

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO E
DESEMPENHO FÍSICO-FUNCIONAL

Pierre Augusto Victor da Silva

**AVALIAÇÃO DO *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADO À APOPTOSE**

Juiz de Fora

2019

Pierre Augusto Victor da Silva

**AVALIAÇÃO DO *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADO À APOPTOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Mestrado em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional

Orientadora: PhD. Professora Flávia de Paoli - UFJF

**Juiz de Fora
2019**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de
geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Pierre Augusto Victor da.

Avaliação do *laser* de baixa potência na expressão de genes
relacionado à apoptose / Pierre Augusto Victor da Silva. -- 2019.

47 f. : il.

Orientadora: Flávia de Paoli

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Juiz de Fora, Faculdade de Fisioterapia. Programa de Pós
Graduação em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico
Funcional, 2019.

1. Fotobiomodulação. 2. Apoptose. 3. relação Bcl-2 / Bax. 4.
Caspase. 5. Fragmentação do DNA. I. Paoli, Flávia de, orient.
II. Título.

Pierre Augusto Victor da Silva

**AVALIAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA EXPRESSÃO DE GENES
RELACIONADOS À APOPTOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Mestrado em Ciências da
Reabilitação e Desempenho Físico-
Funcional da Universidade Federal de
Juiz de Fora como requisito a obtenção
do grau de Mestre em Ciências da
Reabilitação e Desempenho Físico-
Funcional

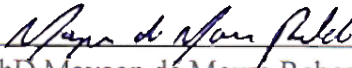
Aprovada em 25 de abril de 2019.

BANCA EXAMINADORA



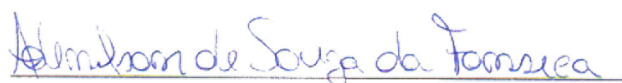
PhD. Flávia de Paoli - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF



PhD. Maycon de Moura Reboredo

Universidade Federal de Juiz de Fora-UFJF



PhD. Adenilson de Souza da Fonseca

Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ

Dedico este trabalho as pessoas que estiveram presentes em todos os momentos de minha vida:

À minha amada esposa, amiga e companheira Leomara, obrigado pela paciência, amor, companheirismo, incentivos e por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida.

Às minhas filhas: Samara e Gabriela, pela paciência e por suportar a minha ausência nos momentos de lazer. Vocês me fazem ser melhor a cada dia. Amo vocês!

Aos meus pais (Selso e Joana), pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos, por sempre me apoiarem direto ou indiretamente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente o meu agradecimento é para Ele (Deus), por ter me capacitado e conduzido com grande louvor do início ao término deste projeto. Agradeço a Deus ainda por ter colocado pessoas mais que especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido!

À minha esposa Leomara por ser tão importante em minha vida. Obrigado por me ter feito acreditar que posso mais do que imagino e por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

As pequenas Samara e Gabriela, amo vocês incondicionalmente filhas. Obrigado por estar sempre perto, mesmo que eu estivesse distante. Vocês me inspiram a querer ser mais do que fui até hoje.

Aos meus irmãos Pablo e Pitter, um agradecimento especial por sempre se orgulharem de mim e do meu profissionalismo. Obrigado pelo amor e carinho!

À professora Dr^a. Flávia de Paoli, orientadora e amiga, obrigado pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser a maior incentivadora na superação de meus limites. Agradeço pela sua disponibilidade, ensinamentos e a condução deste projeto.

Ao professor, amigo e irmão que a vida acadêmica me deu, Dr. Rafael Pereira, obrigado por acreditar em meus potenciais e pela inestimável colaboração.

À Reitoria e pró-reitoria de graduação, ensino e pesquisa da UniREDENTOR por ter concedido a liberação para realização deste projeto e pelos incentivos na busca do crescimento e aperfeiçoamento profissional.

À amiga Thais Fraga Abduch, obrigado pela amizade e companheirismo de sempre.

Ao amigo José Elias Filho, um dos grandes incentivadores para que este projeto se tornasse realidade, obrigado!

Aos irmãos em Cristo da Igreja Cristã Maranata (Cehab) pelas orações não somente neste período, mas em todas os momentos em que necessitei.

Aos queridos professores que compõem o corpo docente do Mestrado em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional, obrigado por todos os ensinamentos e contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta dissertação.

Aos professores membros da banca de qualificação, professor Dr. Rafael Pereira e a professora Dr^a. Alice Belleigoli Rezende pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram

esse estudo e aos membros da banca de defesa, professor Dr. Adenilson de Souza Fonseca e o professor Dr. Maycon de Moura Reboredo por aceitarem o convite e se disponibilizarem para a avaliação deste projeto.

Aos demais amigos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização do mesmo, o meu muito obrigado.

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço,
e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”

(Isaias 41: 10)

RESUMO

INTRODUÇÃO: O conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na fotobiomodulação (FBM) tem aumentado, mas seus efeitos sobre a expressão gênica relacionada à morte/sobrevida celular após a irradiação não são bem compreendidos. Por isso, é importante conhecer esses efeitos para garantir a segurança dos protocolos terapêuticos baseados na PBM. **OBJETIVO:** Investigar os níveis de mRNA de genes relacionados a proteínas envolvidas na morte/sobrevida celular em vias de sobrevivência de tecidos sadios da articulação talocrural de camundongos após PBM. **METODOLOGIA:** Os animais (n=6 por grupo) foram divididos em 3 grupos: controle, PBM a 3Jcm^{-2} e PBM a 30Jcm^{-2} . Os parâmetros do laser foram: 830 nm, potência 10 mW, tamanho do ponto $0,05\text{ cm}^2$, doses 3Jcm^{-2} e 30Jcm^{-2} com tempo de aplicação foi de 15s e 150s, respectivamente. A aplicação foi pontual, durante 4 dias consecutivos e em modo de emissão da luz contínua. Análises dos níveis de mRNA para os genes FasL, Fas, Bax, Apaf-1, Caspase-9, Caspase-3, Caspase-6, Bcl-2 e fragmentação de DNA foram realizadas para uma possível indução de morte celular nas doses testadas. **RESULTADOS:** PBM pode aumentar os níveis de mRNA de genes proapoptóticos, entretanto não foi observada fragmentação de DNA para ambas as doses testadas. Por outro lado, o nível de mRNA do gene da proteína Bcl-2 anti-apoptótica não foi significativamente alterado e a relação Bcl-2/Bax (indicador de resposta molecular protetora) foi reduzida após PBM a 30Jcm^{-2} . **CONCLUSÃO:** Os resultados obtidos neste estudo indicam que a PBM pelo laser infravermelho de baixa potência foi capaz de alterar os níveis relativos de mRNA de genes envolvidos nas vias de morte celular. No entanto, essas alterações moleculares não foram capazes de causar fragmentação do DNA nas células em tecidos articulares talocrural, indicando que a irradiação com o infravermelho não foi suficiente para causar a morte celular.

Palavras-chave: Fotobiomodulação, Apoptose, relação Bcl-2 / Bax, Caspase, fragmentação do DNA.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Molecular mechanisms knowledge involved in photobiomodulation (FBM) has increased but the gene expression effects, in special genes related with cell death/survival post irradiation are not known yet. So, it is important to know these effects in order to guarantee the safety of therapeutic protocols based on PBM. **OBJECTIVE:** This study aimed to investigate mRNA levels of genes related with proteins involved in cell death/survival pathways of healthy tissues from mice talocrural joint post PBM. **METHODOLOGY:** Mice were divided into 3 groups: control, PBM at $3\text{J}/\text{cm}^2$ and PBM at $30\text{J}/\text{cm}^2$. Laser parameters were: wavelength 830 nm, Power output of 10 mW, laser beam area 0.05 cm^2 , doses $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $30\text{J}/\text{cm}^2$ exposure time 15s e 150s, respectively. The irradiations were performed for 4 consecutive days using continuous light emission mode. Analysis of mRNA levels for FasL, Fas, Bax, Apaf-1, Caspase-9, Caspase-3, Caspase-6, Bcl-2 and DNA fragmentation were performed for a possible induction of cell death at the doses tested. **RESULTS:** PBM may increase mRNA levels of proapoptotic genes; however DNA fragmentation was not observed for both doses tested. On the other hand, mRNA level of the anti-apoptotic Bcl-2 gene was not significantly altered and the Bcl-2 / Bax ratio (protective molecular response indicator) was reduced post PBM at $30\text{J}/\text{cm}^2$. **CONCLUSION:** Results obtained in this study indicate that PBM by low-level infrared laser can alter mRNA relative levels of genes involved in cell death pathways. However, these molecular alterations were not able to cause DNA fragmentation in cells in talocrural joint tissues, indicating that infrared laser was not enough to cause cell death.

Keywords: Photobiomodulation, Apoptosis, Bcl-2/Bax ratio, Caspase, DNA fragmentation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlGaAs – Arseneto de Gálio e Alumínio

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

APAF-1 – "Fator apoptótico de ativação da protease-1" ou protease ativadora do fator 1 de apoptose

ATP – trifosfato de adenosina

BAD – membro da família pró-apoptótica Bcl-2

BAK - membro da família pró-apoptótica Bcl-2

BAX – membro da família pró-apoptótica Bcl-2

Bcl-2-B – Proteína do linfoma de células 2

BH3 – membro da família pró-apoptótica Bcl-2

BID – membro da família pró-apoptótica Bcl-2

Caspases – Aspartil-protease específica de cisteína

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar

DISCO - Complexo de Sinalização Indutora da Morte

DNA - ácido desoxirribonucleico

EROs – Espécies de Oxigênio Reativas

FADD – "domínio de morte associado a Fas" ou “domínio de morte associado a FAS”

FAS ou CD95 ou APO-1 – Receptor ou proteína de membrana de pro-apoptose

FAS-L ou CD95L – proteína de membrana de ligação a FAS

FBM – Fotobiomodulação

IL-1 – Interleucina 1

IL-17 – Interleucina 17

J/cm² – Joules por centímetro quadrado

LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LBP – Laserterapia de baixa potência

mJ – milijoules

MMP – Metaloproteinases de Matriz

mW – miliwatt

nm – nanômetros

PBS – solução tampão de fosfato salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – ácido ribonucléico

RNS – *Reactive Nitrogen Species* (Espécies Nitrogenadas Reativas)

t-BID – BID truncado

TdT – terminal desoxinucleotidil transferase

TGF- β – fator de crescimento transformador β

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNFR1– TNF Receptor

μm – micrômetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 SISTEMA ARTICULAR.....	14
1.2 MORTE CELULAR	16
1.2.1 Vias de apoptose.....	17
1.2.2 Caspases	18
1.2.3 Mitocôndria e seu papel na apoptose.....	19
1.3 LASER.....	19
1.3.1 Propriedades da radiação laser.....	21
1.3.2 Mecanismos biológicos do laser.....	22
1.4 LASER DE BAIXA POTÊNCIA E MORTE CELULAR	24
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 GERAL	26
3.2 ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS	26
4.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA.....	27
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E PCR EM TEMPO REAL	28
4.4 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	29
4.5 FRAGMENTAÇÃO DE DNA	30
4.6 ANÁLISES DE IMAGENS.....	31
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS	31
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Na prática clínica, a laserterapia de baixa potência (LBP) ou fotobioestimulação (FBM) vem sendo utilizada frequentemente e tem demonstrado excelentes resultados no tratamento das desordens musculoesqueléticas (HUANG et al., 2015), contribuindo para a recuperação e tratamento de patologias em diversas áreas da fisioterapia (XAVIER et al., 2010; HUANG et al., 2015; PINTO et al., 2016). Adicionalmente, é uma terapia com crescente utilização no meio desportivo e traumato-ortopédico como estratégia profilática para aprimorar o desempenho e recuperação de atletas de alto nível (PINTO et al., 2016; BORGES et al., 2013; LEAL-JUNIOR et al., 2015).

A FBM é baseada em princípios fotoquímico e fotofísico (HUANG et al., 2009; DE CASTRO et al., 2013). Sua ação está baseada na absorção da radiação pelas células, nas quais modulam reações bioquímicas e estimulam a respiração mitocondrial, levando à bioestimulação dos tecidos por uma radiação monocromática (KARU et al., 1987). A FBM vem sendo utilizada e testada no tratamento de diversas lesões e patologias (XAVIER et al., 2010; BALTZER et al., 2017; GLAZOV; YELLAND; EMERY, 2016; KINGSLEY; DEMACHAK; MATHIS, 2014) em diferentes tecidos tendo comprovações científicas positivas desde 1971 quando Mester relatou seus efeitos benéficos em tecidos moles (MESTER, et al., 1971).

Embora a FBM seja amplamente utilizada para tratar uma variedade de distúrbios musculoesqueléticos (TEZCAN et al., 2019; BORGES et al., 2013; BALTZER et al., 2017; HUANG et al., 2015; RUH et al., 2018), investigações experimentais são necessárias para uma melhor compreensão das respostas celulares e moleculares, garantindo a segurança e a efetividade no tratamento clínico. Ainda que o efeito benéfico da FBM pareça ser inquestionável, há estudos descrevendo efeitos que podem ser contraditórios, como danos sub-letais ao DNA e até mesmo apoptose (FONSECA et al 2010, PAOLI et al., 2015; DE FREITAS & HAMBLIN 2016, MINATEL et al., 2009; CARROLL et al., 2014). Por isso, fazem-se necessários estudos experimentais com a finalidade de avaliar os efeitos celulares e moleculares após a utilização da FBM.

1.1 SISTEMA ARTICULAR

As articulações são formadas por tecidos conjuntivos classificadas em diartrose e sinartrose. As diartroses permitem maiores movimentos dos ossos enquanto as sinartroses podem ocorrer apenas movimentos limitados. As articulações sinartroses dividem-se em sinostoses, que são unidas pelos próprios ossos e não permitem nenhum movimento; as sincondroses que são unidas pela cartilagem hialina tendo movimentos limitados; as sindesmoses que também realizam movimentos limitados e a união dos ossos ocorre através do tecido conjuntivo denso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A união dos ossos longos ocorre normalmente pelas articulações diartroses ou articulações sinoviais (figura 1) que permitem grandes mobilidades. As extremidades ósseas desse tipo de articulação contém uma delimitação, a cavidade articular, onde está presente o líquido sinovial com alto teor de ácido hialurônico, um potente lubrificante articular. Com diferentes estruturas, as articulações sinoviais em geral, são constituídas por duas camadas: uma externa, conhecida como camada fibrosa formada por tecido conjuntivo denso e uma interna, chamada de camada ou membrana sinovial que é composta especialmente por fibroblastos e macrófagos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

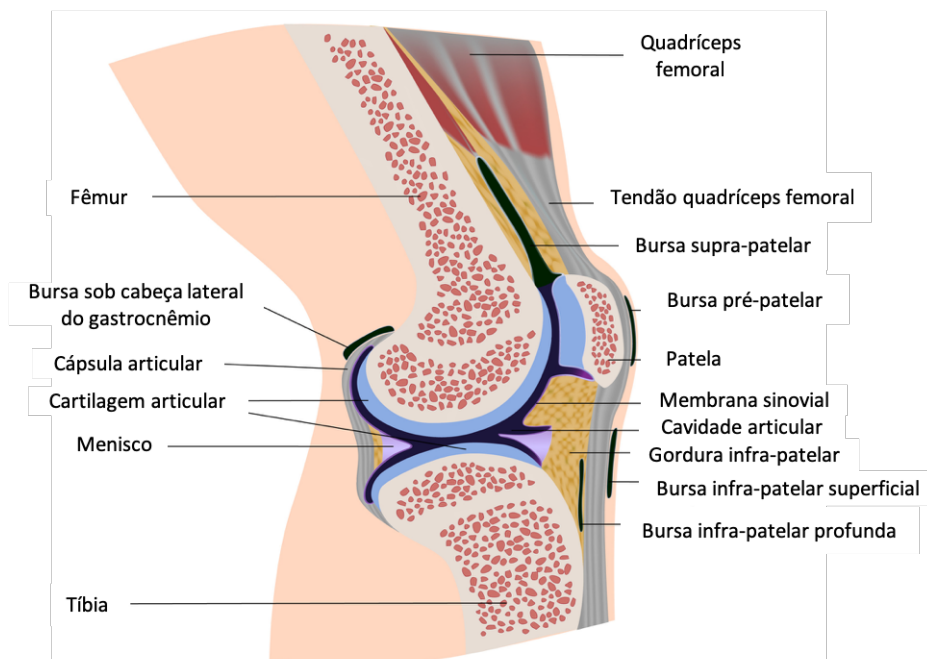


Figura 1: Desenho esquemático de uma articulação sinovial (diartrose), demonstrando seus componentes. Adaptado de <http://www.days-eye.com/human-knee-anatomy-illustration-diagram/patella-human-knee-anatomy-synovial-membrane-joint-cavity-infrapatellar-fat-pad-superficial-deep-bursa/>

A formação e o posicionamento das articulações sinoviais são extremamente importantes durante a evolução, permitindo a adaptação bem-sucedida dos membros. Devido à variedade de componentes da articulação sinovial (cartilagem articular, líquido sinovial, ligamentos, cápsula articular), a doença ou trauma que afeta um tecido tem amplas implicações na saúde e função de toda a articulação (LONGOBARDI, 2016).

Com diferentes propriedades materiais e diferentes orientações com relação à superfície articular, a cartilagem articular é anisotrópica. Suas propriedades a tornam bastante apropriadas com capacidade de resistir às forças de cisalhamento, respondendo às cargas de maneira viscoelástica. A cartilagem deforma instantaneamente a uma carga baixa ou moderada e, se for submetida a uma carga rápida, se tornará mais rígida e deformará durante um período mais prolongado. A cartilagem tem grande importância na estabilidade e no funcionamento de uma articulação, distribuindo as cargas pela superfície e reduzindo pela metade as forças de contato (HAMILL; KNUTZEN; DERRICK, 2016).

Células denominadas condroblastos e condrócitos estão presentes em todos os tipos de cartilagem e são capazes de sintetizar uma matriz extracelular constituída principalmente por colágeno tipo II, grandes proteoglicanos (em especial o agregam), glicosaminoglicanos (como o ácido hialurônico) e glicoproteínas não-colagênicas. A cartilagem articular é avascularizada, e excepcionalmente nas articulações, não são envolvidas pelo pericôndrio (tecido conjuntivo fibroso), sendo nutrida pelo líquido sinovial (LINK, 2011; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

As articulações sinoviais contêm outros componentes formados pelo tecido conjuntivo como: cápsula, membranas sinoviais e ligamentos. Esses tecidos conjuntivos são classificados como tecido conjuntivo frouxo e tecido conjuntivo denso. Com uma boa vascularização, o tecido conjuntivo frouxo é flexível e não é próprio para resistir a trações, mas suas estruturas tendem a suportar pressões e leves atritos. O tecido conjuntivo frouxo está presente nos espaços das células musculares, formam camadas envolvendo os vasos sanguíneos e ainda podem ser encontrados na hipoderme e membranas serosas que revestem as cavidades pleurais e peritoneais contendo vários elementos do tecido conjuntivo propriamente dito como fibroblastos, macrófagos e fibras de colágeno e elástico (LONGOBARDI, 2016; ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003; HAMILL; KNUTZEN; DERRICK, 2016; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Formado pelos mesmos componentes existentes no tecido conjuntivo frouxo, o tecido conjuntivo denso oferece proteção, pouca flexibilidade e mais resistência à tensão que o tecido conjuntivo frouxo, porém contém um número menor de células e uma predominância de

fibras colágenas (HAMILL; KNUTZEN; DERRICK, 2016; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013; LINK, 2011).

1.2 MORTE CELULAR

Para que se obtenha uma homeostase da divisão celular, as células necessitam de uma morte celular e parece haver poucas dúvidas de que a perda de células geralmente acompanha atrofia e involução fisiológica de tecidos e órgãos. Necrobiose foi o termo utilizado para esta "morte celular fisiológica", embora não houvesse uma clara definição de suas características morfológicas (KERR, 1971).

Kerr, em 1971, relatou que este tipo de necrose (necrobiose), que também foi chamada de necrose de encolhimento pela sua característica morfológica, pode ser desencadeada por agentes nocivos, aparecendo espontaneamente ou em respostas a estímulos fisiológicos podendo assim, ser chamada de "apoptose" suas implicações fisiológicas podem ser observadas em organismos pluricelulares na eliminação de células que não são mais necessárias, mantendo nos tecidos uma variação celular (KERR, 1971; KERR; WYLLIE; CURRIET, 1972; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007).

A apoptose é um mecanismo natural da célula para a programação da sua morte, desempenhando um papel importante no desenvolvimento e na homeostasia. É iniciada pela formação de complexos de multiproteínas, incluindo o complexo de sinalização de indutor de morte, que são gerados após a ligação de "ligantes" de morte extracelular aos receptores de morte na via extrínseca e pelo apoptosoma, desencadeada pela liberação do citocromo C das mitocôndrias na via intrínseca. Esses complexos recrutam e ativam as caspases (protease específica de cisteína aspartil) iniciais, que então ativam caspases efetoras, visando substratos celulares específicos para proteólise. As proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas da família Bcl-2 regulam a liberação de fatores apoptogênicos das mitocôndrias, incluindo citocromo C. A mediação da apoptose ocorre por conjuntos específicos de caspases que atuam em cascatas, sendo as caspases-3, 6 ou 7 responsáveis pela morte celular (DANIAL; KORSMEYER, 2004; PFEFFER; SINGH, 2018; NAGATA, 2018; BIALIK et al., 2010).

São diversas as condições que irão resultar na ativação da via apoptótica, incluindo danos no DNA ou proliferação descontrolada. A via apoptótica é acionada por sinais intracelulares e extracelulares em dois caminhos díspares que levam a apoptose: as vias intrínseca e extrínseca que se correlacionam com o tipo de sinal. Eles também são citados como vias de receptor mitocondrial e morte, respectivamente. Os sinais intracelulares incluem danos

no DNA, bloqueio de fatores de crescimento e de citocinas. Já os sinais extracelulares mais comuns são os indutores de morte produzidos por células T citotóxicas do sistema imunológico em resposta a células danificadas ou infectadas (DANIAL; KORSMEYER, 2004; PFEFFER; SINGH, 2018).

1.2.1 Vias de apoptose

As vias de sinalização da apoptose estão representadas na figura 2. A via extrínseca, conhecida como via do receptor da morte, é regulada por receptores de morte na membrana ativados pela ligação de um ligante comum (YOU et al., 2017).

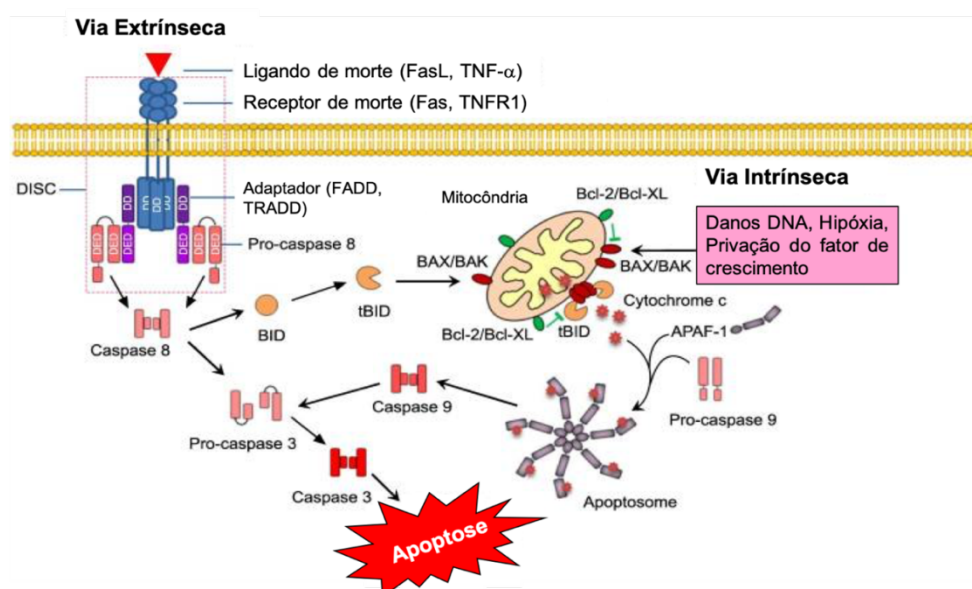


Figura 2: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Adaptado de Shilpa Sarvothaman, et al. 2015.

A ativação da via extrínseca envolve a associação do receptor de morte transmembrana (Fas e TNF-α) e seu ligante extracelular (Fas-L e TNF-α). Fas recruta proteína de domínio de morte associada ao Fas (FADD) enquanto o TNF-R recruta proteína de domínio de morte associada ao TNF-R1 (TRADD) que novamente recruta FADD. Essa associação leva à formação de um complexo de sinalização indutor da morte (do inglês *death-inducing signaling complex* – DISC). Essa sinalização, por sua vez, ativa o iniciador procaspase-8 (ou procaspase-10) e outros reguladores e coeficientes. O complexo auxilia a recrutar mais procaspase-8 (ou procaspase-10) e permite a sua auto-ativação (ASHKENAZI, 2008; NAGATA, 2018; OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011).

Na auto-ativação, cada receptor pode formar independentemente o complexo de sinalização induzindo a morte, recrutando o domínio de morte do adaptador Fas e procaspases 8 e 10. Esse recrutamento leva à ativação induzida por proximidade das caspases 8 e 10, que, por sua vez, sofrem auto-ativação, liberando moléculas de caspase ativas no citoplasma. Essas enzimas então se fragmentam estimulando as caspases efetoras 3, 6 e 7, que executam a apoptose (ASHKENAZI, 2008; KISCHKEL et al., 2000, 2001; LEBLANC et al., 2002).

Em relação à via intrínseca também conhecida como via mitocondrial ou via de estresse, a mesma é ativada por uma variedade de agentes causadores de estresse da morte, estresse genômico, estresse metabólico e oxidativo, presença de proteínas desdobradas e outros estímulos que levam à permeabilização da membrana mitocondrial externa e à liberação de proteínas apoptóticas no citosol. Após permeabilização, o citocromo C é liberado para o citoplasma, iniciando ou regulando a ativação da cascata de caspase específica, desencadeando inúmeros eventos proteolíticos que medeiam o programa de morte de células apoptóticas (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2012; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011; YOU et al., 2017).

O citocromo C desempenha o papel principal nesta via que é ativada após sua interação com o fator ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e trifosfato de desoxiadenosina (dATP) para formar o apoptossomo. O apoptossomo aglomera as moléculas da caspase iniciadora da via intrínseca. A progressão através da via geralmente leva à ativação da caspase-9, permitindo sua auto-ativação. A caspase-9 ativada, então, cliva a procaspase-3, ativando a caspase-3, que atua como um executor dentro do núcleo (LI et al., 1997; OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011; RIEDL; SALVESEN, 2007).

Ambas as vias, extrínseca e intrínseca agregam-se ao nível das caspases efetoras e a comunicação cruzada pode existir entre as duas vias. Por exemplo, em células com baixos níveis de ativação do complexo de sinalização indutor de morte, um ciclo de amplificação pode ativar a via intrínseca e a participação das mitocôndrias é mediada através da ativação dependente de caspase-8 da *BH3-only protein* Bid para a sua forma ativa t-Bid (ASHKENAZI, 2008).

1.2.2 Caspases

Após a sinalização da apoptose, modificações começam a ocorrer no interior da célula incluindo a ativação de caspases através da clivagem dos componentes celulares necessários para a função celular normal como proteínas citoesqueléticas e nucleares. A

ativação das caspases leva as células apoptóticas a reduzirem seu tamanho, sofrendo alterações na membrana plasmática e sinalizando a respostas dos macrófagos (HASSAN et al., 2014).

As caspases são uma classe de proteínas de cisteína responsáveis por clivar as proteínas alvo realizando a apoptose. Sendo essencial para apoptose, a caspase atua na clivagem de centenas de proteínas. As caspases-2, 8, 9 e 10 são caspases ativadoras, enquanto as caspases-3, 6 e 7 são caspases executoras ou efetoras. Caspases ativadoras atuam nas efetoras, que irão ativar diferentes enzimas nas células levando à degradação de substratos distintos, como DNA e proteínas do citoesqueleto, causando modificações morfológicas importantes da apoptose (HASSAN et al., 2014; PFEFFER; SINGH, 2018; ZAMAN; WANG; GANDHI, 2014).

1.2.3 Mitocôndria e seu papel na apoptose

As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis por realizar a maior parte da síntese de ATP celular, além de estarem envolvidas em processos metabólicos vitais, como sinalização redox, homeostase de cálcio e ferro, morte celular programada, imunidade inata além de outros processos fisiológicos (PICARD; WALLACE; BURELLE, 2016; ZEMIRLI; MOREL; MOLINO, 2018).

A via mitocondrial é regulada pelos membros da família Bcl-2 que é constituída por três subfamílias: membros apenas proapoptóticos BH3 (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf e Bad), moléculas efetoras pró-apoptóticas (Bax e Bak) e proteínas da família Bcl-2 anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, A1 e Bcl-B). Em células saudáveis, a ação de Bax/Bak é inibida por membros da família Bcl-2 anti-apoptóticas. Bax e Bak estimulam a liberação do citocromo C das mitocôndrias. O citocromo C, juntamente com Apaf-1, forma um complexo denominado apoptossomo de maneira dependente de ATP (NAGATA, 2018; PFEFFER; SINGH, 2018; YUAN; AKEY, 2013).

1.3 *LASER*

Isaac Newton apresentou no século XVII em resposta à natureza da luz, a teoria conhecida como modelo corpuscular da luz. Thomas Young corrobora com a natureza ondulatória da luz através da interferência, onde duas fontes coerentes de luz são produzidas utilizando uma única fonte. Em 1960, Maxwell deduziu que a luz é uma onda eletromagnética (GARCEZ; RIBEIRO; NÚÑEZ, 2012).

No início do século XX, Albert Einstein recebeu o prêmio Nobel em Física descobrindo que a energia da luz é transferida em quantidades discretas, chamado efeito fotoelétrico. Para a mecânica quântica, pequenos conjuntos de energia representam a luz, os chamados fótons, que se propagam na forma de onda. A propagação da luz é representada pela teoria eletromagnética de Maxwell, enquanto a teoria quântica pode ser utilizada para explicar a interação da luz com a matéria (GARCEZ; RIBEIRO; NÚÑEZ, 2012).

Einstein investigou as propriedades de átomos excitados. Tais átomos excitados podem emitir fótons com um comprimento de onda (λ) especial ao retornar ao estado não excitado. Este processo, que se comporta como um processo de amplificação foi denominado amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, acrônimo da palavra: "*LASER*" e seu espectro eletromagnético abrange o λ na faixa do espectro visível (figura 3) (BLACK; JOBLING, 2014; KARU, 1987, 1989; KARU et al., 1996; PENG et al., 2008).

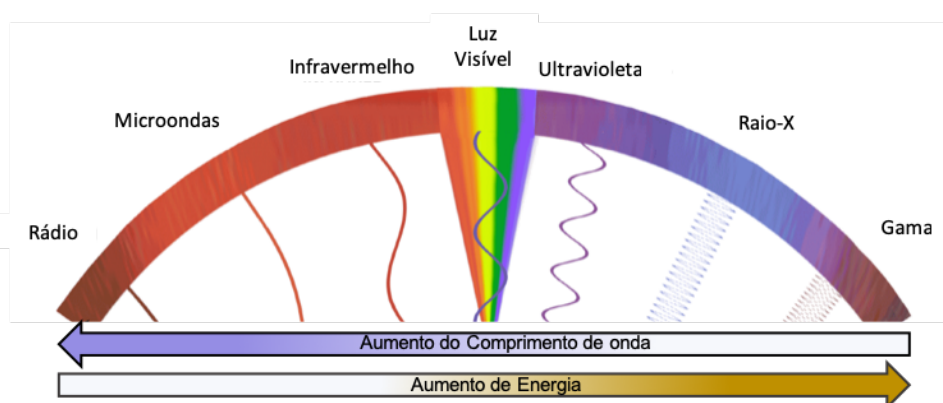


Figura 3: Espectro eletromagnético. Adaptado de: © Copyright. Science Learning Hub, The University of Waikato. <https://www.sciencelearn.org.nz/images/211-the-electromagnetic-spectrum>

Os átomos contêm um núcleo central de prótons e nêutrons onde os elétrons circulam o núcleo em diferentes órbitas (BOHR, 1913). A teoria Bohr diz que elétrons podem pular de uma órbita para outra, se eles são capazes de absorver ou liberar quantidades elevadas de energia na forma de um fóton, dada pela equação: ($E = h \cdot \nu$) onde E é a energia do fóton, h é Planck constante ($6.63 \times 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{s}$) e ν é a frequência do fóton (BOSE, 1924).

O fóton pode ser absorvido ou emitido dependendo do seu estado. A absorção acontece quando um elétron em seu estado fundamental absorve um fóton de energia ($h \cdot \nu$) movimentando-se para uma órbita de mais alta energia induzindo a excitação atômica (BLACK; JOBLING, 2014). A emissão espontânea ocorre quando um elétron de nível superior salta espontaneamente para o que libera um fóton, este, tem fase e direção aleatória e o λ depende da

diferença de energia dos dois estados. Na emissão estimulada, um elétron excitado recebe a incidência de um fóton liberando um segundo fóton "estimulado", semelhante ao fóton incidente em sua direção (BLACK; JOBLING, 2014).

1.3.1 Propriedades da radiação *laser*

A luz produz propriedades ondulatórias tais como amplitude (A), frequência (F), período (T) e λ (figura 4), já suas propriedades corpusculares conduzem a troca de energia entre a luz e a matéria. A amplitude é a magnitude máxima de deslocamento a partir da posição de equilíbrio; a frequência representada pela unidade de medida em hertz (Hz) é o número de oscilações em um determinado intervalo de tempo; o período é o tempo necessário para uma oscilação completa dado entre a razão de 1 pela frequência e o λ caracteriza-se por um ciclo completo da onda, distância entre duas cristas ou vales consecutivos (GARCEZ; RIBEIRO; NÚÑEZ, 2012).

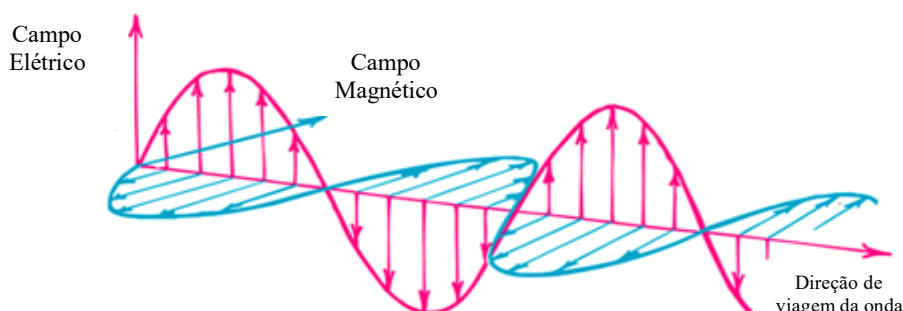


Figura 4: Esquema ilustrativo de uma propagação de onda. Adaptado de (Copyright 2006 Paul G. Hewitt, printed courtesy of Pearson Education Inc., publishing as Addison Wesley.)

Um dos agentes terapêuticos mais antigos utilizados pelos seres humanos é a luz (historicamente como terapia solar, mais tarde como terapia à luz de cor e terapia com Ultravioleta). O uso de *lasers* como fontes de luz foi o próximo passo no desenvolvimento tecnológico da terapia de luz. Em tempos atuais, utilizamos a nomenclatura fototerapia para referir ao tratamento cujo agente terapêutico é a luz, seja por laser ou LED (KARU, 1987, 1989, KARU et al., 1996, 2005; KARU; PYATIBRAT; KALEDO, 1995).

O *laser* é um feixe de luz monocromático, unidirecional e coerente produzido por emissão estimulada de radiação de uma fonte de luz. Os lasers são classificados de acordo com diferentes fatores (características ou propriedades da radiação do feixe ou ainda do meio

emissor) entre os quais temos o tipo de emissão que pode ser contínua ou pulsada. Na emissão contínua, a potência de saída é constante durante todo período de aplicação, enquanto que na emissão pulsada a potência de saída tem sua variação entre o valor máximo (pico máximo de potência) e zero durante um determinado período de tempo, caracterizado como largura temporal (figura 5) (GARCEZ; RIBEIRO; NÚÑEZ, 2012; KARU, 2003; KARU et al., 1996; KARU; PYATIBRAT; KALEND, 1995).

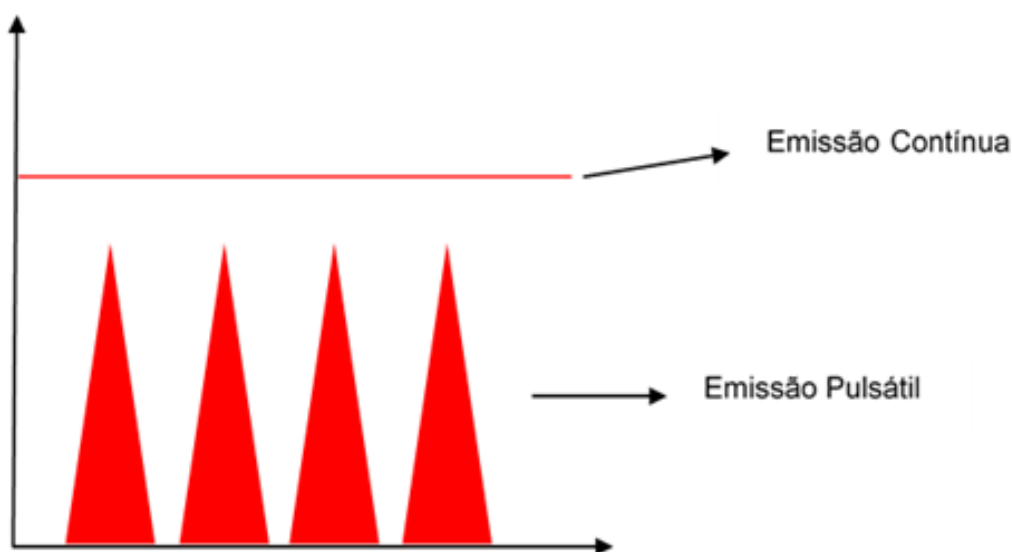


Figura 5: Representação gráfica ilustrando emissão contínua e pulsátil.
(Fonte: arquivo pessoal.)

1.3.2 Mecanismos biológicos do *laser*

A primeira lei da fotobiologia afirma que para a luz visível de baixa potência ter algum efeito em um sistema biológico vivo, a energia da radiação deve ser absorvida por uma molécula (SUTHERLAND, 2002).

A citocromo C oxidase é uma enzima da cadeia de transporte de elétrons, mediando a transferência de elétrons do citocromo C para o oxigênio molecular. Várias linhas de evidência mostram que essa enzima atua como um fotorreceptor e transdutor de foto-sinais nas regiões vermelha e infravermelha próxima do espectro de luz (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; KARU, 2010a, 2010b). O laser de baixa potência aumenta a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular no centro catalítico da enzima, aumentando o potencial de membrana mitocondrial (PMM) e os níveis de adenosina trifosfato (ATP), adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e espécie reativa de oxigênio (EROs) (WU et al., 2010).

Um dos mecanismos mais aceitos para a interação célula-luz foi proposto por Karu, referindo-se à sinalização mitocondrial retrógrada que ocorre com a ativação do fotorreceptor na região visível e infravermelha (KARU, 2008). Segundo Karu, a principal ação é a absorção de um fóton pela citocromo C oxidase. Essa interação eleva o PMM, causando um aumento na síntese de ATP e mudanças nas concentrações de (EROs,) cálcio (Ca^{2+}) e óxido nítrico. Ocorre ainda uma comunicação entre a mitocôndria e o núcleo, impulsionada por mudanças na ultraestrutura da mitocôndria. A alteração na ultraestrutura mitocondrial induz alterações na síntese de ATP, no potencial redox intracelular, no pH e nos níveis de (AMPc)(MAGRINI et al., 2012). Como consequências, fatores de transcrição como NF- κ B (factor nuclear kappa B) e proteína ativadora-1 (AP-1) tem suas atividades alteradas por mudanças na permeabilidade e fluxo de íons da membrana celular luz (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Em um processo inflamatório ocorre um aumento na produção de EROs, acompanhado por uma redução na atividade das defesas antioxidantes, bem como por alterações na atividade de mediadores inflamatórios e moléculas sinalizadoras. Esta situação de estresse oxidativo pode ativar o NF- κ B, levando a modificações na expressão de genes para citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão. Os efeitos do laser de baixa potência na lesão muscular utilizando um comprimento de onda de 808 nm (1,4 J), reduziu a peroxidação lipídica acompanhada por uma diminuição da expressão de mRNA de Cox-2 e aumentou a expressão de mRNA após irradiação. Houve uma redução na formação de nitrotirosina, indicando uma menor atividade e produção de óxido nítrico (ON) e peroxinitrito. Em conclusão, a inibição do estresse oxidativo contribuiu para uma diminuição nos efeitos deletérios observados após a lesão muscular (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; MAGRINI et al., 2012).

Várias citocinas e mediadores inflamatórios têm seus níveis alterados após utilização do laser de baixa potência, independentemente de terem ações pró ou anti-inflamatórias, ou seja, TNF, várias interleucinas, histamina, fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e prostaglandinas (DOS ANJOS et al., 2019). Quando a inflamação está presente, a FBM exerce uma ação anti-inflamatória, mas na ausência de inflamação, a célula libera mediadores pró-inflamatórios que podem ajudar na remodelação do tecido e mediar a função celular (DE LIMA et al., 2013; DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; GAVISH et al., 2012; BRASSOLATTI et al., 2018; CHOW et al., 2009; MINATEL et al., 2009).

A FBM pode regular muitos processos biológicos, tais como viabilidade celular, proliferação celular e apoptose. Os efeitos sobre a proliferação celular podem ser estimulatórios

em baixas fluências sendo útil na cicatrização de feridas, mas poderiam ser inibitórios em fluências mais altas tendo benefícios em cicatrização de feridas hipertróficas e quelóides (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; GAVISH et al., 2012). As aplicações da PBM podem ser amplas na área clínica como: irradiar os locais lesionados para promover a cicatrização, remodelagem e / ou reduzir a inflamação; nos nervos para induzir analgesia; nos gânglios linfáticos para reduzir o edema e a inflamação; e em pontos de gatilho para promover o relaxamento muscular e reduzir a sensibilidade. Uma vez que não é invasivo, o laser de baixa potência é muito útil para pacientes com fobia por agulha ou para aqueles que não toleram terapias com anti-inflamatórios não esteroidais, sendo que os resultados positivos dependem dos parâmetros utilizados no tratamento (CARROLL et al., 2014; DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Mesmo com vários resultados benéficos na literatura sobre a FBM, ainda existem lacunas que limitam a elegibilidade de melhores protocolos de tratamento, bem como o estabelecimento de uma janela terapêutica para os distúrbios musculoesqueléticos e neurológicos já mencionados. Há uma grande divergência nos parâmetros recomendados em cada artigo como fluência, potência, energia, tempo de aplicação e comprimento de onda, que relatam efeitos positivos nos processos de regeneração tecidual (BRASSOLATTI et al., 2018; CHOW et al., 2009; MINATEL et al., 2009), redução de dor e fadiga, melhora do desempenho muscular e prevenção de danos musculares (DE MARCHI et al., 2012). Para minimizar erros e evitar danos a níveis celulares, musculares e articulares, protocolos de aplicações precisam ser definidos, bem como a descrição de possíveis efeitos adversos causados pela energia absorvida.

1.4 *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA E MORTE CELULAR

Baek e colaboradores demonstraram em 2017 que a irradiação com laser de baixa potência no comprimento de onda de 532 nm induz apoptose e aumenta a ativação de caspase-3, Bax e p38 MAPK em células musculares lisas vasculares (BAEK et al., 2017). Wu em 2007 observou que o laser de baixa potência em alta fluência produz morte celular por apoptose iniciando diretamente pela via mitocondrial. A ativação da caspase-8 não foi verificada em seus estudos, já a ativação da caspase-3 aumentou gradualmente, iniciando-se após 30 min de irradiação. Os efeitos celulares ocasionados pela radiação do laser de baixa potência em alta fluência geraram produção imediata de EROs mitocondriais, atingindo um nível máximo em 60 min após a irradiação. Sem evidências de ativação de caspase-8, os resultados deste estudo apontam que a luz é absorvida diretamente pelo porfirinas endógenas nas mitocôndrias, resultando na geração inicial de EROs (WU et al., 2007).

A absorção da luz, aumenta a transferência de elétrons (cadeia respiratória) induzindo uma produção inicial de ERO (KARU & AFANAS'EVA, 1995). Posteriormente, a geração de ERO leva à diminuição da permeabilidade da membrana interna, promovendo a destruição da estrutura mitocondrial e causando a liberação do fator próapoptótico. A liberação de fatores proapoptóticos, como o citocromo C, ativa a caspase-9 e, posteriormente, a caspase-3, que finalmente resulta em apoptose (WU et al., 2007).

De acordo com estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, utilizando os mesmos parâmetros do laser, encontramos uma maior taxa de apoptose apenas em células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo, em modelo de processo inflamatório induzido (DOS ANJOS et al., 2017). Mais ainda, utilizando outros parâmetros de laser (808 nm, potência de 100mW, fluências de 10 e 20J, modo contínuo) em processo inflamatório induzido em pulmões, a ação do laser causando apoptose também foi seletiva para as células inflamatórias presentes no espaço interalveolar (SÉRGIO et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A FBM vem sendo utilizada como recurso terapêutico há décadas para promover a regulação da dor, inflamação, edema, cicatrização de feridas e *performance* muscular. Clinicamente, essa terapia tem se destacado com seus benefícios nos tratamentos das disfunções musculoesqueléticas, como distúrbios dos músculos que compõem o manguito rotador e dor no ombro (ESLAMIAN et al., 2012; CALDERHEAD, et al., 1982), fibromialgia (GUR et al., 2002), síndrome do túnel do carpo (PADUA et al., 1999; WEINTRAUB, 1997), esporão calcâneo (MCKIBBIN& DOWNIE, 1991), osteoartrite (OZDEMIR, BIRTANE & KOKINO, 2001; BROSSEAU et al., 2000) e artrite reumatóide (BROSSEAU et al., 2000).

Porém, os resultados experimentais, envolvendo as respostas celulares e moleculares, têm sido contraditórios em consequência de seus variados parâmetros como comprimento de onda, fluência, densidade de potência, estrutura de pulso e tempo de tratamento (HUANG et al., 2009; DE FREITAS & HAMBLIN, 2016). Isso porque as células podem responder aos estímulos da luz de forma bifásica, tendo uma ação estimulatória ou inibitória (HUANG et al., 2009; HUANG et al., 2011) e a predominância da resposta celular (isto é, resposta estimulatória ou inibitória) é condicionada à dose e tempo de exposição (DE FREITAS & HAMBLIN, 2016). Por isso, é necessário um maior embasamento sobre esses efeitos com a finalidade de garantir a segurança dos protocolos terapêuticos e descrever possíveis efeitos adversos da PBM.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os mecanismos moleculares e celulares do *laser* de baixa potência envolvidos na apoptose de tecidos presentes na articulação talocrural de camundongos.

3.2 ESPECÍFICOS

Descrever a ação do *laser* de baixa potência com comprimento de onda 830nm e em modo contínuo de emissão da luz, comparando duas fluências (3 e 30 J/cm⁻²) e na:

- Indução a fragmentação de DNA;
- Expressão de genes de proteínas proapoptóticas (Bax, Apaf-1, caspases-3, 6 e 9) e anti-apoptótica (Bcl-2);
- Expressão de genes de proteínas envolvidas na sinalização da apoptose (Fas e Fas-ligante);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo 039/2014) e conduzidos de acordo com os padrões éticos internacionais.

4.1 ANIMAIS

Dezoito camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 8-10 semanas, massa corporal entre 24-28g foram mantidos em ambiente controlado (temperatura: 25 ± 2°C; ciclo claro/escuro de 12/12 horas). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n = 6): (I) Controle: não irradiado com laser de baixa potência; (II) 3Jcm⁻²: irradiado com laser de baixa potência a 3Jcm⁻² e (III) 30Jcm⁻²: irradiado com laser de baixa potência a 30Jcm⁻².

4.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Um *laser* infravermelho de baixa potência (*laser* AlGaAs; HTM Indústria de Equipamentos Eletrotécnicos Ltda, Brasil) foi utilizado neste estudo. Os parâmetros do *laser* estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros do laser de baixa potência utilizado nos experimentos.

Comprimento de onda (nm)	830nm
Laser de diodo	AsGaAl
Potência (mW)	10mW
Tamanho do ponto (cm²)	0,05cm ²
Densidade de potência (W/cm²)	0,2W/cm ²
Energia por ponto (J)	0,15J e 1,5J
Densidade de Energia (J/cm²)	3 e 30Jcm ²
Tempo por ponto (s)	15 e 150 s
Número de pontos	01
Técnica de aplicação	Pontual
Número de sessões no tratamento	04 sessões
Spot size (cm²)	0,028

Os animais foram imobilizados e as irradiações com *laser* foram realizadas durante 4 dias consecutivos em ambas as articulações talocrurais. Vinte e quatro horas após a última irradiação com *laser*, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (80mg kg⁻¹, Syntec, Brasil) e cloridrato de xilazina (20mg kg⁻¹, Syntec, Brasil) por via intraperitoneal e luxação cervical conforme aprovação pelo Comitê de Experimentação Animal local. As articulações foram dissecadas, a pele removida, lavadas em água destilada para remover o sangue e distribuídas para análise morfológica e imunohistoquímica (articulações direitas) e análise de PCR em tempo real (articulações esquerdas). A irradiação ocorreu conforme a ordem cronológica na figura 6.

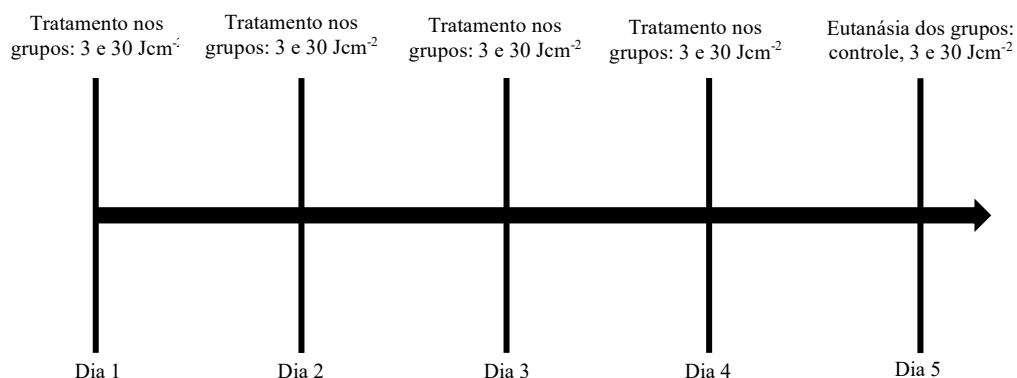


Figura 6: Cronologia experimental.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E PCR EM TEMPO REAL

Após a remoção da pele e dos músculos, as articulações esquerdas foram imersas em nitrogênio líquido, maceradas e o RNA total extraído pela técnica de fenol tamponado (TRIzol® - Invitrogen, EUA). Depois de centrifugados (12.000 rpm, 4°C, 10 min), os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, adicionado clorofórmio e as misturas centrifugadas novamente (12.000 rpm, 4° C, 15 min). As fases aquosas foram transferidas para outros tubos onde foi adicionado isopropanol.

Após incubação à temperatura ambiente por 15 min, as misturas foram centrifugadas (12.000 rpm, 4°C, 10 min), os sobrenadantes descartados e o precipitado lavado com solução etanol-DEPC (80% etanol, 0,1%) e centrifugado. Os sobrenadantes foram removidos e o RNA total foi reconstituído em solução de água-DEPC (0,1%). A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotômetro, calculando a razão de densidade óptica na razão de comprimento de onda de 260/280 nm. Em seguida, 2 µg de RNA total foram transcritos em DNA complementar (cDNA) usando o Kit de Transcrição Reversa cDNA (*Applied Biosystems*, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

Primers para reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram desenhados usando o programa *Primer 3* (XAVIER et al., 2010; GAVISH et al., 2012) (tabela 02), em diferentes exons, a fim de evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado utilizando o sistema de PCR em Tempo Real *Step One Plus™* (*Applied Biosystems*, EUA), nas seguintes condições: 40 ciclos; em cada ciclo, desnaturação inicial a 95° C durante 10 min, desnaturação a 95° C durante 15 segundos e emparelhamento de primários e extensão a 60° C durante 1 min. Para análise da

expressão gênica, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (BRASSOLATTI et al., 2018). Como controle interno, a β -actina foi utilizada.

Tabela 02 - Primers utilizados para qPCR.

Genes alvo	Sequência <i>Forward</i> (5' --> 3')	Sequência <i>Reverse</i> (3' --> 5')	Nº referência NCBI
Fas	AACCTCCAGTCGTGAAACCA	TGTCTTCAGCAATTCTCGGG	NM_007987.2
Fas ligante	CTGGTGGCTCTGGTTGGAAT	TCACGGAGTTCTGCCAGTTC	NM_010177.4
Bax	CAAACCTGGTGCTCAAGGCC	GGCTCACGGAGGAAGTCC	NM_007527.3
Apaf-1	TTACCTGCCTGAAGCCCAAG	CAGCTTTCTTGTGCCCAACC	NM_001042558.1
Caspase-9	GTAGGGCAATGTGGAGCAGT	GGGCACAATCCCTAACCACA	NM_015733.5
Caspase-3	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	CCGTACCAGAGCGAGATGAC	NM_001284409.1
Caspase-6	GACGTGGTGGGAAGGGCTAAA	AGTGTCACAAAAGGGGAGGC	NM_009811.4
β-actina	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC	NM_007393.4

4.4 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

As articulações direitas foram dissecadas e fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 24 h, descalcificadas em ácido nítrico a 5% por 48 h, desidratadas e embebidas em parafina histosec® (Merck, Alemanha). Secções sagitais (4 μ m de espessura) foram usadas para análise TUNEL. Figura 7 representa a comparação das articulações de camundongos (utilizadas) e a de humanos, enquanto na figura 8 podemos observar os cortes realizados para as análises.

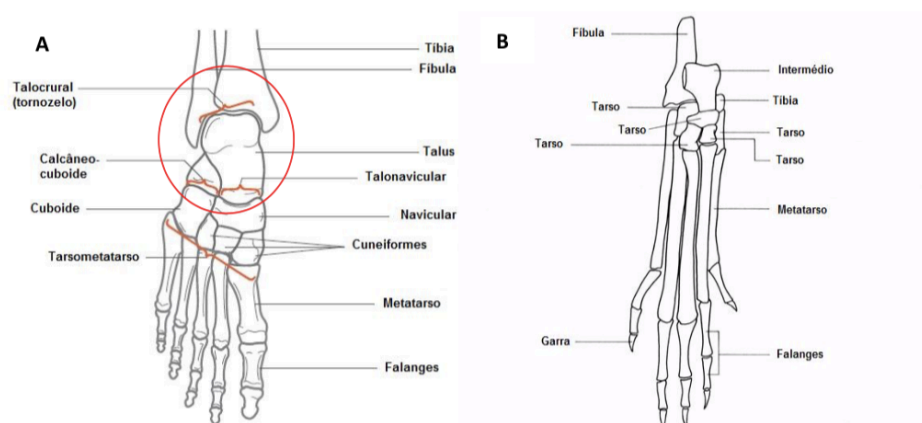


Figura 7: Articulação do pé e tornozelo humano (A) e da pata de rato (B). A - Adaptado de HELLIWELL et al., 2011; B – Adaptado <http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>.

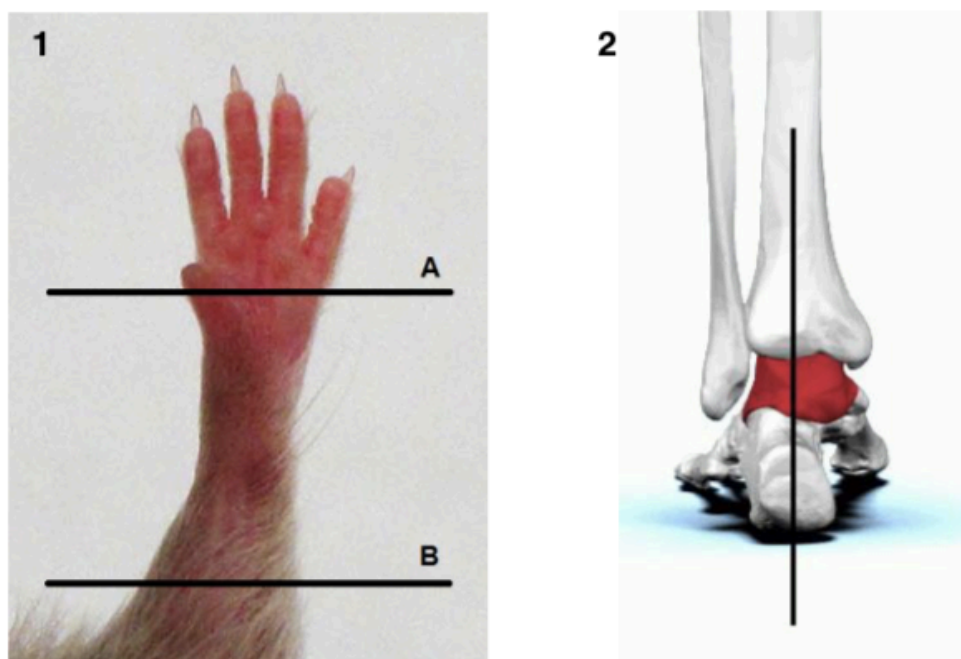


Figura 8: Planos de corte utilizados para remoção da região articular talocrural e microtomia. Figura 1: A - plano de corte para retirada das falanges; corte na porção média do metatarso. B - plano de corte frontal na porção média da tibia e fíbula. Adaptado de <http://hookelabs.com/services/cro/cia.html>. Figura 2: plano de corte sagital utilizado na microtomia para obtenção das lâminas histológicas.

Adaptado de <http://newsblog.drexel.edu/2014/09/16/drexel-engineers-discovery-turns-artificial-ankle-research-in-a-new-direction/>

4.5 FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A fragmentação do DNA foi detectada usando um ensaio *TUNEL POD* (Roche, Alemanha), de acordo com o manual do fabricante. Após a desparafinização e a permeabilização, os cortes foram incubados em proteinase K durante 15 min à temperatura ambiente. Os cortes foram então incubados em mistura reacional *TUNEL* contendo *desoxinucleotidil transferase terminal* (TdT) e fluoresceína-dUTP a 37° C durante 1 h. Após lavagem três vezes com tampão fosfato (PBS), os cortes foram incubados com o *Converter-POD* contendo anticorpo anti-fluoresceína conjugado com peroxidase de rábano (POD) à temperatura ambiente durante 30 min. Após lavagem três vezes com PBS, os cortes foram incubados com 3-3'-diaminobenzidina (Sigma Aldrich, EUA) durante 10 min à temperatura ambiente (25° C) e depois coradas com verde de metilo (XAVIER et al., 2010).

4.6 ANÁLISES DE IMAGENS

A análise morfológica e quantitativa foi realizada no microscópio Olympus (BX53F), equipado com as objetivas U-PlanFL N4/0.13, 10/0.30, 40/0.75 e 100/0.85. As imagens foram capturadas pela câmera Olympus DP73, usando o *software Cell Image Sens* (versão 5.1, Olympus, EUA). Para análise quantitativa, foi utilizada a objetiva 40/0,75. Foi utilizado o *software Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Inc.) para quantificação da marcação celular TUNEL POD positiva. A quantificação foi obtida a partir de 5 campos utilizando objetiva 40/0.75. Os resultados foram expressos como a média do total de número de células marcadas/campo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Considerando que a maioria das variáveis não apresentou distribuição normal, os resultados foram apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartilico. Para as variáveis com distribuição normal, a análise de variância (ANOVA) foi usada para comparações de grupo, seguida por testes *post hoc* apropriados com correções de Bonferroni, quando foram identificadas diferenças significativas. Para outras variáveis, o teste de kurskal-Wallis foi usado para comparações entre os grupos, seguido pelo teste de Dunn como teste *post hoc*, quando diferenças significativas foram identificadas. O nível de significância para todos os testes foi definido como $p \leq 0,05$. O *software* GraphPad (*GraphPad Prism VII Software, San Diego, Califórnia, EUA*) foi utilizado para todas as análises estatísticas e *design* gráfico.

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigo, aceito em 17/01/2019 na revista *Laser in Medical Science*.

DA SILVA, P.A.V., DOS ANJOS, L.M.J., ABDUCH, T.F. et al. Photobiomodulation can alter mRNA levels cell death-related. **Lasers Med Sci** (2019). <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02764-x>



Photobiomodulation can alter mRNA levels cell death-related

Pierre Augusto Victor da Silva¹ · Lúcia Mara Januário Dos Anjos² · Thais Fraga Abduch³ · Rafael Pereira⁴ · Adenilson de Souza da Fonseca⁵ · Flávia de Paoli²

Received: 18 November 2018 / Accepted: 21 January 2019

© Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2019, corrected publication 2019

Abstract

Photobiomodulation (PBM) by low-level laser has demonstrated excellent results for inflammatory treatments, promoting repair of injured tissues. Knowledge regarding the molecular mechanisms involved in this process has been increasing, but its effect on cell death/survival-related gene expression after laser irradiation with different doses is not well understood. So, it is important to know these effects in order to guarantee the safety of therapeutic protocols based on PBM. This study aimed to investigate the mRNA levels of genes related to proteins involved in cell death/survival pathways of healthy tissues from talocrural joint of mice after PBM. Mice were divided into three groups: control, PBM at 3 J cm⁻², and PBM at 30 J cm⁻². Laser irradiation was performed on talocrural joint during four consecutive days. Morphological analyses, immunocytochemistry, FasL, Fas, Bax, Apaf1, Caspase9, Caspase3, Caspase6, Bcl2 mRNA levels, and DNA fragmentation were performed to verify cell death induction after laser irradiation. PBM can increase mRNA levels of almost genes pro-apoptotic. On the other hand, mRNA level of anti-apoptotic protein Bcl-2 gene was not significantly altered. Bcl-2/Bax ratio (indicator of protective molecular response) was decreased after PBM at 30 J cm⁻², trending to DNA fragmentation. Results obtained in this study indicate that PBM by low-level infrared laser alters mRNA relative levels of genes involved in cell death pathways. However, these molecular alterations were not able to cause DNA fragmentation in cells in talocrural joint tissues, indicating that infrared laser was not enough to cause cell death.

Keywords Photobiomodulation · Apoptosis · Bcl-2/Bax ratio · Caspase · DNA fragmentation

✉ Pierre Augusto Victor da Silva
pierreaugusto@gmail.com

- ¹ Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário Redentor (UniRedentor), BR 356, nº 25 - Cidade Nova, Itaperuna / Rio de Janeiro 28300-000, Brazil
- ² Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n-Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036-900, Brazil
- ³ Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA), Alameda Salvaterra, nº. 200, Bairro Salvaterra, Juiz de Fora, Minas Gerais 36033-003, Brazil
- ⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Jequié, Bahia 45210-506, Brazil
- ⁵ Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil

Abbreviations

µm	Micrometers
AlGaAs	Gallium arsenide aluminum
AMPC	Adenosine monophosphate cyclic
APAF-1	“Apoptotic protease-activating factor 1” or apoptosis factor 1 activating protease
ATP	Adenosine triphosphate
BAK	Member of the pro-apoptotic Bcl-2 family
BAX	Member of the pro-apoptotic Bcl-2 family
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
BH3	Member of the pro-apoptotic Bcl-2 family
BID	Member of the pro-apoptotic Bcl-2 family
BAD	Member of the pro-apoptotic Bcl-2 family
Caspase	Cysteine-specific protease aspartyl
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA	Deoxyribonucleic acid
EROs	Reactive oxygen species
FADD	“Fas-associated death domain” or FAS-associated death domain

FAS or CD95 or APO-1	Pro-apoptosis membrane receptor or protein
F A S - L o r	FAS-binding membrane protein
CD95L	
IL-1	Interleukin 1
IL-17	Interleukin 17
J/cm ²	Joules per square centimeters
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
mJ	Millijoules
MMP	Matrix metalloproteinases
mW	Milliwatt
nm	Nanometers
PBS	Saline phosphate-buffered solution
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive nitrogen species
t-BID	Truncated BID
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	TNF receptor
TUNEL POD	Peroxidase-labeled antibody used for the detection of apoptosis (programmed cell death) with the TUNEL reaction followed by microscopy

Introduction

Photobiomodulation (PBM) effect induced by low-level lasers has been widely used in many rehabilitation programs with promising results [1, 2] for treatment of orthopedic and rheumatic disorders, such as muscle and tendon injuries [3], rheumatoid diseases (rheumatoid arthritis and osteoarthritis) [4], fibromyalgia [5], low back pain [6–8], and carpal tunnel syndrome [9]. Several molecular mechanisms were proposed to explain the benefits of laser irradiation and the most accepted for cell-light interaction was proposed by Karu [10], referring to retrograde mitochondrial signaling, which occurs by light activation at visible and infrared region of electromagnetic spectrum. It is reported that alterations on mitochondrial membrane potential and permeability lead to ATP synthesis increase, change the calcium ion homeostasis, and increase of reactive oxygen species (ROS) production [10]. Some of these immediate events (i.e., occurred along some minutes after laser irradiation) lead to cascade of cellular signaling and molecular responses [11], culminating in changes on gene expressions [11–14].

When an area is irradiated, cells absorb energy from monochromatic (laser) radiation [11, 15], inducing cell responses. All tissues irradiated in this area (healthy or not)

may respond it differently, since laser irradiation is not habitual for them. According to Hamblin [15, 16], cells present biphasic-dose response to PBM, in which stimulatory or inhibitory effects can be observed. The type of cell response would be conditioned to time exposure and doses. Thus, the challenge for researches involving PBM is to establish safe doses for rehabilitation treatments, focusing injured tissues and to understand that irradiated area involves not only injured but also healthy tissues. Thereby, these findings may also help to understand molecular mechanisms related to beneficial and adverse laser-induced effects.

Previous studies of inflammatory models demonstrated that apoptosis occurs mainly in inflammatory cells while this process does not occur in other cells (healthy cells close to inflammatory area) [17, 18]. This indicates that different cell types may express different mechanisms of death/survival at different thresholds. It was described that inflammatory cells have additional mechanisms for free radical production [15, 19], and this may explain selective effects of PBM. Also, some authors have reported induction of apoptotic process in healthy tissues after PBM [20–22].

Apoptosis is initiated by formation of multiprotein complexes, including death signaling complex. This complex is generated after binding of extracellular death ligands to death receptors (extrinsic pathway) and/or by cytochrome c release from mitochondria (intrinsic pathway). Both pathways recruit and activate caspases, including effector caspases, targeting specific cellular and nuclear substrates for proteolysis. After signaling apoptosis, modifications occur within cell, including caspase activation that cleaves cellular components necessary for normal functions, such as cytoskeletal and nuclear proteins. Cytoskeleton reorganization and DNA fragmentation by endonucleases are promoted by effector caspases (caspase 3, for example), culminating in apoptotic body formation [23–25].

The mitochondrial pathway is regulated by both anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, and BAG) and pro-apoptotic proteins (Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, and Blk). Pro-apoptotic proteins stimulate cytochrome c release from mitochondria that, together with Apaf-1, form a complex called apoptosome [25–27]. On the other hand, anti-apoptotic Bcl-2 family prevents apoptogenic factors release from mitochondria, including cytochrome c [28]. So, cellular resistance to apoptotic stimuli is due to balance between anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins [29].

Since different cell types have mechanisms of death/survival at different thresholds and molecular mechanisms involved in PBM are not understood yet, this study aimed to investigate mRNA levels of genes related to cell death pathways in tissues from talocrural joint after PBM by low-level infrared laser irradiation.

Material and methods

Experiments were approved by Ethics Committee of Federal University of Juiz de Fora (protocol 039/2014) and conducted in accordance with international ethical standards.

Animals

Eighteen male C57BL/6 mice aged 8–10 weeks, body weight between 24 and 28 g, were kept in a controlled environment (temperature $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, light/dark cycle of 12/12 h). Animals were randomly distributed into three groups ($n = 6$): (i) control—not irradiated with low-level laser, (ii) 3 J cm^{-2} —irradiated with low-level laser at 3 J cm^{-2} , and (iii) 30 J cm^{-2} —irradiated with low-level laser at 30 J cm^{-2} .

Low-level laser

A low-level infrared laser (AlGaAs laser; HTM Indústria de Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda, Brazil) was used in this study. The laser parameters were wavelength 830 nm, power output of 10 mW, laser beam area of 0.05 cm^2 , power density of 0.2 W cm^{-2} , and energy densities of 3 and 30 J cm^{-2} (a total energy of 150 and 1500 mJ after 15 and 150 s, respectively) in continuous wave emission mode.

Animals were immobilized and laser irradiations were performed for 4 consecutive days on both talocrural joints. Twenty-four hours after the last laser irradiation, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (80 mg kg^{-1} ; Syntec, Brazil) and xylazine hydrochloride (20 mg kg^{-1} ; Syntec, Brazil) intraperitoneally and then cervical dislocation was performed, as approved by local Animal Experimentation Committee. Joints were dissected, skin removed, washed in distilled water to remove blood, and distributed to morphological and immunohistochemical analysis (right joints) and real-time PCR analysis (left joints).

Total RNA extraction and real-time PCR

After skin and muscle removal, the left joints were immersed in liquid nitrogen, macerated, and total RNA was extracted by phenolic buffer technique. Briefly, TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) was added and centrifuged (12,000 rpm, 4°C , 10 min). The supernatants were transferred to other tubes, chloroform was added, mixtures were centrifuged (12,000 rpm, 4°C , 15 min), aqueous phases were transferred to other tubes, and isopropanol was added. After incubation at room temperature for 15 min the mixtures were centrifuged (12,000 rpm, 4°C , 10 min), supernatants were discarded, and precipitate was washed with ethanol-DEPC solution (80% ethanol, 0.1%) and centrifuged. Supernatants were removed and total RNA was reconstituted in water-DEPC solution (0.1%). The concentration and purity of RNA was determined

by spectrophotometer, calculating optical density ratio at wavelength ratio of 260/280 nm. Then, 2 μg of total RNA was transcribed into complementary DNA (cDNA) using cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) following manufacturer's guidelines. Primers for quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) were designed using Primer 3 program [17, 30], on different exons in order to avoid the possibility of contamination with genomic DNA. Real-time PCR assay was performed using Step One Plus™ Real Time PCR System instrument (Applied Biosystems, USA) under following conditions: 40 cycles; on each cycle, initial denaturation at 95°C for 10 min, denaturation at 95°C for 15 s, and primer pairing and extension at 60°C for 1 min. For analysis of gene expression, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method was used [31]. As an internal control, β -actin was used.

Histological procedures

Right joints were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde solution for 24 h, decalcified in 5% nitric acid for 48 h, dehydrated, and embedded in histosec® paraffin (Merck, Germany). Sagittal sections (4 μm thick) were used for TUNEL analysis.

DNA fragmentation

DNA fragmentation was detected using a TUNEL POD assay (Roche, Germany) according to manufacturer's manual. After deparaffinization and permeabilization, tissue sections were incubated in proteinase K for 15 min at room temperature. Sections were then incubated in TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and fluorescein-dUTP at 37°C for 1 h. After washing three times with phosphate-buffered solution (PBS), sections were incubated with Converter-POD containing horseradish peroxidase-conjugated anti-fluorescein antibody (POD) at room temperature for 30 min. After washing three times with PBS, these sections were incubated with 3-3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, USA) for 10 min at room temperature (25°C) and then stained with methyl green [17].

Image analyses

Morphological and quantitative analyses were performed using Olympus microscope (BX53F), equipped with U-PlanFL N 4/0.13, 10/0.30, 40/0.75, and 100/0.85 objectives. Images were captured by Olympus DP73 camera, using cell Sens Image software (version 5.1, Olympus, USA). For quantitative analysis, objective 40/0.75 was used. Image Pro Plus software (Media Cybernetics, Inc.) was used for quantification of positive TUNEL POD cell labeling.

Statistical analysis

Normality of data was tested by Shapiro-Wilk test. Considering that most variables did not exhibit a normal distribution, results were presented as median $\pm$ interquartile range. For variables with normal distribution, analysis of variance (ANOVA) was used for group comparisons followed by appropriate post hoc tests with Bonferroni corrections when significant differences were identified. For other variables, Kruskal-Wallis test was used for group comparisons followed by Dunn's test as post hoc test when significant differences were identified. Significance level for all tests was set as $p \leq 0.05$. GraphPad software (GraphPad Prism VII Software, San Diego, CA, USA) was used for all statistical analysis and graphical design.

Results

Relative gene expressions related to apoptosis

Figure 1a, b shows that relative mRNA levels of genes related to apoptotic pathways were altered after infrared laser exposure at 3 and 30 J cm⁻², when compared with control group. Results indicate that infrared laser irradiation at both energy densities increased Bax and Fas mRNA levels, while FasL, Caspase 9, Caspase 3, and Caspase 6 mRNA levels were increased only at 3 J cm⁻². Also, Apaf1 mRNA level was increased only at 30 J cm⁻² when compared with control group.

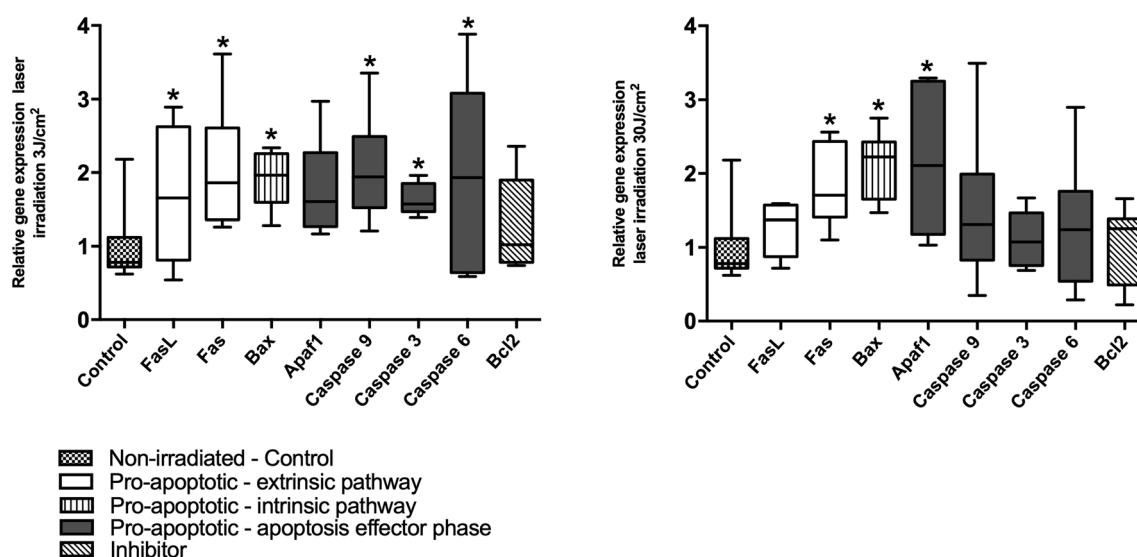


Fig. 1 Median $\pm$ interquartile range of mRNA levels for genes related to apoptotic pathways after laser irradiation at 3 J cm⁻² (a) and 30 J cm⁻² (b). *Significantly different ($p < 0.05$)

Ratio Bcl-2/Bax

The Bcl-2/Bax ratio was used as indicator of apoptotic potential, such as high ratios indicate anti-apoptosis profile and low ratios indicate apoptosis profile. Bcl-2/Bax ratio for animals from 30-J cm⁻² group was decreased when compared with control group. This result was not observed for group laser irradiated at 3 J cm⁻² (Fig. 2).

Morphological analysis and DNA fragmentation

Morphological changes were not observed after infrared laser irradiation for both energy densities evaluated. All tissues present in talocrural joint (articular cartilage, connective tissue, and bone) did not present morphological characteristic altered after infrared laser irradiation.

DNA fragmentation was detected only in cells from connective tissues, while cells from articular cartilage and bone did not present positive labeling. However, quantitative analysis indicated no statistical differences ($p > 0.05$) after infrared laser irradiation for both energy densities evaluated (Fig. 3).

Discussion

Although PBM has been widely used in various therapeutic forms for treatment of disorders [1, 2, 18, 32–35], experimental investigations are necessary for a better understanding of cell responses, becoming this therapy safer and more effective. Most of these studies describe good results for PBM but there are also in literature studies suggesting sub-lethal DNA damages and apoptosis induction [22, 36]. As cells show

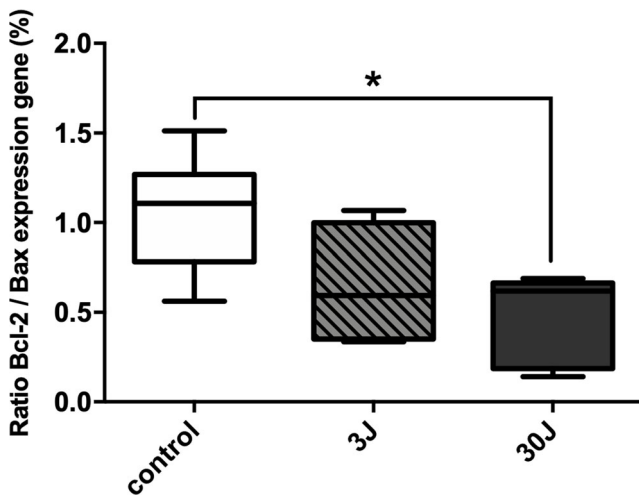


Fig. 2 Median $\pm$ interquartile range of the Bcl-2/Bax mRNA level ratio of control and laser irradiated groups at 3 and 30 J cm⁻². *Significantly different ($p < 0.05$)

biphasic dose response (stimulatory or inhibitory effects) to PBM [15, 16], the type of cellular response would be conditioned by time irradiation and laser doses [33, 37]. Following that, we investigated whether apoptosis mechanisms would be active in different cells from tissues present in talocrural joint

after PBM by low-level infrared laser, comparing two different energy densities (3 and 30 J cm⁻²).

Since light is absorbed by mitochondria and it plays a key role in apoptotic processes, cell death could be triggered through extrinsic and intrinsic pathways. mRNA levels for genes involved in both pathways were altered at two energy densities evaluated (3 and 30 J cm⁻²). Extrinsic pathway-mediated apoptosis is activated when certain ligands, such as Fas-L, bind at death receptors on plasma membrane, leading to cytoplasmatic signaling and caspase-8 activation [38, 39]. Formation of active caspase-8 will act as caspase initiator, which in turn acts other effector caspases (such as caspase-3 and -6) [39–42]. Our results show that Fas, Fas-L, caspases-3, -6, and -9 mRNA levels were upregulated after laser irradiation at 3 J cm⁻². On the other hand, only Fas mRNA level was increased after laser irradiation at 30 J cm⁻² when compared with control group. Intrinsic pathway is directly related to mitochondria, especially via Bid and Bax proteins (two pro-apoptotic proteins present in Bcl-2 family). These proteins promote cytochrome c release from mitochondrial intermembrane space to cytoplasm. Once in cytoplasm, cytochrome c binds to adaptor protein Apaf-1, which is able to activate caspase-9 and, possibly, other initiator caspases. Bax mRNA level was altered after laser irradiation for both energy

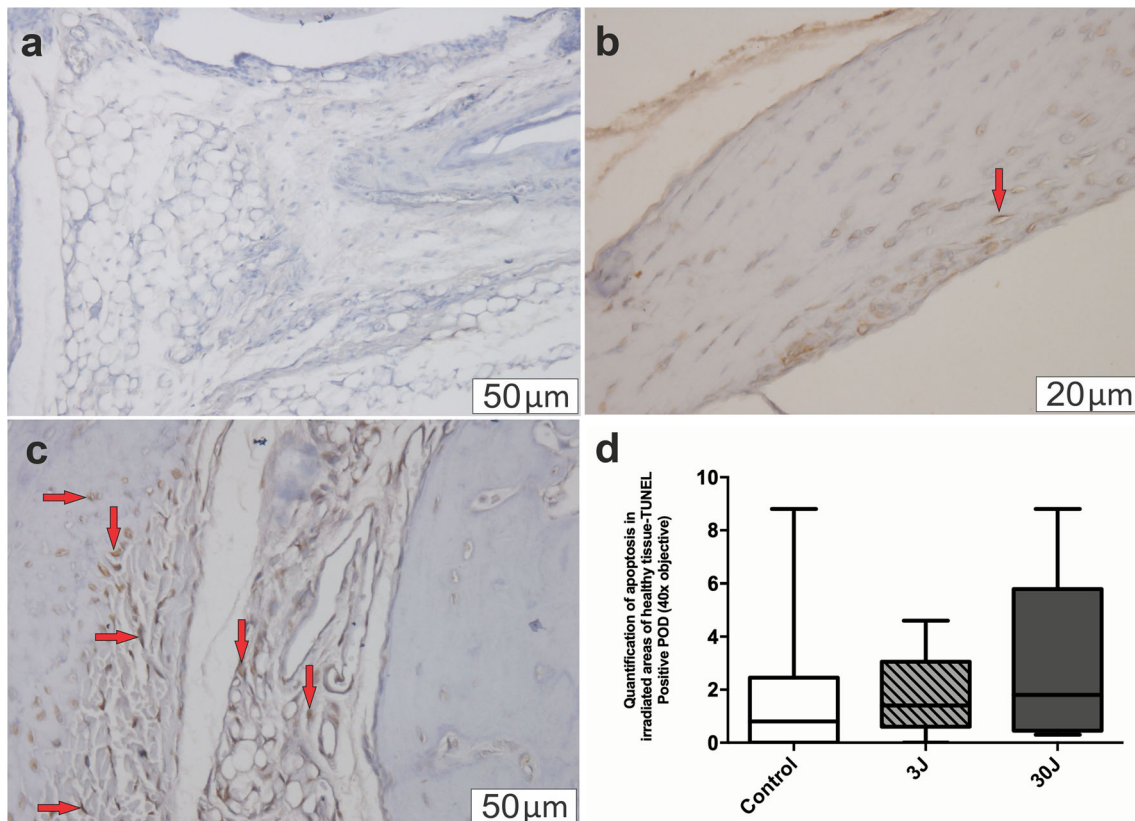


Fig. 3 Representative images demonstrate DNA fragmentation in tissues from mouse talocrural joint. **a** Control. **b** 3 J cm⁻². **c** 30 J cm⁻². **d** Quantification of positive cell labeling (median $\pm$ interquartile). There were no significant differences. Arrow indicates positive cell labeling

densities tested, while Apaf1 mRNA relative level was increased only after laser irradiation at 30 J cm⁻² (Fig. 1a, b).

Bcl-2 family presents a range of bioactivities from inhibition up to promotion of apoptosis [43]. While Bax and Bid proteins can release cytochrome c from mitochondrial intermembrane space to cytoplasm, Bcl-2 protein prevents cytochrome c release, acting as a regulator or inhibitor of apoptosis. Also, this protein contributes to inhibition of ROS generation and intracellular acidification, thereby stabilizing the membrane potential of mitochondria [44, 45]. Bax can act by binding to Bcl-2, promoting formation of apoptosome (complex formed by APAF-1 and activated caspase-9) leading to apoptosis. Moreover, Bax can also promote apoptosis through interaction with mitochondria, independently of interaction with anti-apoptotic proteins [46]. Bcl-2/Bax ratio, when equilibrated, acts as regulatory effect in apoptosis [28]. In our results, Bax mRNA level was increased but Bcl-2 mRNA level was not altered after 30 J cm⁻², which may be indicative of stimulus to cell death.

Morphologically, apoptosis is characterized by chromatin condensation and DNA fragmentation, followed by nuclear membrane disruption and apoptotic body formation [22, 47]. This fragmentation is consequence of cascade caspases that, when activated, moves towards to nucleus causing DNA fragmentation. Although TUNEL result did not demonstrate statistical differences after laser irradiation for both energy densities tested, it demonstrated a tendency of fragmentation after laser irradiation at higher energy density (30 J cm⁻²). In this group, positive cell labeling was well observed in cells from connective tissue present in synovial membranes. In addition, no positive cell labeling was observed in bone and articular cartilage cells. In previous study, DNA fragmentation and loss of chromatin in tendons (connective tissue) is reported as a consequence of PBM by low-level infrared laser (same equipment, but different energy densities); both events are related to apoptosis process [22]. In addition, these different cell responses could indicate more sensibility to light absorption of fibroblasts than other cells. These are important findings for joint injury rehabilitation using PBM, since local tissues could respond in different ways. So, it is important to point out that irradiated area involves not only inflammatory cells but also healthy tissues and PBM may cause apoptosis stimuli in cells not injured.

Although the mRNA levels for almost pro-apoptotic genes were increased and anti-apoptotic mRNA levels were not altered, cell death was not completely implemented. PBM was able to alter mRNA levels for pro-apoptotic genes, both involved in extrinsic and intrinsic pathways, but somehow this stimulus is not enough to drive cells to death. However, it has been previously described that PBM at high energy densities induces apoptosis by activation of caspase-3 and alteration of mitochondrial permeability [33].

Therefore, our research suggests that good clinical practice responses to PBM depend not only on physical laser irradiation parameters but also on understanding of tissues involved and their different responses for laser parameters. This study could contribute to safer therapies decreasing possible side effects from PBM when used for treatment of joint injury.

Conclusion

The results obtained in this study indicate that PBM can alter mRNA levels of genes involved in cell death pathways. However, these molecular alterations were not able to cause DNA fragmentation in cells from talocrural joint tissues, indicating that this stimulus is not enough to drive cell to death.

Funding This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento-CNPq (process number APQ 474405/2013-3) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG (process number APQ 02123/15).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Leal-Junior ECP, Vanin AA, Miranda EF et al (2015) Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. *Lasers Med Sci* 30:925–939. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1465-4>
2. Borges LS, Cerqueira MS, Dos Santos Rocha JA et al (2013) Light-emitting diode phototherapy improves muscle recovery after a damaging exercise. *Lasers Med Sci* 29:1139–1144. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1486-z>
3. David R, De Souza RA, Xavier M et al (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats 558:553–558. <https://doi.org/10.1002/lsm.20896>
4. Baltzer AWA, Stosch D, Seidel F, Ostapczuk MS (2017) Low level laser therapy : A narrative literature review on the efficacy in the treatment of rheumatic orthopaedic conditions. *Z Rheumatol* 76(9): 806–812
5. Ruaro JA, Fréz AR, Ruaro MB, Nicolau RA (2014) Low-level laser therapy to treat fibromyalgia. *Lasers Med Sci* 29(6):1815–1819
6. Kingsley JD, Demachak T, Mathis R (2014) Low-level laser therapy as a treatment for chronic pain. *Front Physiol* 5:1–3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00306>
7. Djavid GE, Mehrdad R, Ghasemi M et al (2007) In chronic low back pain, low level laser therapy combined with exercise is more beneficial than exercise alone in the long term: a randomised trial.

- Aust J Physiother 53:155–160. [https://doi.org/10.1016/S0004-9514\(07\)70022-3](https://doi.org/10.1016/S0004-9514(07)70022-3)
8. Glazov G, Yelland M, Emery J (2016) Low-level laser therapy for chronic non-specific low back pain: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Acupunct Med* 34:328–341. <https://doi.org/10.1136/acupmed-2015-011036>
9. Li Z-J, Wang Y, Zhang H-F et al (2016) Effectiveness of low-level laser on carpal tunnel syndrome: a meta-analysis of previously reported randomized trials. *Medicine (Baltimore)* 95:e4424. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004424>
10. Karu TI (2008) Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol* 84:1091–1099. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x>
11. Karu T (2014) Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 20(2):143–148
12. Wu S, Xing D (2014) Intracellular signaling cascades following light irradiation. *Laser Photon Rev* 8:115–130. <https://doi.org/10.1002/lpor.201300015>
13. Song S, Zhang Y, Fong C-C et al (2003) cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol* 120:849–857. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12133.x>
14. Calles C, Schneider M, MacAluso F et al (2010) Infrared a radiation influences the skin fibroblast transcriptome: mechanisms and consequences. *J Invest Dermatol* 130:1524–1536. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.9>
15. Huang Y-Y, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. Dose-Response 7:dose-response.0. <https://doi.org/10.2203/dose-response.09-027.Hamblin>
16. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR (2011) Biphasic dose response in low level light therapy – an update. Dose-Response 9:dose-response.1. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
17. dos Anjos LMJ, da Fonseca A d S, Gameiro J, de Paoli F (2017) Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities *Lasers Med Sci* 32:975–983. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2196-8>
18. Sergio LPS, Campos VMA, Vicentini SC et al (2016) Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue. *Lasers Med Sci* 31:429–435. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-1870-6>
19. Sergio LPDS, Thomé AMC, Trajano LADS N et al (2018) Photobiomodulation prevents DNA fragmentation of alveolar epithelial cells and alters the mRNA levels of caspase 3 and Bcl-2 genes in acute lung injury. *Photochem Photobiol Sci* 17:975–983. <https://doi.org/10.1039/c8pp00109j>
20. Huang L, Wu S, Xing D (2011) High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3 β signaling pathway. *J Cell Physiol* 226:588–601. <https://doi.org/10.1002/jcp.22367>
21. Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR (2009) High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 218:603–611. <https://doi.org/10.1002/jcp.21636>
22. De Paoli F, Ramos Cerqueira L, Martins Ramos M et al (2014) DNA fragmentation and nuclear phenotype in tendons exposed to low-intensity infrared laser. *Prog Biomed Opt Imaging - Proc SPIE* 9321:1–12. <https://doi.org/10.1117/12.2075726>
23. Hassan M, Watari H, Abualmaaty A, et al (2014) Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* 2014:150845
24. Zaman S, Wang R, Gandhi V (2014) Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 55:1980–1992. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.855307>
25. Pfeffer CM, Singh ATK (2018) Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci* 19:448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
26. Nagata S (2018) Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol* 36(1):489–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>
27. Yuan S, Akey CW (2013) Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure* 21:501–515. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>
28. Bialik S, Zalckvar E, Ber Y et al (2010) Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 35:556–564. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.008>
29. Ashkenazi A (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:325–331. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.04.001>
30. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T et al (2012) Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
31. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
32. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR et al (2014) Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater* 30:465–475. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.006>
33. de Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed mechanisms of Photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 22(3). <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
34. De Marchi T, Leal ECP, Bortoli C 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. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0955-5>
35. Dos Santos Maciel T, Muñoz ISS, Nicolau RA et al (2014) Phototherapy effect on the muscular activity of regular physical activity practitioners. *Lasers Med Sci* 29:1145–1152. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1481-4>
36. Canuto KS, Sergio LPS, Guimarães OR et al (2015) Low-level red laser therapy alters effects of ultraviolet C radiation on *Escherichia coli* cells. *Braz J Med Biol Res* 48(10):939–944
37. Sun X, Wu S, Xing D (2010) The reactive oxygen species-Src-Stat3 pathway provokes negative feedback inhibition of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation. *FEBS J* 277:4789–4802. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07884.x>
38. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
39. Strasser A, Jost PJ, Nagata S (2009) Review the many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30:180–192. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>
40. Jost PJ, Grabow S, Gray D et al (2009) LETTERS XIAP discriminates between type I and type II. *Nature* 460:1035–1039. <https://doi.org/10.1038/nature08229>
41. Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407(6805):789–795
42. Yin X, Wang K, Gross A et al (1999) letters to nature Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400:2–7
43. Schinzel A, Kaufmann T, Borner C (2004) Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1644:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.09.006>
44. Migliaro M, Pittarella P, Fanuli M et al (2014) Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci* 29:1463–1467. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1556-x>

45. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M (2013) Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. *Photomed Laser Surg* 31:95–104. <https://doi.org/10.1089/pho.2012.3361>
46. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3):83–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>
47. Grivicich I, Regner A, da Rocha AB (2007) Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancrol* 53:335–343. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2003000200031>

REFERÊNCIAS

ARCHER, C. W.; DOWTHWAITE, G. P.; FRANCIS-WEST, P. Development of synovial joints. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 69, n. 2, p. 144–155, 2003.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 3–4, p. 325–331, 2008.

BAEK, S. et al. Low-power laser irradiation inhibits PDGF-BB-induced migration and proliferation via apoptotic cell death in vascular smooth muscle cells. **Lasers in Medical Science**, 2017.

BALTZER AWA et al. Low-Level-Lasertherapie. **Z Rheumatol** 806–812, 2017.
<https://doi.org/10.1007/s00393-017-0309-1>

BALTZER, A. W. A.; OSTAPCZUK, M. S.; STOSCH, D. Positive effects of low level laser therapy (LLLT) on Bouchard's and Heberden's osteoarthritis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 498–504, 2016.

BIALIK, S. et al. Systems biology analysis of programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 10, p. 556–564, 2010.

BLACK, S.; JOBLING, L. Physical principles of LASER. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 15, n. 11, p. 530–532, 2014.

BOHR, N. LXXIII. On the constitution of atoms and molecules. **Philosophical Magazine Series 6**, v. 26, n. 155, p. 857–875, 1913.

BORGES LS, CERQUEIRA MS, DOS SANTOS ROCHA JA et al. Light-emitting diode phototherapy improves muscle recovery after a damaging exercise. **Lasers Med Sci** 29:1139–1144, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1486-z>

BOSE. Plancks Gesetz und Lichtquantenhypothese. **Zeitschrift fur Physik**, v. 26, n. 1, p. 178–181, 1924.

BRASSOLATTI, P. et al. Evaluation of the low-level laser therapy application parameters for skin burn treatment in experimental model: a systematic review. **Lasers in Medical Science**, p. 9–14, 2018.

BROSSEAU, L., WELCH, V., WELLS, G., et al. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a meta analysis. **J. Rheumatol** 27:1961–1969, 2000.

CALDERHEAD, G., et al. The Nd-YAG and Ga-Al-As lasers: a comparative analysis in pain therapy. **Laser Accupuncture** 21:1–4, 1982.

CARROLL, J. D. et al. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dental Materials**, v. 30, n. 5, p. 465–475, 2014.

CARROLL, JD et al. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. **Dent Mater** 30:465–475, 2014. <http://doi:10.1016/j.dental.2014.02.006>

CHOW RT, JOHNSON MI, LOPES-MARTINS RA, et al. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet**, 374:1897–908, 2009.

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

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205–219, 2004.

DE CASTRO JF, ABREU EG, CORREIA AV et al. Low-level laser in prevention and treatment of oral mucositis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Photomed Laser Surg**; 31:613–8, 2013.

DE FREITAS, L. F., & HAMBLIN, M. R. (2016). Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, 22(3). <http://doi:10.1109/JSTQE.2016.2561201>

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, 2016.

DE LIMA, F. M. et al. Low-level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 1, p. 179–188, 2013.

DE MARCHI, T. et al. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: Effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 231–236, 2012.

DE PAOLI F, et al. DNA fragmentation and nuclear phenotype in tendons exposed to low-intensity infrared laser. **Prog Biomed Opt Imaging – Proc SPIE** 9321:1–12, 2015. <https://doi.org/10.1117/12.2075726>

DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers Med Sci**, v. 32, n. 5, p. 975–983, 2017.

DOS ANJOS, L. M. J., et al. Modulation of immune response to induced-arthritis by low-level laser therapy. **J Biophotonics**, 12(2), 2019. <http://doi:10.1002/jbio.201800120>

EINSTEIN, A. ??ber einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. **Annalen der Physik**, v. 322, n. 6, p. 132–148, 1905.

ESLAMIAN, F., et al. Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. *Lasers Med Sci*, 27(5), 951-958, 2012. <http://doi:10.1007/s10103-011-1001-3>

FONSECA, A S et al. Effect of laser therapy on DNA damage. *Lasers in Surgery and Medicine*, 42(6), 481-488, 2010. <http://doi:10.1002/lsm.20921>

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Mitochondria: Master regulators of danger signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 12, p. 780–788, 2012.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; NÚÑEZ, S. C. **Laser de baixa potência : princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. [s.l: s.n.]. 2012

GAVISH, L. et al. Low level laser arrests abdominal aortic aneurysm by collagen matrix reinforcement in apolipoprotein E-deficient mice. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 44, n. 8, p. 664–674, 2012.

GLAZOV G, YELLAND M, EMERY J. Low-level laser therapy for chronic non-specific low back pain: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Acupunct Med* 34:328–341, 2016. <https://doi.org/10.1136/acupmed-2015-011036>

GLAZOV, G.; YELLAND, M.; EMERY, J. Low-level laser therapy for chronic non-specific low back pain: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Acupuncture in Medicine*, v. 34, n. 5, p. 328–341, 2016.

GUR, A., KARAKOC, M., NAS, K., et al. Effects of low power laser and low dose amitriptyline therapy on clinical symptoms and quality of life in fibromyalgia: a single-blind, placebo- controlled trial. *Rheumatol Int* 22:188–193, 2002.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K. M. .; DERRICK, T. R. **Bases biomecânicas do movimento humano**. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2016.

HASSAN, M et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/150845>

HUANG, Y-Y et al. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. *Dose-Response* 7:358–383, 2009. <https://doi.org/10.2203/dose-response.09-027.Hamblin>

HUANG, Y. Y et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*, 9(4), 602-618, 2011. <http://doi:10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>

HUANG, Z et al. The effectiveness of low-level laser therapy for nonspecific chronic low back pain: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*, 17, 360, 2015. <https://doi:10.1186/s13075-015-0882-0>

JUNQUEIRA, LCU, CARNEIRO J. *Histologia básica*. [12.ed]. - Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2013.

KARU, T. I et al. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B*, 81(2),

98-106, 2005. <http://doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.07.002>

KARU TI, AFANAS'EVA NI. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. **Dokl Akad Nauk.**; 342(5):693-5, 1995.

KARU, T. I. Cellular Mechanisms of Low Power Laser Therapy: New Questions. **Lasers in Medicine and Dentistry**, n. May, p. 79–100, 2003.

KARU, T. I. et al. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 171–177, 1996.

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

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

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

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 159–160, 2010a.

KARU, T. Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy. **IEEE J Sel TopQuantum Electron**, 23(10), 1987.

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

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALEND, G. Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 27, n. 3, p. 219–223, 1995.

KERR, J. F. R. SHRINKAGE NECROSIS: A DISTINCT MODE OF CELLULAR DEATH. **J. PATH.**, v. 105, p. 13–20, 1971.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIET, A. R. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, n. 6, p. 479–517, 1972.

KINGSLEY JD, DEMACHAK T, MATHIS R. Low-level laser therapy as a treatment for chronic pain. **Front Physiol** 5:1–3, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00306>

KINGSLEY, J. D.; DEMACHAK, T.; MATHIS, R. Low-level laser therapy as a treatment for chronic pain. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1–3, 2014.

KISCHKEL, F. C. et al. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. **Immunity**, v. 12, n. 6, p. 611–620, 2000.

- KISCHKEL, F. C. et al. Death Receptor Recruitment of Endogenous Caspase-10 and Apoptosis Initiation in the Absence of Caspase-8. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46639–46646, 2001.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiology Review**, p. 99–163, 2007.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiology Review**, p. 99–163, 2007.
- LEAL-JUNIOR, ECP et al. Effect of phototherapy (low-level laser therapy and light-emitting diode therapy) on exercise performance and markers of exercise recovery: a systematic review with meta-analysis. **Lasers Med Sci** 30:925–939, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s10103-013-1465-4>
- LEBLANC, H. et al. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. **Nature Medicine**, v. 8, n. 3, p. 274–281, 2002.
- LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479–489, 1997.
- LINK, T. M. Cartilage Imaging - Significance, Techniques, and New Developments. San Francisco, CA, USA: **Springer**, 2011.
- LONGOBARDI, L., LI, T., TAGLIAFIERRO, L., TEMPLE, J. D., et al. (2015). Synovial joints: from development to homeostasis. **Curr Osteoporos Rep**, 13(1), 41-51.
<http://doi:10.1007/s11914-014-0247-7>
- MAGRINI, T. D. et al. Low-level laser therapy on MCF-7 cells: a micro-Fourier transform infrared spectroscopy study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 10, p. 1015161, 2012.
- MCKIBBIN, L.S., and DOWNIE, R. A statistical study on the use of the infrared 904-nm low energy laser on calcaneal spurs. **J Clin Laser Med Surg** 9:71–77, 1991.
- MESTER, E et al. Effects of Laser rays on wound healing. **American Journal of Surgery**, v.122, p.532-535, 1971.
- MINATEL, D. G. et al. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 6, p. 433–441, 2009.
- NAGATA S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annu. Rev. Immunol.** 36:18.1–18.29, 2018.
- OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 351, n. 1–2, p. 41–58, 2011.

OZDEMIR, F., BIRTANE, M., and KOKINO, S. The clinical efficacy of low-power laser therapy on pain and function in cervical osteoarthritis. **ClinRheumatol**20:181–184, 2001.

PADUA, L., PADUA, R., MORETTI, C., et al. Clinical outcome and neurophysiological results of low power laser irradiation in carpal tunnel syndrome. **Laser Med Sci** 14:196–202, 1999.

PENG, Q. et al. Lasers in medicine. **Reports on Progress in Physics**, v. 71, n. 5, 2008.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 448, 2018.

PICARD, M.; WALLACE, D. C.; BURELLE, Y. The rise of mitochondria in medicine. **Mitochondrion**, v. 30, p. 105–116, 2016.

PINTO, H D et al. Photobiomodulation Therapy Improves Performance and Accelerates Recovery of High-Level Rugby Players in Field Test: A Randomized, Crossover, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study. **J Strength Cond Res**, 30(12), 3329-3338, 2016. <https://doi:10.1519/JSC.0000000000001439>

RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: Signalling platform of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 405–413, 2007.

RUH et al. Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory biochemical markers. **Lasers Med Sci**, 33(1), 165-171, 2018. <http://doi:10.1007/s10103-017-2384-6>

SARVOTHAMAN, S., UNDI, R. B., PASUPULETI, S. R., et al.,. Apoptosis: role in myeloid cell development. **Blood Res**, 50(2), 73-79, 2015. <http://doi:10.5045/br.2015.50.2.73>

SERGIO, L et al. Photobiomodulation prevents DNA fragmentation of alveolar epithelial cells and alters the mRNA levels of caspase 3 and Bcl-2 genes in acute lung injury. **Photochem Photobiol Sci**, 17(7), 975-983, 2018. <http://doi:10.1039/c8pp00109j>

SUTHERLAND, J. C. Biological Effects of Polychromatic Light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 164, 2002.

TEZCAN, S et al. Carpal Tunnel Syndrome: Evaluation of the Effects of Low-Level Laser Therapy With Ultrasound Strain Imaging. **J Ultrasound Med**, 38(1), 113-122, 2019. <http://doi:10.1002/jum.14669>

WEINTRAUB, M.I. Noninvasive laser neurolysis in carpal tunnel syndrome. **Muscle Nerve** 20:1029–1031, 1997.

WU, S. et al. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. **Journal of biomedical optics**, v. 12, n. 6, p. 064015, 2007.

WU, Z. H. et al. Mitochondrial signaling for histamine releases in laser-irradiated RBL-2H3 mast cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 503–509, 2010.

XAVIER, M et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. **Lasers Surg Med**, 42(6), 553-558, 2010.
<https://doi:10.1002/lsm.20896>

YOU, Y. et al. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2017.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, v. 21, n. 4, p. 501–515, 2013.

ZAMAN, S.; WANG, R.; GANDHI, V. Targeting the Apoptosis Pathway in Hematologic Malignancies. **Leuk Lymphoma**, v. 55, n. 9, p. 1980–1992, 2014.

ZEMIRLI, N.; MOREL, E.; MOLINO, D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 564, 2018.