

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Magda Patrícia Furlanetto

**Avaliação do potencial genotóxico
e da citotoxicidade da terapia de
fotobiomodulação em modelos
experimentais**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2017

Magda Patrícia Furlanetto

Avaliação do potencial genotóxico e da citotoxicidade da terapia de fotobiomodulação em modelos experimentais

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Ciências da Saúde de
Porto Alegre como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Della Méa Plentz

Coorientadora: Dra. Ivana Grivicich

Porto Alegre

2017

Catálogo na Publicação

Furlanetto, Magda Patrícia

Avaliação do potencial genotóxico e da citotoxicidade da terapia de fotobiomodulação em modelos experimentais / Magda Patrícia Furlanetto. -- 2017.

86 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Rodrigo Della Múa Plentz ;
coorientador(a): Ivana Grivicich.

1. Laser. 2. Genotoxicidade. 3. Citotoxicidade. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo Della M a Plentz

pela oportunidade, orientação, amizade e confiança: muito obrigada!

A Dra. Ivana Grivicich e ao Dr. Rafael Dihl

por serem exemplos de  tica e de profissionalismo: palavra alguma é capaz de expressar meu agradecimento.

A UFCSPA e aos professores do PPGCS

pela estrutura disponibilizada e pelo aprendizado.

A ULBRA e aos amigos do Laboratório de Toxicidade Genética

sem vocês nada disso seria possível.

  Matheus Mocelin Carvalho,

meu genial e amado primo, *“my native speaker”*, por toda ajuda com os artigos em inglês: minha gratidão para sempre!

Aos amigos do laboratório de anatomia

Obrigada pelo apoio nos “bastidores”.

  família e aos amigos

por entenderem a minha constante ausência.

  Léo Doncatto

por me apoiar incondicionalmente.

Aos meus pais, Quintino e Maria,

por serem os melhores e maiores exemplos da minha vida.

A Minha filha, Du,

por ser a principal razão que me faz sempre querer ser uma pessoa melhor.

RESUMO

A terapia de fotobiomodulação (FBM), também conhecida como Laser de Baixa Intensidade (LBI), tem sido estudada principalmente por seus efeitos na reparação, regeneração e cicatrização tecidual, ou seja, devido a sua ação direta e indireta sobre a capacidade proliferativa celular. A literatura, no entanto, tem se mostrado bastante contraditória sob vários aspectos associados ao uso dessa terapia, mostrando divergências nos resultados de acordo com os diferentes tipos de LBI, doses irradiadas, modos de tratamento, bem como relacionadas às condições do tecido e às características genéticas. É necessário, portanto, considerar o modo de ação pelo qual o LBI age e, igualmente, seus efeitos na reparação tecidual, ou seja, se sua atuação direta sobre a proliferação pode ou não afetar a viabilidade celular, a taxa de mutação espontânea e de recombinação mitótica tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos da irradiação com LBI em fluências geralmente utilizadas na prática clínica. Foram realizados os testes Cometa (660 nm and 904 nm) e SMART (904 nm) para detecção de dano ao DNA e o teste colorimétrico MTT (660 nm e 904 nm) para avaliação da viabilidade celular. A linhagem celular murina NIH-3T3 e o organismo experimental *Drosophila melanogaster* foram expostos a diferentes fluências (3, 5, 10 e 20 J/cm²) e comparados aos respectivos controles. Para detecção de dano, em ambos experimentos, os modelos experimentais receberam apenas uma irradiação enquanto, no teste de viabilidade, foram realizadas até três exposições ao LBI no período de 3 dias, com intervalo de 24 horas. Foram utilizados Lasers vermelho (660 nm, 20 mW, onda contínua, tamanho de ponto 0,035 cm², diâmetro 2,2 mm) e infravermelho (904 nm, 50 mW, modo pulsado, tamanho de ponto 0,01 cm², diâmetro 1,2 mm). Todos os modelos experimentais foram irradiados com sonda LBI em varredura, mantendo um ângulo de 90° e uma distância focal de 0,5 cm. No teste MTT, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular, e o LBI não produziu efeitos genotóxicos consideráveis nos parâmetros utilizados para o teste Cometa. Em relação ao teste SMART, foi demonstrado que três, das quatro doses de Laser testadas, induziram danos genéticos. Esses resultados demonstraram que o LBI, nos parâmetros 660 nm e 904 nm, utilizados em fluências de 3, 5, 10 e 20 J/cm², não apresentou efeitos citotóxicos ou outros relacionados a danos genéticos nos testes de viabilidade celular MTT e Cometa, respectivamente. Já no teste SMART, por meio da análise quantitativa e qualitativa da expressão de pêlos mutantes, foi possível verificar a presença de eventos mutagênicos, tanto pontuais quanto cromossômicos, bem como aqueles relacionados à recombinação mitótica nas doses de 5, 10 e 20 J/cm²; além disso, os resultados apontam para um efeito dose-resposta. Conclusão: A radiação a laser foi capaz de induzir um incremento em mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* que apresentou um efeito de dose/resposta. Estes resultados apontam para a necessidade de se avaliar os danos do Laser através de diferentes bioensaios. O LBI nos parâmetros utilizados não apresentaram efeitos citotóxicos ou relacionados a danos genéticos nos testes de viabilidade celular MTT e Cometa, respectivamente. Pesquisas clínicas devem ser realizadas a fim de corroborar ou não os resultados encontrados.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, Laser, SMART, teste Cometa, MTT.

ABSTRACT

Photobiomodulation therapy (PBM), also known as Low Level Laser Therapy (LLLT), has been studied mainly for its effects on repair, regeneration and tissue healing, and this is due to its direct and indirect action on cellular proliferative capacity. The literature, however, has been quite contradictory on several aspects associated with the use of this therapy, showing divergence of the results according to the different types of LLLT, irradiated doses, treatment methods, such as the conditions of the tissue and genetic characteristics. Therefore, it is necessary to consider the mechanism of action by which LLLT acts and also by its effects on tissue repair, that is whether its direct action on proliferation may affect the viability, the rate of spontaneous mutation and mitotic recombination, both *in vivo* and *in vitro*. The objective of this study was to evaluate the possible cytotoxic and genotoxic effects of LLLT irradiation in fluences commonly used in clinical practice. Cometa (660 nm and 904 nm) and SMART (904 nm) tests were used to detect DNA damage and the MTT colorimetric assay (660 nm and 904 nm) were performed to evaluate cell viability. Mouse cell line NIH-3T3 and experimental models *Drosophila melanogaster* were exposed to different fluences (3, 5, 10 and 20 J/cm²) and compared to the respective controls. For detection of damage, in both experiments, the experimental organisms received only one irradiation, while in the viability test up to three exposures to the LLLT were performed in the 3-day period, with a 24-hour interval. Therapeutic low-level red (660 nm, 20 mW, continuous wave, dot size 0.035 cm², diameter 2.2 mm) and infrared (904 nm, 50 mW, pulsed mode, spot size 0.01cm², diameter 1.1 mm) lasers were used in this study. The focal point of the probe was 0.5cm at an angle of 90° by scanning. In the MTT test, no significant differences in cell viability were observed and LLLT did not produce considerable genotoxic effects in the parameters used for the Cometa test. Regarding the SMART test, three of the four doses of Laser tested were shown to induce genetic damage. These results demonstrated that LLLT, in the parameters 660 nm and 904 nm, used in fluences of 3, 5, 10 and 20 J/cm², did not present cytotoxic or genetic damage related effects in the cell viability test and Cometa, respectively. In SMART test, through the quantitative and qualitative analysis of mutant hair expression, it was possible to verify the presence of mutagenic events, both punctual and chromosomal, as well as those related to mitotic recombination at doses of 5, 10 and 20 J/cm² and, in addition, the results indicate a dose/response effect. Conclusion: Laser irradiation was able to induce an increase mutation and somatic recombination in *Drosophila melanogaster* presented a dose/response effect. These results show the importance to evaluate the laser damage through different bioassays. The LLLT in the parameters used did not present cytotoxic or genetic damage related effects in the cell viability tests MTT and Cometa, respectively. Clinical research should be performed to corroborate or not the results found.

Keywords: Photobiomodulation, Laser, SMART, Comet assay, MTT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Espectro de radiações e eletromagnéticas e respectivos comprimentos de onda do Laser de Baixa Intensidade.....	15
Figura 2 -	Profundidade de penetração dos comprimentos de onda de Laser de Baixa Intensidade na pele.....	16
Figura 3 -	Esquema representativo das células-alvo do Teste SMART de Asa.....	28
Figura 4 -	Esquema demonstrando vários padrões de formação de manchas por mutação somática e recombinação no teste SMART de asa (<i>mwh</i>) e (<i>flr</i>).....	28
Figura 5 -	Representação fenotípica das linhagens a) <i>mwh</i> e b) <i>flr</i> ³ e ORR; <i>flr</i> ³	29
Figura 6 -	Representação esquemática do cruzamento e tratamento.....	31
Figura 7 -	Desenho ilustrativo das seções de Leitura da asa de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
Figura 8 -	Fotos de microscopia representando os fenótipos dos tricomas mutantes a) <i>mwh</i> b) <i>flr</i> c) <i>mwh</i> e <i>flr</i> (gêmea).....	32
Figura 9 -	Tabela para classificação das imagens obtidas no Ensaio Cometa Alcalino.....	35
Figura 10 -	Esquema representativo do Teste MTT.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrado
CO ₂	Gás Carbônico
CPD	Dímeros de pirimidina
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxiribonúcleico
DSB	Quebras duplas de DNA
E. coli	Escherichia coli
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBM	Fotobiomodulação
FD	Frequência de danos
°C	Graus Celcius
flr	Flare
g	Gramas
HeNe	Hélio-Neônio
hs	Horas
Hz	Hertz
ID	Índice de danos
J	Joules
J/cm ²	Joules/centímetro quadrado
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LBI	Laser de Baixa Intensidade
ml	Mililitros
mwh	Multiple wing hairs
mW	MiliWatts
µL	Microlitros
Nd:YAG	Neodimio YAG (ítrio-alumínio-granada)
nm	Nanômetros
seg	Segundos
SMART	Somatic Mutation and Recombination Test
SSB	Quebras simples de DNA
UVA	Radiação Ultravioleta A
UVB	Radiação Ultravioleta B
UVC	Radiação Ultravioleta C
WALT	World Association for Laser Therapy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo dos achados disticutados na Seção.....	26
-------------------	--	----

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO.....	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO.....	16
2.3 HISTÓRICO.....	17
2.4 ASPECTOS BIOFÍSICOS.....	18
2.5 EFEITOS BIOLÓGICOS.....	19
2.6 DOSIMETRIA E PROFUNDIDADE NOS TECIDOS.....	20
2.7 EVIDÊNCIAS DE DANOS AO DNA.....	21
2.8 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE DANOS AO DNA.....	27
2.8.1 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática.....	27
2.8.1.1 Linhagens celulares.....	29
2.8.1.2 Cruzamentos e Tratamento.....	29
2.8.1.3 Análise microscópica.....	31
2.8.1.4 Bases genéticas do Teste SMART.....	33
2.8.1.5 Análise estatística.....	33
2.8.2 Teste Cometa.....	34
2.8.2.1 Avaliação de genotoxicidade.....	36
2.8.2.2 Análise estatística.....	36
2.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE.....	36
2.9.1 Ensaio MTT.....	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
5 REFERÊNCIAS	41
6 ARTIGO 1	49
7 ARTIGO 2	59
8 CONCLUSÕES	78
ANEXO A Registro na Comissão de Pesquisa da UFCSPA.....	79
ANEXO B Instruções para autores – Lasers in Medical Science.....	80
ANEXO C Instruções para autores – Journal of Physical Therapy.....	83

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na Tese de Doutorado intitulada “*Avaliação do Potencial Genotóxico e da Citotoxicidade da Terapia de Fotobiomodulação em Modelos Experimentais*”, a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

As razões que levam os genes que regulam o ciclo celular a perderem suas funções são complexas e multifatoriais. Dentre elas, podemos citar predisposições genéticas ou hereditárias, ação de agentes físicos (que incluem principalmente as radiações), químicos e biológicos. Alicerçada nesse contexto, a investigação de agentes que tenham um espectro de ação relacionado ao incremento da proliferação celular torna-se de extrema relevância para o esclarecimento da relação risco-benefício em relação a sua utilização. Foram essas questões de pesquisa que inicialmente estimularam o desenvolvimento deste trabalho.

As publicações acerca da toxicidade ou mutagenicidade das radiações não são escassas. No entanto, a literatura tem concentrado um maior número de trabalhos relacionados às radiações ionizantes. De fato, o estudo das radiações não-ionizantes, como o Laser, tem se centrado nas possibilidades terapêuticas ligadas a alterações anatomohistológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Esta tese é composta por introdução, revisão de literatura, objetivos, dois artigos científicos intitulados “*Photobiomodulation therapy induces genetic toxicity in eukaryotic cells using test in vivo*” e “*Cell viability and DNA damage in mouse fibroblast cell line submitted to Photobiomodulation therapy (660 nm and 904 nm)*”, conclusões e considerações finais, como anexos, o registro na comissão de pesquisa da UFCSPA e as instruções das revistas selecionadas para a submissão dos artigos.

1. INTRODUÇÃO

A terapia de Fotobiomodulação (FBM), também conhecida como Laser de Baixa Intensidade (LBI) [1], tem sido amplamente estudada, principalmente por seus efeitos na reparação, regeneração e cicatrização tecidual, ou seja, devido a sua ação direta e indireta sobre a capacidade de proliferação e diferenciação celular [2]. Essa ação se deve, provavelmente, ao incremento da função mitocondrial [3] e ao estímulo à cadeia respiratória [4,5]. Dessa forma, em curto prazo, acelera a síntese de ATP, via glicólise ou fosforilação oxidativa e, em longo prazo, a transcrição e replicação do DNA [6], levando a um aumento da atividade celular, da produção de fibras colágenas e da regeneração de vasos sanguíneos [7].

De uma forma geral, a FBM tem sido terapeuticamente utilizada em diversas especialidades devido às suas características analgésicas [8], ao estímulo à reparação tecidual [9], à redução de edema e de hiperemia nos processos inflamatórios [10,11], além de atuar em parestesias e paralisias [8,12]. Alguns estudos têm demonstrado efeitos antioxidantes após eventos isquêmicos [13] ou trauma em músculos esqueléticos [14], e outros trabalhos têm demonstrado que a absorção do Laser pode diminuir o dano oxidativo em músculos lesados ou quando irradiados antes de atividades físicas exaustivas [15,16]. A busca em elucidar a associação do LBI à produção de danos ao DNA vem sendo realizada em diferentes modelos experimentais [17-19].

É necessário, no entanto, considerar o modo de ação pelo qual o Laser age e, igualmente, seus efeitos na reparação tecidual, ou seja, se sua atuação direta sobre a capacidade proliferativa das células pode ou não afetar a viabilidade e as taxas de mutação espontânea e de recombinação mitótica celular. Ao mesmo tempo, novos questionamentos merecem ser investigados, tanto em função da extensa utilização do Laser como forma terapêutica, quanto por uma possível relação dose-resposta. Certamente, um dos aspectos no qual se encontra maior divergência é em relação à quantidade de radiação oferecida ao tecido [20] e à falta de padronização dos parâmetros de irradiação utilizados nas pesquisas [21].

A genética toxicológica tem concentrado esforços nestas últimas décadas no uso de diferentes bioensaios que sejam capazes de detectar mutações pontuais, aberrações cromossômicas e, mais recentemente, eventos envolvendo recombinação mitótica [22-24]. A alta correlação entre essas lesões é inquestionável, uma vez que a recombinação homóloga é o mecanismo que mais contribui para a perda de heterozigose, evento que mostra ter grande relação com aparecimento de doenças degenerativas e, especialmente, com os processos tumorais [25].

Considerando que a recombinação está estreitamente relacionada com a perda de heterozigose e consequente expressão de genes deletérios, bem como com o aparecimento de doenças coronarianas [22,26], doenças autoimunes, diabetes [27], envelhecimento [28,29] e, principalmente, câncer [25], torna-se importante investigar mais detalhadamente os efeitos dessa terapia para que a utilização desses aparelhos seja mais segura para os sistemas biológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO – LASER

A palavra Laser é um acrônimo com origem na língua inglesa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Essa radiação eletromagnética não-ionizante tem características muito distintas daquelas de uma lâmpada comum ou fluorescente [30], sendo relacionadas ao seu comprimento de onda e ao princípio gerador do Laser. Dentre eles, podem ser elencados os Lasers gerados a partir de um gás (ou mescla de gases), os sólidos, bem como diodos ou semicondutores, que são resultado de dois minerais de características distintas, que, juntos, permitem a passagem de corrente elétrica em um único sentido [31].

A ação dos diferentes tipos de Lasers varia de acordo com a posição que ocupam no espectro de radiações eletromagnéticas (Figura 1), e sua ação sobre o metabolismo celular e sobre os tecidos tem se mostrado diferente para comprimentos de onda nas faixas visível e não-visível [32].

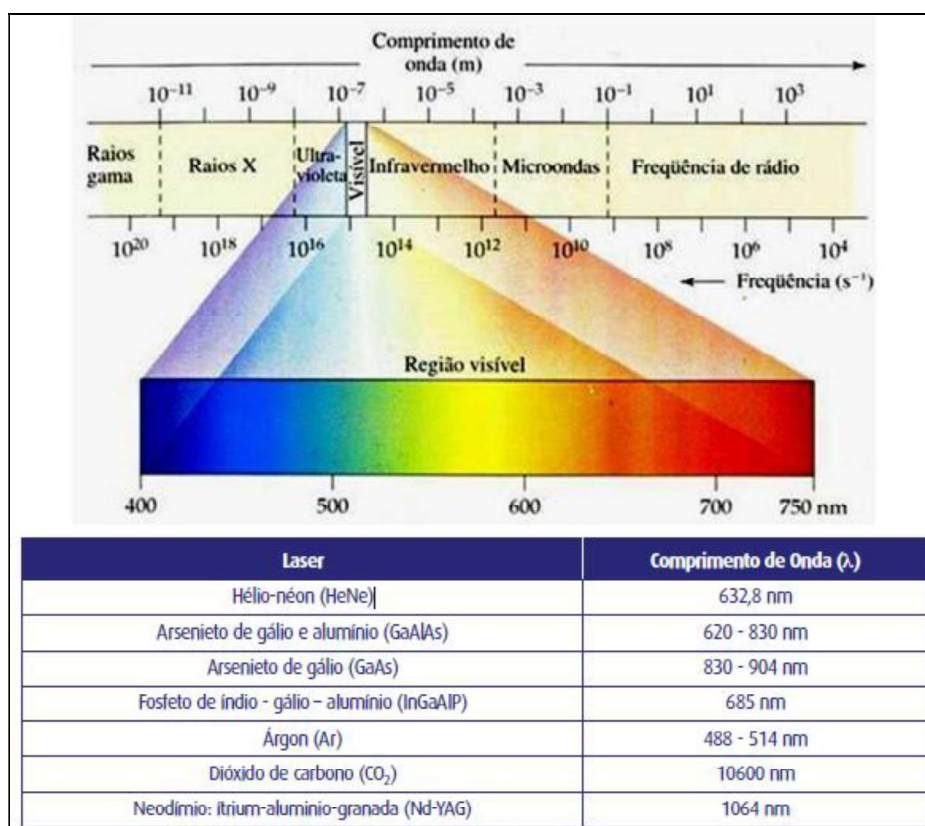


Figura 1 - Espectro de radiações eletromagnéticas e respectivos comprimentos de onda do Laser de Baixa Intensidade. (Fonte: Prock et al., 2008) [31].

2.2 CLASSIFICAÇÃO

De maneira simples, os Lasers podem ser classificados como Baixa Potência (ou Baixa Intensidade), também chamado de *Terapêutico*, e de Alta Potência (Alta Intensidade), que igualmente recebe a denominação de *Cirúrgico* [33]. De acordo com Jedwab [34], os Lasers que são utilizados na prática clínica estão situados na porção visível do espectro eletromagnético, bem como no infravermelho próximo. Os comprimentos de onda de baixa intensidade mais utilizados estão na faixa entre 600 e 1000 nm e apresentam, de forma geral, uma boa transmissão na pele e mucosas (Figura 2).

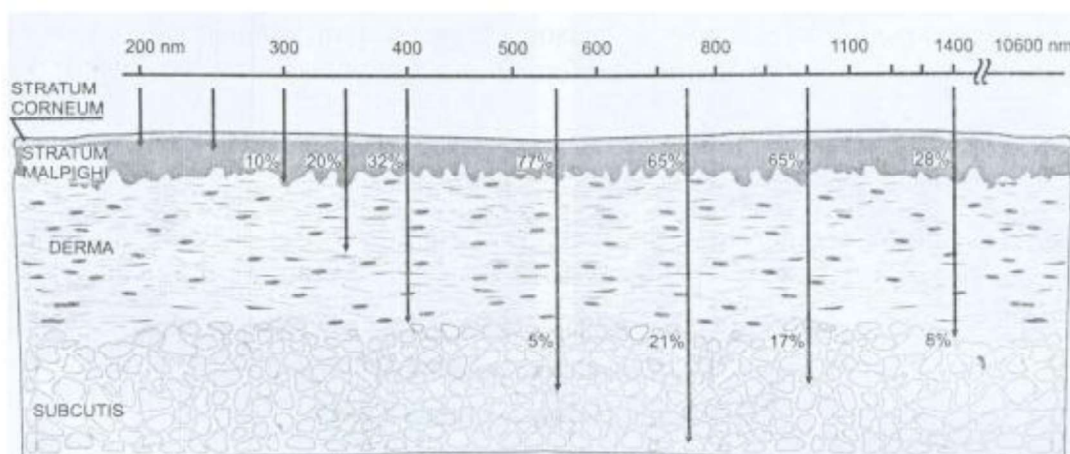


Figura 2 - Profundidade de penetração dos comprimentos de onda de LBI na pele. (Fonte: Simunovi e Trombonjaca, 2000) [35].

O laser sólido emite alta energia, sendo utilizado para cirurgias. São aparelhos grandes, que necessitam de alimentação de alta potência, alta refrigeração e são formados de rubi com tungstato de cálcio e fluoreto de cálcio com disprósio (entre outros) e, quando utilizados de forma desfocada, podem produzir baixa intensidade [36]. Dentre os terapêuticos, os Lasers a gás alcançam um limite de potência de 100 mW: são menores e também podem ser usados para fins cirúrgicos, como o bisturi Laser de CO₂, pois realizam corte e coagulação simultâneos. Eles podem ser formados de Hélio, Neônio, Argônio, Xenônio e Criptônio e apresentam alta dispersão de calor e alta eficiência. O Laser diodo semiconductor é igualmente de baixa energia, com coeficiente de rendimento bastante alto, podendo ser usado de forma contínua ou em pulsos e é bastante utilizado na reabilitação. O LBI é, portanto, classificado como uma

terapia luminosa focal intensa atérmica, ou seja, não constitui uma modalidade de termoterapia [37].

2.3 HISTÓRICO

Na década de 60, Endre Mester iniciou estudos na Hungria operando o Laser em baixa potência. Seus primeiros registros relatam o uso de feixes de rubi e argônio no tratamento de úlceras crônicas de membros inferiores, mas foram suas pesquisas com o laser de Hélio-Neônio (HeNe) que geraram maior número de trabalhos científicos [38,39].

A terminologia empregada por Mester, “Bioestimulador”, designava uma terapia que era utilizada basicamente para acelerar o processo cicatricial. O mecanismo de ação ainda não era esclarecido, mas seus resultados se mostravam excelentes no tratamento de feridas. No entanto, essa terapia passou a ser utilizada buscando efeitos diferentes do proposto inicialmente. Com o tempo, ela foi sendo empregada não apenas para acelerar processos, como também para detê-los. Da mesma forma, foi usada não só com fins analgésicos, mas também para a restauração da sensibilidade [40,41], e seus efeitos não se limitaram apenas à área tratada, mas também aos tecidos adjacentes [42].

Resultados clínicos e laboratoriais demonstraram que o Laser tornava alguns processos mais rápidos e retardava outros. A compreensão desses efeitos levou a um entendimento de que o Laser se apresentava como um normalizador de funções e, em 1991, Oshiro e Calderhead, propuseram a expressão “Balanceador e Normalizador de funções” para designar essa terapia [43].

Termos como Laserterapia, Soft Laser e Laser de Baixa Intensidade ou Laser de Baixa Potência também costumam ser utilizados para designar sua aplicação. Atualmente, o termo Fotobiomodulação vem sendo considerado ideal para descrever tais mecanismos de ação. O consenso em torno dessa nomenclatura foi estabelecido em setembro de 2014 pela North American Association for Light Therapy e pela World Association for Laser Therapy (WALT) [1].

2.4 ASPECTOS BIOFÍSICOS

O Laser emite radiações em um único comprimento de onda, ou seja, é monocromático. De acordo com Karu [44], as ondas se propagam com a mesma fase no espaço e no tempo, conferindo coerência espacial e temporal ao feixe luminoso. Sua direcionalidade permite a obtenção de uma alta concentração de fótons e, com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ainda ser polarizada, ou seja, ter simetria na distribuição de orientação do vetor de intensidade do campo eléctrico ou magnético na onda eletromagnética relativamente à direcção da sua propagação).

Pelo fato de ser uma forma de emissão luminosa, ele está englobado em um espectro de emissão eletromagnética, do mesmo modo que outros recursos utilizados na fisioterapia. Porém, o que o diferencia das demais formas de irradiação de ondas eletromagnéticas são as suas características de monocromaticidade (radiação emitida em uma única frequência ou comprimento de onda), coerência (propagação na mesma direcção de fótons com a mesma frequência), unidirecionalidade (o feixe de luz produzido por um laser diverge muito menos que o feixe de luz produzido por uma lâmpada comum) e alta concentração fototônica (alta concentração de fótons) [34].

O comprimento de onda é fator determinante na interação laser-tecido e corresponde à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa, sendo medida em nanômetros (nm); já a frequência de suas oscilações é aferida em Hertz (Hz). O meio ativo em geral dá o nome ao Laser e seu comprimento de onda confere diferentes modos de emissão e de acção biológica [45,46].

A radiação Laser pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada pelo tecido. A incidência da emissão estimulada pelo Laser faz com que elétrons da camada inferior saltem para camadas de nível energético superior, transformando-o em um átomo metaestável que, ao emitir um fóton e uma radiação de comprimento de onda definido, pode colidir e estimular a emissão de outros átomos, que também irão emitir fótons de mesmo comprimento de onda, gerando um efeito multiplicador por reflexão, denominado Amplificação [47].

2.5 EFEITOS BIOLÓGICOS

Quando a radiação do Laser interage com a matéria, os efeitos são os mesmos de qualquer outra radiação eletromagnética equivalente – reflexão, refração, absorção e, ainda, dispersão. Desse modo, a colimação e a coerência diminuem e se perdem. Quando é absorvida pelos tecidos, considera-se que ocorram efeitos biológicos específicos em razão da natureza especial deste tipo de radiação [48].

Sua ação se dá principalmente nas organelas celulares, em especial nas mitocôndrias, lisossomas e membranas, gerando aumento de ATP e modificando o transporte iônico. Acredita-se que existam fotorreceptores celulares sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Os principais efeitos gerados pela FBM nos tecidos são de natureza estimulatória, levando a um aumento do metabolismo celular, quimiotaxia e vascularização [47].

Nesse contexto, Zhang et al. [49] descreveram a utilização do LBI (HeNe; 632,8 nm) no estudo de um perfil de expressão gênica em células fibroblásticas humanas. Os resultados de expressão gênica por irradiação foram examinados utilizando microarrays de cDNA contendo 9.982 genes e revelaram que 111 genes foram regulados pela irradiação da luz vermelha, podendo ser agrupados em 10 categorias funcionais. A maioria desses genes parecem desempenhar um papel no estímulo à proliferação, especialmente no incremento da produção de enzimas da cadeia respiratória e de supressão à apoptose.

O princípio que parece reger a penetração do Laser pela célula é o de que sua radiação seja absorvida pelos citocromos nas mitocôndrias celulares e isso, por sua vez, possa afetar a permeabilidade da membrana celular. Desse modo, o Laser estará afetando a célula a partir de seu interior [50].

Além disso, Manteifel e Karu [51] relatam que, após 1 hora da irradiação com LBI (HeNe; 632,8nm), há descompactação de cromatina, aumentando a disponibilidade e gerando maior “exposição” de sítios de transcrição no DNA. Kujawa et al. [52] afirmam que o LBI altera a estrutura da membrana celular e aumenta a geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, segundo os autores, interferem em numerosas cascatas de sinalização celular.

A célula, no entanto, possui um limiar de sobrevivência de acordo com seu tecido de origem e estado fisiológico. Ao oferecer uma baixa intensidade de energia, respeitando esse limiar, a energia será utilizada de maneira a estimular a membrana e/ou as mitocôndrias, o que pode induzir a célula a um estado de normalização da área tratada. Esse efeito, por sua vez, é denominado Biomodulação [2,9,53].

2.6 DOSIMETRIA E PENETRAÇÃO NOS TECIDOS

Um dos aspectos mais importantes sobre a aplicação do LBI e no qual se encontra maior divergência é em relação à dose, assim definida como sendo a quantidade de radiação oferecida ao tecido [47,54]. As recomendações de doses terapêuticas foram publicadas pela primeira vez em 2005 pela WALT e são baseadas nas evidências obtidas em estudos pré-clínicos, resultados de estudos clínicos, bem como na combinação entre esses indícios. Certamente, fatores como erros no procedimento de irradiação, erros de cálculo ou mesmo falha dos dispositivos de emissão ainda contribuem para a necessidade de um constante aprimoramento dessas diretrizes [55].

No entanto, os ensaios clínicos ainda fornecem dados limitados sobre a capacidade de penetração do Laser nos tecidos. Em termos biofísicos, essa propriedade é dependente do comprimento de onda empregado na terapia [56]. Irradiações em retalhos cutâneos demonstraram que a penetração do Laser aumenta de forma linear em comprimentos de onda de 405 nm até 1030 nm, e estudos têm relatado achados semelhantes em pele de coelho, na qual a penetração mais significativa foi do comprimento de onda de 904 nm em relação ao comprimento de onda vermelho de 632,8 nm [56,57].

Joensen et al. [58] estudaram perfis de tempo e de penetração de Lasers de 810 e 904 nm em retalhos cutâneos de gastrocnêmios de rato e relatam que o Laser superpulsado de 904 nm penetrou 2 a 3 vezes mais facilmente quando comparado ao de onda contínua de 810 nm, em valores correspondentes respectivamente a 38-58% e 20% da emissão inicial em irradiações de 150 segundos, e afirmam que esses achados correspondem bem aos resultados das análises dosimétricas em revisões de LBI em distúrbios músculo-esqueléticos. Clinicamente, a irradiação Laser em retalhos cutâneos

tem demonstrado que a penetração aumenta linearmente com comprimentos de onda de 450 nm para 1030 nm [58].

A coloração das placas de cultura de tecido e a pigmentação da pele têm sido descritas como um fator relacionado à absorção do Laser. Khan et al. [59] observaram a absorção do LBI (810 nm) através da pele de camundongos classificados em pele pálida e escura e verificaram que é dependente da pontuação de melanina. Cerca de 50% a 98% da luz incidente é absorvida respectivamente pela pele pálida (média melanina pontuação 48) e escura (média melanina pontuação 98) e apenas a luz restante parece ser absorvida pelos tecidos subjacentes. Com base nesses padrões de absorção *in vivo*, desenvolveram um modelo *in vitro* onde tratamentos a laser foram realizados em células HaCaT e NOKSI semeadas em placas claras (<10% de absorção) e placas de poço pretas (100% de absorção). A fototoxicidade foi evidente em doses de 27 J/cm² (0,09 W/cm²) em placas de poço negro apenas.

Similarmente, Kujawa et al. [52] testaram Lasers em dois comprimentos de onda (808 e 905 nm) quanto aos efeitos oxidativos sobre dois tipos celulares (sangue humano e células de câncer de mama MCF-4) e realizaram cultivos celulares incubados em fases clara e escura. A irradiação resultou na geração EROs dose-dependente, e os níveis de radicais livres nas células aumentaram durante a incubação escura após irradiação.

2.7 EVIDÊNCIAS DE DANOS AO DNA

Embora existam trabalhos que apontem para a genotoxicidade do Laser, nem todos conseguiram detectar a sua ação mutagênica. Ocak et al. verificaram que a epilação utilizando Laser Alexandrite (Light Age Epicare Duo – 755 nm) não foi capaz de induzir um aumento da frequência de trocas de cromátides irmãs em mulheres submetidas a esse procedimento. Apenas mulheres que realizaram epilação completa dos membros inferiores e da face foram selecionadas, sendo a análise realizada por meio da coleta de amostras de sangue periférico que foram extraídas antes e 24 horas após a aplicação do Laser [60].

A fim de verificar possíveis efeitos genotóxicos, El-Batanouny et al. [61] realizaram irradiações do Laser HeNe (632,8 nm) em cultivos de linfócitos

humanos por 24, 48, 72 e 96 horas e não verificaram aumento na indução de micronúcleos após irradiação nas doses de 1, 2, 3 e 5 J/cm². Por outro lado, existem indícios de possíveis efeitos danosos relacionados à aplicação desta terapia. Kim [62] demonstrou que a absorção do Laser induz a produção de espécies reativas do oxigênio, levando a alterações celulares que envolvem a interação com moléculas da matriz celular e extracelular para gerar EROs e espécies reativas de nitrogênio que, por sua vez, podem iniciar a peroxidação lipídica, danos a proteínas ou modificação do DNA.

Em 1999, terapias fotodinâmicas foram estudadas e demonstraram que a submissão de plasmídeos à UVA, UVB, UVC e luz solar simulada induziu danos oxidativos ao DNA dependentes do comprimento de onda, uma vez que as lesões foram detectadas nas culturas irradiadas com UVB e UVC. Nesse mesmo estudo, os autores já sugerem a pesquisa dos Lasers de Baixa Intensidade, que se encontram acima desse espectro eletromagnético [17].

Em um outro estudo, a exposição do DNA a radiação pulsada de 532 nm de alta intensidade a partir de um laser Nd: YAG resultou em dímeros de ciclobutilpirimidina. Esses resultados foram medidos por cromatografia líquida de alta resolução e foi demonstrado que a radiação visível de alta intensidade pode iniciar uma cadeia fotoquímica em moléculas biológicas [18].

Hawkins e Abrahamse [19] investigaram uma série de respostas estruturais, celulares e moleculares devido a irradiações em fibroblastos de pele humana do Laser HeNe (632,8 nm) após uma dose única de 0,5, 2,5, 5 ou 10 J/cm² em condições normais e feridas. Como conclusão, verificaram que a dose de 10 J/cm² produziu uma quantidade significativa de danos celulares e moleculares, alterações na viabilidade celular, genotoxicidade e alterações estruturais [19].

Jiang et al. [63] relatam o uso de FBM aplicado na indução de mutações de microorganismos ambientais. Irradiações do Laser HeNe (632,8 nm; 25 min; 5 - 25 mW) foram aplicadas a fim de produzir estirpes mutantes de *Alcaligenes faecalis* capazes de incrementar a biodegradação e remoção do composto fenol de efluentes aquosos. Os resultados mostraram que a taxa de sobrevivência mudou regularmente de acordo com a dose irradiada, e a frequência mais alta de mutação foi determinada pela densidade de energia e pela potência de saída.

Efeitos mutagênicos utilizando LBI (532 nm; 50 mJ; doses de 0 – 14 J/cm²) em cultivos de linfócitos humanos foram descritos por Ravi et al. [64], que observaram um aumento significativo na incidência de micronúcleos. De forma curiosa, a maior frequência de células micronucleadas mostrou-se maior em doses menores (6 – 8 J/cm²) e sugerem que isso pode ser devido aos efeitos letais de doses mais altas sobre as células, evitando, assim, a amplificação da expressão de dano na cultura.

Similarmente, Sergio et al. [65] demonstraram, a partir do teste Cometa, que os Lasers vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm) induzem danos no DNA de células sanguíneas de ratos, especialmente devido a danos oxidativos, dependentes da fluência (25, 50 e 100 J/cm²), potência (30, 50 e 100 mW) e modo de emissão (Contínua; 10, 50 e 100 pulsos/seg). Os resultados demonstram que as doses de 50 J/cm² dos lasers vermelho e infravermelho induziram mais danos do que 100 J/cm², respectivamente.

Ferrando-May et al. [66] reuniram em revisão uma série de trabalhos que utilizaram Lasers de 337 a 1100 nm de comprimento de onda com a finalidade de gerar modelos de estudo de lesões do DNA. Em uma análise geral, foi possível verificar a presença de quebras duplas de DNA (DSB) quando utilizados comprimentos de onda de 355 nm a 500 nm. Todavia, as lesões oxidativas, do tipo dímeros de pirimidina (CPD), foram as mais frequentes quando o comprimento de onda utilizado foi entre 500 e 1100 nm.

Na busca de bons modelos de estudo de reparo de DNA, Solarczyk et al. [67] demonstraram a indução de quebras simples (SSB) e duplas (DSB) da hélice de DNA utilizando Lasers na faixa visível de 405 a 488 nm, sem a presença de fotossensibilizadores.

Outro ponto a ser levantado refere-se a achados experimentais que têm relacionado os danos causados pelo Laser com a geração de EROs, mostrando a necessidade de considerar o envolvimento do estresse oxidativo nesse contexto, uma vez que este já encontra-se relacionado a outros processos como envelhecimento, bem como na gênese de várias doenças, como o câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas [68,69]. Lin et al. [70] relataram o uso do laser HeNe em modelos experimentais de osteoartrose e demonstraram

incremento celular de condrócitos, porém os efeitos benéficos sobre a cartilagem são mais significantes após o declínio nos níveis de proteínas de estresse.

Os danos induzidos por Laser vermelho (658 nm; diâmetro 12.566 mm; doses 0.13, 0.52 and 1.04 J/cm²; 10mW) também foram avaliados em linhagens de *E. coli* proficientes e deficientes em reparo de DNA. Os autores verificaram que a sobrevivência das culturas de *E. coli* não foi afetada, assim como o Laser não foi capaz de induzir danos no DNA em linhagens deficientes nas enzimas de reparo endonuclease IV, formamidopirimidina DNA glicosilase e endonuclease III. Por outro lado, o Laser foi capaz de induzir filamentação bacteriana nas culturas de *E. coli* selvagens e induzir danos no DNA em culturas deficientes em reparo e exonuclease III. Considerando que a exonuclease III está envolvida no reparo de excisão de nucleotídeos, um tipo de reparo utilizado para danos oxidativos do DNA, e que a filamentação bacteriana é um tipo de resposta que a bactéria utiliza como estratégia de sobrevivência, os autores concluíram que o Laser pode causar lesões através da geração de EROs [71].

Fonseca et al. [72] utilizaram Lasers vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm) no estudo de mecanismos de reparo de SSB e DSB em linhagens de *E. coli* selvagens e deficientes em reparo por danos oxidativos e, igualmente, na avaliação da pré-exposição das culturas ao LBI. Os resultados indicam que o LBI não alterou a sobrevivência de culturas de *E. coli* e demonstraram um efeito protetor do DNA contra a ação letal do peróxido de hidrogênio nas culturas. Os autores sugerem que doses de Laser vermelho terapêutico, em diferentes modos de emissão, induzem efeitos subletais às culturas de *E. Coli* do tipo selvagem.

Da mesma forma, Sergio et al. [65] identificaram que as lesões induzidas pelos Lasers vermelho e infravermelho em células sanguíneas de rato são alvos das enzimas formamidopirimidina DNA glicosilase e endonuclease III, enzimas envolvidas no reparo de lesões oxidativas. Por sua vez, Migliario et al. [73] demonstraram que a indução de proliferação de pré-osteoblastos pelo Laser de diodo (980 nm) está intimamente relacionada com o desencadeamento de EROs, uma vez que, na presença de um inibidor oxidativo, incrementos na proliferação não foram observados. Todavia, efeitos inibitórios sobre a proliferação celular também têm sido relatados sobre culturas de fibroblastos de

pele humana expostas à maior fluência. Hawkins e Abrahamse testaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos do Laser HeNe (632,8 nm; doses 0,5, 2,5, 5, 10, 16 J/cm²) e observaram que, nas doses mais altas (10 e 16 J/cm²), houve um aumento do dano ao DNA e, igualmente, uma diminuição na viabilidade celular [74].

Essa resposta, também referida como “Conceito de Hormesis”, tem sido amplamente observada por diferentes autores, os quais demonstraram que doses mais baixas de LBI apresentam maior eficácia em relação ao estímulo e reparo dos tecidos do que doses mais elevadas [75,76]. Como já citado, resultados semelhantes quanto ao parâmetro genotoxicidade foram descritos por Sergio et al. [65], nos quais doses de 50 J/cm² dos Lasers vermelho e infravermelho induziram mais danos do que as de 100 J/cm².

Considerando a possibilidade de efeitos letais quando da aplicação da terapia de FBM (810 nm; 10-60 J/cm²), Liang et al. [77] demonstraram diminuição significativa da viabilidade da linhagem OC2 de câncer oral humano *in vitro*. Em contraste, a morte celular e os níveis de estresse oxidativo foram menores na cultura de células normais. Esses achados levaram os autores a sugerirem a FBM como uma modalidade terapêutica no tratamento de câncer oral. Todavia, Rhee et al. [78] descreveram proliferação agressiva e angiogênese após a aplicação de Laser (655 nm) em câncer de tireóide e afirmam que, embora alguns trabalhos venham demonstrando os efeitos benéficos sobre células tumorais, ainda são necessários mais estudos para que isso se torne um procedimento seguro. A tabela 1 demonstra um resumo dos achados discutidos neste seção.

De fato, a literatura tem se mostrado contraditória em vários aspectos associados à terapia de FBM, relacionando a divergência dos resultados aos diferentes tipos de LBI, doses irradiadas, modos de tratamento, bem como às condições do tecido e características genéticas. Nessa perspectiva, Taffur e Mills [79] afirmam que, embora a elucidação dos mecanismos subjacentes ainda não esteja clara, o LBI parece atuar modulando a fisiologia celular através de mecanismos redox existentes, podendo atuar para promover a proliferação e a homeostase celular.

Autor / ano	Irradiação	Dosimetria (J/cm ²)	Tecido / organismo testado	Resultados
Ocak et al., 2014	Laser 755 nm	-	Sangue periférico humano	Não induziu troca entre cromátides irmãs
El-Batanouny et al., 2002	Laser 632,8 nm	1; 2; 3; 5	Linfócitos humanos	Aumento na indução de micronúcleos
Kuluncsics et al., 1996	UVA UVB UVC Luz solar	-	Plasmídeos	Indução de danos oxidativos dependentes do comprimento de onda (UVB e UVC)
Hawkins e Abrahamse, 2005	Laser 632,8 nm	0,5; 2,5; 5; 10; 16	Cultura de fibroblastos de pele humana	Doses de 10 e 16 J/cm ² produziram alterações na viabilidade celular, genotoxicidade e alterações estruturais.
Jiang et al., 2006	Laser 632,8 nm	-	Linhagens mutantes de <i>Alcaligenes faecalis</i>	Aumento na frequência de mutação demonstrada pelo aumento na taxa de sobrevivência
Ravi et al., 2002	Laser 532 nm	0 - 14	Cultura de linfócitos humanos	Aumento na incidência de micronúcleos. A maior frequência foi encontrada nas doses 6 – 8 J/cm ²
Sergio et al., 2015	Laser 660 e 808 nm	25; 50; 100	Células sanguíneas de ratos	Danos oxidativos especialmente nas doses de 50 J/cm ²
Ferrando-May et al., 2013	Laser 337 – 1100 nm	-	-	Presença de quebras duplas de DNA (355 – 500 nm) e lesões oxidativas, principalmente dímeros de pirimidina (500 – 1100 nm)
Solarczyk et al., 2012	Laser 405 e 488 nm	1,7	DNA nuclear de cultura celular HeLa	Indução de quebras simples e duplas de DNA.
Sergio et al. 2012	Laser 658 nm	0,13; 0,52; 1,04	Linhagens de <i>E. coli</i> proficientes e deficientes em mecanismos de reparo ao DNA	A sobrevivência das culturas não foi afetada, mas houve indução de filamentação bacteriana nas culturas selvagens e danos oxidativos ao DNA nas linhagens deficientes em reparo.
Fonseca et al., 2015	Laser 660 e 808 nm	25; 50; 100	Linhagens de <i>E. coli</i> proficientes e deficientes em mecanismos de reparo por danos oxidativos	Culturas previamente irradiadas e a sobrevivência das culturas não foi afetada, houve efeito protetor contra a ação do H ₂ O ₂ .

2.8 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA

Embora existam estudos explorando a eficácia da FBM no tratamento de diferentes patologias, bem como apontando seus efeitos antiinflamatórios e cicatriciais, ainda há uma lacuna muito grande em relação aos estudos sobre as suas potencialidades genotóxicas e/ou mutagênicas. Existe a necessidade de avaliar o efeito da terapia a Laser utilizando diferentes bioensaios na tentativa de elucidar não só os mecanismos por meio dos quais ela induz seus efeitos terapêuticos, como também a sua interferência nas taxas de indução de mutação e de recombinação em diferentes tecidos. Todas essas abordagens visam a contribuir para que o LBI possa ser utilizado com maior eficácia e menor risco em pacientes com diferentes patologias. A utilização de um bioensaio *in vivo* para avaliar os danos induzidos pela radiação oferece grandes vantagens, principalmente se considerarmos que análises *in vitro* não refletem a mesma resposta que é observada no organismo como um todo [80].

2.8.1 Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O Teste SMART de asa em *Drosophila melanogaster* é baseado na identificação de pêlos que representam a expressão de fenótipos mutantes decorrentes da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, após inúmeras divisões mitóticas, dão origem às asas dos adultos que apresentam pêlos ou tricomas em suas faces ventral e dorsal (Figura 3).

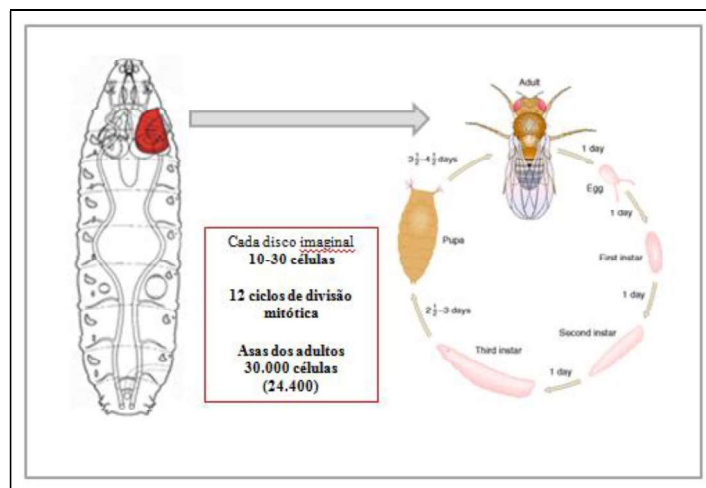


Figura 3 - Esquema representativo das células-alvo do teste SMART de asa. (Fonte: Laboratório de Toxicidade Genética, Ulbra).

Os tricomas mutantes organizam-se em aglomerados denominados manchas, que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica, de acordo com o fenótipo expresso [81], conforme demonstrado na Figura 4.

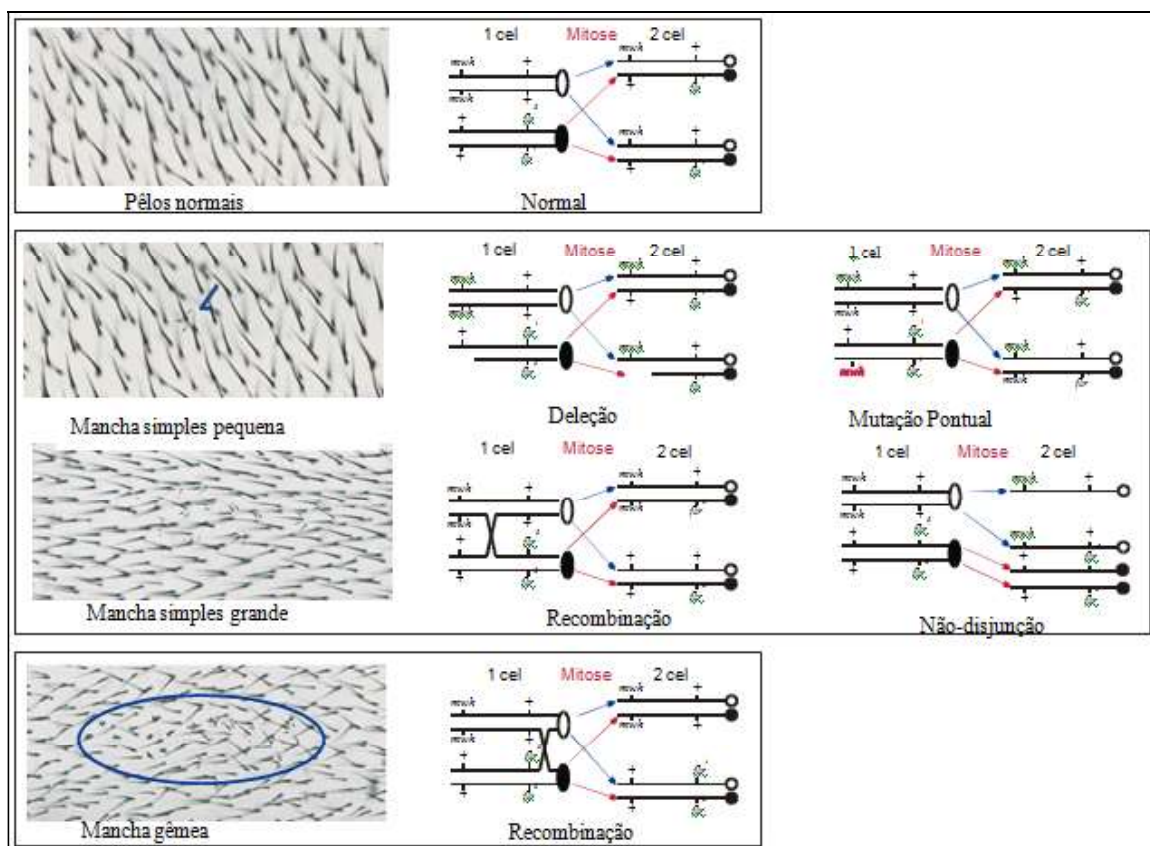


Figura 4 - Esquema demonstrando vários padrões de formação de manchas por mutação somática e recombinação no teste SMART de asa (*mwh*) e (*flr*). (Fonte: Laboratório de Toxicidade Genética, Ulbra).

2.8.1.1 Linhagens Celulares

O organismo experimental é a *Drosophila melanogaster* e utilizam-se linhagens portadoras de genes marcadores específicos localizados no cromossomo 3 designadas como *flr³*; *ORR*; *flr³* e *mwh*, que permitem a detecção de eventos mutacionais, bem como outros relacionados à recombinação somática. Apresentam, respectivamente, os seguintes genótipos: [***flr³***] - *flr³/In(3LR)TM3,ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; [***ORR;flr³***] - *ORR;flr³/In(3LR) TM3,ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd*; [***mwh***] - *mwh/mwh*.

A detecção da toxicidade genética é dada pelos genes de interesse *flr³* e *mwh*, que são responsáveis por alterar forma dos pêlos presentes nas asas dos adultos (Figura 5). Os demais marcadores não apresentam importância para a detecção da atividade tóxicogenética, mas são característicos de inversões (*In*) presentes no braço direito do cromossomo 3 (*3LR*), que eliminam os produtos de recombinação mitótica que ocorrem no genótipo heterozigoto TM3.

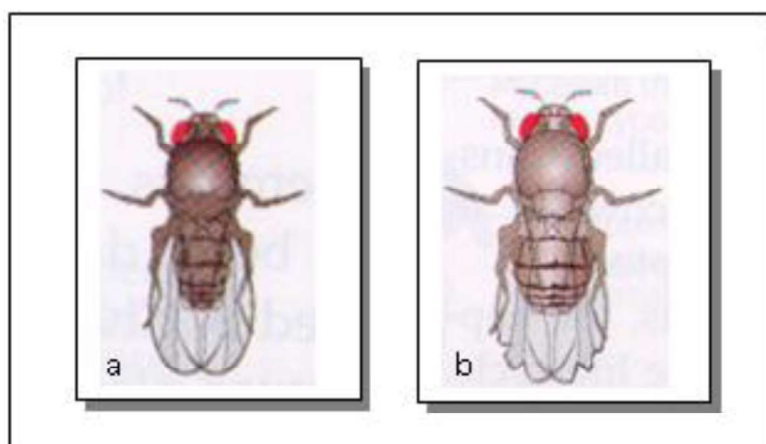


Figura 5 - Representação fenotípica das linhagens a) *mwh* e b) *flr³* e *ORR;flr³* (Fonte: Laboratório de Toxicidade Genética, Ulbra).

Para maiores esclarecimentos a respeito dos marcadores genéticos acima apresentados, ver Lindsley e Zimm [82]. Todos os estoques de *Drosophila melanogaster*, assim como os cruzamentos, são mantidos em frascos de vidros de ¼ litro contendo meio de cultura padrão a 25°C ± 1°C e a umidade de 60-70%.

2.8.1.2 Cruzamentos e Tratamento

Nesta abordagem experimental, é empregado o cruzamento padrão - no qual fêmeas virgens *flr³* são cruzadas com machos *mwh*, originando larvas

portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P450 [83]. Esses cruzamentos originam larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3.

- larvas *mwh* +/ + *flr*³ - que são transheterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr*³;

- larvas *mwh* +/ *TM3*, *Bd*^S - heterozigotas para o cromossomo *TM3*, necessário para balancear o marcador *flr*³, já que este é letal em homozigose. Os adultos heterozigotos para o cromossomo *TM3* apresentam recortes nas asas - determinados pelo gene marcador *Bd*^S - o que permite diferenciá-los dos imagos transheterozigotos que apresentam asas com formato normal.

Os cruzamentos são realizados durante 3 dias, em massa (80 fêmeas:40 machos), em vidros contendo meio de cultura padrão. Os casais são, então, transferidos para tubos de ¼ litro contendo meio de ovoposição e, logo após serem mantidos nesse recipiente por 8 horas, são descartados. As larvas são coletadas após 72 horas (hs) do início do período de ovoposição, ou seja, no terceiro dia, sendo denominadas larvas de terceiro estágio, conforme demonstrado na Figura 6. A coleta é feita por flotação em água corrente, e as larvas são depositadas em placas de 1 cm², para grupos de aproximadamente 100 larvas de modo a formar uma monocamada. Essas larvas, então, são submetidas à irradiação pelo Laser e, logo após, são mantidas em frascos contendo meio de cultura até a sua eclosão. Os recipientes são então embalados em papel alumínio para evitar qualquer reação de reparo via fotólise e todos os adultos que eclodem 10-12 dias após a postura dos ovos são conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos transheterozigotos são submetidas à montagem em lâminas de vidro.

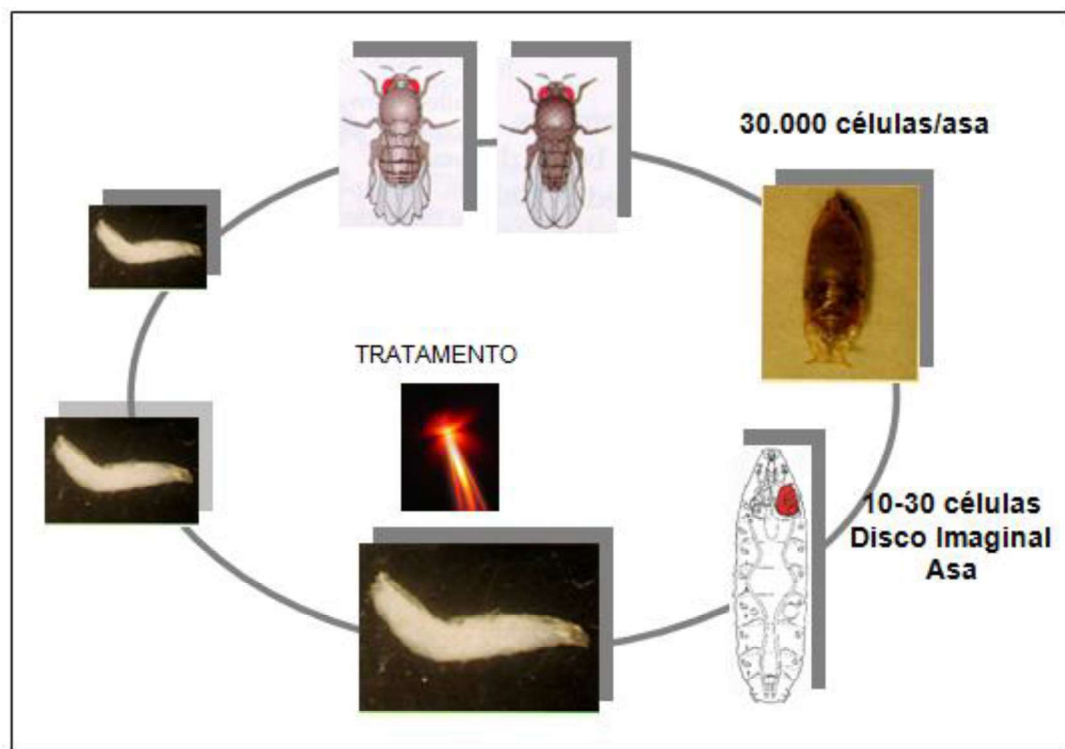


Figura 6 - Representação esquemática do cruzamento e tratamento (Fonte: Laboratório de Toxicidade Genética, Ulbra – adaptado).

2.8.1.3 Análise Microscópica

As lâminas contendo 10 asas de fêmeas e 10 asas de machos são analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes (400X). A análise é realizada em asas de 10 indivíduos de cada sexo, por dose de tratamento, totalizando 100 indivíduos analisados, incluindo o controle negativo observando-se os fenótipos dos tricomas ou pêlos existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas dos indivíduos transheterozigotos. A leitura da lâmina é feita de modo que o avaliador estabeleça uma varredura por todas as seções da asa, conforme Figura 7.

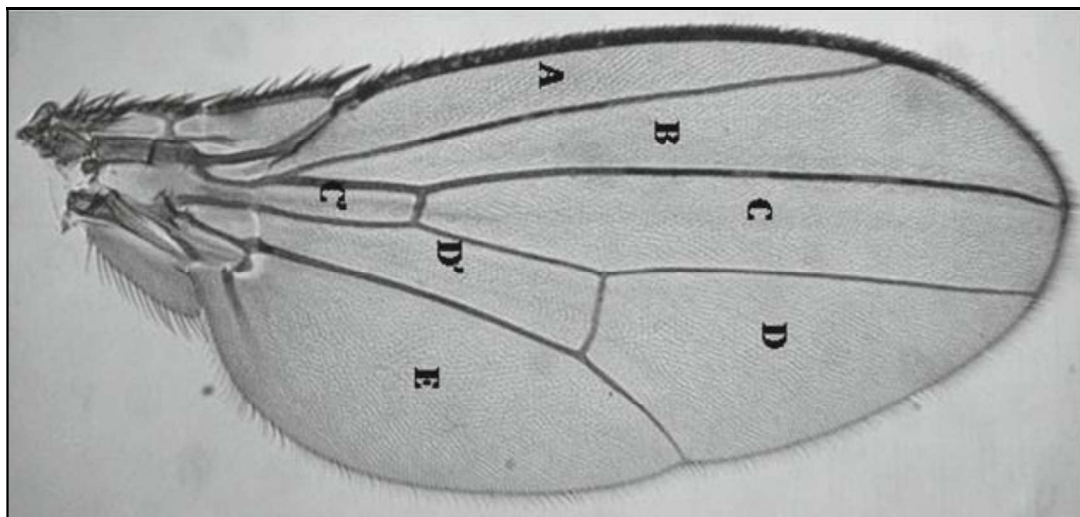


Figura 7 - Desenho ilustrativo das seções de leitura da asa de *Drosophila melanogaster* (Fonte: Marcos & Carmone, 2013) [79].

Cada disco imaginal comporta de 10 a 30 células, que, após 12 ciclos celulares mitóticos, resultam em torno de 24.400 a 30.000 células por asa por indivíduo. Cada lâmina, portanto, representa um número amostral relativo à análise de quase meio milhão de células que expressam em sua superfície, tanto dorsal quanto ventral, pêlos ou tricomas. Os fenótipos mutantes estão representados na Figura 8.

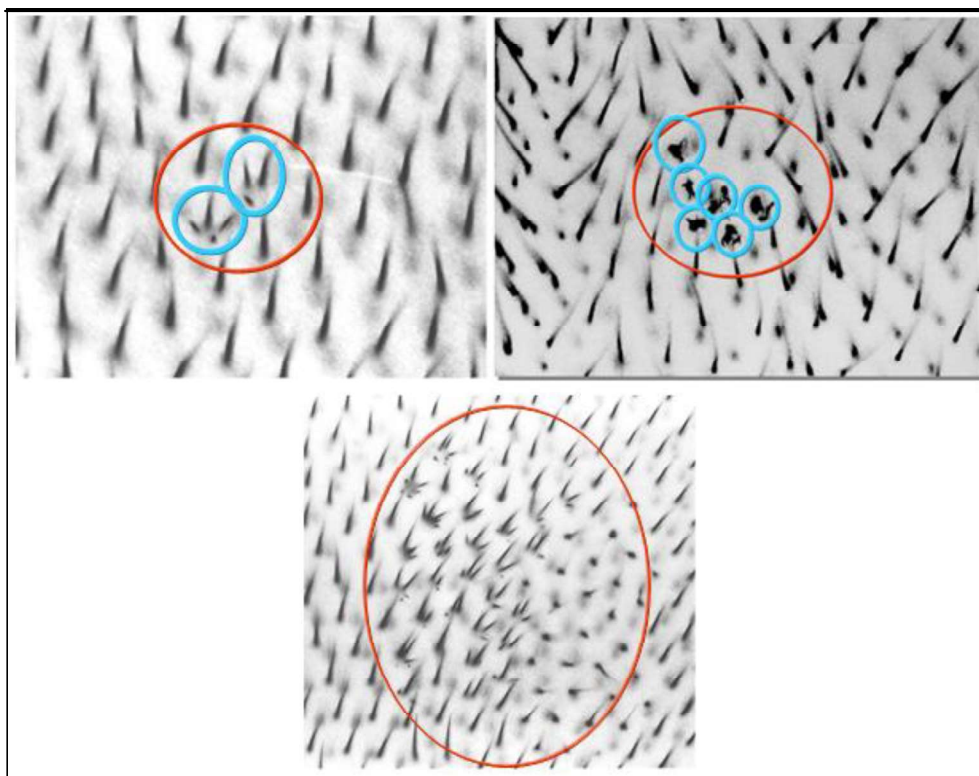


Figura 8 - Fotos de microscopia representando os fenótipos dos tricomas mutantes a) mwh b) flr c) mwh e flr (gêmea). (Fonte: Laboratório de Toxicidade Genética, Ulbra).

2.8.1.4 Bases Genéticas do teste SMART

Por meio da análise dos tricomas presentes nas asas dos adultos transheterozigotos, são detectadas manchas simples (pequenas e grandes) e gêmeas, que refletem a ocorrência de eventos genéticos específicos.

Assim, as manchas simples, com os fenótipos pêlos múltiplos ou pêlos com a base alargada, podem se originar por:

- alteração do conteúdo informacional dos genes selvagens *mwh*⁺ ou *flr*³⁺;
- deleção de um fragmento cromossômico contendo os marcadores selvagens *mwh*⁺ ou *flr*³⁺;
- conversão gênica dos genes *mwh*⁺ ou *flr*³⁺.

E, adicionalmente, também podem ser originadas devido a ocorrência de:

- uma recombinação simples entre os locos *mwh* e *flr*³, que leva ao aparecimento de manchas simples com o fenótipo pêlos múltiplos;
- uma recombinação simples entre *flr*³ e o centrômero, seguido de uma segunda recombinação simples entre *mwh* e *flr*³, que origina pêlos com a base alargada.

Assim, as manchas simples podem originar-se tanto por eventos mutacionais, incluindo mutações pontuais e aberrações cromossômicas, como por conversão gênica ou recombinação mitótica. Por outro lado, as manchas gêmeas, que expressam simultaneamente os fenótipos pêlos com a base alargada e pêlos múltiplos, originam-se exclusivamente de uma recombinação simples entre *flr*³ e o centrômero, com posterior segregação de um cromossomo recombinado e um parental. Dessa forma, a análise das manchas de clones mutantes, efetuada nas asas dos adultos trans-heterozigotos, não permite quantificar a real contribuição da atividade recombinacional para a indução de clones de células mutantes - uma vez que as manchas simples, pequenas e grandes, podem não só ter se originado por eventos mutagênicos ou clastogênicos, como também por recombinação mitótica [84].

2.8.1.5 Análise estatística

Para a avaliação da genotoxicidade, as séries tratadas são comparadas com seus respectivos controles negativos. A análise estatística é realizada por meio de um programa de computador que emprega o teste de Kastenbaum-

Bowman e segue o procedimento de decisão múltipla de acordo com Frei e Würgler [85], possibilitando a caracterização dos resultados como positivos, fraco-positivos, negativos ou inconclusivos. Na aplicação prática do método de decisão, além da hipótese nula, elabora-se uma hipótese alternativa específica, que requer uma frequência de mutação no tratado “**m**” vezes maior que a obtida no controle. Para avaliar os resultados negativos, dois fatores de multiplicação (**m**) foram originalmente introduzidos no teste: $m = 2$ para manchas simples pequenas e o total de manchas, devido às suas altas frequências espontâneas; $m = 5$ para manchas simples grandes e manchas gêmeas, que raramente surgem de forma espontânea [86].

Quatro diferentes diagnósticos estatísticos são possíveis quando testamos a hipótese nula (**Ho**) e a hipótese alternativa (**Ha**): se **Ho** é aceita e **Ha** é rejeitada – negativo; se **Ho** e **Ha** são aceitas – inconclusivo; se **Ho** é rejeitada e **Ha** é aceita – positivo; se **Ho** e **Ha** são rejeitadas – fraco positivo. Isso significa que o tratamento induziu uma resposta genotóxica fraca, com uma frequência de danos que é significativamente menor que m vezes a frequência obtida no controle negativo [85].

2.8.2 Teste Cometa

O ensaio Cometa ou técnica da eletroforese de células isoladas é largamente empregado para avaliação de danos e reparo do DNA em células individuais [87]. É considerada uma técnica rápida e de grande eficiência na quantificação de lesões ao DNA e mecanismos de reparo em células individualizadas de mamíferos. Essa técnica apresenta vantagens quando comparada a testes bioquímicos e citogenéticos, especialmente na utilização de um pequeno número de células que não necessitam estar em divisão [88].

A detecção dos danos no DNA realiza-se por meio da versão alcalinada e permite a detecção de quebras de DNA de fita simples e duplas. Os fragmentos gerados migram durante a eletroforese, formando uma "cauda" de uma imagem semelhante a um cometa. A intensidade da cauda reflete o número de quebras de cadeia presentes. O material pode ser corado por técnicas de fluorescência ou por sal de prata. Este último apresenta vantagens técnicas, como o tipo de microscópio utilizado e a possibilidade de armazenamento das

lâminas [86]. A Figura 9 exemplifica a classificação de dano de acordo com o tamanho da cauda do cometa [89].

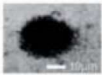
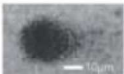
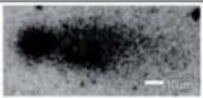
Imagem Observada	Cauda/Cabeça	Classes de Danos
	sem cauda	0
	≤ 1	1
	1 – 2	2
	≥ 2	3
	sem cabeça	4

Figura 9 - Tabela para classificação das imagens das “células cometa” observadas (Adaptado de Villela et al., 2006) [89].

Neste teste, as células da linhagem celular de fibroblasto de camundongo NIH-3T3 (Banco de Células do Rio de Janeiro - Duque de Caxias, RJ) foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² com meio de cultura DMEM, contendo 2% de glutamina e 10% de soro fetal bovino, à temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços, em uma densidade de 10⁴ células/poço e estabilizadas por 24 horas. Dois comprimentos de onda foram testados (660 nm e 904 nm) nos cultivos celulares de fibroblastos e, separadamente, tratados com uma aplicação de LBI em doses de 3 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² e 20 J/cm². A avaliação foi realizada imediatamente após a aplicação do Laser (0 hs) e três horas após a aplicação (3 hs), conforme descrito por Tice e colaboradores [87]. A avaliação do efeito proliferativo induzido pelo Laser é realizada por meio da contagem de células, descrito por Sigalas [90]. Em resumo, as culturas de células são tripsinizadas das placas e contadas em câmara de Neubauer. A seguir, é realizado o cálculo da média do número de células por poço da placa. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 6 poços/tratamento.

2.8.2.1 Avaliação de Genotoxicidade

Após tratamento, as células são tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS, 10 µL de solução celular e homogeneizadas com 90µL de agarose de baixo ponto de fusão 2%. Essa mistura é distribuída sobre lâminas de vidro, previamente cobertas com gel de agarose 2% com ponto de fusão normal, cobertas com lamínulas e mantidas a 4°C por 5 minutos para permitir a solidificação do gel. A seguir, as lamínulas são retiradas, e as lâminas, mergulhadas em solução de lise, por 24 horas sob refrigeração (4°C). As lâminas são colocadas na cuba de eletroforese por 20 minutos a 4°C em solução alcalina (300 mM NaOH/ 1 mM EDTA). A eletroforese é realizada a 300 mA, 25 V, por 20 minutos. Após a neutralização com tampão neutralizador ($\text{NH}_4^+ - \text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ / pH 7,5) é realizada a coloração com Brometo de etídio [91]. Após a coloração, as lâminas são visualizadas em microscópio de fluorescência e o percentual de DNA na cauda é estabelecido (“Tail Intensity”). Os resultados são expressos em índices de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID é obtido pela avaliação das classes de dano (de 0, sem dano aparente, a 4, com máximo dano), em 100 células analisadas por tratamento. São denominados de classe zero os núcleos permanecem que intactos e aparecem redondos. Já nas células lesadas, o DNA livre que migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, é visualizado como uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa e são classificados em classe 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo). Assim o ID varia de 0 (todas as células da classe zero: 0×100) a 400 (todas as células de classe 4 $\times 100$). O cálculo do dano é baseado no número células com dano versus as células sem dano [92].

2.8.2.2 Análise Estatística

A análise estatística dos dados é realizada por meio da análise de variância de uma via seguido por pós-teste de *Tukey*.

2.9 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE

A citotoxicidade define o potencial para que os produtos químicos e/ou físicos destruam células e, conseqüentemente, mede a morte celular independentemente de outro mecanismo subjacente. A maioria dos ensaios

baseia-se no fato das membranas celulares pré-apoptóticas tornam-se permeáveis, e os conteúdos são liberados para o ambiente circundante. A extensão da morte celular pode ser medida pela incubação com corantes fluorescentes que não podem permear membranas intactas [93].

2.9.1 Ensaio MTT

O ensaio de MTT baseia-se na redução celular de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)- 2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide] de acordo com Mosman [93]. A quantificação da redução de MTT constitui um método colorimétrico simples para avaliar a viabilidade celular. Após redução, o MTT amarelo forma cristais de formazan de cor violeta, que, ao serem dissolvidos, absorvem na região do visível e podem ser quantificados por espectrofotometria. A redução do MTT é feita por meio de desidrogenases celulares e, dessa forma, pode-se avaliar a capacidade redutora da célula através desse método.

As culturas celulares são mantidas em crescimento exponencial através do subcultivo das células fibroblásticas a cada dois dias em meio de cultura sem antibióticos. Antes da fototerapia, uma suspensão contendo 7×10^4 células/100 μ l é preparada e incubada em placas de 24 poços de fundo plano para o experimento. A suspensão celular é colocada a cada quatro poços para proporcionar uma distância máxima entre as células e, assim, evitar a dispersão do Laser para outros poços. Todos os experimentos foram realizados duas vezes, em duplicata, com seis amostras para cada dose testada, bem como para o controle negativo (células não tratadas).

As células fibroblásticas murinas são irradiadas com uma ou três aplicações, resultando em culturas de 24 e 72 hs, respectivamente. Após o tratamento, as células são incubadas com 150 μ L de solução de MTT (0,05 g de MTT diluído em 5 mL de PBS) em meio de cultura sem soro e sem fenol, a 37°C por 3 horas. Após a incubação, o sobrenadante é removido cuidadosamente, e os cristais de formazan violeta, resultantes da redução mitocondrial do MTT amarelo, são solubilizados em 100 μ L de DMSO, de acordo com o protocolo proposto por Scudiero et al. [95].

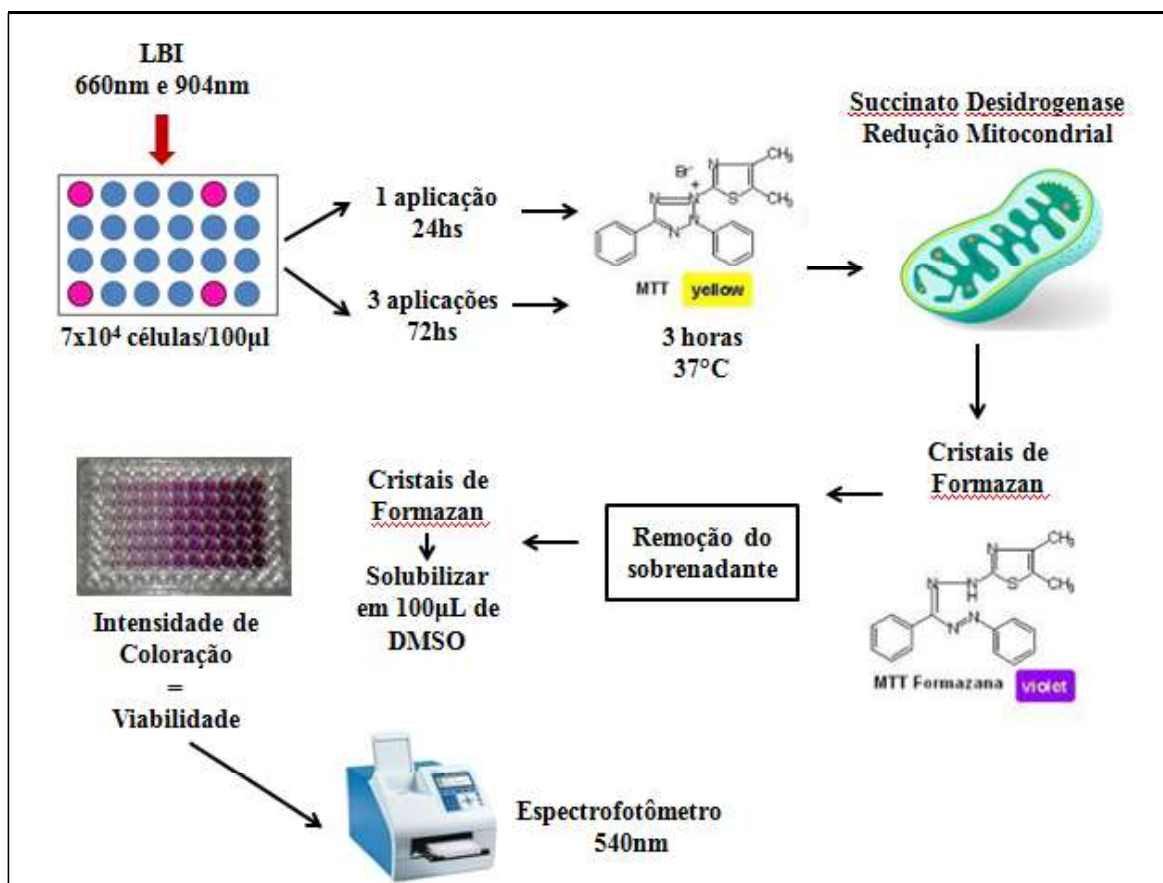


Figura 10 - Esquema representativo do teste MTT (Fonte: autor).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os potenciais genotóxico e citotóxico da terapia de fotobiomodulação em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a Terapia de Fotobiomodulação induz toxicidade genética em células eucarióticas utilizando o teste SMART *in vivo* em *Drosophila melanogaster*;
- Avaliar os efeitos da fotobiomodulação na indução do dano genotóxico em fibroblastos cultivados utilizando o teste Cometa;
- Investigar a relação dose-resposta do Laser de Baixa Intensidade nos parâmetros genotoxicidade e citotoxicidade em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora existam estudos explorando a eficácia da terapia de FBM no tratamento de diferentes patologias, bem como apontando seus efeitos antiinflamatórios e cicatriciais, ainda há uma lacuna muito grande em relação aos estudos sobre as suas potencialidades genotóxicas e/ou mutagênicas. Ainda que estudos *in vitro* permitam padronização e sejam modelos reprodutíveis, os resultados desses estudos ainda não podem ser correlacionados com eventuais resultados clínicos. Contudo, o conhecimento prévio desses efeitos e possíveis repercussões terapêuticas é de extrema importância para a formulação de protocolos *in vivo*. Da mesma forma, um número maior de estudos como este, que comparem de forma concomitante efeitos citotóxicos e genotóxicos, é necessário para uma maior elucidação dos mecanismos envolvidos na fototoxicidade e, assim, garantir maior segurança no uso de Lasers terapêuticos.

A utilização de um bioensaio *in vivo* para avaliar os danos induzidos pela radiação oferece grandes vantagens, principalmente se considerarmos que análises *in vitro* não refletem a mesma resposta que é observada no organismo como um todo.

Os resultados deste trabalho apontam para a necessidade de avaliar o efeito da terapia a laser utilizando diferentes bioensaios na tentativa de elucidar não só os mecanismos por meio dos quais o Laser induz seus efeitos terapêuticos, como também a sua interferência na indução de mutação e recombinação em diferentes tecidos. Todos esses achados visam a contribuir para que o LBI possa ser utilizado com uma maior eficácia e com um menor risco em pacientes com diferentes patologias.

5 REFERÊNCIAS

1. Anders JJ, Lanzaforme RJ, Arany PR (2015) Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg* 33:183–184.
2. Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M (2007) The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photochem Photobiol B* 88: 11-15.
3. Xu X, Zhao X, Liu TC, Pan H (2008) Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. *Photomed Laser Surg* 26: 197-202.
4. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, et al. (2009) Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B* 95: 89-92.
5. Tullberg M, Alstergren PJ, Ernberg MM (2003) Effects of low-power laser exposure on masseter muscle pain and microcirculation. *Pain* 105: 89-96.
6. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD (2005) Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 36: 8-12.
7. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, et al. (2004) The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg* 22: 241-247.
8. Cheng K, Shen XY, Ding GH, Wu F (2009) Relationship between laser acupuncture analgesia and the function of mast cells. *Zhongguo Zhen Jiu* 29: 478-483.
9. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2012) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 27: 237-249.
10. Bortone F, Santos HA, Albertini R, Pesquero JB, Costa MS, et al. (2008) Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol* 8: 206-210.
11. Liu XG, Zhou YJ, Liu TC, Yuan JQ (2009) Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg* 27: 863-869.
12. de Oliveira RF, da Silva AC, Simões A, Youssef MN, de Freitas PM (2015) Laser Therapy in the Treatment of Paresthesia: A Retrospective Study of 125 Clinical Cases. *Photomed Laser Surg* 33: 415-423.

13. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, et al. (2006) Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med* 38: 704-713.
14. Avni D, Levkovitz S, Maltz L, Oron U (2005) Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. *Photomed Laser Surg* 23: 273-277.
15. Assis L, Moretti AI, Abrahão TB, Cury V, Souza HP, et al. (2012) Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med* 44: 726-735.
16. De Marchi T, Leal Junior EC, Bortoli C, Tomazoni SS, Lopes-Martins RA, et al. (2012) Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci* 27: 231-236.
17. Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E (1999) Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B* 49: 71-80.
18. Cao EH, Wang JJ, Xin SM (1993) Nonlinear biological effects of high-intensity visible laser radiation on DNA. *Proc SPIE Int Opt Eng*: 309-313.
19. Hawkins D, Abrahamse H (2005) Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 23: 251-259.
20. Fonseca AS, Moreira TO, Paixão DL, Farias FM, Guimarães OR, et al. (2010) Effect of laser therapy on DNA damage. *Lasers Surg Med* 42: 481-488.
21. Jan Tunér DDS, Jenkins PA (2016) Parameter Reproducibility in Photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery* 34(3): 91-93.
22. Bridges BA, Bowyer DE, Hansen ES, Penn A, Wakabayashi K (1990) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. The possible involvement of somatic mutations in the development of atherosclerotic plaques. Report of ICPEMC Subcommittee 7/1. Conclusions and recommendations. *Mutat Res* 239: 143-148.
23. Doak SH, Griffiths SM, Manshian B, Singh N, Williams PM, et al. (2009) Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* 24: 285-293.
24. de Andrade HHR, Reguly ML, Lehmann M (2004) Wing somatic mutation and recombination test. In: Henderson DS, editor. *Drosophila Cytogenetics Protocols*. New Jersey: Humana Press New Jersey. pp. 389-412.

25. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
26. Penn A, Garte SJ, Warren L, Nesta D, Mindich B (1986) Transforming gene in human atherosclerotic plaque DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7951-7955.
27. Kastern W, Kryspin-Sorensen I (1988) Penetrance and low concordance in monozygotic twins in disease: are they the results of alterations in somatic genomes? *Mol Reprod Dev* 1: 63-75.
28. Kirkwood TB (2005) Understanding the odd science of aging. *Cell* 120: 437-447.
29. Chen XJ (2013) Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 476-496.28.
30. Karu TI (1988) Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci* v.2(1): p.53-74.
31. Prockt AP, Takahashi A, Pagnoncelli RM (2008) Uso de Terapia com Laser de Baixa Intensidade na Cirurgia Bucomaxilofacial. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac* 49: 247-255.
32. Cavalcanti TM, Almeida BRQ, Catão MHCV, Feitosa APA, Lins RDAU (2011) Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. *An Bras. Dermatol.* v.86(5):955-60.
33. Lianza S. Medicina de Reabilitação: Sociedade Brasileira de Medicina Física e Reabilitação/Academia Brasileira de Medicina de Reabilitação. 3ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. Pg.99.
34. Jedwab SKK. Laser e outras tecnologias na dermatologia. São Paulo: Santos, 2010.
35. Simunovic Z, Trobonjaca T. (2000) Lasers in Medicine and Dentistry - Basic Science and up-to-date. Clinical Application of Low Energy - Level Laser Therapy.
36. Bedini R, Manzon L, Fratto G, Pecci R.(2010) Microhardness and morphological changes induced by Nd:Yag laser on dental enamel: an in vitro study. *Ann Ist Super Sanita* v.46(2):168-72.
37. Greve JMD, Amatuizzi MM. Medicina de Reabilitação Aplicada à Ortopedia e Traumatologia. 1ª ed. Roca: São Paulo, 1999. Pg.15-16.
38. Mester E, Mester AF, Mester A (1985) The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* v.5: 31–39.
39. Ohshiro T, Calderhead RG (1998) Laser therapy: a decade further on Laser Therapy. v.10: 5-6.

40. Sasaki K, Ohshiro T (1997) Assessment in the rat model of the effects of 830 nm diode laser irradiation in a diachronic wound healing study. *Laser Therapy* v.9: 25-32.
41. Asagai Y, Ueno T, Ohshiro T. Application of low reactive-level laser therapy (LLLT) in the functional training of cerebral palsy patients. In: *2nd Congress World Association for Laser Therapy Proceedings*. Kansas City, Sep 2-5. 1998. p.13.
42. Costardi CHZ, Tamachiro C. Esteves Júnior I, Gomes AC (2008) Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. *Fisiot Mov* 21(2): 21-30.
43. Ohshiro T, Calderhead RG (1991) The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. *J Clin Laser Med and Surg* v.9(4): 267-275.
44. Karu T. Cellular mechanism of low power laser therapy: new questions. In Simunovic Z (Ed.). *Lasers in Medicine and Dentistry: Basic Science and Up-to-Date Clinical Application of Low-Energy Level Laser Therapy-LLLT* (2003); Rijeka-Croá, Croatia Vitagra 79–100pp.
45. Baxter D. Laserterapia de Baixa Intensidade. In: Kitchen S. (org.) *Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências*. São Paulo: Manole, 2003.
46. Low J, Reed A. *Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática*. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2001.
47. Abreu JAC, Sousa AL, Alves CLGF, Nunes JT (2011) Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sob ação do laser de baixa potência. *Scientia Medica* v.21(3): 96-100.
48. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucro MD (2005) Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* v.20: 426-432.
49. Zhang Y, Song S, Fong C, Tsang C, Yang Z, Yang M (2003) cDNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Human Fibroblast Cells Irradiated with Red Light. *The journal of investigative dermatology* v.120(5): 849-857.
50. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM., Dawes JRKS, Barham CD, Waddel DL (2004) The efficacy of laser therapy in wound repair: a metaanalysis of the literature. *Photomed Laser Surg* v.22(3): 241-7.
51. Manteifel VM, Karu TY (2009) Loosening of condensed chromatin in human blood lymphocytes exposed to irradiation with a low-energy He-Ne laser. *Biology Bulletin* v.36(6): 555–561.

52. Kujawa J, Pasternak K, Zavodnik I, Irzmański R, Wróbel D, Bryszewska M (2014) The effect of near-infrared MLS laser radiation on cell membrane structure and radical generation. *Lasers Med Sci* 29:1663–1668.
53. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA (2003) The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesq. Odontol Bras* v. 17(4):307-313.
54. Fonseca AS, Moreira TO, Paixão DL, Farias FM, Guimarães O, De Paoli S, Geller M, De Paoli F (2010) Effect of Laser Therapy on DNA Damage. *Lasers in Surgery and Medicine* v.42: 481–488.
55. Bjordal JM (2012) Low Level Laser Therapy (LLLT) and World Association for Laser Therapy (WALT) Dosage Recommendations. *Photomedicine and Laser Surgery* v. 30(2): 61-62.
56. Enwemeka C.S (2001). Attenuation and penetration depth of red 632.8nm and invisible infrared 904nm light in soft tissues. *Laser Ther* 13: 95–101.
57. Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, Hecker RS, Gerst H, Anders JJ (2005) Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg. Med* 36: 171–185.
58. Joensen J, Ming KO, Reed RK, Hummelsund S, Iversen VV, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM (2012) Skin Penetration Time-Profiles for Continuous 810nm and Superpulsed 904nm Lasers in a Rat Model. *Photomedicine and Laser Surgery* v.30(12): 688-694.
59. Khan I, Tang E, Arany P (2015) Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. *Nature Scientific Reports* v.5(10581): 1-14.
60. Ocak Z, Özlü T, Tasdemir S, Bilen H, Kocaman EM (2014) Are there any genotoxic effects of laser epilation applications on human? An observational study. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 4: 43-46.
61. El Batanouny M, Korraa S, Fekry O (2002) Mitogenic potential inducible by He:Ne laser in human lymphocytes in vitro. *J Photochem Photobiol B* 68: 1-7.
62. Kim YG (2002) Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species: implications for therapy. *Free Radic Res* v. 36: 1243–1250.
63. Jiang Y, Wen J, Caiyin Q, Lin L, Hu Z (2006) Mutant AFM 2 of *Alcaligenes faecalis* for phenol biodegradation using He-Ne laser irradiation. *Chemosphere* 64: 1236-1241.
64. Ravi M, Venkateswaran N, Solomon FDP, Abraham V, Venkatachalam P (2002) In Vitro Immunogenetic effects of 532 nm Short YAG Laser Pulses on Human Lymphocytes. *IntJour Hum Genet* 2: 15-18.

65. Sergio LP, Silva AP, Amorim PF, Campos VM, Magalhães LA, et al. (2015) DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. *Lasers Surg Med* 47: 361-368.
66. Ferrando-May E, Tomas M, Blumhard P, Stöckl M, Fuchs M, Leitenstorfer A (2013) Highlighting the DNA damage response with ultrashort laser pulses in the near infrared and kinetic modeling. *Front Genet* v.4(135): 1-8.
67. Solarczyk KJ, Zarebski M, Dobrucki JW (2012) Inducing local DNA damage by visible light to study chromatin repair. *DNA Repair* v.11: 996-1002.
68. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, et al. (2015) Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci* 16: 193-217.
69. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, et al. (2016) The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 3907147.
70. Lin YS, Huang MH, Chai CY, Yang RC (2004) Effects of helium-neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. *Am J Phys Med Rehabil* 83: 758-765.
71. Sergio LPS, da Silva Marciano RS, Polignano GAC, Guimarães OR, Geller M, et al. (2012) Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red Laser. *J Clin Exp Dermatol Res* 3: 166.
72. Fonseca AS, Campos VMA, Magalhães LAG, Paoli F (2015) Nucleotide excision repair pathway assessment in DNA exposed to low-intensity red and infrared lasers. *Braz J Med Biol Res* v.48(10) 2015.
73. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F (2014) Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci* 29: 1463-1467.
74. Hawkins DH, Abrahamse H. (2006) The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Laser Surg Med* v.38:74–83.
75. Calabrese EJ (2005) Hormetic dose-response relationships in immunology: occurrence, quantitative features of the dose response, mechanistic foundations, and clinical implications. *Crit Rev Toxicol* 35: 89-295.
76. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR (2011) Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response* 9: 602-618.
77. Liang W, Liu P, Fu E, Chung H, Jan C, Wu C, Shu C, Hsieh Y. (2015) Selective Cytotoxic Effects of Low-Power Laser Irradiation on Human Oral Cancer Cells. *Lasers in Surgery and Medicine* 47:756–764.

78. Rhee Y, Moon J, Choi S, Ahn J (2016) Low-level laser therapy promoted aggressive proliferation and angiogenesis through decreasing of transforming growth factor-b1 and increasing of akt/hypoxia inducible factor-1a in anaplastic thyroid cancer. *Photomedicine and Laser Surgery* v.4(6): 1-7.
79. Tafur J, Mills PJ (2008) Low-Intensity Light Therapy: Exploring the Role of Redox Mechanisms *Photomedicine and Laser Surgery* v.26(4): 323-328.
80. Marcos R, Carmone ER (2013) The Wing-Spot and the Comet tests as useful assays detecting genotoxicity in *Drosophila*. *Method Mol Biol* 1044: 417-427.
81. Tickoo S, Russell S (2002) *Drosophila melanogaster* as model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol* 2: 555-560.
82. Lindsley DL, Zimm GG (1992) The genoma of *Drosophila melanogaster*. New York: , 1992: Academic Press. 1133 p.
83. Frölich A, Würgler FE (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for *Drosophila melanogaster* wing spot test. *Mutation Research* v.216: 179-187.
84. Vogel EW, Graf U, Frei H, Nivard MM (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ* 146: 427-470.
85. Frei H, Würgler FE (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* 203: 297-308.
86. Andrade HHR, Reguly M, Lehmann M. Wing somatic mutation and recombination test (smart). in: Henderson DS (Ed.). *Drosophila Cytogenetics Protocols*. Totowa: Human Press, 2004. pp. 389-412.
87. Brianezi G, Camargo JLV, Miot HA (2009) Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay. *J Bras Patol Med Lab* v.45 (4): 325-334.
88. Tice RR, Agurell E, Anerson D, Burlinson B, Hartemann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sazaki YF (2000) Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35(3): 206-21.
89. Villela IV, Oliveira IM, Silva J, Henriques JA (2006) DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research* 605:78-86.
90. Sigalas E, Regan JD, Kramer PK, Witherspoon DE, Oppermann LA (2004) Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatology* v.20: 21-28.

91. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49(9):1183–1186.
92. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab BS, Urlinson B, Clay P, Collins A, Smith G, Speit T, Tice RR (2003) Mutagenesis. *International Comet Assay Worksho.* v.18(1): 45-51.
93. Houreld NN, Abrahamse H (2007) Effectiveness of Helium-Neon Laser Irradiation on Viability and Cytotoxicity of Diabetic-Wounded Fibroblast Cells *Photomedicine and Laser Surgery* v 25 (6): 474–481.
94. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol Methods* 65: 55-63.
95. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988) Evaluation of asoluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48:4827-33.

5 ARTIGO 1

Terapia de fotobiomodulação induz toxicidade genética em células eucarióticas
utilizando teste *in vivo*

Magda Patrícia Furlanetto, doutoranda em Ciências da Saúde pela
UFCSPA.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Artigo científico formatado segundo as normas do Periódico

Lasers in Medical Science.

Article Type: Brief Report

**PHOTOBIOMODULATION THERAPY INDUCES GENETIC TOXICITY IN
EUKARYOTIC CELLS USING TEST *IN VIVO***

Furlanetto MP, MD^{1,2}; Grivicich I, PhD²; Dihl R, PhD²; Lehmann M, PhD², Souza,
DS, MD; Plentz RDM, PhD¹

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA),

²Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

¹ Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Laboratório de Toxicidade Genética, Universidade Luterana do Brasil, Rio
Grande do Sul, Brasil.

Correspondence: Magda Patrícia Furlanetto

Laboratório de Toxicidade Genética

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA

Av. Farroupilha, 8001 Canoas – RS – Brasil.

Tel: +55(51) 3472-7727

E-mail: magdafurlanetto@hotmail.com

Conflict of interest: The authors have reported to *Lasers in Medical Science*
that no potential conflicts of interest exist.

Abstract

Introduction: Photobiomodulation (PBM) therapy has been mainly studied for its effects on the repairing, regeneration and healing of tissue due to its direct and indirect action on their proliferative capacity. However, it is necessary to consider the way in which the laser acts, that is, whether its performance may or may not affect the rate of spontaneous mutation and mitotic recombination of cells. The objective of this study was to investigate the genotoxic potential of the PBM (904 nm) starting from an *in vivo* bioassay capable of concomitantly checking point and chromosomal mutations and mitotic recombination. **Methods:** Strains of *Drosophila melanogaster*, which carry specific marker genes located on chromosome 3, were used to detect the induction of mutation and recombination in somatic and were exposed to different fluences (3, 5, 10 and 20 J/cm²). DNA damage was measured using the SMART test, based on the identification of wing hair with mutant phenotypes that represent the expression of the occurrence of lesions at the DNA level. **Results:** Of the evaluated doses 5, 10 and 20 J/cm² showed a significant increase in the total number of spots compared to the negative control. The highest frequency of spots induction occurred at a dose of 10 J/cm², with a decrease in the frequency of induction to the dose of 20 J/cm². **Conclusion:** Through quantitative and qualitative analysis of mutant hair manifestation it was possible to verify the presence of mutagenic events, both punctual and chromosomal, as well as those related to recombination and, in addition, the results point to a dose/response relationship.

Keywords: Photobiomodulation, Smart test, Genotoxicity, Laser.

Introduction

Photobiomodulation (PBM) therapy has been studied mainly due to its direct and indirect action on tissue proliferative capacity [1]. This action is likely due to the augmentation in mitochondrial function [2]. There are studies which show that laser absorption leads to the production of reactive oxygen species, leading to cellular alterations [3]. Toxicology has focused its efforts on the use of different bioassays which are capable of detecting point mutations, chromosomal aberrations and, more recently, events involving mitotic recombination [4], something that is closely related to heterozygosity loss and the consequent expression of deleterious genes.

The SMART test (Somatic mutation and recombination test) uses eukaryotic organism (fruit fly) of high genetic and biochemistry similarity to mammals. It presents the possibility of simultaneous detection of several types of DNA lesions, providing relevant responses to humans due to high level of accuracy [5] and the ability of simultaneously checking for chromosomal and mitotic recombination mutations. The objective of this study was to investigate the genotoxic potential of the PBM (904 nm) starting from an *in vivo* bioassay.

Materials and Methods

SMART Assay

Strains of *Drosophila melanogaster* which carry specific marker genes located on chromosome 3 were used to detect the induction of mutation and recombination in somatic cells. Such strains are designated as *flr*³; and *mwh* - having the following genotypic constitutions respectively: *flr*³(*flr*³/*ln*(3LR)*TM3,ri p^p sep l*(3)89Aa *bx*^{34e},*Bd*^S) and *mwh* (*mwh/mwh*). The test is based on the identification of hair with mutant phenotypes that represent the expression of the occurrence of lesions at the DNA level. Such changes are primarily induced in the cells of the imaginal discs which, through innumerable mitotic divisions, give origin to the wings of adults with their trichomes. Mutant trichomes are organized by stains with characteristic phenotypes that indicate the occurrence of these genetic events [6]. About 100 larvae were placed in a monolayer of 1 cm² plates

placed every 3 wells in order to avoid dispersion of the Laser and were exposed to one application of LLLT (904 nm).

Microscopic Analysis

Slides containing 10 female wings and 10 male wings were analyzed under optical microscope with magnification of 400X, totaling 100 individuals analyzed, including the negative control, observing the phenotypes of the trichomes or hairs existing on the dorsal and ventral surfaces of the individuals wings. The blade reading is done so that the evaluator establishes a sweep through all sections of the wing. Each imaginal disk has 10 to 30 cells, which after 12 mitotic cell cycles result in about 24,400 to 30,000 cells per wing per subject. Each slide, therefore, represents a sample number relative to the analysis of almost half a million cells.

Low-Level Lasers and Treatment Parameters

Therapeutic low-level infrared (904 nm, 50 mW, pulsed mode, spot size 0.01 cm², diameter 1.1mm) (Endophoton-LLT-0107; KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, Brazil), were used in this study. The focal point of the probe was 0.5cm at an angle of 90° by scanning. The irradiations were performed with energy densities of 3, 5, 10 and 20 J/cm².

Statistics

For the evaluation of genotoxicity, the examined series were compared to their respective negative controls. Statistical analysis was done through a computer program that employs the Kastenbaum-Bowman test and follows the multiple decision procedure according to Frei and Würigler [7].

Results

The results obtained after irradiation on third stage larvae originated from the standard crossover are presented in table 1. Of the evaluated doses, three (5, 10 and 20 J/cm²) showed a significant increase in the total number of spots compared to the negative control. In transheterozygous individuals, single spots

are produced by point mutation, chromosomal aberration or recombination, whereas twin spots are exclusively derived by mitotic recombination. The highest frequency of spots induction occurred at dose of 10 J/cm², with a decrease in the frequency of induction of dose of 20 J/cm².

Table 1: Summary of results obtained in the SMART test with PBM

Radiant exposure (J/cm ²)	Number of flies ^b (n)	Spots per fly (n° of spots)/statistical diagnosis ^a			
		Small single spots (1–2 cells)	Large single spots (>2 cells)	Twin spots	Total spots
0	20	0.30 (06)	0.00 (0)	0.05 (01)	0.35 (07)
3	20	0.50 (10) -	0.00 (0) -	0.00 (00) -	0.50 (10) -
5	20	0.60 (12) +	0.15 (03) -	0.05 (01) -	0.80 (16) +
10	20	0.85 (17) +	0.20 (04) -	0.00 (00) -	1.05 (21) +
20	20	0.60 (12) +	0.15 (03) -	0.05 (01) -	0.80 (16) +

Three-day-old standard cross (ST) larvae: marker-trans-heterozygous (*mwh/flr³*). ^aStatistical diagnoses according to Frei and Wurgler: +, positive; i, inconclusive; -, negative (P < 0.05)
^b48.800, i.e., approximate number of cells examined per fly.

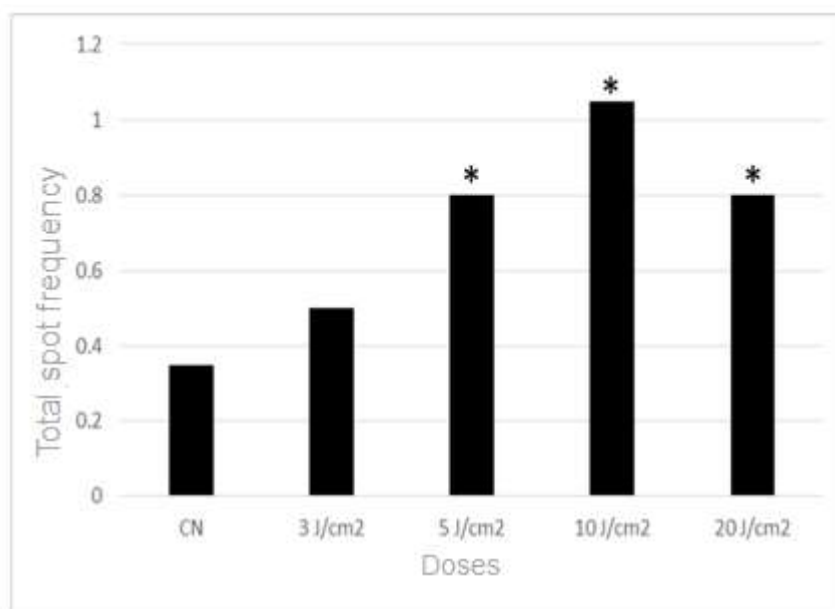


Fig. 1 - Dose/response curve of the frequency of total spots induced by different LLLT concentrations. * Significant difference (p < 0.05).

Discussion

Through quantitative and qualitative analysis of appearance of mutant hair it was possible to verify the presence of mutagenic events, both punctual and

chromosomal, as well as those related to mitotic recombination at doses of 5, 10 and 20J/cm². In addition, the results point to a dose/response effect. There no reports in the literature regarding investigation of possible genotoxic effects of LLLT using the SMART wing test.

Few researches report the use of PBMT in the induction of mutations. Jiang et al. made use of HeNe laser irradiations for periods of 25 minutes with a power of 5 to 25 mW in order to produce mutations capable of generating resistance or augmenting the biodegradation of the phenol compound [8]. Recently, Sergio et al. [9] have demonstrated through the Comet assay that the red and infrared laser induce damage in the DNA of rats' blood cells, especially oxidative damage dependent on the fluency (25, 50 and 100J/cm²), potency (30, 50 and 100mW) and emission mode (Continuous and 10, 50 and 100 pulses). They also identified that the induced lesions are targets of enzymes involved in the repair of oxidative damages.

Ferrando-May et al. [10] gathered in a major review a series of works that utilized lasers from 337 to 1100 nm wavelengths to generate samples of study of DNA lesions. In a general analysis, it is possible to verify the presence of double DNA breaks (DSBs) when using wavelengths of 355nm to 500nm. Pyrimidine dimers (CPD) however were the most frequent lesions when the wavelength used was between 500 and 1100nm.

In the search for good examples of DNA repair study, Solarczyk et al. [11] demonstrated single-strand break (SSB) and double-strand break (DSB) induction of the DNA helix using lasers in the visible range of 405 to 488 nm, without the presence of photosensitizers.

Another point of consideration refers to experimental findings that have related the damage caused by the laser to the generation of reactive oxygen species (ROS), showing the need to consider the involvement of oxidative stress in this context [12].

Inhibitory effects have also been reported on cell cultures exposed to higher fluence [13] and, according to Sergio et al [14], these findings may suggest that different intracellular chromophores or signaling pathways could be involved. This is due to the lesions of DNA being present in greater numbers for infrared lasers. This response, also referred as "Concept of Hormesis", has been

widely observed by different authors, who have shown that lower doses of laser present greater efficacy in relation to stimulus and tissue repair than larger doses [15].

Considering the possibility of lethal effects when applying PBM (810nm), Liang et al. [16] have demonstrated a significant decrease in the viability of human oral cancer *in vitro*. In contrast, cell death and oxidative stress levels were lower in normal cell culture. These findings led the authors to suggest PBMT as a therapeutic modality in the treatment of oral cancer. However, Rhee et al. [17] described aggressive proliferation and angiogenesis after the application of laser (655nm) in thyroid cancer.

Several studies discuss the contradictory effect of laser therapy, associating the difference in results to the different types of lasers, the dosage used, the mode of treatment as well as the conditions of the tissues and genetic characteristics. The use of an *in vivo* bioassay to evaluate the radiation-induced damage presents great advantages, especially if we consider that *in vitro* analyzes do not reflect the same response that is observed in the organism as a whole.

In conclusion, PBM therapy was able to induce an increase in mutation and somatic recombination in *Drosophila melanogaster* and showed a dose/response effect. These results point to the need to evaluate the laser damage through different bioassays, especially considering that several works point to the laser as an inducer of oxidative stress, and that reactive oxygen species are capable of inducing somatic mutation and malignant transformation.

Conflicts of Interest: None.

References:

1. Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, et al. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photochem Photobiol B* 2007;88:11-15.
2. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B* 2009;95:89-92.

3. De Marchi T, Leal Junior EC, Bortoli C, et al. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers Med Sci* 2012;27:231-236.
4. Doak SH, Griffiths SM, Manshian B, et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology. *Mutagenesis* 2009;24:285-293.
5. Tickoo S, Russell S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:555-560.
6. de Andrade HHR, Reguly ML, Lehmann M. In: Henderson DS (ed) *Wing somatic mutation and recombination test.. Drosophila Cytogenetics Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2004. 389-412.
7. Frei H, Würzler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* 1998;203:297-308.
8. Jiang Y, Wen J, Caiyin Q, et al. Mutant AFM 2 of *Alcaligenes faecalis* for phenol biodegradation using He-Ne laser irradiation. *Chemosphere* 2006;65:1236-1241.
9. Sergio LP, Silva AP, Amorim PF, et al. DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. *Lasers Surg Med* 2015;47:361-368.
10. Ferrando-May E, Tomas M, Blumhard P, et al. Highlighting the DNA damage response with ultrashort laser pulses in the near infrared and kinetic modeling. *Front Genet* 2013;4: 135.
11. Solarczyk KJ, Zarebski M, Dobrucki JW. Inducing local DNA damage by visible light to study chromatin repair. *DNA Repair* 2012;11:996-1002.
12. Tafani M, Sansone L, Limana F, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev* 2016:ID 3907147.18pp.
13. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Laser Surg Med* 2006; 38:74-83.
14. da Silva Sergio LP, da Silva Marciano R, Castanheira Polignano GA, et al. Evaluation of DNA damage induced by therapeutic low-level red laser. *J Clin Exp Dermatol Res* 2012; 3: 166.

15. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, et al. Biphasic dose response in low level light therapy: an update. *Dose Response* 2011; 9:602-618.
16. Liang W, Liu P, Fu E, et al. Selective Cytotoxic Effects of Low-Power Laser Irradiation on Human Oral Cancer Cells. *Lasers in Surgery and Medicine* 2015; 47:756-764.
17. Rhee Y, Moon J, Choi S, et al. Low-level laser therapy promoted aggressive proliferation and angiogenesis through decreasing of transforming growth factor-b1 and increasing of akt/hypoxia inducible factor-1a in anaplastic thyroid cancer. *Photomedicine and Laser Surgery* 2016; 34:6.7pp.

7 ARTIGO 2

Cell viability and DNA damage in mouse fibroblast cell line submitted to
Photobiomodulation therapy (660nm and 904nm)

Magda Patrícia Furlanetto, doutoranda em Ciências da Saúde pela
UFCSPA.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Artigo científico formatado segundo as normas do Periódico
Journal of Physical Therapy.

Title: Cell viability and DNA damage in mouse fibroblast cell line submitted to Photobiomodulation therapy (660nm and 904nm).

Furlanetto MP, MD^{1,2}; Grivicich I, PhD²; Dihl R, PhD²; Lehmann M, PhD², Souza, DS, MD; Plentz RDM, PhD¹

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA),

²Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Correspondence to:

Magda Patrícia Furlanetto

Laboratório de Toxicidade Genética

Universidade Luterana do Brasil, ULBRA

Av. Farroupilha, 8001 Canoas/RS - Brasil.

Tel: +55(51) 3472-7727

E-mail: magdafurlanetto@hotmail.com

Conflict of interest: The authors have reported to *Journal of Physical Therapy* that no potential conflicts of interest exist.

Title: Cell viability and DNA damage in mouse fibroblast cell line submitted to Photobiomodulation therapy (660nm and 904nm).

Abstract:

Introduction: Publications have been very contradictory in several aspects associated to the use of Low Level Laser Therapy (LLLT), associating the difference of the results to the different types of Lasers, irradiated doses, modes of treatment, as well as the conditions of the tissue and genetic characteristics. The objective of this study was to reveal the possible cytotoxic and genotoxic effects of LLLT (660 nm and 904 nm) irradiation using the NIH-3T3 mouse fibroblast cell line. **Methods:** Cells were exposed to different fluences (3, 5, 10 and 20 J/cm²). Cell viability was determined by the colorimetric assay MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide) and DNA damage was measured using the single cell gel electrophoresis method (Comet test). **Results:** The LLLT in the parameters of 660 nm and 904 nm, used at fluences of 3, 5, 10 and 20J/cm², showed no cytotoxic or DNA damage effects using MTT assay and Comet assay, respectively. **Conclusion:** As a trend, certain parameters had a biostimulatory effect and others increased cell death, depending on the wavelength and fluences used. Clinical research should be performed to corroborate or not the results found.

Keywords: MTT, Comet Assay, Cytotoxicity, Laser

Running Title: Cell Viability and DNA damage from the LLLT

Introduction

Photobiomodulation therapy (PBM), also known as Low Level Laser Therapy (LLLT), has been increasingly popular in several areas related to human health that include applications in the medical, dental, aesthetic and physiotherapeutic areas^{1,2}. Although their increasing use has aroused interest in research, mechanisms of action, dosimetry, as well as dose/response relationship, are not yet fully established.³⁻⁵ In the last decades some studies have generated favourable evidence on the application of PBM in several biological processes, both *in vivo* and *in vitro*, especially those related to cell proliferation and differentiation.⁵⁻⁷

The concern in making the use of Laser safe has been demonstrated in several studies.⁸⁻¹¹ Khan et al. reported that phototoxic doses mediated by red and infrared lasers did not generate direct DNA damage, neither genotoxic and/or mutagenic effects and that the phototoxicity found was likely the result of the activation of stress pathways, suggesting that these effects may be linked to the overproduction of reactive oxygen species (ROS), since sublethal doses may potentially promote mutagenic events and cell transformation.⁸

In contrast, a number of studies have demonstrated the involvement of laser in DNA lesions and also established associations to their respective mechanisms of repair.¹²⁻¹⁵ Oxidative damage dependent on fluency, power and emission mode were identified using Comet test and the induced lesions were target of enzymes involved in oxidation repair.¹⁶ Ferrando-May et al. collected a series of papers using lasers from 337 to 1100 nm wavelength in order to generate models in study of to lead to DSBNA lesions and verified the presence of double-strand breaks (DSB) when using wavelengths from 355 to 500 nm. However, oxidative lesions such as pyrimidine dimers (CPD) were the most frequent when the wavelength used was between 500 and 1100 nm.¹⁷ Likewise, the use of lasers in the visible range of 405 to 488 nm showed the induction of single (SSB) and double-strand (DSB) breaks of the DNA helix.¹⁸

In addition, inhibition of cell proliferation has also been described in the treatment of tumoral processes, especially when related to head and neck cancers.¹⁹⁻²² However, from cytotoxicity assays, authors state that clinicians

should remain cautious about using Laser to treat patients with malignancies.^{7,23-25}

Pre-inducing stressors with therapeutic Lasers seem to dominate the autophagy and cellular repair response contributing to the increase of the phototoxic dose threshold.⁸ Similarly, a study investigating the effects of Laser (600 to 1000 nm) on levels of bacterial filamentation and survival in *E. coli* deficient lines in nucleotide excision repair and exposed to UVC, demonstrated protective effects of preconditioning against the lethal damage of UVC by prior application of the laser, but indicated the presence of sublethal lesions in the DNA.²⁶

In fact, academic literature has been quite contradictory on several aspects associated with the use of LLLT, associating the difference of the results to the different types of Lasers, irradiated doses, modes of treatment, as well as the conditions of the tissue and genetic characteristics. Despite advances in research, it is still necessary to investigate different experimental models. Thus, the present study seeks to verify the effects of PBM therapy (660 and 904 nm) on cytotoxicity and genotoxicity parameters in biological systems.

Material and Methods

This is an experimental study using fibroblast cells in culture and was approved by the Research Committee of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre under protocol 076/2015.

Cell lines and maintenance of fibroblast culture

The NIH-3T3 mouse fibroblast cell line was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank Collection (Duque de Caxias, RJ). Cells are maintained in 25 cm² culture flasks with DMEM culture medium containing 2% glutamine and 10% fetal bovine serum at 37°C in 5% CO₂ and 95% humidity. Before phototherapy, a suspension containing 7x10⁴ cells/100µL was prepared. Plates from 24 wells of flat bottom were used for the experiment. The cell suspension was placed every four wells to provide a maximum distance between the cells and, thus, to avoid dispersion of the laser to other wells. All experiments were performed in

duplicate, 2 times, with six samples for each dose tested, as well as for the negative control (untreated cells).

DNA damage

Fibroblast cells are distributed into 24 well plates at a density of 1×10^4 cells/well and cultured for 24 hours. The fibroblasts are treated with 660 and 904 nm laser applications in irradiation parameters which are described in Table 1. The evaluation is performed immediately after the application of the Laser (0) and three hours after the application (3h), as described by Tice et al. [27]. After 2 min, 50µL complete medium was added, and the cells were gently resuspended and mixed with 90µL low-melting point agarose solution and spread on agarose-pre-coated microscope slides. Slides were incubated for 24 hours in lysis solution at 4°C slides and placed in a horizontal electrophoresis unit and incubated with fresh buffer solution (300mM NaOH, 1 mM EDTA) at 4°C for 15 min in order to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (94 V/cm). All of the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage.

Evaluation of citotoxicity

Cell cultures are maintained in exponential growth by subculture of the cells every two days in culture medium. Cells were irradiated with 660 and 904 nm Laser applications in parameters which are described in Table 1. Post-irradiation, the cell proliferation was evaluated using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay according to the protocol proposed by Scudiero et al.³⁰ After laser exposure, the cells were incubated with 200 µL/well of MTT solution (0.05 g of MTT 5 mL diluted in PBS) for 3 h. After this step, MTT was removed and 200 µL DMSO was added immediately to the formazan precipitate. The absorbance of formazan crystals, which is a direct indicator of the amount of viable cells, was assessed with a microplate reader (Multiskan, Uniscence) at 540 nm.

Low-Level Lasers and Treatment Parameters

Therapeutic low-level red (660 nm, 20 mW, continuous wave, spot size 0.035 cm², collimate fibre shape, diameter 2.2 mm) and infrared Lasers (904 nm, 50 mW, pulsed mode, spot size 0.01 cm², divergent fiber shape, diameter 1.2 mm) (Endophoton-LLT-0107; KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, Brazil), were used in this study. The focal point of the probe was 0.5 cm, equal to the diameter of culture plate Wells, at an angle of 90°. Irradiation parameter evaluation in Comet assay and MTT is provided in Table 1. Parameters are described according to Turnér & Jenkins.²⁹

After 24 hours, cultures of cells were exposed to one, two or three applications of laser irradiation. Irradiation exposures were performed at energy densities of 3, 5, 10, and 20 J/cm². Each experiment included 18 replicates for each application of laser and six replicates of negative/untreated controls. For experiments with one and three repeated exposures, the irradiation applications were separated by 24 hours.

Table 1. Treatment Parameters

Test	Wavelength (nm)	Power (mW)	Fluence (J/cm ²)	Irradiated area (cm ²)	No points irradiated	Treatment sessions	Effective fluence (J/cm ²)
Comet Assay	660 904	20 50	3	1,91	6	1	3,14
			5	1,91	6	1	5,23
			10	1,91	6	1	10,47
			20	1,91	6	1	20,94
MTT	660 904	20 50	3	1,91	6	1	3,14
			5	1,91	6	1	5,23
			10	1,91	6	1	10,47
			20	1,91	6	1	20,97
MTT	660 904	20 50	3	1,91	6	3	3,14
			5	1,91	6	3	5,23
			10	1,91	6	3	10,47
			20	1,91	6	3	20,97

Statistical Analysis

We used SPSS version 11.5 to determine the statistical significance in cell proliferation outcomes after laser irradiation. Descriptive statistics were used to describe the means and standard deviation (SD) of the percentage. Two-way ANOVA was used to compare different groups. One-way ANOVA with Tukey's

Honestly Significant Difference (HSD) test was performed to determine the level of significance, when comparing energy density and number of exposures of irradiated cells versus the untreated controls. $P < 0.05$ was considered statistically significant (95% confidence interval).

Results

No adverse effects were found related to cytotoxicity or genotoxicity parameters in the Comet and MTT assays. Cell proliferation was evaluated after 24 (1dose) and 72 hours (3 doses) by MTT assay, verifying the viable and dead cells at 4 different doses (3, 5, 10 and 20 J/cm²) as shown in Figures 1 and 2.

The low-intensity laser parameters used did not present significant differences in the different irradiated doses, either with one or three irradiations presenting cell viability higher than 80%, allowing them to be classified as non-cytotoxic.

Figures 1 (660 nm) and 2 (904 nm) represent the results obtained by the MTT cell viability test. Cells irradiated with only one laser application, both 660 nm and 904 nm, demonstrated a growing increase in cell proliferation relative to the doses used. However, consecutive irradiations for 3 days demonstrated a different pattern in relation to the wavelengths tested. Comparatively, when irradiations were performed at 660 nm, there was an increase in cell proliferation at doses of 3 and 5 J/cm², a decrease at 10 J/cm², and an even greater reduction at the dose of 20 J/cm², below control values and indicating cell death. Consecutive 904 nm irradiations showed a proliferative decrease at doses of 5 and 10 J/cm² and the dose of 20 J/cm² also caused cell death, below control levels, suggesting a cytotoxic effect of greater magnitude in relation to the 20 J/cm² dose of Wavelength 660 nm, indicating a dose-dependent effect.

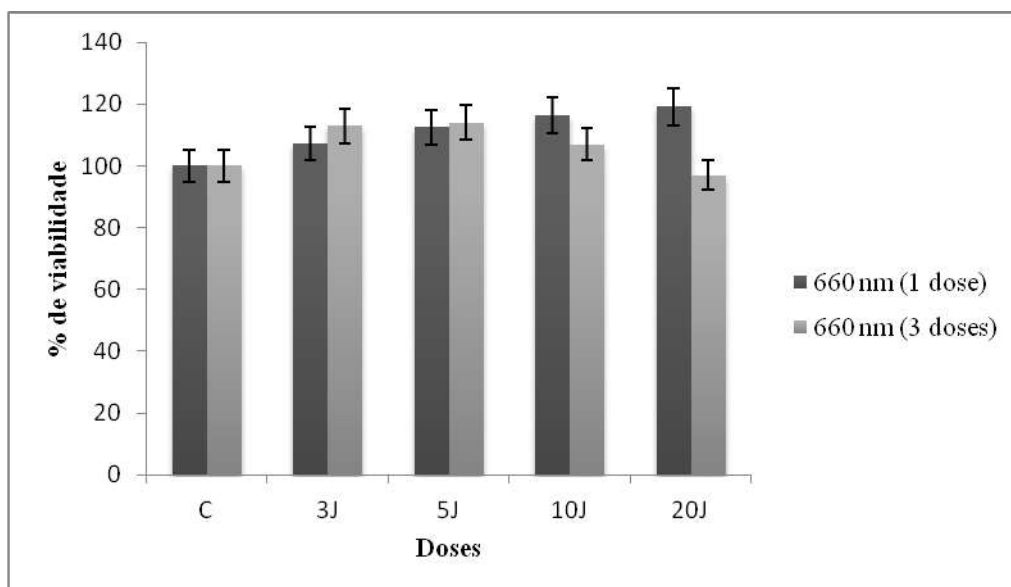


Fig. 1 - Cell viability by MTT after 1 dose (24hs post irradiation) and 3 doses (24, 48, 72hs post irradiation) using laser at 660 nm wavelength. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (**) $P < 0.05$ when compared to the negative control.

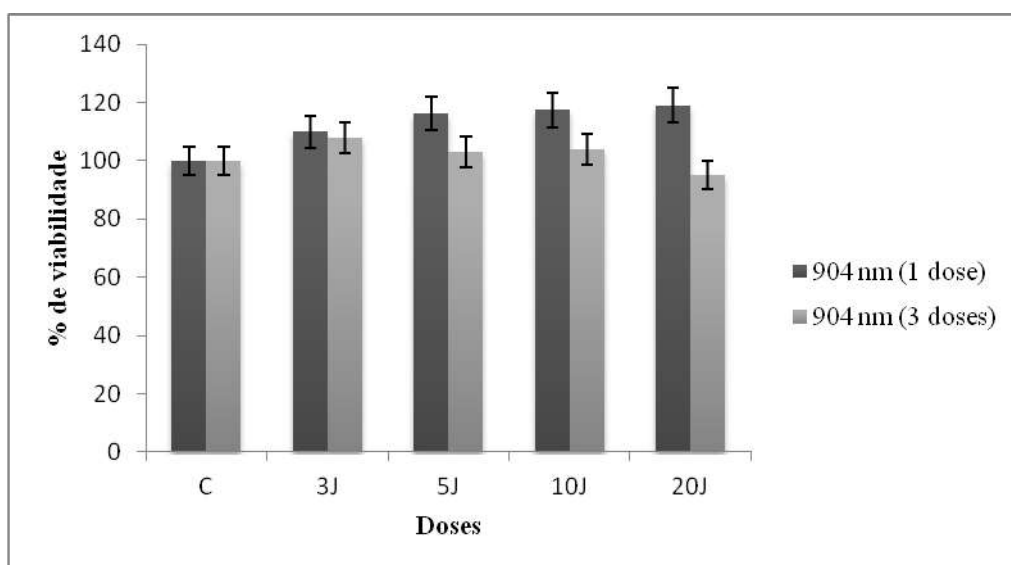


Fig. 2 - Cell viability by MTT after 1 dose (24hs post irradiation) and 3 doses (72hs post irradiation) using laser at 904 nm wavelength. Error bars indicate the standard deviation of the mean. (**) $P < 0.05$ when compared to the negative control.

Figures 3 and 4 respectively demonstrate the damage index in samples of fibroblastic cells submitted to a single exposure (24 hs) to red (660 nm) and infrared (904 nm) Lasers in fluids of 3, 5, 10 and 20 J/cm². The data show that the irradiations were not able to produce DNA damage when compared to the negative control (non-irradiated cells), and were not statistically significant.

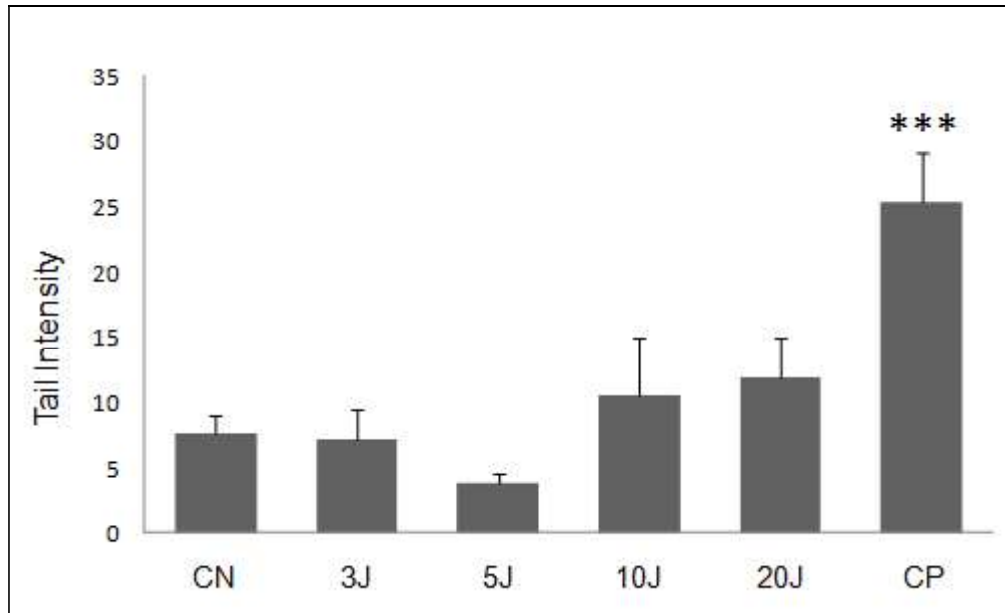


Fig.3 - Damage index in cell cultures of fibroblasts exposed to Lasers in different columns: (CN) Negative control, (3J) 3 J/cm² of 660 nm laser, (5J) 5 J/cm² of 660nm laser, (10J) 10 J/cm² of 660 nm laser, (20J) 20 J/cm² of 660 nm laser (CP) Positive control (5 mM hydrogen peroxide). Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) P <0.001 when compared to the negative control.

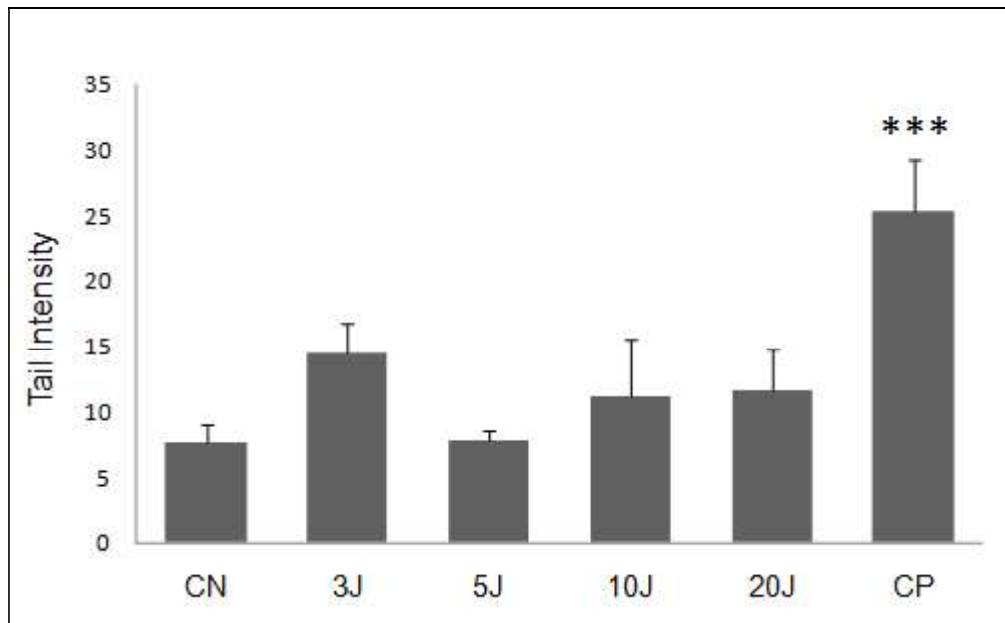


Fig.4 - Damage index in cell cultures of fibroblasts exposed to Lasers in different columns: (CN) Negative control, (3J) 3 J/cm² of 904 nm laser, (5J) 5 J/cm² of 904 nm laser, (10J) 10 J/cm² of 904 nm laser, (20J) 20 J/cm² of 904 nm laser (CP) Positive control (5 mM hydrogen peroxide). Error bars indicate the standard deviation of the mean. (***) P <0.001 when compared to the negative control.

Discussion

In this study we evaluated the effect of different exposures and irradiation doses with Lasers that are commonly used in clinical practice and have been

shown not to induce genetic damage in cultures of murine fibroblasts, nor were there significant changes in cell viability.

Publications have shown to be quite divergent in relation to virtually all the parameters of photobiomodulation¹¹ and, although the use of laser has increased in many countries, the molecular mechanisms and effects of LLLT, mainly on DNA, are controversial.²⁶

In this work, it was demonstrated that 3 consecutive doses presented higher rates of cell death when compared to a single application. In addition, this effect was shown to be amplified at the highest wavelength used (904 nm). Cytotoxicity defines the potential for chemical (or physical) products to destroy cells and, consequently, measures cell death independently of another underlying mechanism.¹¹ The findings of this study, although not statistically significant, indicate a trend that suggests that a single laser exposure (3, 5, 10 and 20 J/cm²) increases cell proliferation (dose-response) and that being exposed for 3 consecutive days to red and infrared lasers at doses of 10 and 20 J/cm² may, respectively, decrease cell viability and lead to cell death, especially at 20 J/cm² where growth was lower than that found in non-irradiated cultures (negative control).

Similar results were found by Frigo et al. using the MTT viability test and found that there was no significant cell proliferation at doses of 3 J/cm², but the dose of 21 J/cm² showed negative effects on fibroblast culture, as it inhibited cell proliferation. The authors suggest that the physiological status of cells affects the results of PBM, and that cells with high metabolic rate and short cycle do not respond to this therapy.³⁰

Hourelid & Abrahamse tested 5 J/cm² laser fluids (632.8 nm) in human epithelial cells that were harvested in diabetics and maintained in culture and performed viability and genotoxicity tests. The *in vitro* experiment demonstrated that consecutive doses were cytotoxic. However, the 72 hours interval between applications showed less DNA damage and increased cell proliferation. The irradiation interval therefore proved to play an important role in wound healing *in vitro*.¹¹ The authors therefore suggest that factors such as exposure time, dose, potency and interval between applications should be considered in clinical practice, which is in agreement with the findings in this study.

When using irradiations in leukemic cells (810 nm, 0,1W), Dastanpour et al. claim that cell growth differs according to irradiation and cell type conditions. They report that normal and neoplastic cells may have different sensitivity to laser irradiation by suggesting that responses to phototherapy have different effects on cells and their distinct mechanisms of cell proliferation. In their experiment, cell cultures were irradiated 1, 2 or 3 times per week at 5, 10 and 20 J/cm² fluences. They did not show significant changes in cell proliferation between single applications or 3 times a week, irrespective of irradiation dose at 5 and 10 J/cm², but showed a statistically significant difference at doses of 20J/cm² when applied twice a week. When affirming that the biological effects of the laser remain from 9 to 72 hours, they suggest that this time should be considered to determine the interval between the applications, which was also verified in our study.²³

Likewise, Souza et al. utilized irradiations of 660 nm (15 mW, 7.5 J/cm²) and 780nm (70 mW, 3 J/cm²) to verify cell viability in cultures of 1, 3 and 5 days and demonstrated increased mitochondrial function of macrophages in simulated inflammatory condition *in vitro* after the second application, but no later than the fifth day (third application). The increase in cell proliferation was only maintained in cells without the activated inflammatory condition.³¹ According to Huang et al., Laser therapy exerts an effect on biological responses and appears to be cumulative with each new dose applied.¹⁰

Agrawall et al. describe the effect of PBM therapy in a preconditioning study on injured tissues and report the important role of LLLT in the mechanisms of cellular biomodulation, since they can minimize the secondary damage caused by the inflammatory process.³

However, the Laser study on the effect of preconditioning in primary neuronal cultures to test for the possibility of inhibition of apoptotic cells concluded that laser preconditioning protected the neuronal cells of cyanide by a mechanism that probably involves decreased production of ROS, down-regulation of pro-apoptosis mechanisms, activation of anti-apoptotic proteins and by increased tissue energy.³² Several authors suggest that levels of ROS determine the risk/benefit binomial when using phototherapy, being dependent on dosimetry, exposure time, tissue pigmentation, and others.^{4,6,8} In our study,

oxidative stress was not evaluated, resulting in a limitation in the interpretation of the results found.

In this context, Kujawa et al. suggest that lower doses act to increase cell proliferation and inhibit apoptosis ("protective" function).⁴ Higher doses, however, appear to be involved in irreparable damage that can lead to apoptosis and autophagy.^{31,33} In addition, they appear to exhibit cytotoxic selectivity, since they appear to inhibit proliferation in oral mucositis but seem to accentuate it in other tumors.^{19,23,34,35} Thus, Huang et al. state that dosimetry to be used in protocols should consider the biphasic response.¹⁰

As in this study, other publications did not detect the presence of DNA damage.^{36,37} However, a number of papers have described DNA damage caused by the use of LLLT.^{14,16,38,39} Manteifel and Karu performed experiments on yeasts using fluences of 4.6 J/cm² and 11.5 J/cm² (632.8 nm). At the lower dose they observed an increase in cell proliferation and at the doses of 11 J/cm² they describe changes in the mitochondrial (and possibly nuclear) DNA, affirming that these alterations last for generations and attribute these lesions by the acting of ROS as secondary messengers.⁹

Canuto et al. states that red laser radiation can induce DNA lesions at a sublethal level.²⁶ Khan et al. describe that sublethal doses may potentially promote cell mutagenicity and transformation. The results indicate that this does not appear to be mediated by direct DNA damage and also implies that high doses of LLLT may be phototoxic without being genotoxic or mutagenic, indicating that they may be safe for clinical applications. This is due to laser phototoxicity *in vitro* and *in vivo* involving production of surface heat and damage resulting from stress-mediated levels of ATF-4, which activates transcription factors.⁸ Thus, they suggest the utility of monitoring surface temperature and expression of ATF-4 as potential biomarkers to develop safe and effective use of low intensity lasers. In addition, Manteifel and Karu report decomposition of chromatin after 1 hour of HeNe laser irradiation (628nm) and describe a greater availability of transcription sites in DNA.⁴⁰

Kujawa et al., however, also found no cytotoxic and/or genotoxic effects after 810 nm LLLT irradiation at fluences of 3.75 and 11.25 J/cm².⁴¹ Hawkins and Abrahamse (2006), in turn, concluded that HeNe red laser irradiations for 2

consecutive days of 10 and 16 J/cm² significantly increased DNA damage.⁴² In this context, it should be noted that in our study the cells received only a single irradiation of the 660 and 904nm Lasers in the different fluences tested.

The effects of LLLT on the DNA molecule, the involved oxidative mechanisms and the effects on cell proliferation in different tissues remain controversial. Cell viability and genotoxicity tests have proved to be valuable in this understanding and have been widely used.^{11,16,30,35} Although *in vitro* studies allow standardization and are reproducible models, the results of these studies still cannot be correlated with possible clinical results. However, the prior knowledge of these effects and possible therapeutic repercussions is of extreme importance for the formulation of *in vivo* protocols. Likewise, a larger number of studies such as this, which concomitantly compare cytotoxic and genotoxic effects, is necessary for a greater elucidation of the mechanisms involved in the phototoxicity and, thus, to guarantee greater safety in the use of therapeutic Lasers.

Conclusion

The low intensity laser in the parameters of 660 and 904 nm, used at fluences of 3, 5, 10 and 20 J/cm², showed no cytotoxic or genetic damage-related effects in the MTT and Comet cell viability tests, respectively. Clinical research should be performed to corroborate or not the results found.

Conflicts of Interest: None.

References:

1. Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet*. 2009;374:1897–1908.
2. Dantas CMG, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PM, Marques MM. In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Braz Oral Res*. 2010;24(4):460-466.

3. Agrawal T, Gaurav GK, Rai V, Carroll JD, Hamblin MR. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm. *Dose-Response*. 2014;12:619–649.
4. Kujawa J, Pasternak K, Zavodnik I, Irzmański R, Wróbel D, Bryszewska M. The effect of near-infrared MLS laser radiation on cell membrane structure and radical generation. *Lasers Med Sci*. 2014;29:1663–1668.
5. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*. 2011;27: 237-249.
6. Zhang L, Xing D, Gao X, WU, S. Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol*. 2009;219:553-562.
7. Sperandio FF, Simões A, Corrêa L, Aranha ACC, Giudice FS, Hamblin MR, Sousa SCOM. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics*. 2015;8(10):795–803.
8. Khan I, Tang E, Arany P. Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. *Nature Scientific Reports*. 2015;5(10581):1-14
9. Manteifel V, Karu T. Prolonged Effects of He-Ne Laser Irradiation on Ultrastructure of Mitochondria in Successive Generations of Yeast Cells. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A*. Méndez-Vilas (Ed.) 2007;21-31(10pp).
10. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9:602-618.
11. Houreld NN, Abrahamse H. Effectiveness of Helium-Neon Laser Irradiation on Viability and Cytotoxicity of Diabetic-Wounded Fibroblast Cells *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007;25(6):474–481.
12. Berra CM, Oliveira CS, Garcia CCM, Rocha CRR, Lerner LK, Lima LCA, et al. Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;61:343–356.

13. Fonseca AS, Campos VMA, Magalhães LAG, Paoli F. Nucleotide excision repair pathway assessment in DNA exposed to low-intensity red and infrared lasers. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(10): 929-938.
14. Sergio LPS, da Silva Marciano RS, Polignano GAC, Guimarães OR, Geller M, et al. Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red Laser. *J Clin Exp Dermatol Res.* 2012;3:166.
15. Lauder P, Botchway SW, Berry MG, Parker AW, Harper JV, O'Neill P. The induction of DNA damage signalling/repair responses in mammalian cells by near infrared femtosecond laser pulses. *Central Laser Facility Annual Report.* 2007
16. Sergio LP, Silva AP, Amorim PF, Campos VM, Magalhães LA, et al. DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. *Lasers Surg Med.* 2015;47: 361-368.
17. Ferrando-May E, Tomas M, Blumhard P, Stöckl M, Fuchs M, Leitenstorfer A. Highlighting the DNA damage response with ultrashort laser pulses in the near infrared and kinetic modeling. *Front Genet.* 2013;4(135):1-8.
18. Solarczyk KJ, Zarebski M, Dobrucki JW. Inducing local DNA damage by visible light to study chromatin repair. *DNA Repair.* 2012;11:996-1002.
19. Liang W, Liu P, Fu E, Chung H, Jan C, Wu C, Shu C, Hsieh Y. Selective Cytotoxic Effects of Low-Power Laser Irradiation on Human Oral Cancer Cells. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2015;47:756–764.
20. Lai X, Ning F, Xia X, Wang D, Tang L, Hu J, et al. HMME combined with green light-emitting diode irradiation results in efficient apoptosis on human tongue squamous cell carcinoma. *Lasers Med Sci.* 2015;30:1941–1948.
21. Freitas ACC, Campos L, Brandão TB, Cristófaró M, Eduardo FP, Luiz AC, et al. Chemotherapy-Induced Oral Mucositis: Effect of LED and Laser Phototherapy Treatment Protocols *Photomedicine and Laser Surgery.* 2014;32(2):81–87.
22. Cunha CB, Eduardo FP, Zezell DM, Bezinelli LM, Shitara PPL, Correa L.vEffect of irradiation with red and infrared laser in the treatment of oral mucositis. *Lasers Med Sci.* 2012;27:1233–1240.

23. Dastanpour S, Beitollahi JM, Saber K. The effect of low-level laser therapy on human leukemic cells. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2015;6(2):74-79.
24. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE. Could the biological robustness of low level laser therapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients *Oral Oncology*. 2016 (article in press)
25. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tuner J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RAB. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2011;19:1069–1077.
26. Canuto KS, Sergio LPS, Guimarães OR, Geller M, Paoli F, Fonseca AS. Low-level red laser therapy alters effects of ultravioleta C radiation on *Escherichia coli* cells. *Braz J Med Biol Res*. 2015;48(10):939–944.
27. Tice RR, Agurell E, Anerson D, Burlinson B, Hartemann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-221.
28. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48:4827-4833.
29. Tuner J, Jenkins PA. Parameter Reproducibility in Photobiomodulation. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2016;34(3):91-93.
30. Frigo L, Fávero GM, Lima HJC, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, et al. Low-Level Laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010;28(S1):151-156.
31. Souza NHC, Ferrari RAM, Silva DFT, Nunes FD, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther*. 2014;18(4):308-314.

32. Gonzalez-Lima F, Auchter A. Protection against neurodegeneration with low-dose methylene blue and near-infrared light. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9:179 (5pp).
33. Zhang Y, Song S, Fong C, Tsang C, Yang Z, Yang M. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Human Fibroblast Cells Irradiated with Red Light. *The journal of investigative dermatology*. 2003;120(5): 849-857.
34. Rhee Y, Moon J, Choi S, Ahn JC. Low-level laser therapy promoted aggressive proliferation and angiogenesis through decreasing of transforming growth factor- β 1 and increasing of akt/hypoxia inducible factor-1 α in anaplastic thyroid cancer. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2016;34:6.7pp.
35. Frigo L, Luppi JSS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, et al. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2009;9:404.
36. Ocak Z, Özlü T, Tasdemir S, Bilen H, Kocaman EM. Are there any genotoxic effects of laser epilation applications on human? An observational study. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*. 2014;4:43-46.
37. El Batanouny M, Korraa S, Fekry O. Mitogenic potential inducible by He:Ne laser in human lymphocytes in vitro. *J Photochem Photobiol*. 2002;B68:1-7.
38. Jiang Y, Wen J, Caiyin Q, Lin L, Hu Z. Mutant AFM 2 of *Alcaligenes faecalis* for phenol biodegradation using He-Ne laser irradiation. *Chemosphere*. 2006;65: 1236-1241.
39. Ravi M, Venkateswaran N, Solomon FDP, Abraham V, Venkatachalam P. In Vitro Immunogenetic effects of 532 nm Short YAG Laser Pulses on Human Lymphocytes. *Int Jour Hum Genet*. 2002;2:15-18.
40. Manteifel VM, Karu TY. Loosening of condensed chromatin in human blood lymphocytes exposed to irradiation with a low-energy He-Ne laser. *Biology Bulletin*. 2009;36(6):555–561.
41. Kujawa J, Zavodnik IB, Lapshina A, Labieniec M, Bryszewska M. Cell survival, DNA, and protein damage in B14 cells under low-intensity near-

- infrared (810 nm) laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2004;22:504–508.
42. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006;38:74–83.

8 CONCLUSÕES

A radiação Laser de baixa intensidade (660 nm e 904 nm) não alterou a viabilidade celular nos parâmetros utilizados, mas foi capaz de induzir um incremento em mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* e demonstrou um efeito de dose-resposta. Torna-se necessário, portanto, avaliar os danos do Laser a partir de diferentes bioensaios principalmente se considerarmos que vários trabalhos apontam o Laser como indutor de estresse oxidativo e que espécies reativas de oxigênio são capazes de induzir mutação somática e transformação maligna estando intimamente relacionada com a gênese e com a progressão de processos tumorais e do câncer.

ANEXO A – Atestado da Comissão de Pesquisa da UFCSPA

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

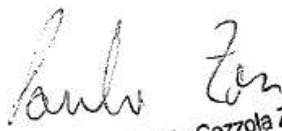
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
COMISSÃO DE PESQUISA

Atestado

Atestamos que o projeto de pesquisa intitulado *"Avaliação do Potencial Genotóxico e de Citotoxicidade do Laser de Baixa Intensidade em Modelos Experimentais"*, de Rodrigo Della Méea Plentz, está registrado na Comissão de Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre sob o número 076/2015. Salientamos que este registro **não autoriza o pesquisador a coletar ou analisar dados oriundos de sujeitos de pesquisa.**

Salientamos ainda que tal registro **não garante** a concessão de recursos financeiros por parte da UFCSPA a este projeto de pesquisa.

Porto Alegre, 03 de novembro de 2015.


Paulo Ricardo Gazzola Zen
Coordenador Geral da Pesquisa
UFCSPA

ANEXO B – Instruções para Autores – Lasers and Medical Science

■ Type of Articles

Original Articles: Should contain title page, abstract, keywords, introduction, methods, results, discussion, acknowledgment, references, tables and figures. The length of the text should be limited to 4500 words excluding the references.

Review Articles: Should be requested by the editor, but J Lasers Med Sci will also accept submitted reviews. The authors of review articles are invited to contact the Editorial Office before preparing a review article. Both solicited and unsolicited review articles are subjected to editorial review such as the original papers. This type of articles should be limited to 5000 words.

Case Reports and Brief Reports: Should not exceed 2000 words. Both should include abstract, keywords, case presentation, discussion, acknowledgment, references, and 1 to 4 figures. Necessary documentations of the case(s) like pathology and laboratory test reports should be included in the submission package. Brief reports should not have more than one figure and/or table.

Case Series: It is included all of the reports about the special treatment and new procedure in some limited cases with good results but not confirmed yet internationally as a global choice. It should be limited to 2500 words.

Photo Essay: It is a quiz type article which should be presented by a high quality picture, a brief history about the picture and a question about the best modality of intervention. It should be limited to 2500 words.

Letters to the Editor: J Lasers Med Sci accepts letters to the editor. Letters, less than 500 words, should discuss articles published in the journal during the previous six months. Letters will undergo peer-review processing and will be edited for clarity.

Commentary: J Lasers Med Sci accepts the comment(s) from the experts in the shape of Commentary Letter not more than 1000 words.

■ Submission

Manuscript submission to the J Laser Med Sci is only possible through the Journal's URL: <http://www.jlms.ir>. Manuscript must be accompanied by a covering letter to the Editor-in-Chief, including title and author(s) name and undertaking that it has not been published or submitted elsewhere. In case the manuscript was earlier submitted to some other journals and was rejected, the authors must provide full information for proper analysis. Manuscript should be typed as a Microsoft Word document in double space on the A-4 size page set up with clear margins on both sides. Tables as well as illustrations should be typed and drawn at the end of the manuscript after the references. Do not submit tables as photographs. All text documents should be uploaded in Microsoft Word format as an attachment. The figures should be sent in a format of JPEG or GIF which will produce high quality images in the online edition of the journal.

***The Title Page:** The complete title of the manuscript, the name of all the authors with their highest qualifications, the department or institution to which they are attached, address for correspondence with telephone numbers, e-mail, and fax number.

***The Abstract:** All original articles must accompany a structured abstract. It should be structured as Background, Methods, Results and Conclusion followed by 3 to 5 Keywords. Keywords will assist indexers in cross indexing the article as they are published with abstract. Use terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Authors need to be careful that the abstract reflects the content of the article accurately.

***Introduction:** This should summarize the purpose and the rationale for the study. It should neither review the subject extensively nor should it have data or conclusions of the study.

***Methods:** This should include exact method or observation or experiment. If an apparatus is

used, its manufacturer's name and address should be given in parenthesis. Please note that for any article dealing with laser details such as type of laser, energy, pulse duration and the spot size should be mentioned precisely. If the method is established, give reference but if the method is new, give enough information so that another author be able to perform it. If a drug is used, its generic name, dose and route of administration must be given. For patients, age, sex with mean age $\pm$ standard deviation should be given. Statistical method must be mentioned and specify any computer software used.

***Results:** It must be presented in the form of text, tables and illustrations. The contents of the tables should not be all repeated in the text. Instead, a reference to the table number may be given. Long articles may need sub-headings within some sections (especially the Results and Discussion parts) to clarify their contents.

***Discussion:** This should emphasize the present findings and the variations or similarities with other work done in the field by other workers. The detailed data should not be repeated in the discussion again. Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. It must be mentioned whether the hypothesis mentioned in the article is true, false or no conclusions can be derived.

***Acknowledgement:** All contributors who do not meet the criteria for authorship should be covered in the acknowledgement section. It should include persons who have provided technical help, writing assistance and departmental head who has only provided general support. Financial and material support should also be acknowledged.

***Tables:** In limited numbers should be submitted with the legends placed above. Do not submit tables as photograph. Place explanatory matters in footnotes, not in the heading.

***Figures:** Should be in limited numbers, with high quality art work and mounted on separate pages. The legends should be placed below. The same data should not be presented in tables, figures and text, simultaneously.

***References:** All manuscripts should be accompanied by relevant references. The author

should ensure reference to locally published studies by doing proper literature search. It may not be possible for the editor and reviewers to check the accuracy of all reference citations. To minimize such errors author should verify references against the original documents. The Reference should provide the following information as stated in the presented models as follows:

- **Article:** Tallab TM, Bahamdah KA, Mirdad S, et al. Cutaneous leishmaniasis: Schedules for intralesional treatment with sodium stibogluconate. *Int J Dermatol* 1996;35:594-7.
- **Chapter:** Bigby M. The hierarchy of evidence. In: Williams HC, Bigby M, Diepgen T, et al. (Eds). *Evidence-based dermatology*. Oxford: BMJ Publishing Group; 2003. 44-8.
- **Book:** Norman IJ, Redfern SJ (Eds). *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

***Abbreviations and Symbols:** Use only standard abbreviations. Avoid using them in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

***The Corresponding Author:** The corresponding author should be the person who is willing and able to handle all correspondence with the journal editor, including responding to reviewers' comments and proofreading the final version

***Ethical Guidelines:** Ethical considerations must be addressed in the Methods section.

- 1) Please state that informed consent was obtained from all human adult participants and from the parents or legal guardians of minors. Include the name of the appropriate institutional review board that approved the project.
- 2) Indicate in the text that the maintenance and care of experimental animals complies with National Institutes of Health guidelines for the humane use of laboratory animals, or those of your Institute or agency.

***Conflicts of Interest:** Authors must acknowledge and declare any sources of funding and potential conflicting interest, such as receiving funds or fees by, or holding stocks and shares in,

Instructions for Authors

an organization that may profit or lose through publication of your paper. Declaring a competing interest will not lead to automatic rejection of the paper, but we would like to be made aware of it.

***Page Charges:** There are no charges for publication in this Journal.

***Copyright:** The entire contents of the J Laser Med Sci are protected under international copyrights. This Journal is for your personal noncommercial use. You may not modify copy, distribute, transmit, display, or publish any materials contained on the Journal without the prior written permission of it or the appropriate copyright owner.

***Peer Review Process:** All manuscripts are considered to be confidential. They are peer-reviewed by at least 2 anonymous reviewers selected by the Editorial Board. The corresponding author is notified as soon as possible of the editor decision to accept, reject, or require modifications. If the manuscript is completely acceptable according to the criteria set forth in these instructions, it is scheduled for the next available issue.

***Disposal of Material:** Once published, all copies of the manuscript, correspondence and artwork will be held for 6 months before disposal.

The Final Checklist

1. The authors must ensure that before submitting the manuscript for publication, they have taken care of the following: Title page should

contain title, name of the author/co-authors, their qualifications, designation & institutions they are affiliated with and mailing address for future correspondence, e-mail address, and phone and fax number.

2. Abstract in structured format.
3. References mentioned as stated in the Instruction to Authors section.
4. Make sure for headings of tables, their numbers and captions of illustrations. Don't repeat the information in tables if it is covered in the text.
5. Photographs / illustrations along with their captions.
6. Letter of Undertaking signed by all the authors.
7. Disclosure regarding source of funding and conflict of interest if any besides approval of the study from respective Ethics Committee/ Institution Review Board.
8. Covering Letter
9. Main Manuscript document

Arash Mohammadi Tofigh; MD
Editor-in-Chief,
Journal of Lasers in Medical
Sciences

ANEXO C – Instruções para Autores – *Journal of Physical Therapy (JPT)*

Journal of Physical Therapy (JPT) is an International peer-reviewed open-access quarterly journal dedicated towards publishing research articles in the field of but not limited to Physical Therapy and Rehabilitation. Authors are encouraged to submit their research reports which are original information and are not yet reported at length elsewhere. The Journal is currently covered (both abstracted, and full-text indexed) by Index Copernicus International database.

Authors who wish to submit manuscripts (prepared according to the following instructions to authors) for publication in JPT should compulsarily email the chief editor(s) for manuscript submission through the following e-mail ids:

[senthilparamasivamkumar\(at\)gmail.com](mailto:senthilparamasivamkumar(at)gmail.com)
[editor.jphysther\(at\)gmail.com](mailto:editor.jphysther(at)gmail.com)

Please note that *Journal of Physical Therapy (JPT)* is the only "free-for-author" and "free-for-reader" open-access journal in the world, and hence your valuable scientific information has the unlimited and unrestricted scope for dissemination and development.

Information for Author(s):

Manuscripts must be prepared in accordance with "Uniform requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journal" developed by international committee of medical Journal Editors.

Submission of manuscript:

- o Authors should submit electronic version (Microsoft word doc) of the manuscript via e-mail
- o Accepted papers will be acknowledged and processed further, if the papers are rejected, the decision will be communicated to the corresponding author.
- o Acceptance or rejection of the manuscript would be decided after the decision of editorial team.
- o Acceptance or rejection of the manuscript for publication in journal would be informed to corresponding author at the earliest.

Preparing a Manuscript:

- o Authors should keep their manuscripts as short as they reasonably can (the total number of words should not exceed 3200).
- o Page number should appear in the upper right hand corner of each page, beginning with the title page.
- o The language of manuscript must be simple and explicit.
- o Author's / Co-author's name or any other identification should not appear anywhere in the body of the manuscript to facilitate blind review.

We accept manuscript under following categories:

- o Original Research Articles
- o Review
- o Case reports
- o Perspectives
- o Invited Commentary
- o Short communications
- o Letter to Editor

Original Research Articles:

It should be arranged into the following sections:

Title page

The title page should have the following information:

Title:

Title must be concise and should include information that will make electronic retrieval of the article both sensitive and specific.

Authors and affiliations:

The names of authors and their appropriate addresses should be given. It should be made clear which address relates to which author.

Disclaimers:

If any

Contact information for corresponding authors:

The name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence about the manuscript (the “corresponding author;” this author may or may not be the “guarantor” for the integrity of the study). The corresponding author should indicate clearly whether his or her e-mail address can be published.

Source(s) of support:

Source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of these.

Running title:

It is a short title typed in the journal at the right top corner of right hand page of the article (except the lead page). A short running title of not more than 40 characters (including letters and spaces) should be given.

Conflict of Interest Notification Page

To prevent potential conflicts of interest from being overlooked or misplaced, this information needs to be part of the manuscript. The ICMJE has developed a uniform disclosure form for use by ICMJE member journals (http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf).

Abstract and key words**Abstract:**

It must start on a new page carrying the following information: (a) Title (without author’s names or affiliations), (b) Abstract body, (c) Key words, (d) Running title. It should not exceed 250 words excluding the title and the key words. The abstract must be concise, clear and informative rather than indicative. New and important aspects must be emphasized.

The abstract must be in a structured form consisting of context or background for the study, objectives, methods (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), results (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible) and conclusions. Authors should state the main conclusions clearly and not in vague statements. The conclusions and recommendations not found in the text of the article should not be given in the abstract. Articles on clinical trials should contain abstracts that include the items that the CONSORT group has identified as essential (<http://www.consort-statement.org/?=1190>). Clinical trial registration number should be mentioned at the end of the abstract. Whenever a registration number is available, Authors should list that number the first time they use a trial acronym to refer to either the trial they are reporting or to other trials that they mention in the manuscript.

Key words:

Provide 3-5 keywords which will help readers or indexing agencies in cross-indexing the study. The words found in title need not be given as key words.

Introduction

It should start on a new page. Essentially this section must introduce the subject and briefly say how the idea for research originated. Provide a context or background for the study (that is, the nature of the problem and its significance). State the specific purpose or research objective of, or hypothesis tested by, the study or observation; the research objective is often more sharply focused when stated as a question. Both the main and secondary objectives should be clear, and any prespecified subgroup analyses should be described. Provide only directly pertinent references, and do not include data or conclusions from the work being reported.

Material and Methods

This section should deal with the materials used and the methodology - how the work was carried out. The procedure adopted should be described in sufficient detail to allow the study to be interpreted and repeated by the readers, if necessary. This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written; all information obtained during the study belongs in the Results section.

Selection and Description of Participants

Describe your selection of the observational or experimental participants (patients or laboratory animals, including controls) clearly, including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. Because the relevance of such variables as age and sex to the object of research is not always clear, authors should explain their use when they are included in a study report—for example, authors should explain why only participants of certain ages were included or why women were excluded. The guiding principle should be clarity about how and why a study was done in a particular way. When authors use such variables as race or ethnicity, they should define how they measured these variables and justify their relevance.

Technical Information

Identify the methods, apparatus (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods (see below); provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well-known; describe new or substantially modified methods, give the reasons for using them, and evaluate their limitations. Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

Statistical Methods

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as P values, which fail to convey important information about effect size. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the computer software used.

Results

Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations, giving the main or most important findings first. Do not repeat all the data in the tables or illustrations in the text; emphasize or summarize only the most important observations. Extra or supplementary materials and technical detail can be placed in an appendix where they will be accessible but will not interrupt the flow of the text, or they can be published solely in the electronic version of the journal.

When data are summarized in the Results section, give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical methods used to analyze them. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample."

Where scientifically appropriate, analyses of the data by such variables as age and sex should be included.

Discussion

This section should deal with the interpretation, rather than recapitulation of results. For experimental studies, it is useful to begin the discussion by briefly summarizing the main findings, then explore possible mechanisms or explanations for these findings, compare and contrast the results with other relevant studies, state the limitations of the study, and explore the implications of the findings for future research and for clinical practice.

Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions

not adequately supported by the data. In particular, avoid making statements on economic benefits and costs unless the manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority or alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but label them clearly as such.

Acknowledgements

It should be typed in a new page. Acknowledge only persons who have contributed to the scientific content or provided technical support. Sources of financial support should be mentioned.

References

It should begin on a new page. Avoid citing abstracts as references. Papers which have been submitted and accepted but not yet published may be included in the list of references with the name of the journal and indicated as "Forth coming". A photocopy of the acceptance letter should be submitted with the manuscript. Information from manuscript "submitted" but "not yet accepted" should not be included. Avoid using abstracts as references. The "unpublished observations" and "personal communications" may not be used as references but may be inserted (in parentheses) in the text. References are to be cited in the text by superscribed number and should be in the order in which they appear (after the punctuation). References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustration. The references must be verified by the author(s) against the original documents. The list of references should be typed double spaced following the Vancouver style.

General Considerations Related to References

Although references to review articles can be an efficient way to guide readers to a body of literature, review articles do not always reflect original work accurately. Readers should therefore be provided with direct references to original research sources whenever possible. Avoid using abstracts as references. References to papers accepted but not yet published should be designated as "in press" or "forthcoming"; authors should obtain written permission to cite such papers as well as verification that they have been accepted for publication. Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as "unpublished observations" with written permission from the source.

Avoid citing a "personal communication" unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication.

Some but not all journals check the accuracy of all reference citations; thus, citation errors sometimes appear in the published version of articles. To minimize such errors, references should be verified using either an electronic bibliographic source, such as PubMed or print copies from original sources. Authors are responsible for checking that none of the references cite retracted articles except in the context of referring to the retraction. For articles published in journals indexed in MEDLINE, the ICMJE considers PubMed the authoritative source for information about retractions. Authors can identify retracted articles in MEDLINE by using the following search term, where pt in square brackets stands for publication type: Retracted publication [pt] in PubMed.

Reference Style and Format

Authors may also consult sample references

(http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) , a list of examples extracted from or based on Citing Medicine for easy use by the ICMJE audience; these sample references are maintained by NLM.

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by superscribed Arabic numerals. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the list of Journals Indexed for MEDLINE, posted by the NLM on the Library's Web site. The list of references should be typed

double spaced following the Vancouver style.

Tables

Each table must be self-explanatory and presented in such a way that they are easily understandable without referring to the text. Type or print each table with double-spacing on a separate sheet of paper. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Do not use internal horizontal or vertical lines. Give each column a short or an abbreviated heading. Authors should place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain all nonstandard abbreviations in footnotes, and use the following symbols, in sequence:

*, †, ‡, §, ||, ¶, **, ††, ‡‡, §§, ||||, ¶¶, etc.

Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text.

If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge that source fully.

Additional tables containing backup data too extensive to publish in print may be appropriate for publication in the electronic version of the journal, deposited with an archival service, or made available to readers directly by the authors. An appropriate statement should be added to the text to inform readers that this additional information is available and where it is located. Submit such tables for consideration with the paper so that they will be available to the peer reviewers.

Figures (Illustrations)

Figures should be either professionally drawn and photographed, or submitted as electronic files of figures in a format (JPEG or GIF) authors should review the images of such files on a computer screen before submitting them to be sure they meet their own quality standards.

For x-ray films, scans, and other diagnostic images, as well as pictures of pathology specimens or photomicrographs, send sharp, glossy, black-and-white or color photographic prints, usually 127 x 173 mm (5 x 7 inches). Letters, numbers, and symbols on figures should therefore be clear and consistent throughout, and large enough to remain legible when the figure is reduced for publication. Figures should be made as self-explanatory as possible, since many will be used directly in slide presentations. Titles and detailed explanations belong in the legends not on the illustrations themselves.

Photomicrographs should have internal scale markers. Symbols, arrows, or letters used in photomicrographs should contrast with the background.

Photographs of potentially identifiable people must be accompanied by written permission to use the photograph.

Figures should be numbered consecutively according to the order in which they have been cited in the text. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the figure. Permission is required irrespective of authorship or publisher except for documents in the public domain.

Legends for Figures (Illustrations)

Type or print out legends for illustrations using double spacing, starting on a separate page, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend.

Explain the internal scale and identify the method of staining in photomicrographs.

Units of Measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (meter, kilogram, or liter) or their decimal multiples. Temperatures should be in degrees Celsius. Blood pressures should be in millimeters of mercury. Authors should report laboratory information in both local and International System of Units (SI). Drug concentrations may be reported in either SI or mass units, but the alternative should be provided in parentheses where appropriate.

Abbreviations and Symbols

Use only standard abbreviations; use of nonstandard abbreviations can be confusing to readers. Avoid abbreviations in the title of the manuscript. The spelled-out abbreviation followed by the

abbreviation in parenthesis should be used on first mention unless the abbreviation is a standard unit of measurement.

Reviews

JPT endorses the PRISMA statement (<http://www.prisma-statement.org>). Authors submitting systematic reviews are required to follow these guidelines, include a flow diagram within the manuscript, and submit the checklist.

Case reports

Case report describes the overall management of an unusual case or a condition that is infrequently encountered in practice or poorly described in the literature. The entire care of the patient "from start to finish" is described, with no one aspect of care receiving greater focus.

Perspectives

Perspectives are highly scholarly papers expounding on a specific clinical approach to patient care (on either a theoretical or practical basis) or addressing professional issues in Health care, and related areas. Perspectives contain new ideas, interpretations, and opinions and are intended to inform and advance practice in important ways. Perspectives can address translational research. Perspectives are one of the most highly cited manuscript types. Typically, these manuscripts are written by leaders in the field who set forth future directions.

Invited Commentary

Topic suggestions should be submitted to the editor, include a detailed definition of the topic and a suggestion of at least two possible authors to write the commentary. Offers to write a commentary are also accepted. If you wish to write a commentary, please contact the editor first.

Short communications

The manuscript should not be divided into sub-sections. It may have up to 1200 words (including a maximum of 5 references) and one figure or one table.

Letters to the Editor

JPT Letters to the Editor provide timely, thoughtful dialogue on issues of concern to the Health profession, to related disciplines, to the health care delivery system, to patients, and to all members of society who are interested in health and well-being.