laser actions in cells due to cytochrome *c* oxidase absorbing these radiations [1, 24]. Cu_A, Cu_B, and mixed-valence copper components of cytochrome *c* oxidase are photoacceptors (chromophores), and part of the versatility of low-level lasers inducing biological effects could be explained by the same photoacceptor being involved in different cellular responses [25].

Although UCP3 shares 72% homology with UCP2 [21], they present a particular expression in different tissues. The uncoupling of respiration and the dissipation of heat are important keys to energy balance [21]. When a stimulus occurs to a UCP, energy is not taken to the phosphorylation of the ADP, and heat is generated [26, 27]. Also, UCPs are involved in other cellular processes such as mitochondrial free radical production [28].

An important function of a UCP is to be part of the limitation of reactive oxygen species (ROS) synthesis; these proteins increase the proportion of electron transfer and stimulate O₂ consumption, thus inhibiting reactive oxygen species production [27]. As ROS are able to damage DNA, this uncoupling could protect cells exposed to low-level lasers against the toxicity of these chemical species.

Our findings suggest that UCP2 and UCP3 mRNA expression could be altered in different tissues exposed to low-level red and infrared lasers. In skin, UCP2 mRNA expression is increased after exposure to an infrared laser (808 nm) but no alteration occurs after exposure to a red laser (660 nm) (figure 1). Also, UCP2 mRNA expression does not alter in skeletal muscle after exposure to a red laser, but infrared laser exposure alters the expression of this mRNA, including at a lower

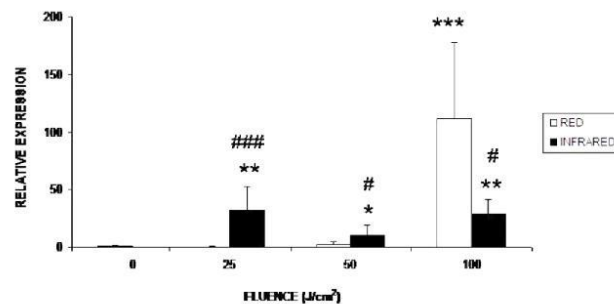


Figure 4. UCP3 mRNA relative expression in skeletal muscle tissue after exposure to low-level red and infrared lasers at different fluences. GAPDH was used as the internal standard for normalization. (***) $p < 0.001$ when compared with the control group, (**) $p < 0.01$ when compared with the control group, (*) $p < 0.05$ when compared with the control group, (###) $p < 0.001$ when comparing the infrared laser group with the red laser group, (#) $p < 0.05$ when comparing the infrared laser group with the red laser group.

fluence (figure 3). The effects of infrared lasers could be better in deeper tissues, such as skeletal muscles [29], and this could explain the higher UCP mRNA expression after irradiation with an infrared laser than that obtained with a red laser. These results suggest a wavelength-dependent effect on UCP2 mRNA expression. Previous studies showed that exposure to infrared lasers at low fluences can increase mitochondrial metabolism and mitochondrial free radical production [30]. This could explain the increase in UCP2 in both muscle and skin after exposure to an infrared laser. Figure 2 shows that in skin tissue UCP3 mRNA expression decreases after exposure to an infrared laser, as well as after exposure to a red laser at a lower fluence (25 J cm^{-2}). However, UCP3 mRNA expression in muscle tissue (figure 4) increases after all fluences of an infrared laser, as well as after exposure to a red laser at a higher fluence. The better absorbance of infrared radiation in muscle tissue could explain the increase in UCP3 mRNA expression in skeletal muscle, as obtained with UCP2 (figure 3). These results could also reinforce low-level lasers affecting differently the expression of genes related to the control of ATP and ROS levels in mitochondria.

On the other hand, despite the fact that the UCP2 gene is expressed throughout the body, it is not uniformly expressed in the organs [21]. Also, the UCP3 gene is expressed differently in skeletal muscle and the heart (20). Skin and skeletal muscle tissue could present specific photoacceptors that improve infrared radiation absorption and free radical generation, which could alter UCP mRNA expression. Usually, uncoupling leads to oxygen consumption by state 4 mitochondria, which suppresses the formation of O_2 [31]. The high production of ROS can damage mitochondrial DNA and proteins, the peroxidation of phospholipids, and induce transcriptional factors [21, 32]. Thus, the alteration of UCP gene expression could be a part of cell adaptive/protective responses induced by low-level laser radiation, rendering cells capable of survival in adverse environments or stressful conditions, such as those in damaged tissues. In fact, previous studies have demonstrated that exposure to low-level lasers increases the survival of bacterial cultures in stationary growth phase, but not in an exponential growth phase depending on DNA repair

mechanisms [33]. In addition, the expression of DNA repair genes in damaged skin is dependent on the repair phase of tissue repair [34].

5. Conclusions

The data show that UCP2 and UCP3 mRNA expression is differently altered in skin and skeletal muscle tissue exposed to lasers. Both UCP2 and UCP3 mRNA expression is wavelength dependent, but UCP3 mRNA expression could also be dose dependent for an infrared laser. The alteration of UCP gene expression could be a part of the biostimulation effect and is necessary to make cells exposed to red and infrared low-level lasers more resistant to or capable of adapting in damaged tissues or diseases.

Acknowledgments

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

References

- [1] Karu T 2003 Low power laser therapy *Biomedical Photonics Handbook* ed T Vo-Dinh (Boca Raton, FL: CRC Press)
- [2] O'Shea D C, Callen W R and Rhodes W T 1978 *Introduction to Lasers and Their Applications* (Menlo Park, CA: Addison-Wesley)
- [3] Niemi M H 2007 *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications* (New York: Springer)
- [4] Reddy G K 2004 *J. Clin. Laser Med. Surg.* **22** 141–50
- [5] Peplow P V, Chung T Y and Baxter G D 2010 *Photomed. Laser Surg.* **8** 291–325
- [6] Huang T H, Lu Y C and Kao C T 2012 *Lasers Med. Sci.* **3** 612–7
- [7] Fonseca A S, Mencia 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.* **4** 1077–84

- [8] Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M and Renò F 2014 *Lasers Med. Sci.* **29** 1463–7
- [9] Kim Y G 2002 *Free Radic. Res.* **36** 1243–50
- [10] Fujimoto T, Ito S, Ito M and Kanazawa H 2012 *Lasers Surg. Med.* **8** 685–94
- [11] Hawkins D and Abrahamse H 2005 *Photomed. Laser Surg.* **23** 251–9
- [12] Godon C, Cordelières F P, Biard D, Giocanti N, Mégnin-Chanet F, Hall J and Favaudon V 2008 *Nucleic Acids Res.* **36** 4454–64
- [13] Kong X, Mohanty S K, Stephens J, Heale J T, Gomez-Godinez V, Shi L Z, Kim J S, Yokomori K and Berns M W 2009 *Nucleic Acids Res.* **37** e68
- [14] Mbene A B, Houreld N N and Abrahamse H J 2009 *J. Photochem. Photobiol. B* **94** 131–7
- [15] Li S D, Chen P, Zhang C P, Wen J X, Liang J, Kang H X, Gao R L and Fu X B 2011 *Laser Phys.* **21** 1989–94
- [16] Ho P W L, Ho J W, Liu H F, So D H, Tse Z H, Chan K H, Ramsden D B and Ho S L 2012 *Transl. Neurodegener.* **13** 3
- [17] Donadelli M, Dando I, Fiorini C and Pamieri M 2014 *Cell. Mol. Life Sci.* **71** 1171–90
- [18] Fromme T and Klingenspor M 2011 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300** R1–8
- [19] Hesselink M K and Schrauwen P 2005 *Horm. Metab. Res.* **37** 550–4
- [20] Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P and Giacobino J P 1997 *FEBS Lett.* **408** 39–42
- [21] Ricquier D and Bouillaud F 2000 *Biochem. J.* **345** 161–79
- [22] Yu X X, Barger J L, Boyer B B, Brand M D, Pan G and Adams S H 2000 *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279** E433–46
- [23] Livak K J and Schmittgen T D 2001 *Method. Methods* **25** 402–8
- [24] Kim H P 2014 *Biomol. Ther. (seoul)* **22** 491–6
- [25] Tiina K 2010 *Photomed. Laser Surg.* **28** 159–60
- [26] Boschini R P and Garcia J J R 2005 *Rev. Nutr.* **6** 753–64
- [27] Ricquier D, Bouillaud F 2000 *J. Physiol.* **529** 3–10
- [28] Michael T, Roland M, Ismene F, Sanja L F and Wolfgang F G 2007 *Nat. Cell Biol.* **9** 445–52
- [29] Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Okita M and Yoshimura T 2009 *Exp. Physiol.* **94** 1005–15
- [30] Manteifel V, Bakeeva L and Karu T 1997 *J. Photochem. Photobiol. B* **38** 25–30
- [31] Skulachev V P 1998 *Biochim. Biophys. Acta* **1363** 100–24
- [32] Lee F Y, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin H Z, Trush M and Diehl A M 1999 *Hepatology* **29** 677–87
- [33] Canuto K S, Sergio L P S, Guimarães O R, Polignano G A C, Geller M, Paoli F and Fonseca A S 2013 *Laser Phys. Lett.* **10** 065606
- [34] Trajano E T, da Trajano L A, Dos Santos Silva M A, Venter N G, de Porto L C, Fonseca A S and Monte-Alto-Costa A 2015 *Lasers Med. Sci.* **30** 1297–304