

CRISTINA DE PAULA NOVAES

**Efeito da fotobiomodulação sobre o dano e o reparo de DNA em
queratinócitos expostos ao 5-Fluorouracil**

São Paulo

2022

CRISTINA DE PAULA NOVAES

Efeito da fotobiomodulação sobre o dano e o reparo de DNA em queratinócitos expostos ao 5-Fluorouracil

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Luciana Corrêa

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Novaes, Cristina de Paula.

Efeito da fotobiomodulação sobre o dano e o reparo de DNA em queratinócitos expostos ao 5-Fluorouracil / Cristina de Paula Novaes; orientadora Luciana Corrêa. -- São Paulo, 2022.

119 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. 5-Fluorouracil. 2. Dano e reparo de DNA. 3. Fotobiomodulação. I. Corrêa, Luciana. II. Título.

Novaes CP. Efeito da fotobiomodulação sobre o dano e o reparo de DNA em queratinócitos expostos ao 5-Fluorouracil. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 16 / 02 / 2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Fabio Daumas Nunes

Instituição: Universidade de São Paulo (USP) Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Flavia de Paoli

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Flávia Cristina Rosin Prado

Instituição: União das Faculdades dos Grandes Lagos (Unilago) Julgamento:
APROVADA

Dedico essa Tese à minha mãe, exemplo de força, amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me abençoar e fortalecer, em todos os momentos.

Agradeço imensamente a Professora Luciana Corrêa, pela oportunidade e confiança em mim depositadas. Obrigada por desempenhar a difícil missão de equilibrar o papel ora de orientadora e cientista, ora de mãe e amiga. Seu acolhimento foi fundamental no meu renascimento como mãe-cientista-pesquisadora.

Aos Professores do Departamento de Patologia, Fábio, Décio, Suzana, Marília, Paulo, Marina e Karen, agradeço pelo alto padrão de ensino e incentivo. Vocês são inspiradores.

Às Professoras Camilla e Carina e colegas da Liga Interdisciplinar das Neoplasias Buciais (LINB/FOUSP), agradeço a confiança em mim depositada e a honra por poder trocar experiências com vocês. Minha eterna gratidão!

Aos Professores, preceptores, funcionários e colegas do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE/FOUSP), agradeço a oportunidade em poder contribuir e aprender com vocês.

À Adriana pela disponibilidade e pela forma generosa com que sempre me ajudou. À Elisa e ao Juvani do Laboratório e à Daniela da Secretaria da Patologia Oral, agradeço a boa disposição e espírito de ajuda. À Cida, secretária da Radiologia, por ser apoio e conforto em todos os momentos.

Às meninas da recepção da FOUSP, agradeço pelo meu dia começar e terminar sob os olhares e os sorrisos de vocês. Obrigada por acolherem minha família.

À Flávia Rosin, por tornar toda essa caminhada mais leve. Pelos seus ensinamentos, amizade e por se desdobrar para que tudo isso desse certo. Obrigada por não me deixar sozinha em nenhum momento.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo apoio e convivência,

Agradeço às minhas amigas do coração, Ju Costa e Ju Mota, parceiras de risadas e estudos. À Mari Ferreira, pela troca de experiências, torcida e carinho. À

Anaeliza pela ajuda e convívio nos laboratórios. À Emília, Aline, Mariana, Jefferson, Paulo, pelo apoio e amizade.

À Universidade de São Paulo, agradeço pela oportunidade,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa de Doutorado,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. FAPESP n. 2018/19028-6) pelo financiamento ao estudo, com auxílio a pesquisa.

À Professora Gisele, da UFJF, ao lado de quem iniciei minha jornada pelos caminhos da Docência. Sou grata por nossa amizade e por sempre me encorajar

Agradeço à toda minha família, pela torcida e incentivo,

Agradeço aos meus irmãos, por mesmo de longe, se fazerem presentes. Vocês continuam sendo os meus heróis.

Ao meu pai, por ter sido tão presente, meu sempre muito obrigada. Você será sempre minha referência de determinação e bondade.

À minha mãe, por toda inspiração. Sou muito grata e reconheço tudo o que faz por mim diariamente.

Agradeço ao Diego, por nunca me deixar desistir e ser o meu maior suporte. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha filha, Nina, por ressignificar o amor e o que realmente importa. Obrigada por me escolher.

*“A maior riqueza do homem
é a sua incompletude.
Nesse ponto sou abastado.
Palavras que me aceitam como sou - eu não aceito.*

*Não agüento ser apenas um sujeito que abre portas,
que puxa válvulas, que olha o relógio,
que compra pão às 6 horas da tarde,
que vai lá fora, que aponta lápis,
que vê a uva etc. etc.*

*Perdoai
Mas eu preciso ser Outros.
Eu penso renovar o homem usando borboletas.”*

Manoel de Barros

RESUMO

Novaes CP. Efeito da fotobiomodulação sobre o dano e o reparo de DNA em queratinócitos expostos ao 5-Fluorouracil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

O quimioterápico 5-Fluorouracil (5FU) induz efeitos genotóxicos por intermédio de quebras de fitas simples e duplas de DNA. Em resposta ao dano no DNA, as células acionam mecanismos de resposta ao dano no DNA (DDR). O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da fotobiomodulação (FBM) sobre o estresse oxidativo, o dano no DNA e a DDR em queratinócitos cutâneos previamente expostos ao 5FU. Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: a) Grupo controle – células HaCaT expostas ao DMSO; b) Grupo 5FU – HaCaT expostas ao 5FU; c) Grupos 5FU irradiados: HaCaT expostas ao 5FU e posteriormente submetidas a 6 segundos de irradiação – Grupo 6s; 10 segundos de irradiação – Grupo 10s; e 20 segundos de irradiação – Grupo 20s. Após 24h de exposição ao 5FU, as células foram irradiadas com três tempos diferentes (laser de diodo, 660nm±10nm, 100mW±20%, tamanho do spot de 0,09cm², 1,1W/cm², 6s – 6,6J/cm², 10s – 11,1J/cm² e 20s – 22,2J/cm²). Para cada grupo, foram realizadas duas sessões de FBM, com intervalo de 4h entre elas. Após 24h da segunda sessão de FBM foram realizados, em todos os grupos experimentais, quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de peroxidação lipídica (quantificação de malonaldeído (MDA)), análise de enzimas antioxidantes (quantificação da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)), análise do dano no DNA (ensaio cometa e quantificação de 8-oxo-dG e γ -H2AX), análise da DDR (OGG1, ERCC1, ATM e p53), análise de senescência (ensaio da atividade de β -galactosidade) e atividade mitocondrial (ensaio de MTS). Em geral, observou-se que a FBM em todos os tempos de irradiação reduziu quantidade de EROs derivada da exposição ao 5FU, porém provocou aumento da peroxidação lipídica; SOD e CAT foram ativadas principalmente nos tempos de 6s e 20s. O tempo de 6s acarretou aumento da quantidade de DNA na cauda do cometa, bem como de 8-oxo-dG. Já o tempo de 20s reduziu a expressão desses marcadores de dano no DNA. Todos os tempos de irradiação também induziram superexpressão de γ -H2AX, indicativo ao mesmo tempo de dano de fita dupla e acionamento do reparo do DNA.

OGG1, ERCC1 e ATM foram superexpressas principalmente nos tempos de 10s e 20s, sugerindo que tempos de irradiação maiores acionam o reparo no DNA em comparação a tempos de irradiação mais curtos. Houve aumento também da expressão de p53, maior porcentagem de células em senescência e menor atividade mitocondrial nos grupos irradiados em relação ao 5FU. Conclui-se que o estresse oxidativo foi modulado pela FBM, porém não foi suficiente para reduzir a peroxidação lipídica. A FBM aumentou a expressão de marcadores de dano no DNA de forma heterogênea, dependendo do tempo de irradiação, porém acionou o reparo no DNA no tempo de irradiação de 10s e principalmente de 20s. A FBM induziu senescência nas células expostas ao 5FU, interpretada como um mecanismo compensatório para o reparo no DNA, sugerindo uma ação protetora contra os efeitos genotóxicos desse quimioterápico.

Palavras-chave: 5-Fluorouracil. Dano e Reparo de DNA. Fotobiomodulação.

ABSTRACT

Novaes CP. Photobiomodulation effect on DNA damage and repair in keratinocytes exposed to 5-fluorouracil [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil (5FU) induces genotoxic effects through single- and double-strand DNA breaks. In response to DNA damage, cells trigger a series of intracellular pathways, collectively termed as DNA damage response (DDR). The aim of this study was to verify the effects of photobiomodulation (PBM) on oxidative stress, DNA damage and DDR in cutaneous keratinocytes previously exposed to 5FU. The following experimental groups were established: a) Control group – HaCaT cells exposed to DMSO; b) 5FU group – HaCaT exposed to 5FU; c) 5FU groups irradiated: HaCaT exposed to 5FU and subsequently irradiated for 6 seconds – 6s group; irradiated for 10 seconds – Group 10s; and irradiated for 20 seconds – Group 20 s. After 24 hours of 5-FU exposure, the cells were irradiated for three different times (diode laser, 660 nm \pm 10nm, 100 mW \pm 20%, spot size of 0,09 cm², 1,1 W/cm², 6s – 6,6 J/cm², 10s – 11,1 J/cm² and 20s – 22,2 J/cm²). For each group, two PBM sessions with interval of 4h were performed. After 24 hours of the second PBM session, reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation quantification (quantification of malonaldehyde (MDA)), antioxidant enzyme analysis (quantification of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)), DNA damage analysis (comet assay, 8-oxo-dG, and γ -H2AX quantifications), DDR analysis (OGG1, ERCC1, ATM and p53), senescence analysis (β -galactosyl activity assay) and mitochondrial activity (MTS assay) were performed in all experimental groups. In general, all irradiation times reduced ROS derived from 5FU exposure but increased lipid peroxidation; SOD and CAT were mainly activated with 6s and 20s exposure times. The 6-second exposure time increased the DNA amount in the comet's tail, as well as 8-oxo-dG. The 20-second exposure time reduced the expression of these DNA damage markers. All irradiation times also induced γ -H2AX overexpression, indicative at the same time of double-strand breaks and triggering DNA repair. OGG1, ERCC1 and ATM were overexpressed mainly at 10s and 20s times, suggesting that longer irradiation times

trigger DNA repair compared to shorter irradiation times. There was also an increase in p53 expression, higher percentage of senescent cells, and lower mitochondrial activity in the irradiated groups in relation to 5FU. In conclusion, PBM modulated oxidative stress, but this effect was not sufficient to reduce lipid peroxidation. PBM also increased DNA damage in a heterogeneous pattern, depending on the irradiation time. On the other hand, the irradiation triggered DNA repair, observed mainly with 20s-irradiation time, and induced senescence to the cells exposed to 5FU. This fact was interpreted as a compensatory mechanism for the DNA repair, suggesting a protective action against the genotoxic effects of this chemotherapeutic agent.

Keywords: 5-Fluorouracil. DNA damage and repair. Photobiomodulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Esquema ilustrativo do 8-oxo-dG, importante marcador de dano oxidativo no DNA derivado de EROs e do mecanismo de reparo realizado principalmente por OGG1 através do acionamento de BER.....35
- Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da via de reparo NER e recrutamento da endonuclease ERCC1.....36
- Figura 2.3 - Esquema ilustrativo do reconhecimento das quebras de fita dupla (DSBs) de DNA e acionamento do reparo através de ATM, γ -H2AX e p5338
- Figura 2.4 - Esquema ilustrativo das vias de reparo do DNA nos danos gerados pelo 5FU42
- Figura 4.1 - Sequência de execução dos ensaios laboratoriais60
- Figura 5.1 - Média (\pm desvio-padrão) da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO)72
- Figura 5.2 - Média (\pm desvio-padrão) da atividade de superóxido dismutase (SOD). Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra73
- Figura 5.3 - Média (\pm desvio-padrão) da atividade da catalase. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra.....74

Figura 5.4 - Média (\pm desvio-padrão) da quantidade de malonaldeído, indicando peroxidação lipídica. Os valores foram normalizados pelo controle (células ao DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra.....	75
Figura 5.5 - Box plot para a porcentagem de DNA na cauda do cometa.....	76
Figura 5.6 - Imagens representativas do ensaio cometa. A = Grupo 5FU; B = Grupo 6s; C = Grupo 10s; D = Grupo 20s	77
Figura 5.7 - Média (\pm desvio-padrão) da expressão de 8oxo-dG. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de DNA em cada amostra.....	78
Figura 5.8 - Média (\pm desvio-padrão) da expressão de γ -H2AX. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra	79
Figura 5.9 - Média (\pm desvio-padrão) da expressão do gene OGG1 relação ao grupo 5FU, calculada a partir da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (double delta Ct).....	80
Figura 5.10 - Média (\pm desvio-padrão) da expressão de ERCC1. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra	81
Figura 5.11 - Média (\pm desvio-padrão) para a expressão do gene ATM em relação ao grupo 5FU, calculada a partir da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (double delta Ct)....	82

- Figura 5.12 - Média (\pm desvio-padrão) da expressão de p53. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra 83
- Figura 5.13 - Frequência (%) de células exibindo senescência nos grupos 5FU e irradiados. Os valores absolutos foram normalizados pelos valores encontrados no controle (células expostas ao DMSO). 84
- Figura 5.14 - Imagens representativas das células positivas (setas) para senescência (expressando β -galactosidase). A= Grupo 5FU; B = Grupo 10s..... 85
- Figura 5.15 - Média (\pm desvio-padrão) da atividade mitocondrial celular obtida a partir do ensaio de MTS. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO)..... 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU	5-Fluorouracil
8-oxo-dG	8-oxo-7,8diidro-2'-deoxiguanina
8-oxoGuo	8-oxo7,8-di-hidro-guanosina
AlGaAs	arseneto de gálio-alúminio
APE1	endonuclease apurínica/apirimidínica 1, do inglês <i>Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1</i>
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
ATP	adenosina trifosfato
ATR	Ataxia-telangiectasia e relacionada a Rad3
BER	via de excisão de base, do inglês <i>Base Excision Repair</i>
CAT	catalase
CdK	quinase dependentes de ciclina, do inglês <i>ciclin dependent kinase</i>
ChK1	proteína-quinase do ponto de checagem 1, do inglês <i>checkpoint kinase 1</i>
ChK2	proteína-quinase do ponto de checagem 2, do inglês <i>checkpoint kinase 2</i>
CuZnSOD	do inglês <i>copper-zinc-superoxide dismutase</i>
DDR	resposta ao dano no DNA, do inglês <i>DNA damage response</i>
DL	dose letal
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSBs	quebras de fita dupla, do inglês <i>DNA double-strand breaks</i>
dTMP	monofosfato de desoxitimidina
dUMP	monofosfato de desoxiuridina
dUTP	trifosfato de desoxiuridina
ECSOD	do inglês <i>extracellular superoxide dismutase</i>
ERCC1	grupo 1 de complementação cruzada do reparo por excisão, do inglês <i>Excision Repair Cross Complementing Group 1</i>

ERCC2	grupo 2 de complementação cruzada do reparo por excisão, do inglês <i>Excision Repair Cross Complementing Group 2</i>
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FBM	fotobiomodulação
FdUMP	monofosfato de fluorodeoxiuridina
FdUTP	fluronucleotídeo trifosfato de fluorodeoxiuridina
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FPG	formamidopirimidina DNA glicosilase
FUTP	fluronucleotídeo trifosfato de fluorouridina
GAPDH	gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona redutase
GSTs	glutathiona transferases
HaCaT	linhagem comercial de queratinócitos cutâneos humanos imortalizados
He-Ne	hélio-neônio
HR	recombinação homóloga do inglês <i>homologous recombination</i>
IC50	concentração inibitória média
LEDs	diodos emissores de luz, do inglês <i>light-emitting diode</i>
LLLT	terapia a laser de baixa intensidade, do inglês <i>Low-Level Laser Therapy</i>
MDA	malonaldeído
MMR	reparo de incompatibilidade do DNA, do inglês <i>mismatch repair</i>
MnSOD	do inglês <i>manganese superoxide dismutase</i>
MO	mucosite oral
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
NER	reparo de excisão de nucleotídeos, em inglês <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	união de extremidades não homólogas do inglês <i>non-homologous end joining</i>
OGG1	8-oxoguanina DNA glicosilase-1 do inglês <i>8-Oxoguanine DNA Glycosylase</i>

PBS	tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
pH	potencial hidrogeniônico
Redox	oxidação/redução
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i>RiboNucleic Acid</i>
RPA	proteína de replicação A
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa, do inglês <i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SOD	superóxido dismutase
SOD2	superóxido dismutase 2
SSBs	quebras de fitas simples, do inglês <i>DNA single-strand breaks</i>
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARs	peroxidação lipídica reativo ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TS	timidilato sintetase

LISTA DE SÍMBOLOS

s	segundos
h	hora
nm	nanometro
%	porcentagem
mW	milliwatts
cm ²	centímetro quadrado
W/cm ²	watt por centímetro quadrado
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
mW/cm ²	milliwatt por centímetro quadrado
γ	gama
β	beta
OH [•]	radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
CO ₂	dióxido de carbono
μ g/ml	micrograma por mililitro
HO-1	heme oxigenase-1
μ M	micrômetro
J	Joule
min	minuto
Gy	gray
W	potência
kJ/cm ²	quilojoule por centímetro quadrado
°C	graus Celsius
mm	milímetro
μ l	microlitro
M	mol/l
U/ml	unidade de atividade enzimática por mililitro
x g	unidades de gravidade
pg/ml	picograma por mililitro

ml	mililitro
mM	milimolar
nM	nanomolar
V	volt
nM	nanomol
±	mais ou menos
<	menor
=	igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	5-Fluorouracil (5FU)	29
2.2	Estresse oxidativo, danos na estrutura do DNA e resposta ao dano no DNA (DDR)	31
2.3	5-Fluorouracil: estresse oxidativo, danos na estrutura do DNA e resposta ao dano no DNA (DDR)	38
2.4	Fotobiomodulação: estresse oxidativo, danos na estrutura do DNA e resposta ao dano no DNA (DDR)	44
2.5	Hipótese	53
3	PROPOSIÇÃO	55
3.1	Objetivo geral	55
3.2	Objetivos específicos	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	Aspectos éticos	57
4.2	Grupos experimentais	57
4.3	Cultivo celular	57
4.4	Exposição ao 5FU	58
4.5	Fotobiomodulação	59
4.6	Atividade mitocondrial celular por ensaio MTS	60
4.7	Análise de senescência por ensaio da atividade da β-galactosidade	60
4.8	Quantificação de espécies reativas de oxigênio por ensaio fluorimétrico	61
4.9	Obtenção de lisado celular e quantificação de proteínas	62
4.10	Quantificação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e malonaldeído (MDA)	62
4.11	Análise do dano no DNA por ensaio cometa	63

4.12	Quantificação de γ-H2AX, p53 e ERCC1 por ensaio imunoenzimático	64
4.13	Quantificação de 8-oxo-dG por ensaio imunoenzimático	65
4.14	Expressão gênica de ATM e OGG1 por meio da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR)	66
4.15	Análise estatística	68
5	RESULTADOS	71
5.1	Padronização da dose do 5FU	71
5.2	Estresse oxidativo	71
5.2.1	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)	71
5.2.2	Quantificação da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT)	72
5.2.3	Quantificação de malonaldeído (MDA)	74
5.3	Dano no DNA	75
5.3.1	Ensaio cometa	75
5.3.2	Quantificação de 8-oxo-dG	78
5.3.3	Quantificação de γ -H2AX	79
5.4	Reparo do DNA	79
5.4.1	Expressão do gene OGG1	80
5.4.2	Quantificação de ERCC1	81
5.4.3	Expressão do gene ATM	82
5.4.4	Quantificação de p53	83
5.5	Ensaio de senescência	84
5.6	Atividade mitocondrial celular dos grupos irradiados	85
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES	113
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

O 5-Fluorouracil (5FU) é um quimioterápico da classe dos antimetabólitos, utilizado no tratamento de diversos tumores sólidos, incluindo neoplasias do trato digestivo e câncer de cabeça e pescoço (Longley et al., 2003). Dependendo da via metabólica ativada, diferentes mecanismos de ação são atribuídos ao seu efeito antiproliferativo, resultando na redução da síntese da cadeia polinucleotídica e na alteração da estabilidade e do reparo da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*), o que induz a quebras de fitas simples e duplas em sua estrutura (Longley et al., 2003; Wyatt; Wilson, 2009). O reparo dos danos no DNA induzidos pelo 5FU é realizado principalmente pela via de excisão de base (BER, do inglês *Base Excision Repair*), ativando proteínas como Ataxia-telangiectasia mutada (ATM, do inglês *Ataxia-telangiectasia mutated*), Ataxia-telangiectasia e relacionada a Rad3 (ATR, do inglês *Ataxia-telangiectasia and Rad3-related*), DNA-glicosilases e DNA-polimerases (Wyatt; Wilson, 2009; Matuo et al., 2010).

Em resposta ao dano no DNA, as células acionam uma série de vias intracelulares, definidas coletivamente como resposta ao dano no DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*). Essa cascata de sinalização coordenada inclui a ativação de proteínas associadas aos pontos de verificação do ciclo celular, indução de apoptose ou senescência celular (Woods; Turchi, 2013; Cicia; Elledge, 2010).

O efeito da fotobiomodulação (FBM) sobre a estrutura do DNA ainda é pouco conhecido. Alguns estudos mostraram que a terapia a laser diminuiu significativamente a quantidade de danos na estrutura do DNA (Dube et al., 2001; Mbene et al., 2009), não induziu a quebras de fita dupla, avaliado pela expressão de γ -H2AX (Dillenburg et al., 2014) e aumentou a expressão de proteínas da DDR, como a ATM e p53 (Trajano et al., 2016). No entanto, esses efeitos protetores na estrutura do DNA parecem ser dose-dependentes, ou seja, diretamente associados à densidade de energia utilizada na FBM (Mbene et al., 2009; Rosin et al., 2022). Nenhum desses estudos descreveu, contudo, o efeito da FBM sobre queratinócitos humanos com danos no material genético induzido pelo agente quimioterápico 5FU. Densidades de energia ótimas e seguras necessitam ser estabelecidas, aliando o efeito bioestimulatório à estabilidade genômica (Trajano et al., 2016), em um contexto onde as células já exibem alterações no DNA. Além disso, como a via de reparo do

DNA é um processo marcadamente complexo, uma melhor compreensão sobre o dano ao DNA induzido pelo 5FU e as respostas celulares a esse dano podem ampliar o entendimento sobre sua citotoxicidade (Adamsen et al., 2011; Sampath et al., 2003). Essa avaliação é importante porque a FBM tem sido utilizada para prevenção e tratamento de efeitos adversos na mucosa oral induzidos por agentes quimioterápicos, dentre eles o 5FU, os quais induzem destruição do tecido epitelial e conjuntivo provavelmente em função do excesso de dano no DNA (Lionel et al., 2006; Abdel-Rahman et al., 2016; Ziegler et al., 2016).

Para conduzir essa análise, o estudo foi realizado com marcadores bastante utilizados para detecção de dano e reparo do DNA induzidos por estresse oxidativo, a principal via citotóxica do efeito do 5FU. A expressão desses marcadores permitiu avaliar o efeito da FBM na fragmentação do DNA e na modulação de proteínas ativadas na DDR e estresse oxidativo em células HaCaT que foram previamente expostas ao 5FU.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 5-Fluorouracil (5FU)

Para o presente projeto, selecionamos o quimioterápico 5-Fluorouracil (5FU), por ser um agente antineoplásico empregado no tratamento de diversas neoplasias incluindo câncer de mama, neoplasias do trato digestivo e câncer de cabeça e pescoço (Longley et al., 2003); e ainda por sua administração estar associada a uma alta toxicidade para células da mucosa oral, levando ao desenvolvimento de mucosite oral (Abdel-Rahman et al., 2016).

O 5FU é classificado na categoria dos antimetabólitos. Estes têm como alvo a fase S do ciclo celular (na qual ocorre a replicação de DNA), inibindo a síntese de DNA das células tumorais (Cicia; Elledge, 2010; López-González et al., 2012). Nesse grupo de fármacos, estão incluídos os antifolatos (que bloqueiam a atividade do ácido fólico, um componente essencial dos precursores de DNA e de ácido ribonucleico (RNA)), os inibidores da ribonucleotídeo redutase (que reduzem a produção de desoxirribonucleotídeos) e os análogos de pirimidina e purina (que interferem no processo de síntese do DNA e RNA) (Cheung-Ong et al., 2013). Os antimetabólitos análogos de pirimidina e purina são incorporados no mecanismo de síntese de DNA ou RNA, impedindo a adição correta das bases e inibindo o mecanismo de replicação (Cheung-Ong et al., 2013).

Dentre os antimetabólitos pirimidínicos, as fluoropirimidinas, que têm o 5FU como principal representante, são importantes agentes quimioterápicos para o tratamento de diversos tipos de câncer (Longley et al., 2003). Trata-se de um análogo estrutural da uracila, diferindo apenas desta pela substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor no carbono 5 no anel pirimidínico (Heidelberger et al., 1957; Grem, 1997).

Para exercer a sua ação antitumoral e tornar-se ativo, o 5FU passa por uma série de etapas de metabolização intracelular após sua absorção. Como o 5FU é um análogo da uracila e da timina, muitas das enzimas que participam do metabolismo da uracila ou da timina também metabolizam efetivamente o 5FU (Wyatt; Wilson, 2009). Dependendo da via metabólica ativada, três diferentes mecanismos de ação

são atribuídos ao seu efeito antiproliferativo: a incorporação errônea do fluoronucleotídeo trifosfato de fluorouridina (FUTP) no RNA; a incorporação errônea do fluoronucleotídeo trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) no DNA; e a inibição da enzima timidilato sintetase (TS), exercida pelo metabólito ativo monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) (Parker; Cheng, 1990; Grem, 1997; Longley et al., 2003).

O metabólito 5FU FUTP, quando erroneamente incorporado ao RNA, é o responsável por interromper muitos aspectos do processamento e funções normais do RNA, podendo resultar em efeitos no metabolismo e na viabilidade celular (Longley et al., 2003).

A TS é a enzima responsável por catalisar a conversão de monofosfato de desoxiuridina (dUMP) a monofosfato de desoxitimidina (dTMP), com um doador de metil 5,10-metilenotetrahidrofolato. Por ser a única fonte de timidilato intracelular na via da síntese das pirimidinas, essa reação é fundamental para que ocorra a replicação e o reparo do DNA (Longley et al., 2003).

O metabólito ativo do 5FU, monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), inibe a ação da TS ao ligar-se ao sítio de ligação do nucleotídeo da enzima, formando um complexo ternário covalente entre a TS e o 5,10-metilenotetrahidrofolato, resultando em níveis intracelulares aumentados de dUMP e de seu derivado anabólico, dUTP (Longley et al., 2003). A inibição de TS leva ao desequilíbrio nas proporções de nucleotídeos e, conseqüentemente, à incorporação da uracila na cadeia de DNA (Parker; Cheng, 1990; Grem, 1997; Longley et al., 2003). Além disso, dUMP acumulado e o metabólito ativo FdUMP podem posteriormente ser fosforilados e levar ao aumento dos níveis de trifosfato de desoxiuridina (dUTP) e do metabólito ativo trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP), respectivamente; este, por si só, é um substrato para DNA polimerases, sendo prontamente incorporado erroneamente no DNA (Sampath et al., 2003).

Os mecanismos da toxicidade celular do 5FU permanecem pouco compreendidos, apesar do relativo entendimento acerca da conversão enzimática e dos destinos metabólicos do 5FU *in vivo* (Sampath et al., 2003).

Quando incorporado ao DNA, o 5FU causa diversos efeitos celulares, como a inibição da síntese de DNA pela depleção de desoxirribonucleotídeos, alteração na estabilidade e reparo da sua molécula, maior porcentagem de DNA na cauda do cometa e indução de quebras de fitas simples e duplas de DNA (Grem, 1997; Longley et al., 2003; Matuo et al., 2009; Kevadiya et al., 2012).

2.2 Estresse oxidativo, danos na estrutura do DNA e resposta ao dano no DNA (DDR)

Para análise do estresse oxidativo, neste trabalho foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de duas importantes enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), além da expressão de malonaldeído (MDA), subproduto da peroxidação lipídica reativo ao ácido tiobarbitúrico (TBARs, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances* ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

E, para análise do dano no DNA foram avaliadas a expressão de dois importantes marcadores: 8-oxo-7,8diidro-2'-deoxiguanina (8-oxo-dG), importante molécula relacionada com o dano oxidativo e γ -H2AX, indicador de danos de fita dupla do DNA; além do ensaio cometa para visualização de quebras de fita simples e dupla do DNA (Singh et al., 1988). Para avaliar o reparo do DNA foi realizada a análise da enzima 8-oxoguanina DNA glicosilase-1 (OGG1, do inglês 8-Oxoguanine DNA Glycosylase), ativada na DDR pela via BER; a expressão da proteína do grupo 1 de complementação cruzada do reparo por excisão (ERCC1, do inglês *Excision Repair Cross Complementing Group 1*) ativada pela via do reparo de excisão de nucleotídeos (NER, em inglês *Nucleotide Excision Repair*); além da expressão da ATM e de p53, proteínas chaves no processo de reparo de quebras de fita dupla de DNA.

A molécula de DNA, apesar de sua importante função biológica de conter e transmitir a informação genética das células, não é inerte (Lindahl, 1996; Lagerwerf et al., 2011). O DNA celular é continuamente exposto a subprodutos metabólicos reativos (por exemplo, as espécies reativas de oxigênio) e a agentes físicos e químicos exógenos (por exemplo, drogas quimioterápicas), que prontamente encontram alvos reativos na molécula de DNA (Shiloh; Lehmann, 2004). A manutenção da integridade genômica em um ambiente de estresse genotóxico torna-se um pré-requisito para a função celular adequada (Lagerwerf et al., 2011).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo celular, produzindo radicais livres (espécies reativas de oxigênio - EROs e de nitrogênio - ERNs) de forma natural ou por disfunção biológica (Barbosa et al., 2010). As EROs constituem uma variedade de moléculas derivadas do oxigênio metabolizado na mitocôndria, produzidas durante a geração de energia e naturalmente degradadas

pelo sistema antioxidante. As principais espécies reativas de oxigênio são: radical hidroxila (OH^\bullet), radicais superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$), frequentemente denominados de radicais livres, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); este é considerado ERO devido à sua ação direta na geração do radical hidroxila (Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

As EROs desenvolvem papel duplo, podendo ser benéficas ou prejudiciais para o organismo. Os efeitos benéficos envolvem funções fisiológicas importantes, como sinalização celular e síntese proteica; já concentrações elevadas de EROs causam danos a estruturas celulares devido à oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos (DNA e RNA) (Cooke et al., 2003; Klaunig; Kamendulis, 2004).

O estresse oxidativo é definido como uma produção excessiva de EROs que não podem ser neutralizadas pela ação de antioxidantes, levando a uma perturbação do equilíbrio de oxidação/redução (redox) celular. O dano celular ocorre devido à alta capacidade de interação das EROs com outras moléculas, causando alterações das estruturas celulares (Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Embora o acúmulo de EROs esteja frequentemente associado ao metabolismo celular de oxigênio, fatores exógenos como agentes ambientais, radiação ionizante ou ultravioleta, ou outros fatores citotóxicos, como os agentes quimioterápicos, também induzem seu acúmulo (Cooke et al., 2003; Lagerwerf et al., 2011). Independentemente de sua origem, as EROs podem interagir com biomoléculas celulares, levando a modificações e consequências potencialmente graves para a célula (Cooke et al., 2003).

Com a finalidade de evitar os danos causados pelo estresse oxidativo, as células desenvolveram mecanismos de defesa. Assim, doses elevadas de EROs levam a ativação dos agentes antioxidantes que podem ser do tipo enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos fundamentais no processo antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as enzimas do ciclo redutor da glutatona, glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), constituindo a primeira defesa endógena de neutralização das EROs (Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

A SOD catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Existem no organismo três formas de SOD. A primeira (CuZnSOD) contém cobre e zinco como centros redox e atua no citosol; já a segunda (MnSOD) contém manganês como centro redox e está presente na mitocôndria; a terceira (ECSOD) é sintetizada no interior das células e secretada para o meio extracelular (Rahman et al., 2006; Barbosa et al., 2010). A CAT

catalisa a reação de dismutação do H_2O_2 , formado pela ação da SOD, em água e oxigênio molecular (Rahman et al., 2006). Essa enzima age de forma integrada ao sistema antioxidante das glutatonas, atuando sobre altas concentrações de H_2O_2 , evitando o aumento da produção do radical hidroxila, um importante desencadeador do processo de peroxidação lipídica (Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Para que não haja aumento na indução da peroxidação lipídica, a concentração intracelular da SOD deve estar em níveis ideais. O radical superóxido possui habilidades paradoxais, ou seja, sua presença pode tanto iniciar a peroxidação lipídica, assim como sua eliminação excessiva (pelo aumento na expressão da SOD) pode aumentar a peroxidação lipídica. Assim, em baixas concentrações de SOD haveria mais radicais superóxidos; e em altas concentrações de SOD, maior quantidade de dismutação do superóxido, resultando em acúmulo de peróxido de hidrogênio; ambas hipóteses culminariam em alta peroxidação lipídica. Assim, em uma concentração intermediária da SOD, a iniciação da peroxidação lipídica por superóxido seria suprimida, enquanto a eliminação desse radical ainda estaria ocorrendo, resultando em peroxidação lipídica mínima (McCord, 2008).

Todas as organelas celulares podem sofrer modificações quando interagem com as EROs, sendo a peroxidação lipídica resultante de alterações desencadeadas na membrana celular. Como consequência, ocorre perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas e a formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA). O MDA, assim, é um produto genotóxico endógeno da peroxidação lipídica induzida por radicais enzimáticos e de oxigênio (Niedernhofer et al., 2003; Gentile et al., 2017).

A célula pode se recuperar após o dano oxidativo por intermédio da substituição das moléculas danificadas e do reparo de danos oxidativos, mantendo a viabilidade celular. No entanto, o dano oxidativo, especialmente ao DNA, pode induzir a morte celular por necrose ou apoptose, derivadas de intensa peroxidação lipídica (Barbosa et al., 2010; Ayala et al., 2014). Por exemplo, no DNA o malonaldeído causa inserção, deleção e substituição de pares de bases, o que resulta em quebras de fita do DNA (Niedernhofer et al., 2003).

As lesões induzidas no DNA podem ser quebras de fita simples (SSBs, do inglês *DNA single-strand breaks*), no qual somente uma das cadeias de DNA é alterada; e quebras de fita dupla (DSBs, do inglês *DNA double-strand breaks*), onde ambas as fitas de DNA são danificadas. Essas últimas são mais deletérias, pois não

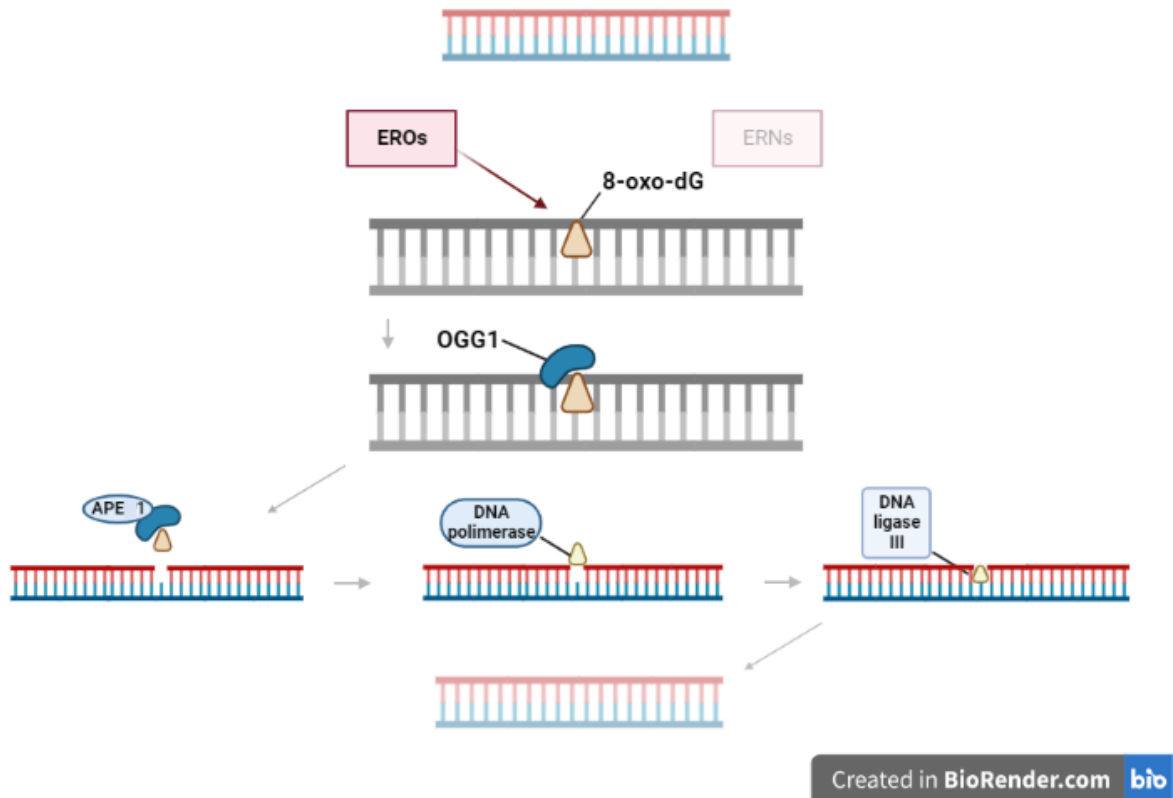
deixam uma fita intacta para ser usada como molde durante o mecanismo de reparo (Desai et al., 2018).

Em resposta ao dano no DNA, as células acionam uma série de vias intracelulares visando preservar a integridade genômica, conhecidas como resposta ao dano no DNA. A DDR pode ser definida como uma rede de eventos moleculares que resultam na detecção do dano ao DNA e incluem mecanismos de reparo de DNA, na ativação de proteínas associadas aos pontos de verificação do ciclo celular, a fim de impedir que a célula progrida no ciclo com o DNA danificado, bem como na indução de apoptose ou senescência celular caso o DNA não possa ser reparado (Woods; Turchi, 2013; Cicia; Elledge, 2010).

O reparo de lesões de fita simples pode ser realizado através de dois mecanismos distintos que diferem na maneira pela qual a lesão no DNA é removida: o reparo por excisão de bases (BER) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER). O BER é responsável pela correção de danos que não causam grande distorção no DNA, derivados de processos como oxidação, desaminação ou perda completa das bases. Tal processo envolve primeiramente a excisão da base danificada por uma DNA-glicosilase, deixando um sítio abásico, no qual nem uma base púrica ou pirimídica está presente. A ausência de base é então reconhecida por uma endonuclease apurínica/apirimidínica 1 (APE1, do inglês *Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1*), que cliva a ligação fosfodiéster, removendo assim o esqueleto açúcar-fosfato e levando a formação de uma quebra de fita simples, que posteriormente é corrigida pela DNA-polimerase e pela DNA-ligase III (O'Connor, 2015; Desai et al., 2018).

A oxidação da guanina na posição C8, conhecida como 8-oxo-dG, é um dos mais importantes marcadores de dano oxidativo no DNA (Watters et al., 2009), gerado por intermédio da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), oriundos do tratamento com agentes antineoplásicos. Tal dano é reparado através da BER, que primeiramente irá reconhecer e remover a base danificada, 8-oxo-dG, através da DNA glicosilase OGG1 (Chernikov et al., 2017; Yahyapour et al., 2018; Davalli et al., 2018) (Figura 2.1).

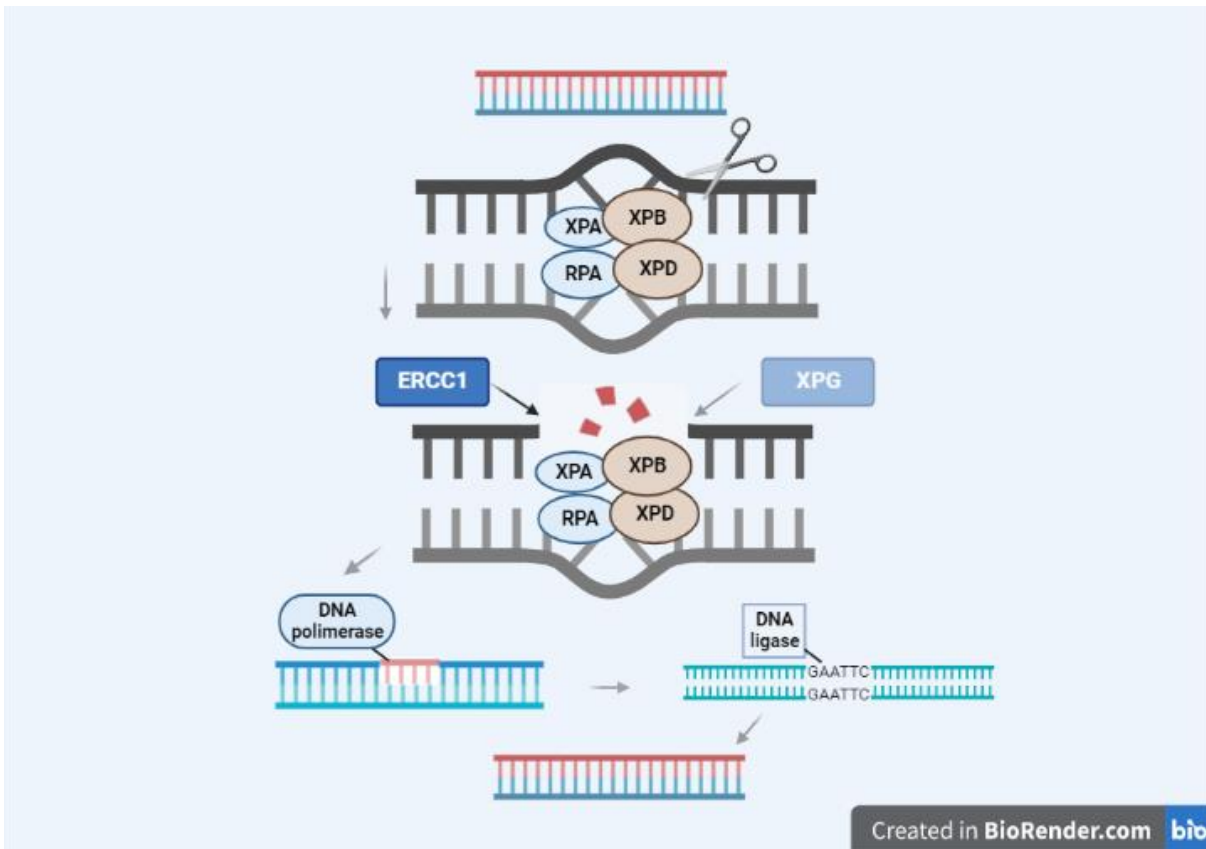
Figura 2.1 – Esquema ilustrativo do 8-oxo-dG, importante marcador de dano oxidativo no DNA derivado de EROs e do mecanismo de reparo realizado principalmente por OGG1 através do acionamento de BER



Fonte: A autora (criado com BioRender.com). Adaptado das informações dos artigos: Chernikov et al. (2017), Yahyapour et al. (2018) e Davalli et al. (2018).

Outro mecanismo de reparo acionado após lesões de fita simples é a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Essa via repara lesões volumosas que distorcem a estrutura da dupla hélice, removendo múltiplas formas de danos ao DNA, como dímeros de pirimidina, ligações cruzadas intracadeias e adutos químicos que alteram a hélice. Nessa via, as proteínas XPA e a proteína de replicação A (RPA) se ligam ao local da lesão, recrutando proteínas helicases (XPB e XPD) que desenrolam o DNA, facilitando assim o recrutamento das endonucleases XPG e ERCC1, que removem o fragmento de DNA contendo a lesão. O intervalo produzido na hélice é então corrigido pela DNA polimerase e pela DNA ligase (O'Connor, 2015; Desai et al., 2018) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo da via de reparo NER e recrutamento da endonuclese ERCC1



Fonte: A autora (criado com BioRender.com). Adaptado das informações dos artigos: O'Connor (2015) e Desai et al. (2018).

As quebras de fita dupla (DSBs) estão entre as lesões mais destrutivas, sendo reparadas por dois processos: união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) e recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*). A NHEJ pode ocorrer em todas as fases do ciclo celular; esse tipo de reparo é mais impreciso, sendo propenso a erros como inserções e deleções locais, pois essa via promove o reparo através da ligação das extremidades quebradas de DNA. Já a HR promove um reparo mais preciso, pois usa uma cromátide-irmã como molde para realizar o reparo; contudo esse tipo de reparo é restrito as fases S e G2 do ciclo celular, quando então o conteúdo de DNA está duplicado. O processo de HR é complexo e regulado a partir da interação de várias proteínas e vias distintas (Polo; Jackson, 2011; Minchom et al., 2018).

O reconhecimento das DSBs é feito pelo complexo proteico MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), que promove o recrutamento de ATM para o local da lesão, promovendo

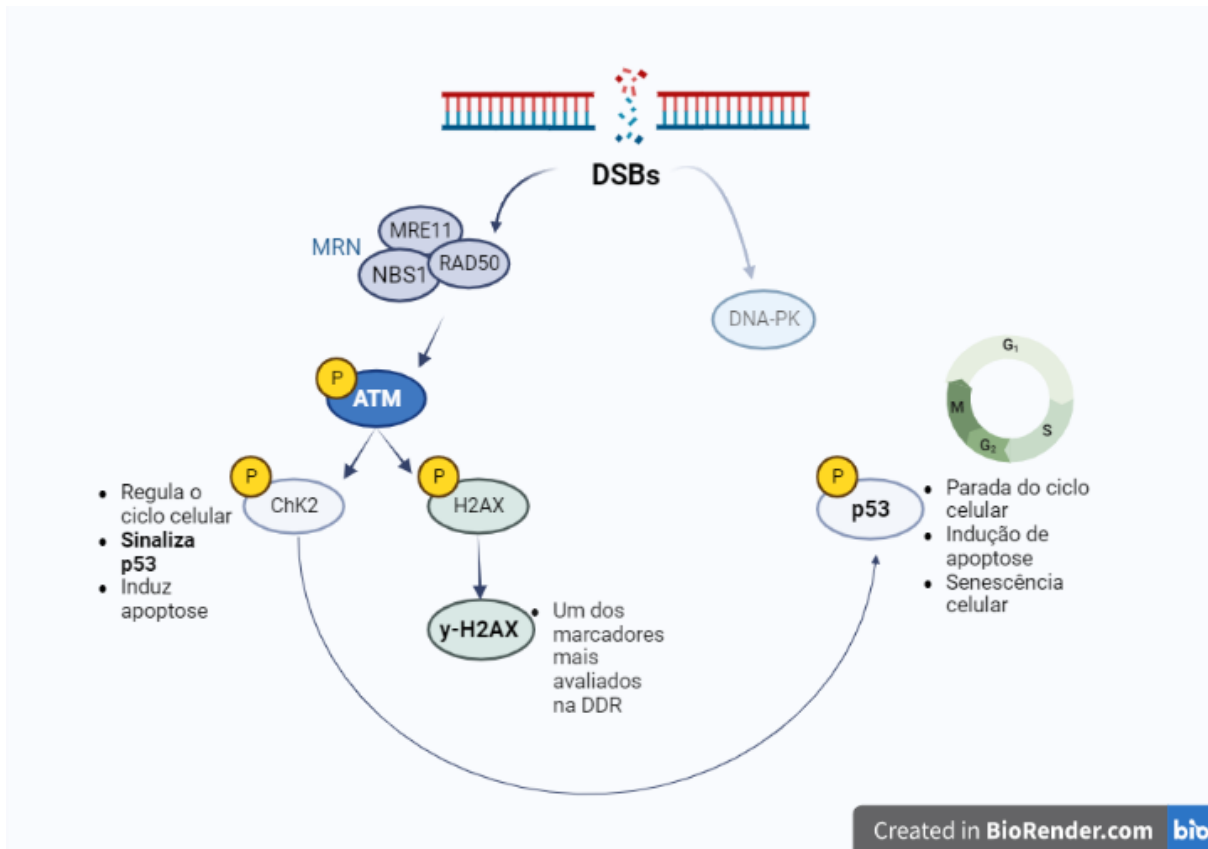
sua ativação. A proteína-quinase ATM após ativada leva à cascata de fosforilação de outras proteínas-quinases que controlam respostas relacionadas à apoptose, reparo do DNA e parada do ciclo celular. De maneira geral, a DDR mediada pela ATM leva à sinalização para o processo de HR (Cicia; Elledge, 2010; Desai et al., 2018).

ATM ativada induz a fosforilação de vários substratos, incluindo a proteína-quinase do ponto de checagem 2 (Chk2, do inglês *checkpoint kinase 2*) e a histona H2AX (Cicia; Elledge, 2010; Woods; Turchi, 2013). O objetivo de tal fosforilação é sinalizar para a maquinaria de reparo de DNA a presença de um dano. Após a fosforilação na serina 139, a histona H2AX é conhecida como γ -H2AX. Essa molécula é um dos marcadores mais avaliados na DDR, sendo associada a quantidade de danos no DNA e, portanto, pode ser relacionada com a presença de quebras de fita dupla de DNA (Rothkamm; Horn, 2009; Ikeda et al., 2010; Nikitaki et al., 2015).

A fosforilação de Chk2 induz a disseminação do sinal de dano pelo núcleo, fosforilando várias proteínas envolvidas em muitos aspectos da DDR, como regulação do ciclo celular, sinalização de p53 e indução de apoptose. Além disso, a proteína Chk2 em conjunto com ATM, induz a fosforilação de p53, promovendo sua ativação e estabilização (Branzei; Foiani, 2008; Zannini et al., 2014).

A p53 é uma proteína supressora tumoral e um fator de transcrição que regula a expressão de proteínas associadas com a parada do ciclo celular, indução de apoptose e senescência celular (Lombard et al., 2005). Seu papel no controle do ciclo celular está associado a regulação positiva de p21, que inibe os complexos ciclina/quinase dependentes de ciclina (Cdk, do inglês *cyclin dependent kinase*) responsáveis pela progressão do ciclo celular. Além disso, a p53 induz a expressão das proteínas pró-apoptóticas BAAP e PUMA (Cicia; Elledge, 2010; Senturk; Manfredi, 2013) (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Esquema ilustrativo do reconhecimento das quebras de fita dupla (DSBs) de DNA e acionamento do reparo através de ATM, γ -H2AX e p53



Fonte: A autora (criado com BioRender.com). Adaptado das informações dos artigos: Ciccia e Elledge (2010), Ikeda et al. (2010) e Zannini et al. (2014).

2.3 5-Fluorouracil: estresse oxidativo, danos na estrutura do DNA e resposta ao dano no DNA (DDR)

Estudos demonstraram que agentes antineoplásicos induzem estresse oxidativo nas células dos pacientes que recebem essas drogas durante a quimioterapia contra o câncer (Subramaniam et al., 1994; Faber et al., 1995; Conklin, 2004; Kasapović et al., 2008; Kasapović et al., 2010). A exposição celular a essas drogas resulta no aumento da produção de EROs; esse estresse oxidativo inicial não apenas produz dano imediato às células, como ainda modifica as reações normais de oxidação/redução (redox), levando a um persistente e prolongado aumento na produção de EROs (Conklin, 2004; Kasapović et al., 2008; Kasapović et al., 2010).

Foram demonstrados, entre outros efeitos, níveis elevados de subprodutos da peroxidação lipídica reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) após tratamento com adriamicina (Faber et al., 1995), com diferentes poliquimioterapias combinadas com antraciclinas, bleomicina, vincristina, ciclofosfamida, etoposídeo e mitomicina (Look; Musch, 1994) e ainda com ciclofosfamida, metotrexato e 5FU (Subramaniam et al., 1994). Além do aumento do nível de superóxidos lipídicos, foram identificados níveis plasmáticos aumentados de H_2O_2 e alterações de sua neutralização por antioxidantes enzimáticos (CAT, GPx, GR) em pacientes com câncer de mama após poliquimioterapia com 5FU, doxorubicina e ciclofosfamida (Kasapović et al., 2010).

Um estudo realizado com animais encontrou níveis aumentados de MDA e diminuídos de CAT, mas ausência de alterações de SOD, em camundongos tratados com monoterapia com 5FU ou esse quimioterápico associado ao agente antineoplásico crocina (Amerizadeh et al., 2018). Aumento dos níveis de peroxidação lipídica também foi encontrado em estudo conduzido em modelo animal de mucosite oral (MO) induzida pelo tratamento com 5FU associado ao ácido acético. Um aumento significativo dos níveis de MDA foi observado nos grupos de MO; os autores sugeriram que EROs podem ter sido geradas acima de sua concentração típica na localidade da MO (Yoshino et al., 2013).

Estudos realizados com linhagens celulares também demonstraram níveis aumentados de EROs após a exposição ao 5FU. Esse fenômeno foi associado à indução da apoptose por danos no DNA após exposição a esse quimioterápico (Akhdar et al., 2009). Outros estudos sugeriram que a apoptose mediada pelas EROs mitocondriais em resposta ao 5FU ocorre de forma dependente da via do p53 (Hwang et al., 2001; Ikeda et al., 2010; Matsunaga et al., 2010).

Afim de investigar os efeitos do tratamento com o 5FU na expressão de glutathione transferases (GSTs) e enzimas antioxidantes, Akhdar et al. (2009) realizaram a incubação da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) com 100µg/ml de 5FU nos períodos de 1, 2, 4, 8, 24 e 48h. Os resultados demonstraram que o 5FU, após 48h de incubação com a droga, induziu ao aumento na expressão de mRNAs que codificam glutathione transferases, além de aumentarem níveis de enzimas antioxidantes, como heme oxigenase-1 (HO-1). O 5FU aumentou ligeiramente a expressão de MnSOD. Ocorreu, ainda, aumento nos níveis do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) após 16h de tratamento com 5FU, enquanto os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram semelhantes entre as células não tratadas e tratadas.

Outro estudo examinou a sequência de administração da combinação do 5FU com mitomicina C afim de maximizar a toxicidade contra uma linhagem de células de câncer gástrico humano. Quando se observam somente os resultados do tratamento realizado com o 5FU (23 μ M) em relação ao grupo não tratado, a viabilidade celular no grupo tratado foi pouco afetada, tendo o menor valor ocorrido no período de 72h após o tratamento com o 5FU. Em relação ao 8-oxo-dG, um importante marcador de dano oxidativo no DNA, houve aumento da sua expressão após 24h do tratamento com 5FU. Na terapia conjugada, na qual realizou-se o pré-tratamento por 24h com 5FU, a toxicidade induzida pela mitomicina C foi aumentada. O efeito sinérgico foi mediado principalmente pela geração de EROs (H₂O₂) e da via apoptótica dependente de p53, levando à disfunção mitocondrial e ativação da caspase. A diminuição da função antioxidante (níveis de glutathiona e CuZnSOD) foi considerada a principal causa do acúmulo de EROs, e não o aumento da produção de EROs por si (Matsunaga et al., 2010).

Em trabalho anterior do nosso grupo, ao avaliar o estresse oxidativo em fibroblastos gengivais primários expostos ao 5FU (150 μ M), observamos aumento na peroxidação lipídica expressa pelo malonaldeído, além de maior atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase 24h após o tratamento com esse quimioterápico (Rosin et al., 2022). Vale comentar que esse estudo foi o primeiro a avaliar o efeito do 5FU com cultura primária de células saudáveis da mucosa oral com relação ao estresse oxidativo.

Dentre as diferentes classes de quimioterápicos, as antraciclinas induzem os mais altos níveis de EROs, seguidas pelos agentes alquilantes, complexos de coordenação de platina, epipodofilotoxinas e camptotecinas (Gille; Nohl, 1997; Conklin, 2004). Taxanos, alcalóides da vinca e antimetabólitos, como os antifolatos e análogos de pirimidina e purina, geram baixos níveis de estresse oxidativo (Conklin, 2004). No entanto, todos os agentes antineoplásicos geram EROs em algum nível e induzem a apoptose nas células cancerígenas. Isso ocorre após a ativação de uma das vias de apoptose, resultando na liberação de citocromo c das mitocôndrias (Kaufmann; Earnshaw, 2000). Quando esse processo acontece, os elétrons residentes nas membranas mitocondriais escapam do sistema de transporte de elétrons e reagem com o oxigênio molecular, resultando na formação de radicais superóxido (Kaufmann; Earnshaw, 2000; Conklin, 2004).

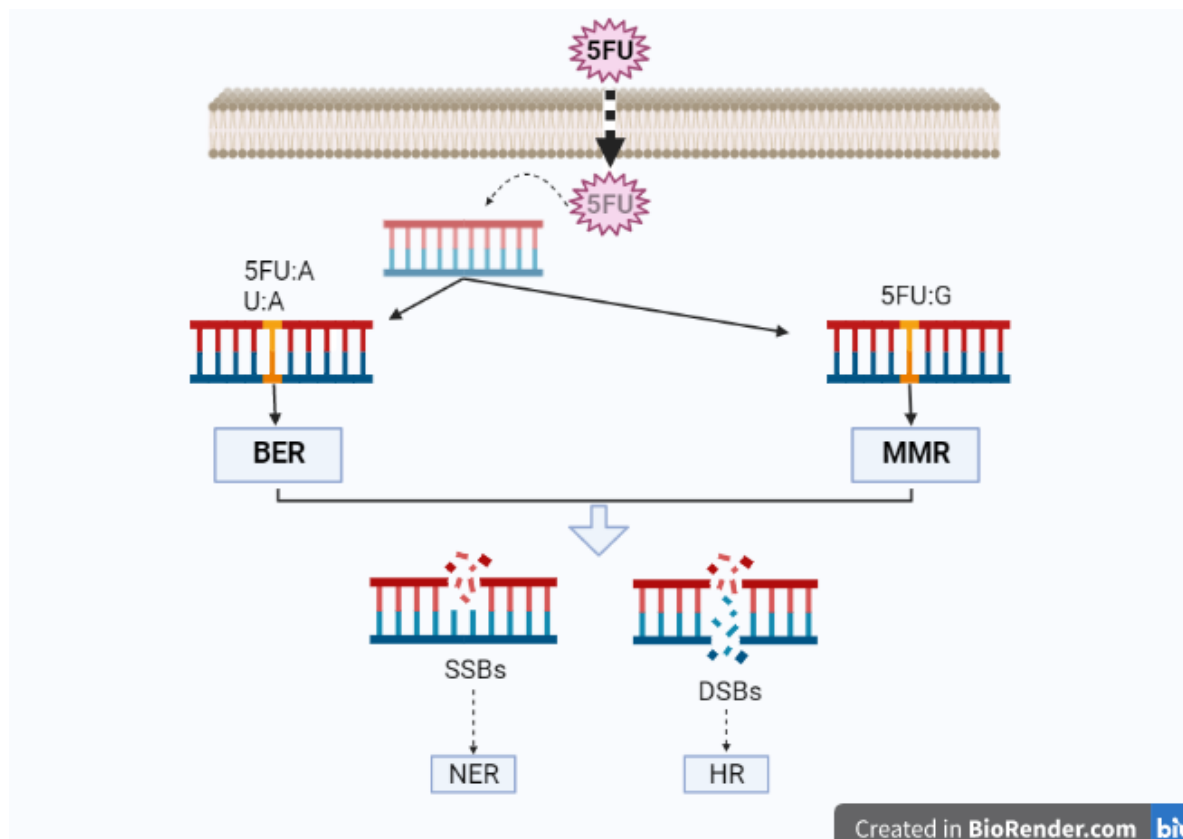
Sabe-se, portanto, que as espécies reativas de oxigênio participam diretamente do dano ao DNA induzido pelo 5FU, sendo, então, consideradas importantes marcadores de sensibilidade celular para este quimioterápico (Longley et al., 2003; Wyatt; Wilson, 2009; Rosin et al., 2022).

Os danos no DNA induzidos pelo 5FU podem levar ao surgimento tanto de SSBs, quanto de DSBs ou ainda a outras alterações estruturais (Longley et al., 2003; Matuo et al., 2009).

O reparo dos danos no DNA induzidos pelo 5FU é feito principalmente pela via de excisão de base (BER), que remove a base inapropriada ativando proteínas relacionadas a DDR, incluindo ATM, ATR, DNA-glicosilases e DNA-polimerases (Wyatt; Wilson, 2009; Matuo et al., 2010). Outros estudos sugeriram ainda a participação do sistema de reparo de incompatibilidade do DNA ou MMR (do inglês, *mismatch repair*) no processamento de lesões causadas pelo 5FU, através também da ativação de DNA-glicosilases (Fischer et al., 2007; Matuo et al., 2010). Esses estudos demonstraram que os resíduos de 5FU no DNA são removidos por vários sistemas enzimáticos, nos quais todas DNA-glicosilases são ao mesmo tempo ativadas (Fischer et al., 2007).

Após tratamento com o 5FU, dependendo do tipo de pareamento entre as bases, diferentes vias podem ser acionadas. Assim, os fluoronucleotídeos de 5FU erroneamente incorporados podem ser reparados por BER (5FU:adenina) e MMR (5FU:guanina), enquanto a uracila seria reparada através de BER (uracila:adenina). Assim, quando pareados com adenina, a via BER é ativada; já a via MMR é ativada após pareamento entre fluoronucleotídeos com a guanina. Ainda, caso sejam formadas simultaneamente múltiplas lesões no DNA, podem ocorrer falhas durante o reparo por essas vias; resultando em SSBs e DSBs. Uma pequena parcela das SSBs poderia ser reparada por NER; enquanto HR estaria envolvida na resposta compensatória aos danos por DSBs (Fischer et al., 2007; Matuo et al., 2010) (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Esquema ilustrativo das vias de reparo do DNA nos danos gerados pelo 5FU



Fonte: A autora (criado com BioRender.com). Adaptado das informações dos artigos: Fischer et al. (2007) e Matuo et al. (2010).

Apesar de não termos encontrados na literatura trabalhos com linhagem de queratinócitos normais sobre o efeito do 5FU nessas moléculas, sabemos que as EROs, além de induzirem a formação de 8-oxo-dG, participam diretamente do dano ao DNA induzido pelo 5FU.

Um estudo avaliou a expressão de 8-oxo-dG e de 8-oxo7,8-di-hidro-guanosina (8-oxoGuo), pela excreção urinária de 106 pacientes com câncer colorretal após terapia de combinação de 5FU e oxaliplatina (FOLFOX). A análise mostrou que a quimioterapia aumentou a excreção de 8-oxoGuo e 8-oxo-dG; concluindo que o tratamento com FOLFOX induz estresse oxidativo através do aumento de EROs (Afzal et al., 2012).

Um estudo realizado com linhagem celular de medula óssea (HS-5), ao explorar o efeito protetor antioxidante do polissacarídeo *Angelica sinensis* (ASP), avaliou o dano oxidativo causado por 5FU. Doses supressoras de tumor com o 5FU inibiram o

crescimento de HS-5 de maneira dose-dependente e tempo-dependente. Neste ensaio de proliferação celular, foram avaliadas duas outras diferentes linhagens celulares, de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e de carcinoma colorretal (HCT-116) observando que o efeito supressor de diferentes concentrações de 5FU (12,5 a 100 µg/mL) em células tumorais foi dose-dependente e tempo-dependente. Além disso, 5FU induziu apoptose de HS-5 e acumulou marcas celulares de senescência, incluindo parada do ciclo celular e coloração positiva de β -galactosidase associada à senescência. As EROs aumentaram em células HS-5 tratadas com 5FU, ao mesmo tempo que as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase diminuíram. O estresse oxidativo iniciou o dano ao DNA indicado pelo aumento de γ -H2AX e 8-oxo-dG (Xiao et al., 2017).

Como a via de reparo do DNA é um sistema de sinalização complexo e intrincado, embora pareça improvável que o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) participe da resposta ao 5FU, devido a sua preferência por adutos de DNA volumosos, há indícios de que essa via reconhece e excisa lesões de base mais sutis, como exemplo a 8-oxo-dG (Reardon et al., 1997).

O aumento da expressão da ERCC1 poderia reparar de forma eficaz e imediata as lesões de DNA induzidas por quimioterapia ou radioterapia (Hasegawa et al., 2018). Alguns trabalhos na literatura encontraram aumento na ativação de ERCC1 após exposição ao 5FU. Um estudo encontrou altos níveis na expressão gênica de ERCC1 e p53 após tratamento com 5FU/cisplatina em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (Hasegawa et al., 2018). Outro estudo realizado em um modelo de cultura primária com células de câncer gástrico encontrou diminuição significativa nos valores de concentração inibitória de 50% (IC50) após tratamento com 5FU; além de aumento nas expressões XRCC1 e ERCC1 após a quimioterapia 5FU/leucovorin (FOLFOX) (Wongsirisin et al., 2018). Liu et al. (2018) também demonstraram que a expressão de ERCC1 pode ser regulada positivamente e, posteriormente, afetar a citotoxicidade em células de câncer gástrico (linhagem AGS) tratadas com 5FU.

Um estudo avaliou o efeito do 5FU em quatro diferentes tipos de linhagens celulares de adenocarcinoma endometriode, correlacionando a histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) com a fase do ciclo celular, a indução de apoptose e a indução de senescência celular, essa última detectada pela análise de β -galactosidase. O tratamento com 5FU levou à fosforilação de H2AX preferencialmente em células na fase S, bem como levou a expressão da p53 de forma variada entre as linhagens

celulares analisadas (Ikeda et al., 2010).

Outro estudo, realizado com linhagens de câncer colorretal demonstrou que o 5FU, em combinação com outros quimioterápicos, causou danos ao DNA mais sustentados em comparação com as drogas isoladas, principalmente o acúmulo persistente de γ -H2AX. O 5FU reduziu o reparo das DSBs através da supressão transitória do reparo de recombinação homóloga (HR). Os autores concluíram ser possível que o 5FU exerça efeitos citotóxicos e interfira no reparo do DNA por diversas vias, seja sozinho ou em combinação com terapias adicionais (Srinivas et al., 2015).

Adamsen et al. (2011) analisaram sinalizações de danos no DNA em três linhagens de células de câncer colorretal após exposição ao 5FU. Os autores relataram que a ativação da ATM, proteína-quinase do ponto de checagem 1 (Chk1, do inglês *checkpoint kinase 1*) e/ou Chk2 refletiram na ativação de diferentes vias e na formação de SSBs e/ou DSBs; o dano no DNA dependeu ainda da dose e do tipo de linhagem celular.

O estudo de Ju et al. (2007) encontrou níveis significativamente aumentados na expressão de p53, com expressão máxima em 24h após tratamento com 5FU em células de câncer de cólon humano (RKO). Os autores sugerem que os mecanismos regulatórios que controlam a expressão de p53 em resposta ao estresse celular sejam complexos e dependentes do tipo de agente genotóxico.

2.4 Fotobiomodulação: estresse oxidativo, danos na estrutura do DNA e resposta ao dano no DNA (DDR)

A terapia a laser ou terapia a laser de baixa intensidade (LLLT, do inglês *Low-Level Laser Therapy*) tem sido amplamente utilizada há mais de 50 anos (Ginani et al., 2015). Inicialmente, diversos termos relacionados ao efeito de estimulação de lasers de baixa intensidade, como “fotobioativação” e “bioestimulação”, foram utilizados para descrever essa ferramenta de tratamento (King, 1989; Wu et al., 2012). Posteriormente, foram descritos também efeitos inibitórios e deletérios aos tecidos associados a fototerapia, como inflamação ou dor, sendo estabelecido o termo “fotobiomodulação” (FBM) (Anders et al., 2015). Atualmente, a FBM inclui diversas fontes de luz não ionizantes, como lasers, diodos emissores de luz (LEDs, do inglês

light-emitting diode), luz de espectro visível como a luz vermelha, e o infravermelho (Schindl et al., 2000).

Na FBM, para que a aplicação da luz tenha efeito sobre um sistema biológico, deve ocorrer a absorção da energia dos fótons pelos cromóforos endógenos, como a citocromo c oxidase, chamados de fotorreceptores (Bjordal et al., 2001; Hawkins et al., 2005). A energia absorvida pelo fóton pode ser transferida para outra molécula, podendo então levar a uma conversão fotoquímica, sem que haja alteração da temperatura no tecido circundante (Mochizuki-Oda et al., 2002; Brondon et al., 2005). Após o fóton retomar o seu estado fundamental, a energia é liberada e, conseqüentemente, ocorrem modificações nas reações bioquímicas celulares, tais como aumento do metabolismo energético (Karu, 1999; de Freitas; Hamblin, 2016).

Dependendo dos parâmetros utilizados na radiação laser, as respostas fotofísicas, fotoquímicas e os impactos fotobiológicos nos tecidos são diferentes (Hawkins; Abrahamse, 2006).

As mitocôndrias são consideradas um dos componentes celulares mais sensíveis à luz visível e infravermelho próximo (Karu, 1999; Karu et al., 2001). A sensibilização pela luz pode resultar em estimulação da produção de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP), aumento da síntese de DNA, modulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico e a indução de fatores de transcrição (Hamblin; Demidova, 2006).

Na FBM, os resultados relacionados à modulação de EROs permanecem conflitantes. Aparentemente, o benefício ou malefício da produção das EROs dependem da ativação dos agentes antioxidantes e do estado redox celular. Em células normais, o efeito da FBM induz ao aumento do potencial de membrana mitocondrial desencadeando baixas produções de EROs (Hamblin, 2017). Sabe-se que tecidos ou células injuriadas apresentam maior sensibilidade à FBM, principalmente porque a citocromo c oxidase torna-se mais fotossensível, absorvendo mais fótons (Tafur; Mills, 2008). Portanto, nas células nas quais o potencial de membrana encontra-se diminuído, há uma tendência que a FBM aumente o potencial de membrana mitocondrial a níveis normais, reduzindo os níveis de EROs; isso ocorre principalmente quando a FBM é realizada em baixas doses (Hamblin, 2017). Quando mantido o equilíbrio redox, haverá também a manutenção do funcionamento normal das enzimas antioxidantes; a ação eficiente dessas enzimas pode ativar vias de

sinalização, resultando em efeitos benéficos para as células e os tecidos (Huang et al., 2011; de Freitas; Hamblin, 2016).

De maneira geral, as células em estado Nox reduzido podem ter elevados índices de resposta após a FBM, enquanto células em equilíbrio redox podem apresentar baixos índices de resposta ou não responderem ao tratamento com a radiação laser (Hamblin; Demidova, 2006; de Freitas; Hamblin, 2016; Hamblin, 2017).

Alguns estudos realizados em animais demonstraram menor quantidade de MDA após a FBM. Esses estudos foram realizados com diferentes tecidos e injúrias, parâmetros de irradiação distintos, além de terem avaliado a redução de MDA após períodos maiores do que cinco dias de FBM (Tatmatsu-Rocha et al., 2016; Guaraldo et al., 2016; Ribeiro et al., 2016). Em estudo realizado em pele de ratos diabéticos com feridas induzidas e FBM por 5 dias consecutivos (904nm, 40mW, 60s, 2.3J, 18.2J/cm²), observou-se 24h após a última irradiação níveis diminuídos de peroxidação lipídica em relação aos ratos diabéticos não irradiados (Tatmatsu-Rocha et al., 2016). Outro estudo realizado em tecido muscular de ratos idosos submetidos ou não a 6 semanas de exercícios aeróbicos e FBM (808nm, 100mW, 4J, 144 J/cm²), encontrou-se diminuição de MDA nos grupos irradiados em relação aos não irradiados. Também foram avaliadas as atividades de CAT, SOD e GPx com aumento dos seus níveis nos grupos que receberam irradiação (Guaraldo et al., 2016). Ribeiro et al. (2016) avaliou o efeito da FBM (660nm e 780nm, 10J/cm², 40mW, 3.2J) em músculo de ratos lesionados encontrando diminuição na peroxidação lipídica avaliada após um dia da FBM com 660nm prévia à lesão e após sete dias em ambos comprimentos de onda. A atividade da CAT diminuiu quando avaliada após um e sete dias com FBM; enquanto SOD e GPx aumentaram após sete dias nos grupos submetidos à irradiação com 780nm (Ribeiro et al., 2016).

Yadav et al. (2020) investigaram os níveis de estresse nitro-oxidativo, o *status* de antioxidantes endógenos e a homeostase redox em pele de ratos com queimadura induzida e posteriormente submetidos à irradiação com laser superpulsado desfocado (904nm, 0.4 mW/cm², 0.2 J/cm², 100 Hz, 200 ns) durante 10 minutos diários por sete dias. A FBM diminuiu significativamente os níveis de EROs, óxido nítrico e peroxidação lipídica em comparação ao controle não irradiado. Os resultados foram evidenciados pelos níveis de antioxidantes endógenos significativamente aumentados de SOD, CAT, GPx, GST, glutathiona reduzida e tiol (T-SH, Np-SH, P-SH), auxiliando na redução do estresse oxidativo e na manutenção da homeostase redox, podendo

levar ao aumento da cicatrização de queimaduras.

Outro estudo conduzido por Diniz et al. (2020) sugeriram que a FBM (660nm, 60mW, 0.33J, 2.14W/cm², 11.7J/cm² e 6s) pode potencializar os efeitos da cisplatina, levando ao aumento da citotoxicidade dessa droga em linhagens de carcinoma epidermoide de boca e queratinócitos cutâneos. Os autores detectaram níveis aumentados de apoptose nas células de carcinoma epidermoide tratadas com cisplatina associada à FBM; essas células apresentaram menor produção de ATP, sugerindo que a redução de ATP seria a responsável pela fragmentação mitocondrial e consequente apoptose. No entanto, a cisplatina associada a FBM não foi capaz de aumentar significativamente os níveis de EROs quando comparada ao grupo controle exposto somente a cisplatina. Os autores justificaram o resultado devido ao tipo de ensaio utilizado no estudo (di-hidrodamina 123 - Sigma-Aldrich) ser restrito à quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e que portanto, estudos complementares sobre o efeito sinérgico da cisplatina e FBM devam ser conduzidos para avaliar outras moléculas de EROs, além de outras condições de cultura de células.

Em outro estudo realizado com linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) expostos ao 5FU foi encontrado redução dos níveis de EROs e redução na expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase 2 (SOD2, também conhecida como MnSOD), após FBM realizada em combinação com três diferentes comprimentos de onda (660nm, 808nm e 970nm, densidade de energia total de 15J/cm²). Para isso, as células foram tratadas por 18h com o quimioterápico, o que induziu a produção de EROs e SOD2, seguidas de irradiação utilizando os comprimentos de onda de laser combinados. A produção de EROs foi medida 30min após a FBM com sondas (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) geneticamente codificadas, explorando proteínas fluorescentes sensíveis a oxidação. Os autores sugeriram que protocolos de irradiação com múltiplos comprimentos de onda devam ser considerados, afim de atingir tecidos em diferentes profundidades, além de explorar diferentes características de comprimentos de onda únicos (Rupel et al., 2018).

O efeito da FBM sobre a estrutura do DNA ainda é pouco conhecido. No quadro 2.1 estão descritos alguns dos principais estudos que avaliaram o efeito FBM sobre o DNA. A literatura contém ampla gama de tipos de estudos, envolvendo células e tecidos tanto normais, quanto expostos a algum agente agressor, incluindo radiação ionizante, radiação ultravioleta, queimaduras e indução de diabetes. Os resultados

são diversos, podendo estar relacionados a disparidades no desenho do estudo, incluindo o uso de diferentes lasers e variações nos parâmetros de FBM (Musstaf et al., 2019). Mas, em geral os estudos demonstram certa tendência de o laser acarretar redução de danos no DNA, bem como acionar DDR.

Quadro 2.1 – Descrição de estudos nos quais foram utilizados a fotobiomodulação e analisados o dano no DNA

Tipo de material	Dosimetria	Expressão de genes/proteínas/função após a fotobiomodulação		Referência
		Aumento	Diminuição	
Cultura de linfócitos B humanos normais	Laser de He-Ne (633nm, 100mW, 27W/m ² , 1kJ/cm ²), sessão única; seguida de irradiação UV doses variando de ~ 0,5 a 2,7 kJ/m ² = 0,05 a 0,27J/cm ²	Nada descrito	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentação de DNA (ensaio cometa) depois de 1h após a FBM 	Dube et al. (2001)
Cultura de células de fibroblastos normais	LED (628nm, 15mW, 0,88J/cm ²), irradiadas por 3 dias consecutivos	<ul style="list-style-type: none"> Selenoproteína W – antioxidante ATX1 - antioxidante Proteína ligante JAK – sobrevivência celular NUDT1 – prevenção da incorporação de 8oxodGTP APRT – reparo do DNA quando há exposição a agentes alquilantes 	<ul style="list-style-type: none"> HSP70 – apoptose Caspase 6 – apoptose 	Zhang et al. (2003)
Cultura de fibroblastos cutâneos humanos normais e com ferida induzida	Laser He-Ne (632.8nm, 3mW/cm ² , spot 3.3cm) dose única de 0,5, 2,5, 5, 10 e 16J/cm ² , 2 dias	<ul style="list-style-type: none"> Atividade mitocondrial celular (ATP) após FBM com 2,5 e 5J/cm²(fibroblastos normais e com ferida) e 0,5J/cm² (normais) Fragmentação do DNA (ensaio cometa) após FBM com 10 e 16J/cm² (normais e com ferida) 	<ul style="list-style-type: none"> Atividade mitocondrial celular (ATP) após FBM com 10 e 16J/cm² (fibroblastos normais e com ferida) e 0,5J/cm² (com ferida) Fragmentação do DNA (ensaio cometa) após FBM com 5J/cm² (com ferida) 	Hawkins e Abrahamse (2006)
Cultura de fibroblastos cutâneos humanos normais simulando ferida diabética	Laser He-Ne (632.8nm, 3mW/cm ² , spot 3.3cm) dose única 5 e 16J/cm ² , uma vez por dia nos dias 1 e 4	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentação do DNA (ensaio cometa) após FBM com 16J/cm² OBS.: sem modificação na fragmentação do DNA (ensaio cometa) com 5J/cm² 	Nada descrito	Hourelid e Abrahamse (2007)
Cultura de fibroblastos cutâneos humanos normais com ferida induzida	Laser de diodo (636nm, 100mW, 5 ou 16J/cm ²), duas sessões, 30min e 72h após o ferimento; incubadas 1 e 24h após a segunda FBM	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentação do DNA (ensaio cometa) após 1 e 24h da FBM com 16J/cm² 	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentação do DNA (ensaio cometa) após 1 e 24h da FBM com 5J/cm² 	Mbene et al. (2009)
Pele (região dos rins) de ratos diabéticos	LED (670nm, 35mW/cm ² , 10.5J/cm ²), sessão	<ul style="list-style-type: none"> Uremia, creatinina sérica – função renal Catalase - antioxidante 	<ul style="list-style-type: none"> 8-oxo-dG – dano no DNA por oxidação 	Lim et al. (2010)

	diária, durante 98 dias (70 sessões)	<ul style="list-style-type: none"> • COX – antioxidante • Atividade da bomba de sódio e potássio – energia (ATP) 	OBS.: sem modificação nos níveis de glutatona peroxidase, glutatona redutase, glutatona reduzida, glutatona S-transferase e superóxido dismutase (SOD)	
Pele íntegra e músculo estriado esquelético normal de ratos	Laser de AlGaAs (830nm, 1, 5 e 10J/cm ²), sessão única	<ul style="list-style-type: none"> • APE1 (5J/cm² no músculo e na pele após 24 h) – excisão de base • APE1 (1, 5 e 10J/cm² no músculo após 1h) • OGG1 (10J/cm² no músculo após 1h e 5J/cm² após 24h) - excisão de base 	<ul style="list-style-type: none"> • APE1 (1, 5 e 10J/cm² na pele após 1h; 1 e 10J/cm² na pele após 24 h) • OGG1 (1J/cm² na pele após 1h e 24h) 	de Souza da Fonseca et al. (2013)
Cultura de queratinócitos orais humanos normais imortalizados	Laser de diodo (660nm, 40mW, 1mW/cm ² , 4J/cm ² e 20J/cm ²), três sessões (0, 6 h e 12 h)	<ul style="list-style-type: none"> • EROs (4J/cm²) – estresse oxidativo <p>OBS: 20J/cm² não foi analisado quanto aos marcadores de dano no DNA</p>	<ul style="list-style-type: none"> • EROs (20J/cm²) • γ-H2AX (4J/cm²) – resposta a quebras de fita dupla de DNA • pBRCA1 (4J/cm²) – ativação de proteínas “<i>checkpoint</i>” 	Dillenburg et al. (2014)
Cultura de fibroblastos de camundongos embrionários	Laser He-Ne (632.8nm, 10mW, 12.74 mW/cm ² , 1J/cm ²), sessão única; radiação UVB prévia (0 a 10 mJ/cm ² , duas tensões por dia, 3 dias	<ul style="list-style-type: none"> • via ERK/FOXM1 (até 2h após FBM) – controle do ciclo celular 	<ul style="list-style-type: none"> • p21 (12, 24 e 36h após FBM) – controle do ciclo celular • Atividade da β-galactosidase (12 e 24h após FBM) – marcador de senescência celular 	Ling et al. (2014)
Pele de ratos com queimadura induzida	Laser (660nm, 100mW, 20J/cm ²), sessões únicas diárias durante 5 dias	<ul style="list-style-type: none"> • OGG1 – excisão de base 	<ul style="list-style-type: none"> • APE1 - excisão de base • XPC – reconhecimento de nucleotídeos danificados 	Trajano et al. (2014)
Cultura de fibroblastos normais e de células de câncer de mama humanos	Laser diodo (660nm, 40mW, 30, 90 e 150J/cm ²); irradiação ionizante prévia (2,5 e 10Gy) sessão única	<ul style="list-style-type: none"> • Senescência (10Gy e 90J/cm² em células de câncer de mama 4 dias após a FBM) 	<ul style="list-style-type: none"> • Senescência (10Gy e 90J/cm² em fibroblastos 4 dias após a FBM) 	Ramos Silva et al. (2016)
Cultura de mioblastos murinos normais em concentrações normais e baixas de soro fetal bovino (SFB 10% e 2%)	Laser (808nm, 100mW, 10J/cm ² , 35J/cm ² , 70J/cm ²), sessão única	<ul style="list-style-type: none"> • APE1 (35 e 70J/cm² SFB 2%; todas fluências SFB 10%) – excisão de base • OGG1 (10J/cm² SFB 2%; 10 e 70J/cm² SFB 10%) – excisão de base • ERCC1 (em todas as fluências SFB 2 e 10%) – excisão de nucleotídeo • ATM (35J/cm² SFB 2%; 35 e 70J/cm² SFB 10%) – ativação de proteínas “<i>checkpoint</i>” • p53 (35J/cm² SFB 2 e 10%) – regulação do ciclo celular e revisão do DNA 	Nada descrito	Trajano et al. (2016)
Pele íntegra e músculo estriado	Laser diodo (660nm e 808nm, 100mW,	<ul style="list-style-type: none"> • ERCC1 (todas as fluências em 808nm 	<ul style="list-style-type: none"> • ERCC1 (todas as fluências em 808nm na pele) 	Sergio et al. (2016)

esquelético normal de ratos	25, 50 e 100J/cm ² , sessão única	no músculo) – excisão de nucleotídeo <ul style="list-style-type: none"> ERCC2 (50J/cm² em 660 e 808nm no músculo) - excisão de nucleotídeo 	<ul style="list-style-type: none"> ERCC2 (25 e 50J/cm² em 660nm na pele e em todas as fluências em 808nm) 	
Pele íntegra e tecido muscular esquelético normal de ratos	Laser AlGaInP 660nm e GaAlAs 808nm (100mW, 25, 50 e 100 J/cm ²), sessão única	<ul style="list-style-type: none"> ATM após FBM no músculo estriado esquelético normal de ratos (660nm, 25 J/cm² e 808nm, 50 e 100 J/cm²) – ativação de proteínas “<i>checkpoint</i>” <p>OBS.: Expressão de TP53 não alterou após FBM em pele íntegra e tecido muscular esquelético normal de ratos</p>	Nada descrito	Guedes de Almeida et al. (2017)
Cultura primária de fibroblastos gengivais expostos ao 5FU (150µM)	Laser diodo (660nm, 100mW, 1W/cm ² , 6,6, 11,1 ou 22,2J/cm ²), duas sessões de FBM (0 e 4h)	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentação de DNA (ensaio cometa) 24h após FBM 11,1 e 22,2J/cm² 	<ul style="list-style-type: none"> Fragmentação de DNA (ensaio cometa) 24h após FBM 6,6J/cm² γ-H2AX (em todas fluências) 24h após FBM – resposta a quebras de fita dupla de DNA p53 (em todas fluências) 24h após FBM – regulação do ciclo celular e revisão do DNA MDA 24h após FBM 6,6 e 22,2J/cm² – peroxidação lipídica 	Rosin et al. (2022)
Tecido cardíaco com modelo experimental de lesão pulmonar de ratos	Laser AsGaAl (808nm, 100mW spot 0,028cm ² , 10 e 20J/cm ²), sessão única	<ul style="list-style-type: none"> OGG1 e ATM após FBM com 20J/cm² – excisão de base e ativação de proteínas “<i>checkpoint</i>” <p>OBS.: Expressão de APE1 e p53 não apresentaram alterações significativas após FBM</p>	Nada descrito	Trajano et al. (2022)

Foram incluídos estudos em animais e *in vitro* que analisaram dano no DNA, publicados no período 2001 a 2022. Outros artigos e abordagens podem ser encontrados na excelente revisão de Trajano et al. (2018).

Fonte: A autora.

Um estudo avaliou o efeito da FBM (660nm, 40mW, 1mW/cm²), nas densidades de energia de 4 e 20J/cm², sobre uma linhagem de queratinócitos orais humanos. As células submetidas a FBM com laser de baixa potência com 4J/cm² exibiram níveis mais elevados de EROs em comparação com as células tratadas com 20J/cm². O aumento de EROs observado nas células irradiadas com 4J/cm², contudo, não induziu fragmentação de DNA (avaliada pelo ensaio de cometa). A irradiação com a densidade de energia menor não induziu também quebras de fita dupla de DNA, avaliado pela expressão de γ -H2AX, nem ativação da proteína BRCA1, que está associada com o reparo de DNA (Dillenburg et al., 2014).

Outro estudo avaliou o efeito da irradiação com laser de He-Ne (633nm) em cultura de linfócitos B humanos tratados com radiação ultravioleta A (UVA). A FBM diminuiu a quantidade de danos no DNA induzidos pela radiação com UVA (detectados pelo ensaio cometa); contudo, esse efeito foi dose-dependente, já que em densidades de energia acima de 1kJ/cm² esse efeito protetor não foi mais observado (Dube et al., 2001). Ling et al. (2014) em estudo também realizado com radiação ultravioleta detectou diminuição das características de células senescentes 24h após FBM (632,8nm, 10mW, 1,0J/cm²) em fibroblastos embrionários de camundongos expostos à radiação ultravioleta B (UVB).

Alguns trabalhos têm avaliado a ativação de vias de reparo de DNA após a FBM. Um estudo avaliou a participação de fatores associados a BER e NER em ratos nos quais foram induzidas queimaduras de pele tratadas posteriormente com irradiação com laser (660nm, 20J/cm², 100mW). A FBM reduziu a expressão de mRNA de APE1 e XPC, e aumentou a expressão de OGG1, sugerindo que o reparo de DNA após a FBM ocorre principalmente pelo mecanismo de excisão de bases, em uma via de reparo dependente de OGG1 (Trajano et al., 2014). Na mesma linha de pesquisa, um estudo *in vitro* com mioblastos mostrou que a FBM com comprimento de onda de 808nm infravermelho altera a expressão de genes relacionados as vias de reparo NER e BER. A FBM aumentou os níveis de mRNA de genes relacionados a via de excisão de bases (OGG1), reparo por excisão de nucleotídeos (ERCC1), bem como aumentou a expressão de ATM e p53 (Trajano et al., 2016). Outro estudo demonstrou aumento de OGG1 no tecido cardíaco com modelo experimental de lesão pulmonar de ratos após irradiação única, sugerindo que a FBM (808nm, 100mW, 10 e 20J/cm²) poderia modular o reparo de danos oxidativos através da via BER. O processo de reparo após FBM mostrou melhor efeito na dose de 20J/cm² quando

comparado a $10\text{J}/\text{cm}^2$ (Trajano et al., 2022).

Guedes de Almeida et al. (2017) observaram tendência de aumento da ATM após FBM em pele íntegra (660nm e 808nm, 100mW, $100\text{J}/\text{cm}^2$) e aumento significativo no músculo estriado esquelético normal de ratos (660nm, 25 J/cm^2 e 808nm, 50 e 100 J/cm^2). Segundo os autores os efeitos da FBM na expressão da ATM, poderiam ser explicados pelos diferentes comprimentos de onda aplicados, assim como diferentes tecidos o que levaria a variações na absorção da irradiação e, conseqüentemente, na dose absorvida.

A densidade de energia utilizada na FBM é determinante para o efeito sobre o DNA, já que fluências mais altas de FBM podem induzir danos no DNA (Hawkins; Abrahamse, 2006; Hourel; Abrahamse, 2007; Mnebe et al., 2009). Estudos demonstraram através do ensaio cometa que a FBM (632.8nm, $3\text{mW}/\text{cm}^2$) com fluências superiores a $10\text{J}/\text{cm}^2$ danificou o DNA, enquanto densidades de energia inferiores a $5\text{J}/\text{cm}^2$ não causaram danos adicionais em células de fibroblastos de pele humana simulando ferida e em modelo diabético ferido, respectivamente (Hawkins; Abrahamse, 2006; Hourel; Abrahamse, 2007). Outro estudo com fibroblastos humanos mostrou que a irradiação das células com laser de 636nm (100mW, $11\text{mW}/\text{cm}^2$) utilizando densidades de energia acima de $10\text{J}/\text{cm}^2$ provocou danos no DNA; contudo, houve uma redução significativa da taxa de dano 24 horas após a irradiação, sugerindo que os danos podem ser reversíveis, com acionamento de reparo de excisão de bases (Mbene et al., 2009).

Recentemente, nosso grupo publicou (Rosin et al., 2022) um estudo no qual investigou o efeito do FBM no dano e reparo do DNA e no estresse oxidativo em fibroblastos gengivais expostos ao 5FU. Para isso, fibroblastos gengivais primários foram previamente expostos ao 5FU ($150\mu\text{M}$) e 24h após a incubação com o quimioterápico, foram tratados com laser (660nm, 100mW, $1\text{W}/\text{cm}^2$) por três tempos de irradiação diferentes (6, 10 ou 20 s; $6,6\text{J}/\text{cm}^2$, $11,1\text{J}/\text{cm}^2$ ou $22,2\text{J}/\text{cm}^2$) e duas sessões de irradiações intervaladas por 4 horas. Ficou demonstrado que a FBM poderia minimizar os danos ao DNA em fibroblastos gengivais expostos ao 5FU dependendo da densidade de energia aplicada; esse efeito ocorreu principalmente com tempo de exposição de 6s. Essa proteção envolveu a ativação do reparo do DNA e a redução do estresse oxidativo.

Além do nosso estudo (Rosin et al., 2022), não há outros que descrevam os efeitos da FBM sobre o dano e o reparo no DNA de células normais expostas aos

quimioterápicos ou a outros agentes genotóxicos. Nesse trabalho anterior, nosso grupo avaliou a expressão de superóxido dismutase (SOD) e do malonaldeído (MDA) em fibroblastos gengivais normais; além disso, apenas duas proteínas que participam da DDR (γ -H2AX e p53) foram analisadas. No presente estudo, a avaliação do estresse oxidativo, do dano no DNA e da DDR foi ampliada, envolvendo agora queratinócitos cutâneos. Essa continuidade do estudo possibilitará maior abrangência na discussão do efeito da FBM sobre o dano no DNA e a DDR, permitindo a comparação entre dois tipos celulares diferentes, considerando-se os mesmos parâmetros de FBM. Além disso, a inclusão de três tempos de irradiação diferentes, os quais, por exemplos, têm sido comumente utilizados para prevenção e tratamento de mucosite oral (Migliorati et al., 2013; He et al., 2018), dará suporte para discussões acerca dos parâmetros seguros de FBM nesses contextos de instabilidade genômica, abordagens ainda pouco exploradas na área de FBM (Trajano et al., 2016).

2.5 Hipótese

Nossa hipótese é de que a exposição ao agente quimioterápico 5FU induza danos no DNA; e que a FBM reduza a quantidade de danos ao material genético e module a expressão dessas proteínas, reduzindo o efeito genotóxico do 5FU em queratinócitos normais. Esse efeito será dependente do tempo de irradiação utilizado.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Verificar se a FBM acarreta redução do estresse oxidativo e do dano no DNA e aumento da expressão de proteínas relacionadas a DDR em queratinócitos cutâneos expostos ao 5FU.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se a FBM, com três diferentes tempos de irradiação, modifica a expressão de EROs, bases oxidadas (8-oxo-dG), proteínas antioxidantes SOD e CAT e peroxidação lipídica em queratinócitos expostos ao 5FU.
- Verificar o efeito da FBM (sob os mesmos parâmetros de energia anteriores) sobre a fragmentação do DNA (ensaio cometa) e a expressão de proteínas relacionadas à DDR (OGG1, ERCC1, ATM, γ -H2AX e p53) nessas células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

A metodologia a seguir foi aprovada previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (nº 3.311.752) (Anexo A).

4.2 Grupos experimentais

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

a) Grupo controle – células HaCaT tratadas com solvente DMSO nas mesmas concentrações utilizadas para diluir o 5FU.

b) Grupo 5FU: células HaCaT tratadas com 5FU.

c) Grupos 5FU irradiados – células HaCaT tratadas com 5FU e posteriormente submetidas a FBM; esse grupo foi subdividido conforme os tempos de irradiação: Grupo 6s – 6 segundos de irradiação; Grupo 10s – 10 segundos de irradiação; e Grupo 20s – 20 segundos de irradiação.

4.3 Cultivo celular

Para todo o experimento do presente trabalho foi utilizado a linhagem comercial de queratinócitos cutâneos humanos imortalizados HaCaT (Human Keratinocyte cell line HaCaT, CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany; Boukamp et al., 1988). As células foram acondicionadas em criotubos e mantidas no nitrogênio líquido até sua utilização. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C; após esse procedimento, as células foram transferidas para frascos de cultivo celular contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's modified*

Eagle's) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e 1% de L-Glutamina. Os frascos de cultivo foram mantidos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂). A manipulação das células ocorreu em fluxo laminar e seu crescimento foi analisado a cada dois dias em microscópio invertido com contraste de fase (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). O meio de cultivo foi trocado conforme o metabolismo celular (em média a cada dois dias). Para cada ensaio foi padronizado um número de células de acordo com a área da placa utilizada (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Número de células plaqueadas por poço de acordo com a área da placa e tipo de ensaio realizado

Tipo de placa	Número de células/poço	Ensaio laboratoriais
Placa 96 poços	1 x 10 ⁴	MTS, EROs
Placa 12 poços	7 x 10 ⁴	Senescência
Placa 100mm	1 x 10 ⁶	SOD, CAT, MDA; Cometa; Ensaio Elisa (γ-H2AX, p53 e ERCC1); Extração de DNA (8-oxo-dG); Extração de RNA (RT-qPCR ATM e OGG1)

Fonte: A autora.

4.4 Exposição ao 5FU

Foi realizada a padronização da concentração de 5FU para se atingir uma dose letal entre 30% e 50%. Os resultados dessa padronização encontram-se no Apêndice A. A concentração selecionada foi de 200µM. A exposição ao 5FU consistiu inicialmente no cultivo de células HaCaT conforme descrito no item 4.3 (Cultivo celular); 24h após o plaqueamento, as células foram expostas ao 5FU veiculado com DMSO, por 24h em incubadora de CO₂ a 37°C. Após esse período, o meio de cultivo

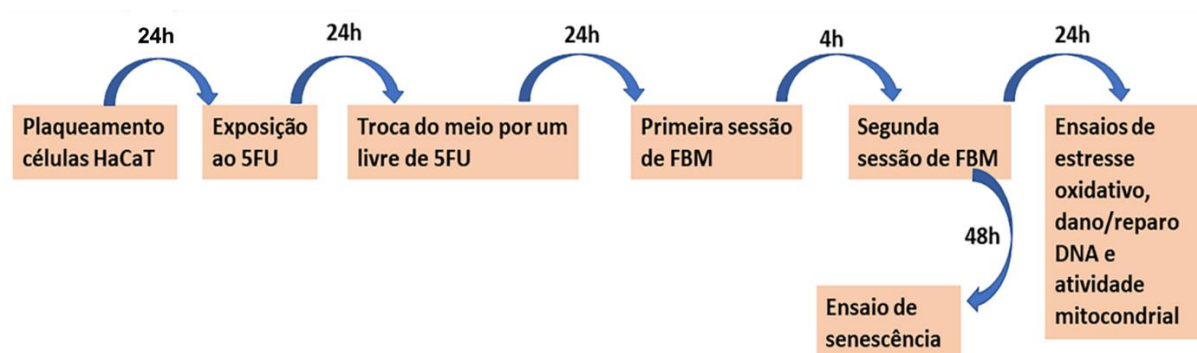
foi trocado por meio de cultura sem quimioterápico, e as células foram cultivadas por mais 24 horas, estando prontas para os demais ensaios laboratoriais.

4.5 Fotobiomodulação

Após 24h de exposição ao 5FU, as células HaCaT foram expostas a FBM (laser de diodo, 660nm±10nm, 100mW±20%, tamanho do spot de 0,09cm², 1,1W/cm²), com três tempos de irradiação: 6s (6,6J/cm², 0,6J), 10s (11,1J/cm², 1J) e 20s (22,2J/cm², 2J). A densidade de energia de 6,6J/cm² está na faixa recomendada para o tratamento de mucosite oral (Zecha et al., 2016). As demais estão acima dessa faixa, mas estão compatíveis com vários estudos envolvendo a análise da FBM e o dano no DNA, descritos no Quadro 2.1, sendo passíveis de comparações com a literatura.

A irradiação foi feita na parte inferior da placa de cultivo (placa de 12 poços, placa de 100mm), a qual recebeu um adesivo preto contendo orifícios de diâmetro idêntico ao do spot do aparelho, para evitar que houvesse sobreposição de luz. Também foram utilizadas placas de 96 poços de cor preta com fundo transparente. Esse método foi adaptado de estudos anteriores (Sperandio, 2012; Rosin, 2015; Carvalho, 2018). A potência do equipamento foi verificada (Laser Check; MMO OPTICS) antes e após todas irradiações. Todo o procedimento foi feito em fluxo laminar, com ambiente desprovido de luz, mantendo-se todos os grupos sob as mesmas condições experimentais. As células foram expostas a duas sessões de FBM, com intervalo de 4h entre elas (Carvalho, 2018). Esse procedimento foi adotado para simular parcialmente a situação de múltiplas exposições a FBM que ocorrem normalmente nas situações de prevenção e tratamento de lesões orais derivadas do tratamento antineoplásico. Os ensaios laboratoriais foram realizados conforme os intervalos descritos na Figura 4.1. Durante o intervalo de tempo das irradiações, o grupo controle foi transferido para o fluxo laminar, com meio de cultivo livre de 5FU.

Figura 4.1 – Sequência de execução dos ensaios laboratoriais



Fonte: A autora.

4.6 Atividade mitocondrial celular por ensaio MTS

Para verificar a atividade mitocondrial das células, utilizou-se o ensaio de MTS (sal tetrazólio), em todos os grupos, 24h após a segunda sessão de FBM. Para tanto, seguiu-se as recomendações do fabricante do kit Cell Titer 96 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Previamente, o meio de cultivo foi substituído (180µl) e, em seguida, foram adicionados 20µl da solução Cell Titer 96, seguida por incubação por 180min em estufa CO₂ a 37°C. Após esse período, a formação do sal formazan foi quantificada em espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), com filtro de 490nm. Os experimentos foram realizados em sextuplicata. Os valores dos grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos do grupo controle.

4.7 Análise de senescência por ensaio da atividade da β-galactosidade

A análise de senescência celular foi realizada pelo método da atividade da β-galactosidade utilizando kit comercial (ab65351 - Abcam, Cambridge, Reino Unido), adaptando-se a técnica conforme Noren Hooten e Evans (2017). Primeiramente, foi realizado o preparo da solução de estoque 20X de X-gal em DMSO, de acordo com instruções do fabricante. Previamente ao início do ensaio, todas as soluções do kit

foram aquecidas em banho-maria a 37°C. Em seguida, foi preparada a solução de coloração para SA- β -gal de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultivo celular foi então removido, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate-Buffered Saline*), foi adicionado 1ml da solução fixadora e foi realizada incubação por 15min em temperatura ambiente; em seguida, adicionou-se a solução de SA- β -gal e realizou-se incubação a 37°C em estufa de CO₂. Após 72h da incubação, as células foram quantificadas utilizando-se microscópio invertido (Axio Vert®, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no aumento de 200X, obtendo-se uma porcentagem das SA- β -gal-positivas (células exibindo a coloração azul). O experimento foi realizado em triplicata. A contagem relativa das células positivas nos grupos 5FU e irradiados foi normalizada pela contagem relativa encontrada no grupo controle.

4.8 Quantificação de espécies reativas de oxigênio por ensaio fluorimétrico

A quantificação de EROs intracelular foi realizada em todos os grupos de estudo usando kit comercial (Fluorometric Intracellular ROS, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). O ensaio é realizado pela detecção das EROs intracelular, especialmente radicais superóxido e hidroxila, através de um sensor permeável à membrana celular. As EROs reagem com o sensor localizado no citoplasma, resultando em um produto fluorescente proporcional à quantidade de EROs presente nas amostras. As células HaCaT (10⁴ células/poço) foram cultivadas por 24h e irradiadas conforme descrito nos itens 4.3 e 4.5. O meio de cultivo celular foi então substituído por 100 μ l da solução padrão do kit (ROS Detection Reagent Stock Solution e Assay Buffer), seguido de incubação por 1h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após a incubação, foi feita a leitura da fluorescência no leitor de microplacas (Synergy HTX Multi-Mode Reader, Vermont, EUA) com filtro de excitação de 540nm e emissão de 570nm. O controle positivo da reação foi composto por células expostas a peróxido de hidrogênio (100 μ M). A quantificação de EROs foi expressa em unidades de fluorescência relativa, sendo normalizada nos grupos 5FU e irradiados pelos valores do grupo controle. O experimento foi feito em quadriplicata.

4.9 Obtenção de lisado celular e quantificação de proteínas

Para a análise da expressão de proteínas nos ensaios de ELISA e de estresse oxidativo, foi realizado o lisado das células de todos os grupos experimentais. Para tanto, após o cultivo celular descrito no item 4.3, adicionou-se 1ml de tampão RIPA (50nM Tris-HCL, 150nM cloreto de sódio, 1% Triton X, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e 1nM de EDTA), contendo inibidor de protease (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). Após utilização do “*cell scraper*” por 10min, a solução obtida foi então coletada e centrifugada a 10800 x g por 20min a 4°C (Fresco™ 17 Microcentrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O sobrenadante foi então aliqotado em microtubos de 1,5ml e armazenado em freezer a -80°C. Para a normalização dos valores das proteínas de estresse oxidativo e dano e reparo do DNA, foi realizada quantificação das proteínas totais pelo método do ácido biocinconínico (BCA) (Protein Assay Reagent Kit, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

4.10 Quantificação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e malonaldeído (MDA)

A atividade da SOD foi quantificada utilizando kit comercial (kit SOD Assay, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). O ensaio colorimétrico é baseado na inibição da redução do sal de tetrazólio WST-1 pela SOD, resultando em um corante formazan que pode ser detectado pelo aumento da absorbância. Uma alíquota (20µl) de cada amostra foi adicionada a 20µl de H₂O₂, seguida da adição dos reagentes do kit, da solução de estoque (200µl) e da *Enzyme Working Solution* (20µl). Todos os poços foram homogeneizados e a placa de 96 poços levada em incubadora a 37°C por 20 min. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Ez Read 400, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), com filtro de 450nm. Os valores foram expressos em % de inibição da SOD. Os valores para os grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos do grupo controle e pelo total de proteínas em cada grupo. O ensaio foi feito em duplicata.

A atividade da CAT foi quantificada em todos os grupos pelo método colorimétrico de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizando kit comercial (Catalase Colorimetric Activity Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Esse método de ensaio é baseado na avaliação do substrato de H_2O_2 remanescente após a ação da catalase. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), com filtro de 560nm. Os resultados foram expressos em U/ml. Os valores para os grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos do grupo controle e pelo total de proteínas em cada grupo. O ensaio foi feito em duplicata.

A quantificação de MDA foi realizada por meio da reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando em um composto de coloração rosada. Alíquotas (100 μ l) dos lisados de cada amostra foram homogeneizadas com 200 μ l de solução TBA (15% de ácido tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e 0,25N de ácido clorídrico) e incubados por 30min em banho seco a 95°C. Foi então realizada centrifugação a 2100 x g a 4°C por 15m. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), com filtro de 532nm. A concentração de MDA foi calculada de acordo com a curva padrão, e os resultados foram expressos em μ M. Os valores para os grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos do grupo controle e pelo total de proteínas em cada grupo. O ensaio foi feito em duplicata.

4.11 Análise do dano no DNA por ensaio cometa

Ensaio cometa em solução alcalina (para visualização de quebras de fita simples e dupla do DNA) foi realizado conforme descrito por Singh et al. (1988). Células HaCaT (1×10^6) foram submetidas aos diferentes tratamentos e, 24h após a segunda sessão de FBM, foram tripsinizadas, centrifugadas (Fresco™ 17 Microcentrifuge, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a 200 x g por 5min e ressuspendidas em microtubos com 1mL de DPBS (1×10^5 células por/ml; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, foram novamente centrifugadas a 200 x g por 3min a 4°C e misturadas a 500 μ l da agarose a 0,75% (Ultrapure Low Melting Point Agarose, Thermo Scientific, Waltham,

Massachusetts, EUA) previamente diluída em DPBS 1X; o material foi então homogeneizado e 50µl foram adicionados a lâmina de vidro apropriada para eletroforese (Comet Assay High Throughput Slides, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). Após incubação a 4°C por 15min, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise com 1% de Triton X-100 (2,5M de cloreto de sódio, 0,1M de EDTA, 10mM de Tris HCl) e mantidas a 8°C por 60min. Após esse período, foram imersas em solução alcalina (200 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) e incubadas por 1h a 4°C. Em seguida, foi realizada eletroforese (25V, 30min) em cuba de eletroforese apropriada (Comet Assay Electrophoresis System II, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), contendo a solução alcalina descrita anteriormente. Após a eletroforese, as lâminas foram fixadas em álcool 70% por 5min e incubadas a 37°C por 10min. Para visualização do material genético, 100µl de fluoróforo (SYBR® Green, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) diluído em tampão (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,5) foram adicionados às lâminas, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por 30min. Após a completa secagem das lâminas, foi realizada digitalização dos campos em microscópio Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), em aumento final de 100X. As imagens foram analisadas por meio de plugin (Gyori et al., 2014) instalado no programa Image J (Schneider et al., 2012), quantificando-se a porcentagem de DNA na cauda do cometa, que representa a quantidade de material genético fragmentado. Todo o ensaio foi feito em sextuplicata. Controle positivo da reação (em duplicata) foi realizado por meio do tratamento das células com solução de peróxido de hidrogênio (100µM) (Singh et al., 1988). Ao final, os valores de porcentagem de DNA na cauda do cometa nos grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos detectados no grupo controle.

4.12 Quantificação de γ -H2AX, p53 e ERCC1 por ensaio imunoenzimático

As proteínas γ -H2AX e p53 foram avaliadas por ensaio imunoenzimático ELISA utilizando kits comerciais (DuoSet IC ELISA Human Phospho-Histone H2AX, S139, DYC2288-2, R&D Systems, Minneapolis, EUA; Human Phospho-p53, S15, DYC1839-2, R&D Systems, Minneapolis, EUA) respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Alíquotas de 100µl foram misturadas a 100µl dos anticorpos fornecidos

pelo kit; após período de incubação fornecido pelo fabricante, foram adicionados 100µl da estreptavidina diluída seguida de 100µl de solução de substrato. Após incubação, foram adicionados 50µl de solução bloqueadora. Foi determinada então a densidade óptica de cada poço, usando um leitor de microplacas ajustado para 450nm (Ez Read 400, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). As concentrações de γ -H2AX e p53 foram calculadas de acordo com a curva padrão, e os resultados foram expressos em pg/ml. O ensaio foi feito em duplicata. Os valores de γ -H2AX e p53 obtidos nos grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos detectados no grupo controle e pelo total de proteínas encontrado em cada grupo.

A expressão da ERCC1 também foi quantificada por meio de ensaio imunoenzimático ELISA utilizando kit comercial (Human ERCC1 ELISA Kit - ab210582, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Alíquota de 25µl de cada amostra foi diluído em 25µl do diluente fornecido no kit e, em seguida, foram adicionados os componentes do kit conforme as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Ez Read 400, Biochrom, Cambridge, Reino Unido), com filtro de 450nm. A expressão de ERCC1 foi calculada em pg/mL de acordo com a curva padrão. O ensaio foi feito em triplicata. Os valores de ERCC1 obtidos nos grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos detectados no grupo controle e pelo total de proteínas encontrado em cada grupo.

4.13 Quantificação de 8-oxo-dG por ensaio imunoenzimático

Para quantificação de 8-oxo-dG, foi realizado cultivo celular e FBM conforme descrito nos itens 4.3 e 4.5. Em seguida, foi realizada incubação com 1,0ml de TRIzol™ (código 15596026, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA) por 10min, armazenando-se as células obtidas em freezer -80°C, para uso posterior. Em seguida, foi feita extração de DNA seguindo as orientações do fabricante do kit TRIzol™. Após a solubilização, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Depois de quantificadas, as amostras de DNA foram congeladas a -20°C até a realização do ensaio de quantificação do 8-oxo-dG.

A quantificação do 8-oxo-dG foi realizada por meio de ensaio enzimático ELISA utilizando kit comercial (HT 8-oxo-dG ELISA Kit II 4380-096-K, R&D Systems,

Minneapolis, EUA) e as orientações do fabricante. Nesse ensaio, a detecção é realizada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano (HRP) e o substrato colorimétrico (TACS-Sapphire™), gerando a cor azul na presença de HRP. Para interromper a reação, adiciona-se ácido fosfórico a 5%, resultando em coloração amarela. A formação do produto é inversamente proporcional à quantidade de 8-oxo-dG presente na amostra. A leitura foi imediatamente realizada em espectrofotômetro (Ez Read 400, Biochrom, Cambridge, Reino Unido) com absorvância a 450nm. Os resultados foram expressos em nM. O ensaio foi realizado em duplicata. Os valores detectados nos grupos 5FU e irradiados foram normalizados pelos do grupo controle.

4.14 Expressão gênica de ATM e OGG1 por meio da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR)

A análise da expressão gênica de ATM e OGG1 foi realizada por meio de RT-qPCR. Inicialmente foi realizada a coleta das células com TRIzol™, conforme descrito no item 4.13. Em seguida, foi realizada extração de RNA adaptada das orientações do fabricante do kit TRIzol™ (código 15596026, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para tanto, foram adicionados às amostras 500µl de álcool isopropílico gelado e 1ml de álcool etílico a 75%; em seguida o pellet foi ressuscitado com 10-50µl de água livre de RNase/DNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water – 10977015, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Foi realizada quantificação no espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). A extração de RNA foi realizada em duplicata experimental e triplicata amostral e em cada extração realizada adicionado um controle negativo. A integridade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose (Chomczynski; Sacchi, 1987). A corrida do gel de agarose foi realizada em cuba de eletroforese horizontal (Owl™ EasyCast™ D2, Thermo Fisher Scientific, EUA) a 90V por 40min. Para confirmação sobre a integridade do gel, as imagens das bandas de RNA ribossomal 18S e 28S foram visualizadas a partir da interação entre o brometo de etídeo e o RNA, após a exposição do gel à luz ultravioleta. As imagens dos géis contendo o RNA foram analisadas em um fotodocumentador (MiniBIS Pro, UNISCIENCE, Brasil). Para a transcrição de cDNA, primeiramente foi feita descontaminação de DNA com o kit

DNase I (DNase I, Amplification Grade cDNA – 18068015, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida, iniciou-se a transcrição por meio de kit comercial (High-Capacity cDNA Reverse Transcription, código 4368814, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA; enzima RNase Inhibitor, código 8080119, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas no termociclador (Eppendorf® Mastercycler, Hamburgo, Alemanha) ajustado para a seguinte ordem de ciclo: 10min a 25°C; 120min a 37°C; 5min a 85°C. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C até a realização dos ensaios de RT-qPCR. O ensaio RT-qPCR foi feito utilizando-se os *primers* descritos na Tabela 4.2 e também para o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Após adição dos primers, sensores e fluoróforo, as amostras (volume final de 10µl) foram adicionadas as placas de PCR (Microplaca Axygen PCR-96M2-HS-C) e centrifugadas (Centrifuge 5810 R – Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) a 3220 x g por 2min em temperatura ambiente. A ciclagem do PCR foi: desnaturação inicial (95°C por 10min), seguida por 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15s), anelamento (60-62°C por 30s) e extensão (72°C por 40s) utilizando termociclador ABI7500 (Applied Biosystems™ 7500 PCR Systems, Thermo Fisher Scientific, EUA). Valores de *Cycle threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados como ausência de expressão. A expressão gênica foi calculada por meio da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$, na qual é feita a normalização dos valores pelos genes de referência e o grupo controle (grupo exposto somente ao DMSO). O ensaio foi realizado em sextuplicata.

Para análise da expressão relativa dos genes, os valores de Ct foram lançados no programa qRAT (Flatschacher et al., 2022). Inicialmente o programa filtra os valores de Ct dentro de valores pré-estabelecidos pelo usuário em relação à variação dos dados; em seguida, calcula a diferença dos valores de Ct do gene alvo em relação ao gene referência (GAPDH) (ΔCt referência) em cada um dos grupos; o programa estabelece então a diferença entre os grupos experimentais (no caso, dos grupos irradiados) em relação ao grupo calibrador (adotado aqui como sendo o grupo 5FU) (ΔCt teste). A expressão relativa em cada grupo experimental é determinada então pela fórmula $2^{-(\Delta Ct \text{ teste} - \Delta Ct \text{ referência})}$ (Zhang et al., 2022). O programa ainda realizava análise estatística, apresentando a média e o desvio-padrão da expressão gênica relativa.

Tabela 4.2 – Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para cada gene no RT-qPCR com suas respectivas concentrações, temperaturas de hibridização (Th) e eficiências

Gene	Primers 5' → 3'	Concentração	Th (°C)
ATM	F: CTC TGA GTG GCA GCT GGA AGA R: TTT AGG CTG GGA TTG TTC GCT	400nM	60
OGG1	F: ATG GGG CAT CGT ACT CTA GC R: CTC CCT CCA CCG GAA AGA T	400nM	60
GAPDH	F: AGG TCG GAG TCA ACG GAT TT R: ATG AAG GGG TCA TTG ATG GCA	400nM	62

F: foward; R: reverse. C: citosina; T: timina; A: adenina; G: guanina.

Fonte: A autora.

4.15 Análise estatística

Os dados categóricos foram apresentados frequência absoluta e relativa (%). Os dados numéricos foram apresentados em média e desvio-padrão quando exibiram uma distribuição paramétrica, e em média, mediana e valores mínimo e máximo, quando exibiram uma distribuição não-paramétrica. Para verificar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Quando a distribuição foi paramétrica, comparações múltiplas entre os grupos foi realizada por meio de análise de variância ANOVA um critério, seguido do teste de Tukey; para a distribuição não-paramétrica, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Na análise da expressão gênica relativa no ensaio de RTq-PCR, os grupos irradiados foram comparados com o 5FU por meio do teste t Student, com correção de Bonferroni (Ritchie et al., 2015). Para os dados categóricos, as comparações entre os grupos foram feitas por meio do teste χ^2 corrigido pelo teste de Bonferroni.

Na comparação somente do grupo 5FU com o controle para os dados não normalizados (constantes no Apêndice B), foram utilizados os testes t de Student e Mann-Whitney para dados numéricos com distribuição paramétrica e não-paramétrica, respectivamente; o teste do qui-quadrado corrigido por Bonferroni foi aplicado para os dados categóricos.

Os cálculos foram feitos utilizando-se pacote estatístico R versão 4.2.1 (R Core Team, 2013). O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da dose do 5FU

A atividade mitocondrial celular do grupo 5FU em relação ao controle encontra-se no Apêndice A, no qual são apresentadas com as concentrações do quimioterápico e suas respectivas viabilidades. Nota-se que o grupo 5FU (concentração de 200 μ M, adotada durante todo o experimento) acarretou porcentagem de células viáveis de 63.0 \pm 5.5% (dose letal de 37.0 \pm 5.5%) em comparação ao grupo controle.

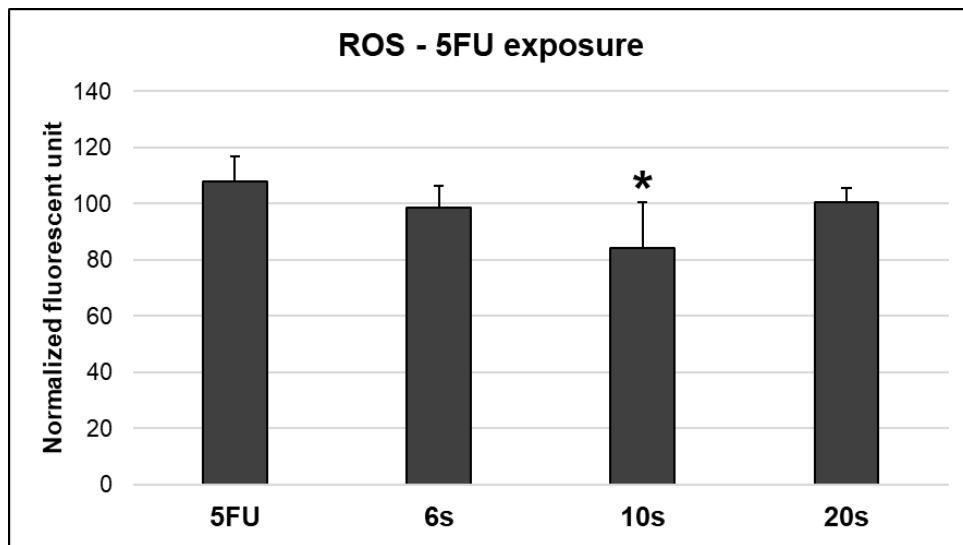
5.2 Estresse oxidativo

5.2.1 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Na comparação do grupo controle com 5FU, nota-se que esse quimioterápico acarretou aumento significativo de EROs ($p < 0.001$) (Apêndice B).

A Figura 5.1 exibe a média da expressão de EROs nos grupos 5FU e irradiados. Nota-se que houve uma tendência de a FBM diminuir a produção de EROs após a exposição ao 5FU. Isso foi observado, principalmente, quando o tempo de irradiação de 10s foi aplicado ao grupo exposto ao 5FU, exibindo diferenças significativas ($p < 0.05$).

Figura 5.1 – Média (\pm desvio-padrão) da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO)



* $p < 0.05$ em relação a 5FU. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

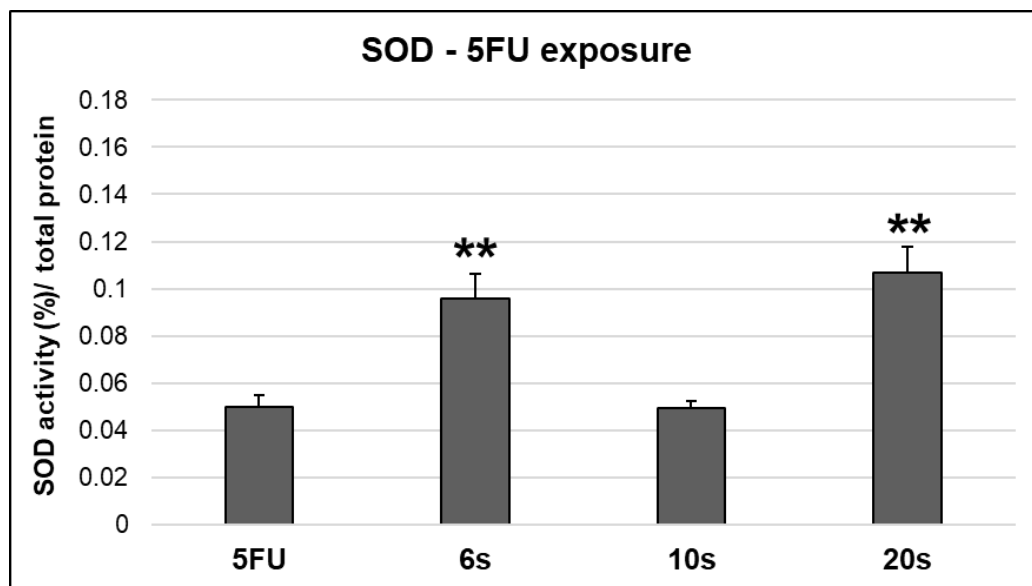
Fonte: A autora.

5.2.2 Quantificação da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT)

Na comparação do grupo controle com 5FU, observa-se que a expressão de SOD e CAT foi significativamente maior no grupo controle ($p < 0.001$) (Apêndice B).

A média da atividade da SOD nos grupos 5FU e irradiados é apresentada na Figura 5.2. Houve uma tendência de a atividade da SOD ser menor após 10s de FBM em relação ao grupo 5FU. Já os tempos de irradiação de 6s e 20s geraram atividade da SOD significativamente maior em relação ao grupo 5FU ($p < 0.01$).

Figura 5.2 – Média (\pm desvio-padrão) da atividade de superóxido dismutase (SOD). Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra

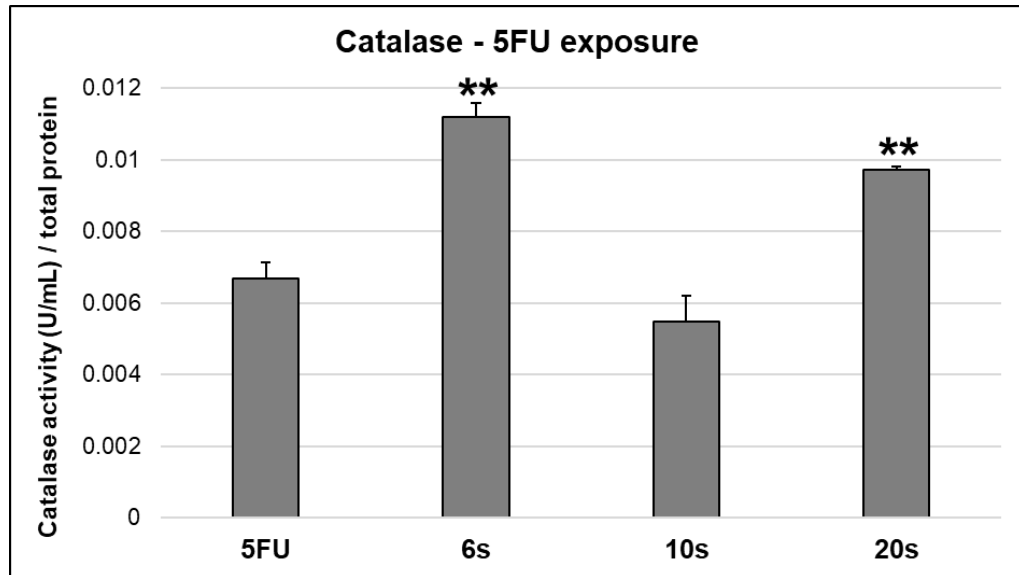


** $p < 0.01$ em relação a 5FU. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

Fonte: A autora.

A média da atividade da CAT nos grupos 5FU e irradiados é exibida na Figura 5.3. Nota-se que, para o tempo de irradiação de 10s, houve uma tendência de diminuição da atividade da CAT. Já os tempos de irradiação de 6s e 20s exibiram aumento dessa enzima ($p < 0.01$). Os resultados para a CAT seguiram a mesma tendência observada para a SOD.

Figura 5.3 – Média (\pm desvio-padrão) da atividade da catalase. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra



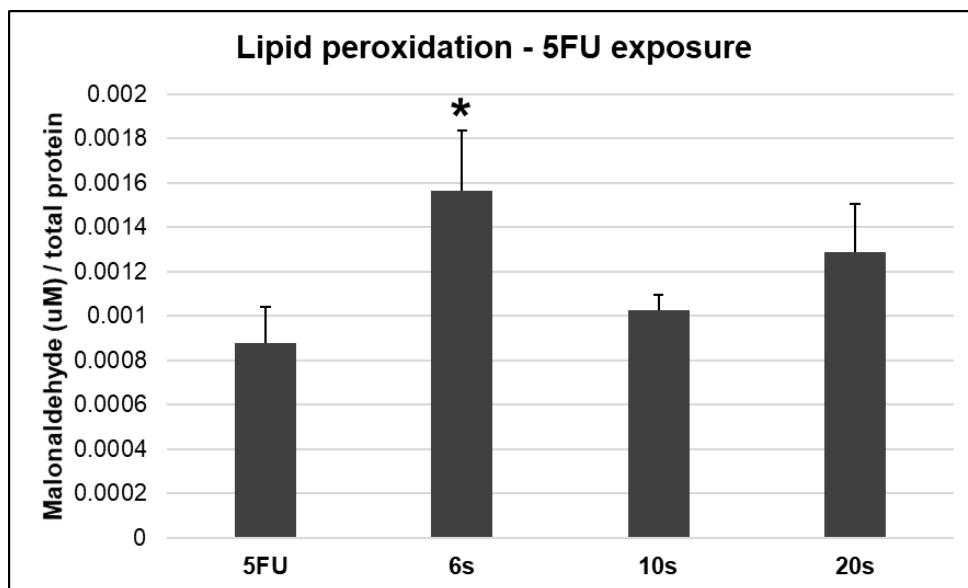
** $p < 0.01$ em relação ao grupo 5FU. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

Fonte: A autora.

5.2.3 Quantificação de malonaldeído (MDA)

A Figura 5.4 exibe a média da quantidade de MDA em cada grupo. A irradiação provocou aumento da peroxidação lipídica, principalmente com o tempo de irradiação de 6s ($p < 0.05$). No entanto, esse aumento não foi significativo nos grupos expostos aos tempos de irradiação de 10s e 20s, observando-se apenas uma tendência na maior quantidade de MDA.

Figura 5.4 – Média (\pm desvio-padrão) da quantidade de malonaldeído, indicando peroxidação lipídica. Os valores foram normalizados pelo controle (células ao DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra



* $p < 0.05$ em relação ao grupo 5FU. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

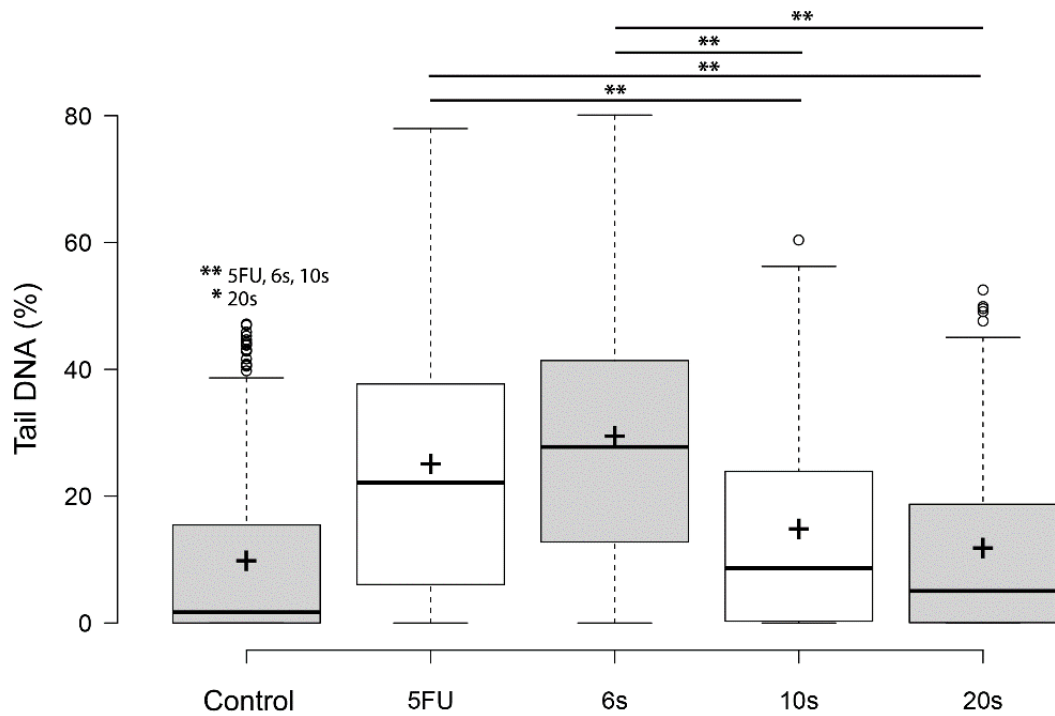
Fonte: A autora.

5.3 Dano no DNA

5.3.1 Ensaio cometa

A Figura 5.5 mostra a distribuição dos valores da porcentagem de DNA na cauda do cometa. O grupo controle exibiu a menor porcentagem em relação aos demais grupos (5FU, 6s e 10s $p < 0.01$; 20s $p < 0.05$). A FBM feita com os tempos de irradiação de 10s e 20s diminuiu a porcentagem de DNA na cauda do cometa, exibindo valores estatisticamente menores em relação ao grupo 5FU ($p < 0.01$) e 6s ($p < 0.01$).

Figura 5.5 – Box plot para a percentagem de DNA na cauda do cometa

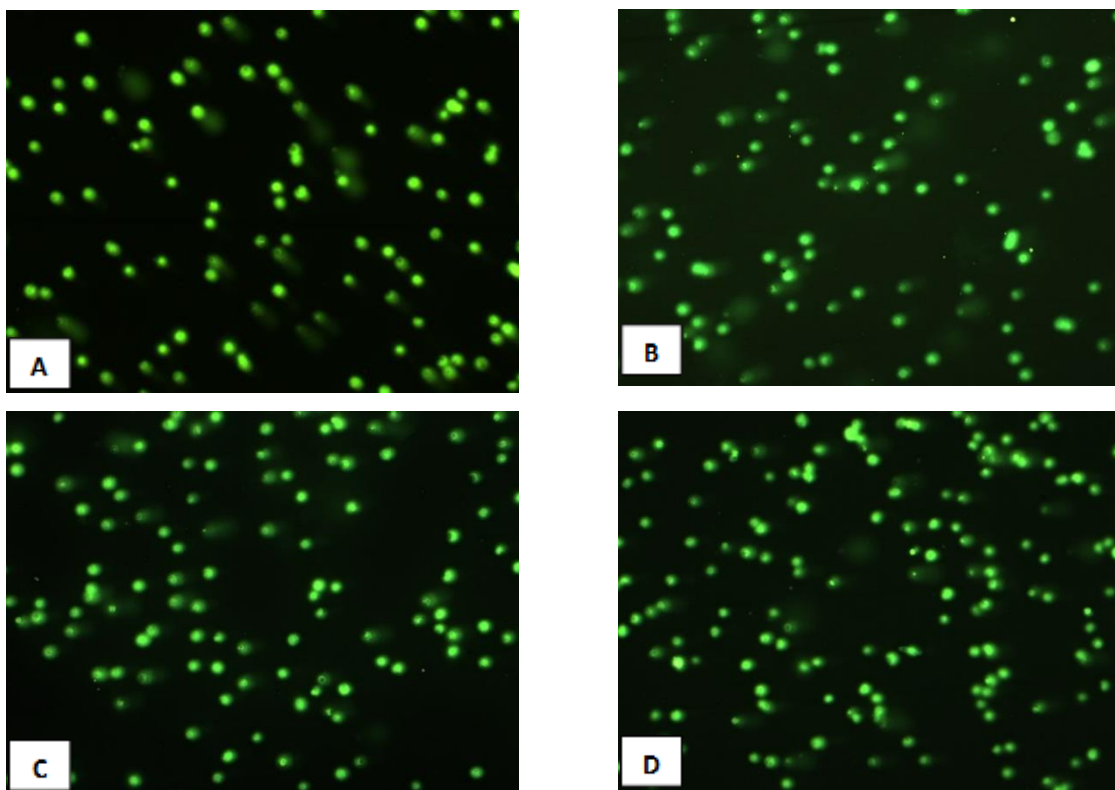


* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). Barra horizontal – mediana; + - média; whiskers – valores mínimo e máximo

Fonte: A autora.

A figura 5.6 exhibe imagens do ensaio cometa.

Figura 5.6 – Imagens representativas do ensaio cometa. A = Grupo 5FU; B = Grupo 6s; C = Grupo 10s; D = Grupo 20s



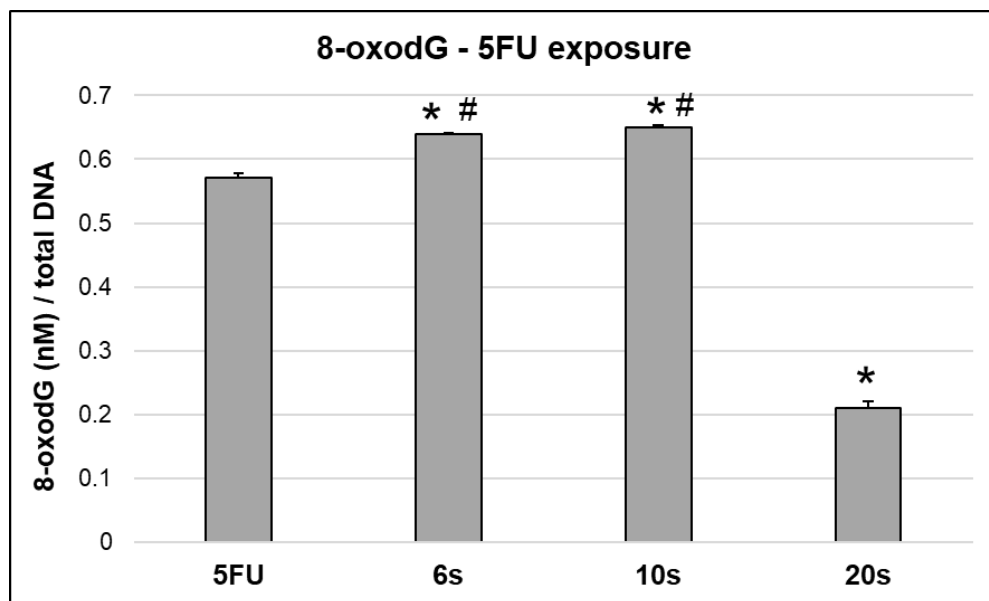
Fonte: A autora.

5.3.2 Quantificação de 8-oxo-dG

Houve expressão significativamente maior de 8-oxo-Dg no grupo 5FU quando comparado diretamente ao grupo controle ($p < 0.001$) (Apêndice B).

A Figura 5.7 mostra a média da expressão de 8-oxo-dG nos grupos. Nos grupos 6s e 10, houve aumento significativo da indução de 8-oxo-dG em relação ao 5FU e ao grupo 20s ($p < 0.05$). Neste último, houve diminuição de 8-oxo-dG em relação ao 5FU ($p < 0.05$).

Figura 5.7 – Média (\pm desvio-padrão) da expressão de 8oxo-dG. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de DNA em cada amostra



* $p < 0.05$ em relação ao grupo 5FU; # $p < 0.05$ em relação ao grupo 20s. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

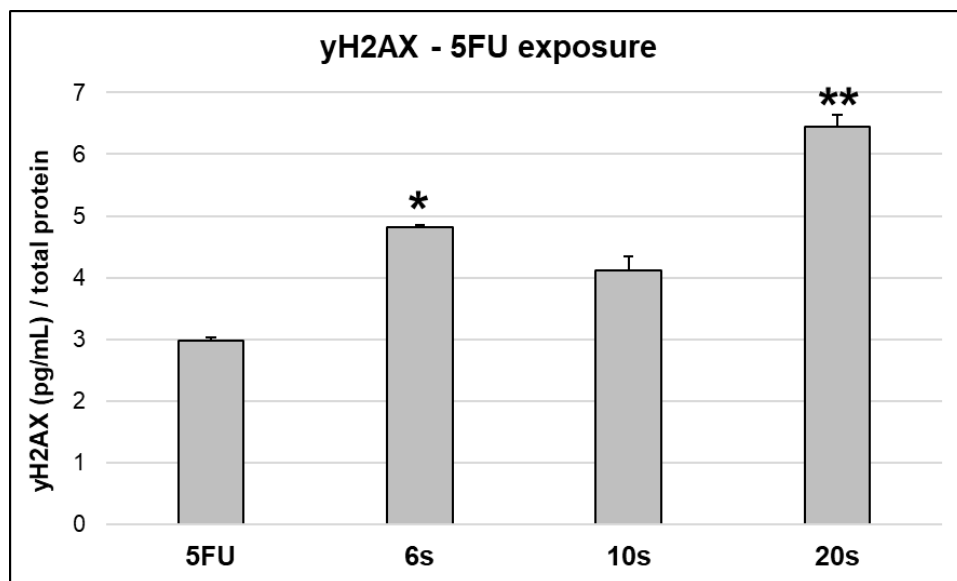
Fonte: A autora.

5.3.3 Quantificação de γ -H2AX

Quando o grupo 5FU foi comparado diretamente com o controle, nota-se que exibiu maior expressão de γ -H2AX ($p < 0.001$) (Apêndice B).

A média da expressão de γ -H2AX em todos os grupos é exibida na Figura 5.8. Os grupos submetidos a FBM exibiram aumento da expressão em relação ao grupo 5FU, com diferenças significativas foram detectadas nos grupos 6s ($p < 0.05$) e 20s ($p < 0.01$).

Figura 5.8 – Média (\pm desvio-padrão) da expressão de γ -H2AX. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra



* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ em relação ao grupo 5FU. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

Fonte: A autora.

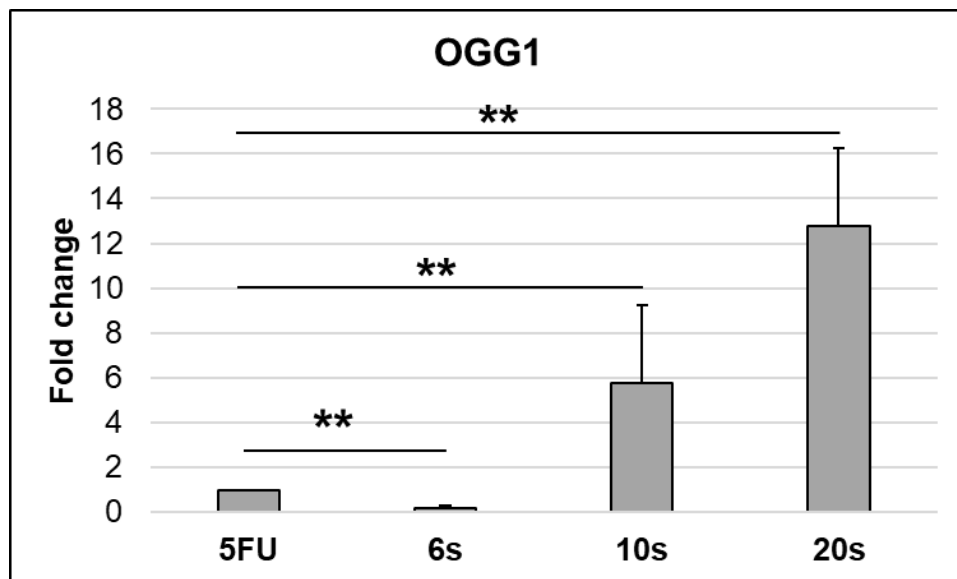
5.4 Reparo do DNA

5.4.1 Expressão do gene OGG1

A expressão do gene OGG1 no grupo 5FU foi inicialmente analisada em relação ao grupo controle. Nota-se que o grupo 5FU exibiu menor expressão gênica, com diferença estatisticamente significativa (Apêndice B).

A Figura 5.9 mostra a média da expressão relativa do gene OGG1 nos grupos irradiados em relação ao grupo 5FU. Observa-se que os tempos de irradiação de 10s e 20s acarretaram expressão de OGG1 significativamente maior em relação ao 5FU; já a irradiação de 6s acarretou significativamente menor expressão.

Figura 5.9 – Média (\pm desvio-padrão) da expressão do gene OGG1 relação ao grupo 5FU, calculada a partir da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (double delta Ct)



** $p < 0.01$ (teste t de Student ajustado pelo teste de Bonferroni)

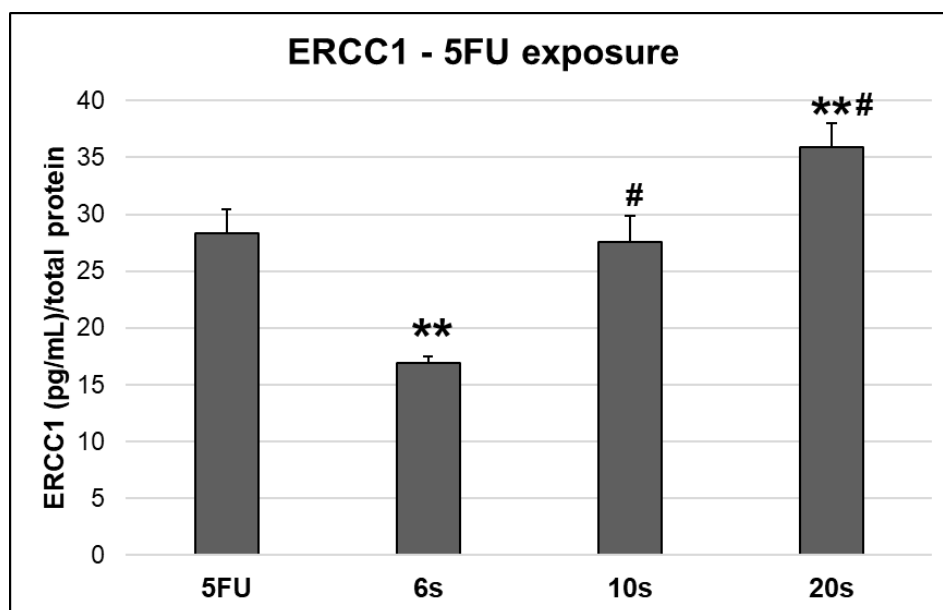
Fonte: A autora.

5.4.2 Quantificação de ERCC1

Na comparação do grupo controle com o 5FU, observou-se redução significativa na expressão de ERCC1 no grupo exposto ao quimioterápico ($p < 0.001$) (Apêndice B).

A Figura 5.10 mostra a média de expressão da proteína ERCC1. Observa-se que as FBM com tempos de 6s e 20s acarretaram diminuição e aumento de ERCC1 ($p < 0.01$), respectivamente. O tempo de 10s não acarretou diferença significativa em relação ao 5FU. Quando observamos somente a expressão da proteína entre os grupos irradiados, os tempos de 10s e 20s apresentaram diferenças significativas ($p < 0.01$) em relação ao tempo de 6s.

Figura 5.10 – Média (\pm desvio-padrão) da expressão de ERCC1. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra



** $p < 0.01$ em relação ao grupo 5FU; # $p < 0.01$ em relação ao grupo 6s. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

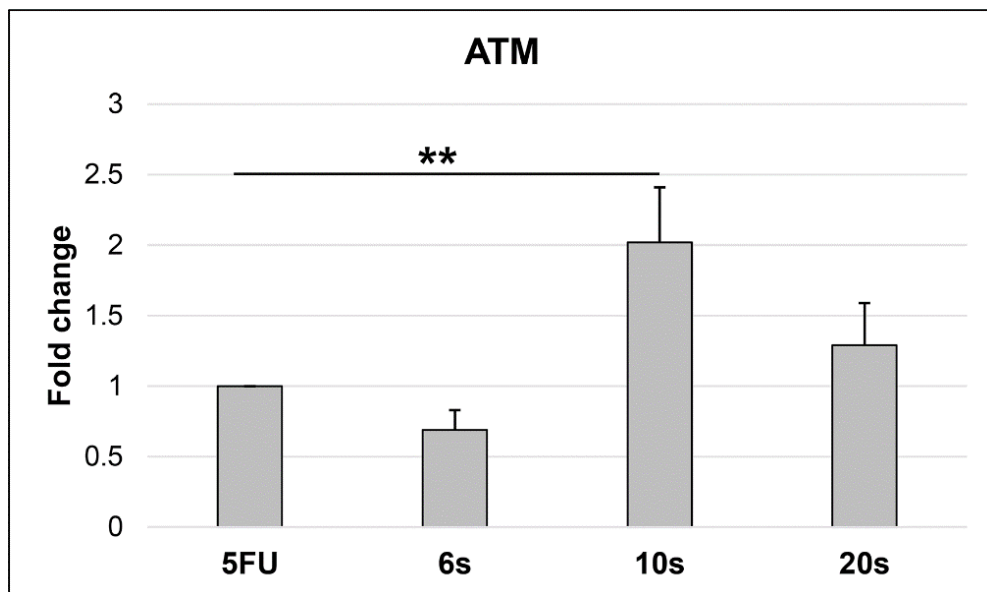
Fonte: A autora.

5.4.3 Expressão do gene ATM

A expressão do gene ATM no grupo 5FU foi analisada em relação ao grupo controle (Apêndice B), mostrando que o grupo 5FU exibiu expressão relativa significativamente menor.

A Figura 5.11 evidencia a média de alteração da proporção de expressão gênica dos grupos irradiados em relação ao 5FU. Nota-se que os grupos 10s e 20s exibiram aumento da expressão relativa ao 5FU, com diferença significativa para o grupo 10s. Já o grupo 6s exibiu redução dessa expressão relativa, porém sem diferenças significativas.

Figura 5.11 – Média (\pm desvio-padrão) para a expressão do gene ATM em relação ao grupo 5FU, calculada a partir da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (double delta Ct)



** $p < 0.01$ (teste t de Student ajustado pelo teste de Bonferroni)

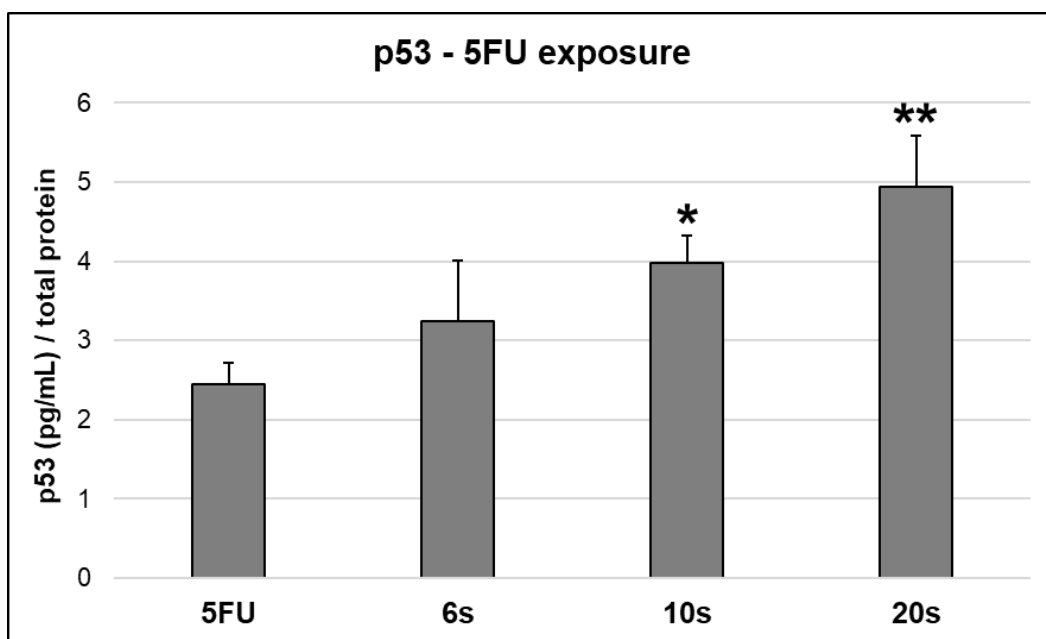
Fonte: A autora.

5.4.4 Quantificação de p53

Na comparação do grupo controle com o 5FU, observou-se expressão significativamente maior de p53 no grupo 5FU ($p=0.020$) (Apêndice B).

A Figura 5.12 mostra a média da expressão da proteína p53 nos grupos 5FU e irradiados. Todos os grupos irradiados exibiram aumento da expressão da p53 em relação ao 5FU, com diferenças significativas nos grupos 10s e 20s.

Figura 5.12 – Média (\pm desvio-padrão) da expressão de p53. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO) e também pelo total de proteínas em cada amostra



* $p<0.05$ em relação ao grupo 5FU; ** $p<0.01$ em relação ao grupo 5FU. Valor de p obtido com teste de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey

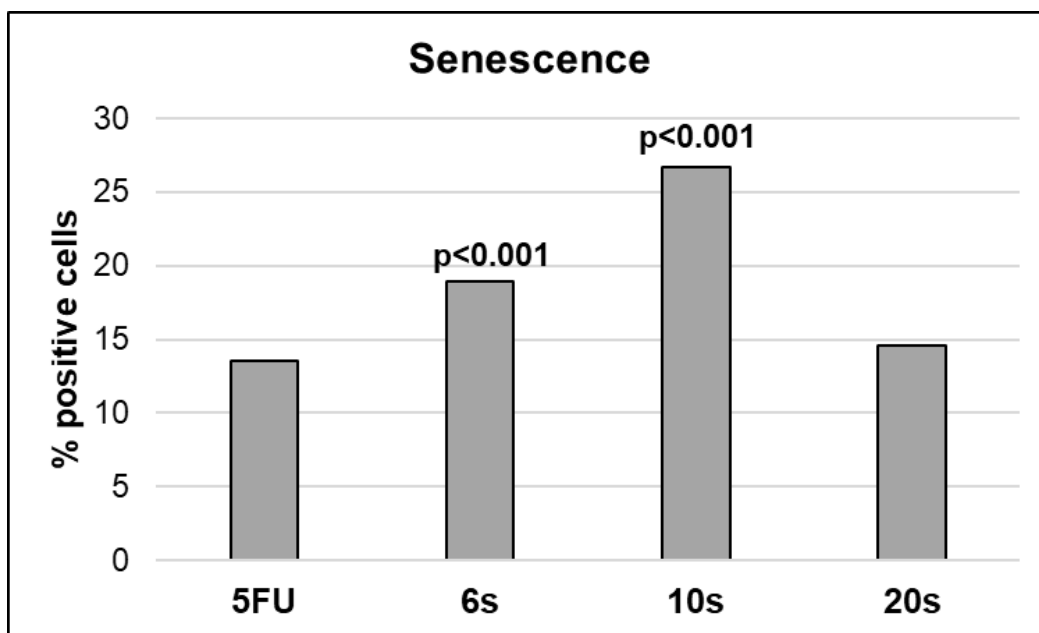
Fonte: A autora.

5.5 Ensaio de senescência

Na comparação da frequência das células positivas para senescência (expressando β -galactosidase) no grupo controle em comparação ao grupo 5FU (Apêndice B), o grupo 5FU exibiu menor porcentagem de células senescentes ($p < 0.001$).

A Figura 5.13 mostra frequência de células senescentes no grupo 5FU e nos grupos irradiados após normalizados dos valores pelo grupo controle. Os grupos irradiados exibiram maior frequência de células senescentes em comparação ao grupo 5FU, com diferenças significativas nos tempos de irradiação de 6s e 10s.

Figura 5.13 – Frequência (%) de células exibindo senescência nos grupos 5FU e irradiados. Os valores absolutos foram normalizados pelos valores encontrados no controle (células expostas ao DMSO)

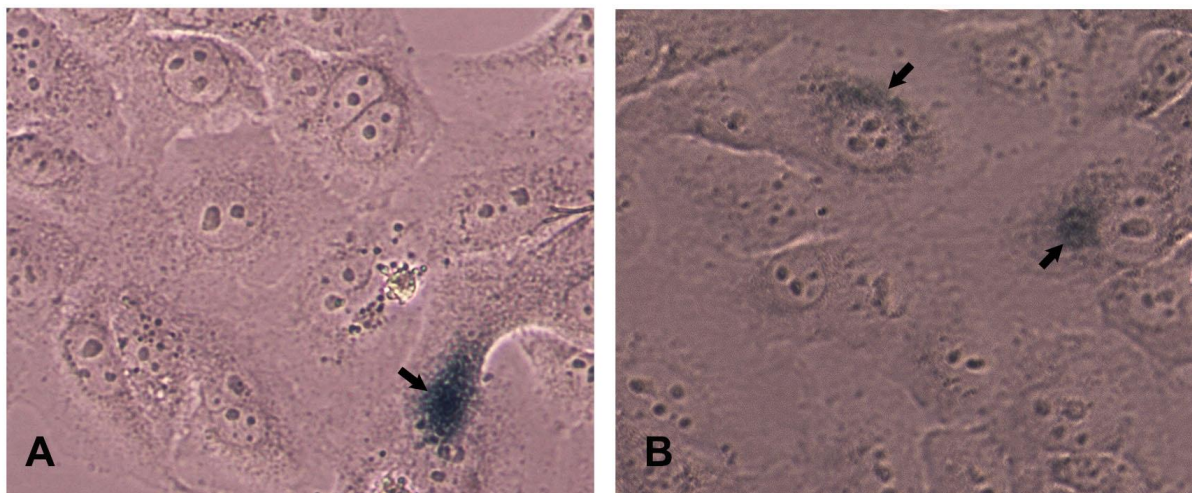


Valor de p obtido pelo teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni

Fonte: A autora.

A figura 5.14 exibe imagens, das células positivas para senescência (expressando β -galactosidase).

Figura 5.14 – Imagens representativas das células positivas (setas) para senescência (expressando β -galactosidase). A = Grupo 5FU; B = Grupo 10s

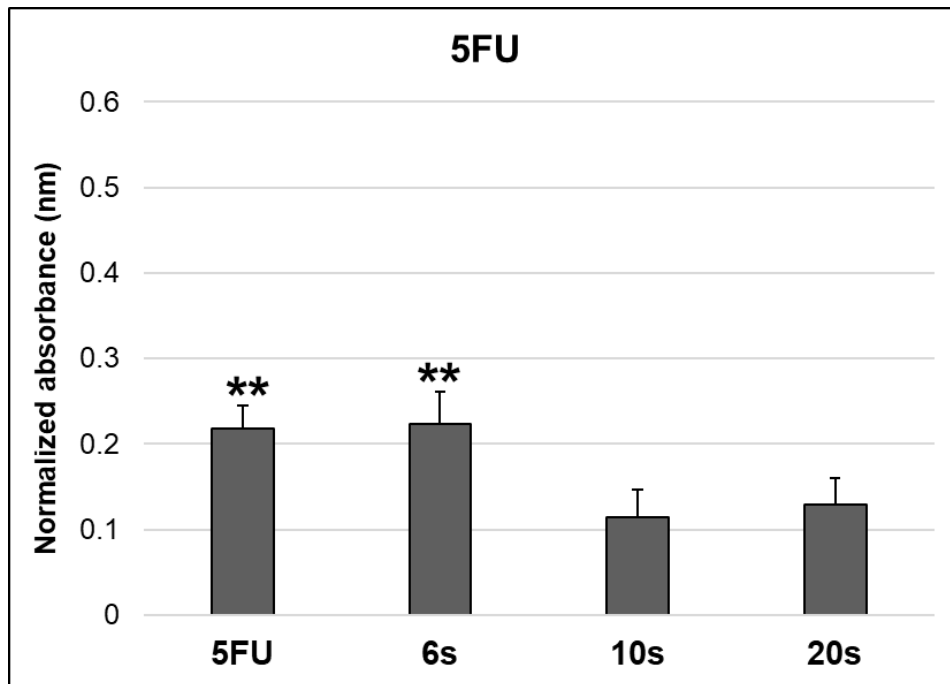


Fonte: A autora.

5.6 Atividade mitocondrial celular dos grupos irradiados

A Figura 5.15 mostra a média da atividade mitocondrial celular nos grupos 5FU e irradiados, obtida pelo ensaio MTS. Nota-se que os grupos 10s e 20s exibiram viabilidade significativamente menor do que o grupo 5FU ($p < 0.01$). Após FBM com 6s, a viabilidade foi significativamente maior ($p < 0.01$) em relação aos outros tempos de irradiação (10s e 20s), porém, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo 5-FU.

Figura 5.15– Média (\pm desvio-padrão) da atividade mitocondrial celular obtida a partir do ensaio de MTS. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO)



** $p < 0.01$ em relação a 10s e 20s. Valor de p obtido com teste ANOVA, seguido do teste de Tukey

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A proposta do presente estudo foi investigar se a FBM, em diferentes tempos de irradiação, poderia reduzir o estresse oxidativo e o dano no DNA, além de aumentar a expressão de proteínas relacionadas a reparo do DNA em queratinócitos normais previamente expostos ao quimioterápico 5FU. De maneira geral, verificamos que o 5FU induziu estresse oxidativo e danos na estrutura do DNA; e que a FBM pôde reduzir o efeito genotóxico do 5FU por intermédio da ativação de enzimas antioxidantes e de proteínas associadas ao reparo do DNA. Esse efeito protetor da FBM ocorreu, principalmente, com o maior tempo de irradiação aplicado.

A literatura aponta uma tendência de haver um efeito protetor da FBM sobre a estrutura do DNA de células humanas e o mesmo ser dose-dependente (Dube et al., 2001; Mbene et al., 2009; Musstaf et al., 2019; Rosin et al., 2022); no entanto, esse efeito ainda é pouco conhecido. Os trabalhos anteriores analisaram o dano no DNA por intermédio de diversos modelos de agressão, muitos deles induzidos por radiações ionizante e ultravioleta (Dube et al., 2001; Ling et al., 2014; Ramos Silva et al., 2016). Até onde sabemos, nenhum estudo mostrou o efeito da FBM em queratinócitos normais que já exibam danos no material genético causado por quimioterapia.

A escolha de queratinócitos normais como fonte das análises do efeito da FBM foi inspirada no fato de que compõem o epitélio da mucosa oral, e sua destruição pelos agentes antineoplásicos contribui substancialmente para a instalação das lesões avançadas de mucosite oral.

Nossa hipótese era de que o 5FU poderia induzir a uma grande quantidade de danos no DNA. A FBM, realizada posteriormente a essa exposição, reduziria esse dano e modularia a expressão de proteínas relacionadas a DDR, levando à diminuição do efeito genotóxico causado pelo 5FU. Esse efeito seria dependente do tempo de irradiação utilizado. Essa hipótese foi baseada em estudos conduzidos com a FBM sendo realizada com diferentes densidades de energia, encontrando resultados diversos, conforme foi demonstrado no Quadro 2.1.

Como o dano no DNA está ligado à produção de EROs (Wyatt; Wilson, 2009), inicialmente avaliamos o efeito da FBM sobre o estresse oxidativo após a exposição ao 5FU. Em nosso experimento, verificamos que o 5FU sozinho induziu aumento de EROs e diminuição da atividade da SOD e CAT (Apêndice B), fato já anteriormente constatado em outros estudos envolvendo outros tipos celulares (Akhdar et al., 2009; Matsunaga et al., 2010; Xiao et al., 2017). Nos grupos irradiados houve tendência de redução de EROs independentemente do tempo de irradiação, fato que sugeriu um efeito protetor do laser, apesar de a diferença significativa ter sido encontrada somente no tempo de 10s. Além disso, houve aumento da atividade de SOD e CAT nos tempos de irradiação de 6s e 20s. Essa tendência de redução do estresse oxidativo foi descrita na literatura em outras situações de agressão, tais como diabetes e queimaduras (Lim et al., 2010; Yadav et al., 2020), e também em outro estudo com queratinócitos expostos a 5FU e a FBM combinando três comprimentos de onda (660nm, 808nm e 970nm, densidade de energia total de 15J/cm²) (Rupel et al., 2018). Assim, a tendência de a FBM promover redução nos marcadores de estresse oxidativo quando os mesmos se encontram elevados (de Freitas; Hamblin, 2016; Hamblin, 2017) repetiu-se no presente experimento.

Somente para o tempo de irradiação de 10s, a atividade da SOD e da CAT foi reduzida em relação ao 5FU. Isso ocorreu provavelmente porque esse tempo de irradiação gerou menor quantidade de EROs. Esse resultado já tinha sido observado por nosso grupo em estudo anterior envolvendo fibroblastos normais expostos ao 5FU (Rosin et al., 2022), no qual os mesmos parâmetros de FBM, incluindo os tempos de irradiação de 6s, 10s e 20s, foram utilizados. Assim, a tendência de que a expressão de enzimas antioxidantes é diretamente proporcional a de EROs após a FBM em células expostas à quimioterapia (Rupel et al., 2018; Rosin et al., 2022) repetiu-se no presente experimento.

Um outro achado inesperado foi o fato de que os grupos com FBM exibiram maior quantidade de MDA, sugerindo maior peroxidação lipídica. A mucosite oral induzida pelo 5FU é explicada, em parte, pela indução de peroxidação lipídica na mucosa oral (Yoshino et al., 2013). No presente estudo, verificamos que o 5FU induziu alta produção de peroxidação lipídica, porém esta não foi reduzida após a FBM, principalmente após 6s, grupo no qual houve diferenças significativas em relação ao 5FU. Em geral, os estudos demonstram

menor peroxidação lipídica após exposição a FBM (Tatmatsu-Rocha et al., 2016; Guaraldo et al., 2016; Ribeiro et al., 2016), apesar de envolverem parâmetros de FBM e situações experimentais distintos dos utilizados no presente estudo. Também não se pode descartar que a alta peroxidação lipídica pode estar associada à alta produção de SOD, a qual foi observada nos grupos 6s e 20s, conforme discutido anteriormente. A concentração dessa enzima antioxidante deve estar em níveis ótimos no interior celular (nem excessivos nem reduzidos); o aumento não equilibrado de sua expressão pode induzir peroxidação lipídica pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio formado durante a dismutação do superóxido (McCord, 2008). Provavelmente a CAT induzida pela irradiação de 6s não foi suficiente para neutralizar o peróxido de hidrogênio, culminando com a produção de MDA. Assim, apesar de a FBM ter induzido maior atividade de SOD, que pode levar a proteção contra superóxidos, a ausência de níveis ótimos dessa enzima pode ter induzido à peroxidação lipídica, a qual já estava presente em função do tratamento com 5FU.

Essa complexa modulação do estresse oxidativo conferida pela FBM provavelmente influenciou os resultados envolvendo a expressão de marcadores de dano no DNA, conforme descrito a seguir.

A exposição ao 5FU acarretou maior porcentagem de DNA na cauda do cometa, sugerindo que esse quimioterápico induziu danos de fita simples e dupla no DNA em queratinócitos normais, tal qual costuma fazer com células neoplásicas (Longley et al., 2003; Matuo et al., 2009; Matsunaga et al., 2010; Ikeda et al., 2010; Adamsen et al., 2011; Kevadiya et al., 2012; Srinivas et al., 2015). Após a FBM, houve redução significativa dessa porcentagem nos tempos de irradiação de 10s ($11,1\text{J}/\text{cm}^2$) e 20s ($22,2\text{J}/\text{cm}^2$), porém com 6s ($6,6\text{J}/\text{cm}^2$), a quantidade de dano no DNA não teve diferença significativa em relação ao 5FU. Esse achado contraria afirmações anteriores de que densidades de energia superiores a $10\text{J}/\text{cm}^2$ podem provocar danos no DNA (Hawkins; Abrahamse, 2006; Hourel; Abrahamse, 2007; Mbene et al., 2009), e de que densidades de energia iguais ou menores do que $5\text{J}/\text{cm}^2$ seriam mais seguras por não causarem ou até mesmo diminuir os danos no DNA (Hawkins; Abrahamse, 2006; Hourel; Abrahamse, 2007; Mbene et al., 2009; Dillenburg et al., 2014; consultar o Quadro 2.1 para considerar as particularidades dos parâmetros de

FBM utilizados em alguns dos estudos citados). A alta de peroxidação lipídica encontrada no grupo 6s, por sua vez, pode dar subsídios para interpretação da manutenção dos níveis de dano no DNA detectados no ensaio cometa nesse grupo, uma vez que o MDA pode induzir deleções, inserções e substituições de pares de bases, especialmente do par guanina-citosina (GC) (Niedernhofer et al., 2003).

Além da porcentagem de DNA na cauda do cometa, foi também avaliada a expressão de 8-oxo-dG, um importante marcador de dano oxidativo no DNA derivado de agentes quimioterápicos (Matsunaga et al., 2010), que pode induzir quebras de fita dupla. Diferentemente do observado no ensaio cometa, houve aumento da expressão de 8-oxo-dG nos tempos de irradiação de 6s e 10s, e diminuição no tempo de 20s. Alguns estudos têm demonstrado que não há correlação entre a análise da expressão da porcentagem de DNA na cauda do cometa e a expressão de 8-oxo-dG (Watters et al., 2009), principalmente quando o ensaio cometa é desprovido de tratamento enzimático com formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG), que converte as bases oxidadas em sítios de quebra (Moller, 2022). No presente estudo não realizamos essa modificação do protocolo padrão do cometa alcalino, que mostra o quanto as alças enroladas de DNA estão relaxadas devido a quebras (sem estarem relacionadas a dano oxidativo necessariamente) e conseguem migrar quando em eletroforese (Moller, 2022). Esse fato nos obriga a tratar os dois resultados de dano no DNA como achados independentes.

Podemos interpretar a alta expressão de 8-oxo-dG no tempo de 10s e a baixa expressão desse marcador em 20s pela expressão das enzimas antioxidantes, as quais foram muito e pouco expressas em 20s e 10s, respectivamente. Já o aumento de 8-oxo-dG no grupo de 6s pode ser explicado pela alta peroxidação lipídica, já que o MDA e outros produtos de peroxidação contribuiriam para a formação de 8-oxo-dG nesses grupos (Gentile et al., 2017).

Ainda para verificar o dano no DNA, foi analisada a expressão de γ -H2AX, que indica danos no DNA de fita dupla (Rothkamm; Horn, 2009; Nikitaki et al., 2015). A exposição ao 5FU causou aumento da expressão desse marcador em relação ao controle, porém os grupos irradiados exibiram superexpressão de γ -H2AX quando comparados ao 5FU. Isso sugere que a irradiação provocou maior quantidade de dano de fita dupla. Esses resultados não foram compatíveis com

os encontrados em outro estudo envolvendo queratinócitos normais (Dillenburg et al., 2014), porém sem exposição a agentes genotóxicos e com potência e densidade de energia menores ($4\text{J}/\text{cm}^2$), diferenças que podem justificar a ausência de expressão de $\gamma\text{-H2AX}$. Por outro lado, em trabalho anterior (Rosin et al., 2022), nosso grupo demonstrou que, para os mesmos parâmetros de FBM e exposição ao 5FU, porém com fibroblastos gengivais, a expressão de $\gamma\text{-H2AX}$ foi menor, sugerindo um efeito protetor da FBM. Assim, podemos inferir que a presença de dano no DNA de fita dupla presente nos queratinócitos do presente estudo está condicionada a esse tipo celular, cujo DNA parece ser mais sensível a FBM do que o dos fibroblastos gengivais, quando utilizadas densidades de energia iguais ou acima do que $11,1\text{J}/\text{cm}^2$. É importante acrescentar que a forma fosforilada do H2AX ($\gamma\text{-H2AX}$) também indica acionamento do reparo do DNA (Nikitaki et al., 2015) e, nesse sentido, o aumento desse marcador também supõe acionamento da via da ATM, conforme comentado a seguir.

Assim, com base no ensaio cometa e nas análises da expressão de 8-oxo-dG e $\gamma\text{-H2AX}$, podemos dizer que a irradiação de 6s acarretou maior dano no DNA, provavelmente em função do alto grau de peroxidação lipídica encontrado nesse grupo. As irradiações de 10s e 20s também acarretaram aumento de dano no DNA, apesar de no ensaio cometa essas tendências não terem sido tão evidenciadas e da abrupta redução de expressão de 8-oxo-dG no tempo de irradiação de 20s. Pode-se sugerir, portanto, que tempos de irradiação maiores, por volta de 20s, mantendo-se a densidade de potência fixa em $1,1\text{W}/\text{cm}^2$, acarreta menor quantidade de EROs e, conseqüentemente, menor risco de dano no DNA em comparação com tempos de irradiação menor. Essa afirmação ainda se sustenta considerando o duplo significado do $\gamma\text{-H2AX}$ como marcador de dano e ao mesmo tempo de acionamento do reparo de DNA. Nesse sentido, admitindo-se que todos os parâmetros de irradiação geraram dano no DNA em algum grau, foi possível identificar uma curva dose-resposta binária, porém invertida, ou seja, menores densidades de energia geraram maior risco de dano no DNA, e maiores densidades de energia, menor risco.

O reparo do DNA induzido pelo 5FU é realizado principalmente pela via de excisão de base (BER), ativando diversas proteínas relacionadas a DDR, como ATM, DNA-glicosilases e DNA-polimerases (Wyatt; Wilson, 2009; Matuo

et al., 2010). No presente estudo, a expressão de OGG1, ERCC1 e ATM, indicativa do acionamento dessas vias de reparo, foram menores no grupo 5FU quando comparados ao controle, sugerindo que a exposição ao 5FU não acionou significativamente esses mecanismos. Outros estudos realizados em cultura primária de tecidos neoplásicos e linhagens com células cancerígenas encontraram aumento na ativação de ERCC1 (Wongsirisin et al., 2018; Liu et al., 2018) e de ATM (Adamsen et al., 2011) após exposição ao 5FU. Provavelmente não detectamos esse reparo pelo fato de termos utilizado queratinócitos humanos normais.

Considerando a expressão de OGG1, responsável pelo reparo de dano oxidativo, principalmente de 8-oxo-dG (Chernikov et al., 2017; Yahyapour et al., 2018; Davalli et al., 2018), detectou-se que, com 10s e 20s de FBM, houve aumento da expressão de OGG1, enquanto com 6s a expressão dessa proteína quase não foi detectada. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que a FBM aumentou a expressão de OGG1 em animais de experimentação nos quais foram induzidas queimaduras de pele (Trajano et al., 2014), em mioblastos murinos normais (Trajano et al., 2016), em tecido cardíaco e pulmonar (Trajano et al., 2022) e, em pele íntegra e músculo estriado esquelético (de Souza da Fonseca et al., 2013). Nesses estudos, as densidades de energia foram por volta de $10\text{J}/\text{cm}^2$. Esse último estudo ainda encontrou diminuição de OGG1 em ambos tecidos na menor densidade de energia avaliada, $1\text{J}/\text{cm}^2$, sugerindo que densidade de energia mais baixas podem não ser suficientes para bioestimular células e tecidos e, portanto, não ativarem o reparo por excisão de bases em uma via dependente de OGG1, o que explicaria nossos resultados no tempo irradiado por 6s ($6,6\text{J}/\text{cm}^2$). O aumento da expressão de OGG1 nos tempos de irradiação de 10s e 20s, detectados no presente estudo, constituem um forte indício de que a FBM com essas densidades de energia pode estimular o reparo no DNA, neutralizando o efeito inibitório do 5FU no tocante ao acionamento desse mecanismo para correção do dano oxidativo.

A expressão de ERCC1 indica reparo de DNA pela excisão de nucleotídeos danificados (O'Connor, 2015; Desai et al., 2018). Quando houve exposição a FBM, os tempos de irradiação de 6s e 20s acarretaram diminuição e aumento de ERCC1, respectivamente, e o tempo de 10s não provocou

diferenças em relação ao 5FU. Em outros trabalhos a FBM também provocou aumento da expressão dessa proteína (Trajano et al., 2016; Sergio et al., 2016) quando densidades de energia maiores (iguais ou maiores que $10\text{J}/\text{cm}^2$) foram aplicadas. Assim, pelos resultados do presente estudo e com base na literatura, pode-se dizer que também para ERCC1 houve tendência de maior expressão em situações de FBM feita com maior densidade de energia e menor expressão em situações de menor densidade de energia.

O reparo no DNA foi também avaliado pela expressão da ATM, que fosforila o H2AX e aciona o p53, que por sua vez induz a células a apoptose ou a senescência. Seguindo a tendência observada para OGG1 e ERCC1, também para ATM a irradiação de 6s reduziu a expressão dessa proteína em relação ao 5FU, e as irradiações de 10s e 20s provocaram superexpressão. Apesar de nenhum estudo ter avaliado a influência da FBM sobre a expressão da ATM após exposição a agentes antineoplásicos, alguns trabalhos (Trajano et al., 2016; Guedes de Almeida et al., 2017; Trajano et al., 2022) demonstraram que a FBM pode induzir o aumento de ATM quando densidades de energia maiores foram empregadas (a partir de $20\text{J}/\text{cm}^2$).

Assim, considerando de forma global os marcadores de reparo no DNA, pode-se dizer que o tempo de irradiação de 6s não foi suficiente para acionar vias de reparo, diferentemente dos tempos de irradiação de 10s e principalmente de 20s, que induziram superexpressão desses marcadores. Dessa forma, tempos de irradiação maior que 6s aumentaram a expressão de proteínas de reparo em níveis superiores aos encontrados no grupo 5FU, sugerindo ação protetora contra efeitos genotóxicos.

A ATM pode acionar a p53, induzindo a célula a apoptose ou a senescência (Ju et al., 2007). Após exposição ao 5FU, houve aumento da expressão de p53, tal qual outros estudos demonstraram (Hasegawa et al., 2018; Rosin et al., 2022). A FBM provocou superexpressão dessa proteína em todas as situações de irradiação, com valores maiores para o tempo de 20s. Outros autores também já tinham observado essa tendência de a FBM induzir aumento de p53 com densidades de energia iguais a $35\text{J}/\text{cm}^2$ (Trajano et al., 2016), porém em nosso estudo anterior com fibroblastos gengivais não verificamos esse aumento (Rosin et al., 2022).

O aumento da p53 nos grupos irradiados veio acompanhado do aumento da frequência de células senescentes comparativamente ao 5FU, principalmente nos tempos de irradiação de 6s e 10s, indicando que provavelmente, após ativação do mecanismo de reparo pela ATM, houve indução de senescência, favorecendo a parada do ciclo celular e a redução da atividade mitocondrial celular detectada pelo MTS. Essas células podem retomar a progressão do ciclo celular uma vez que o dano tenha sido reparado, ou as células que sofreram danos irreparáveis no DNA sofrem apoptose ou parada permanente do ciclo celular (Lombard et al., 2005).

O presente trabalho contém limitações. Há poucos estudos disponíveis sobre os efeitos da FBM no dano e reparo do DNA (Trajano et al., 2016); além disso, os resultados parecem depender das condições celulares e dos parâmetros físicos da FBM, o que dificulta comparações e não permite maiores extrapolações com relação aos mecanismos possíveis. Por outro lado, em nosso estudo a avaliação sobre o estresse oxidativo, o dano no DNA e a DDR foi realizada de maneira ampla, proporcionando um painel de seus vários marcadores. Priorizamos ainda parâmetros da FBM baseados em protocolos clínicos utilizados na prevenção e tratamento da mucosite oral (Migliorati et al., 2013), o que permite que os resultados do presente estudo sejam extrapolados para pacientes sob tratamento quimioterápico com o 5FU em futuros protocolos clínicos de FBM.

Em resumo, como resultados gerais, nota-se que a FBM com 10s e 20s provocou menor produção de EROs e desencadeou a expressão de marcadores de dano no DNA de forma heterogênea dependendo da natureza desse marcador; por outro lado, as proteínas de reparo do DNA foram superexpressas, bem como houve maior frequência de células senescentes, sugerindo um mecanismo de proteção contra os efeitos genotóxicos do 5FU. Já o tempo de irradiação de 6s provocou intensa peroxidação lipídica, alta expressão de marcadores de dano no DNA e menor expressão de proteínas de reparo, também induzindo as células à senescência.

7 CONCLUSÕES

- A FBM reduziu a produção de EROs induzida pelo 5FU por intermédio da ativação de enzimas antioxidantes, porém não foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica.
- A FBM aumentou a expressão de marcadores de dano no DNA de forma heterogênea, dependendo do tempo de irradiação.
- A FBM feita com tempos de irradiação de 10s e principalmente de 20s foi capaz de aumentar a expressão de proteínas de reparo do DNA, o mesmo não sendo observado com o tempo de irradiação de 6s.
- A FBM induziu senescência nas células expostas ao 5FU, interpretada como um mecanismo compensatório para o reparo no DNA, sugerindo uma ação protetora contra os efeitos genotóxicos desse quimioterápico.
- O efeito da FBM sobre o estresse oxidativo, bem como sobre o dano e o reparo no DNA depende do tempo de irradiação, com uma tendência geral de maiores tempos de irradiação induzirem maior chance reparo no DNA por intermédio de mecanismos compensatórios de controle do estresse oxidativo e de ativação de múltiplas vias de correção do material genético.

REFERÊNCIAS¹

Abdel-Rahman O, ElHalawani H, Essam-Eldin S. S-1-based regimens and the risk of oral and gastrointestinal mucosal injury: a meta-analysis with comparison to other fluoropyrimidines. *Expert Opin Drug Saf.* 2016 Jan;15(1):5-20. doi: 10.1517/14740338.2016.1105959.

Adamsen BL, Kravik KL, De Angelis PM. DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status. *Int J Oncol.* 2011 Sep;39(3):673-82. doi: 10.3892/ijo.2011.1080.

Afzal S, Jensen SA, Sørensen JB, Henriksen T, Weimann A, Poulsen HE. Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Feb;69(2):301-7. doi: 10.1007/s00280-011-1700-2.

Akhdar H, Loyer P, Rauch C, Corlu A, Guillouzo A, Morel F. Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells. *Eur J Cancer.* 2009 Aug;45(12):2219-27. doi: 10.1016/j.ejca.2009.05.017.

Amerizadeh F, Rezaei N, Rahmani F, Hassanian SM, Moradi-Marjaneh R, Fiuji H, Boroumand N, Nosrati-Tirkani A, Ghayour-Mobarhan M, Ferns GA, Khazaei M, Avan A. Crocin synergistically enhances the antiproliferative activity of 5-fluorouracil through Wnt/PI3K pathway in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2018 Dec;119(12):10250-10261. doi: 10.1002/jcb.27367.

Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015 Apr;33(4):183-4. doi: 10.1089/pho.2015.9848.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Ver. Nutri., Campinas.* 2010 jul/ago 23(4):629-43. doi:10.1590/S1415-52732010000400013.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- Barreiros ALS, David JM, David AP. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim Nova*. 2006; 29(1):113-23. doi: 10.1590/S0100-40422006000100021.
- Bjordal JM, Couppe C, Ljunggren AE. Low level laser therapy for tendinopathy: evidence of a dose-response pattern. 2001. *Phys Ther Rev*. 2001 Jun;6(2):91-99. doi: 10.1179/108331901786166569.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. 1988 Mar;106(3):761-71. doi: 10.1083/jcb.106.3.761.
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Apr;9(4):297-308. doi: 10.1038/nrm2351.
- Brondon P, Stadler I, Lanzafame RJ. A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg Med*. 2005 Jun;36(5):409-13. doi: 10.1002/lsm.20183.
- Carvalho DLC. Efeito da fotobiomodulação sobre o estresse oxidativo e o dano no DNA induzido pelo bussufano em doses encontradas na saliva: estudo in vitro. [Tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018 [citado 2022-11-07]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23154/tde-08042019-152406/pt-br.php>.
- Chernikov AV, Gudkov SV, Usacheva AM, Bruskov VI. Exogenous 8-Oxo-7,8-dihydro-2'- deoxyguanosine: Biomedical Properties, Mechanisms of Action, and Therapeutic Potential. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Dec;82(13):1686-1701. doi: 10.1134/S0006297917130089.
- Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol*. 2013 May 23;20(5):648-59. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.04.007.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
- Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010 Oct 22;40(2):179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.

Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther.* 2004 Dec;3(4):294-300. doi: 10.1177/1534735404270335.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1195-214. doi: 10.1096/fj.02-0752rev.

Davalli P, Marveti G, Lauriola A, D'Arca D. Targeting oxidatively DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Mar 27;2018:2389523. doi: 10.1155/2018/2389523.

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016 May-Jun;22(3). doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.

de Souza da Fonseca A, Mencialha AL, Araújo de Campos VM, Ferreira Machado SC, de Freitas Peregrino AA, Geller M, de Paoli F. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. *Lasers Med Sci.* 2013 Jul;28(4):1077-84. doi: 10.1007/s10103-012-1191-3.

Desai A, Yan Y, Gerson SL. Advances in therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer. *DNA Repair (Amst).* 2018 ; 66-67: 24–29. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.04.004.

Dillenburg CS, Almeida LO, Martins MD, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy triggers the production of reactive oxygen species in oral epithelial cells without inducing DNA damage. *J Biomed Opt.* 2014 Apr;19(4):048002. doi: 10.1117/1.JBO.19.4.048002.

Diniz IMA, Souto GR, Freitas IDP, de Arruda JAA, da Silva JM, Silva TA, Mesquita RA. Photobiomodulation Enhances Cisplatin Cytotoxicity in a Culture Model with Oral Cell Lineages. *Photochem Photobiol.* 2020 Jan;96(1):182-190. doi: 10.1111/php.13152.

Dube A, Bock C, Bauer E, Kohli R, Gupta PK, Greulich KO. He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage. *Radiat Environ Biophys.* 2001 Mar;40(1):77-82. doi: 10.1007/s004110000086.

Faber M, Coudray C, Hida H, Mousseau M, Favier A. Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after chemotherapy, including adriamycin. A preliminary study. *Biol Trace Elem Res.* 1995 Jan-Mar;47(1-3):117-23. doi: 10.1007/BF02790108.

Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. 5-Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterology.* 2007 Dec;133(6):1858-68. doi: 10.1053/j.gastro.2007.09.003.

Flatschacher D, Speckbacher V, Zeilinger S. qRAT: an R-based stand-alone application for relative expression analysis of RT-qPCR data. *BMC Bioinformatics.* 2022 Jul 19;23(1):286. doi: 10.1186/s12859-022-04823-7.

Gentile F, Arcaro A, Pizzimenti S, Daga M, Cetrangolo GP, Dianzani C, Lepore A, Graf M, Ames PRJ, Barrera G. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genet.* 2017 Apr 18;4(2):103-137. doi: 10.3934/genet.2017.2.103.

Gille L, Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(5):775-82. doi: 10.1016/s0891-5849(97)00025-7.

Ginani F, Soares DM, Barreto MP, Barboza CA. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2015 Nov;30(8):2189-94. doi: 10.1007/s10103-015-1730-9.

Grem JL. Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil. *Semin Radiat Oncol.* 1997 Oct;7(4):249-259. doi: 10.1053/SRAO00700249.

Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, Antônio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJ, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. *Lasers Med Sci.* 2016 Jul;31(5):833-40. doi: 10.1007/s10103-016-1882-2.

Guedes de Almeida L, Sergio LPDS, de Paoli F, Mencialha AL, da Fonseca AS. TP53 and ATM mRNA expression in skin and skeletal muscle after low-level laser exposure. *J Cosmet Laser Ther.* 2017 Aug;19(4):227-231. doi: 10.1080/14764172.2017.1293829.

Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014 Jan 9;2:457-65.

Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of Low Level Light Therapy. Proc. of SPIE. 2006 Feb;6140:614001:1-12. doi: 10.1117/12.646294.

Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. Photochem Photobiol. 2017 Mar;94(2):199-212. doi: 10.1111/php.12864.

Hasegawa Y, Goto M, Hanai N, Ozawa T, Hirakawa H. Predictive biomarkers for combined chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in oro- and hypopharyngeal cancers. Mol Clin Oncol. 2018 Feb;8(2):378-386. doi: 10.3892/mco.2017.1521.

Hawkins D, Abrahamse H. Laboratory methods for evaluating the effect of low level laser therapy (LLLT) in wound healing. Afr J Biomed Res. 2006 Sep;8:1-14. doi: 10.4314/ajbr.v8i1.35752.

Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. Ann N Y Acad Sci. 2005 Nov;1056:486-93. doi: 10.1196/annals.1352.040.

Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. Lasers Surg Med. 2006 Jan;38(1):74-83. doi: 10.1002/lsm.20271.

He M, Zhang B, Shen N, Wu N, Sun J. A systematic review and meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) on chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric and young patients. Eur J Pediatr. 2018 Jan;177(1):7-17. doi: 10.1007/s00431-017-3043-4.

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. Nature. 1957 Mar 30;179(4561):663-6. doi: 10.1038/179663a0.

Houreld N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². Photomed Laser Surg. 2007 Apr;25(2):78-84. doi: 10.1089/pho.2006.990.

Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. Dose Response. 2011;9(4):602-18. doi: 10.2203/dose-response.11-009.

Hwang PM, Bunz F, Yu J, Rago C, Chan TA, Murphy MP, Kelso GF, Smith RA, Kinzler KW, Vogelstein B. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med*. 2001 Oct;7(10):1111-7. doi: 10.1038/nm1001-1111. Erratum in: *Nat Med* 2001 Nov;7(11):1255.

Ikeda M, Kurose A, Takatori E, Sugiyama T, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sawai T. DNA damage detected with gammaH2AX in endometrioid adenocarcinoma cell lines. *Int J Oncol*. 2010 May;36(5):1081-8. doi: 10.3892/ijo_00000589.

Ju J, Schmitz JC, Song B, Kudo K, Chu E. Regulation of p53 expression in response to 5-fluorouracil in human cancer RKO cells. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 15;13(14):4245-51. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2890.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.

Karu TI, Afanasyeva NI, Kolyakov SF, Pyatibrat LV, Welser L. Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by laser radiation at 633, 670, and 820 nm. *IEEE J Select Topics Quantum Electron*. 2001 Nov-Dec;7(6):982-988. doi: 10.1109/2944.983303.

Kasapović J, Pejić S, Stojiljković V, Todorović A, Radošević-Jelić L, Saičić ZS, Pajović SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Clin Biochem*. 2010 Nov;43(16-17):1287-93. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.08.009.

Kasapović J, Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Pajović SB. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell Biochem Funct*. 2008 Aug;26(6):723-30. doi: 10.1002/cbf.1499.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):42-9. doi: 10.1006/excr.2000.4838.

Kevadiya BD, Patel TA, Jhala DD, Thumbar RP, Brahmabhatt H, Pandya MP, Rajkumar S, Jena PK, Joshi GV, Gadhia PK, Tripathi CB, Bajaj HC. Layered inorganic nanocomposites: a promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU). *Eur J Pharm Biopharm*. 2012 May;81(1):91-101. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.01.004.

King PR. Low level laser therapy: A review. *Laser Med Sci.* 1989. 4: 141–150. doi: 10.1007/BF02032427.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:239-67. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851.

Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI, Mullenders LH. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst).* 2011 Jul 15;10(7):743-50. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.04.024.

Lim J, Sanders RA, Snyder AC, Eells JT, Henshel DS, Watkins JB 3rd. Effects of low-level light therapy on streptozotocin-induced diabetic kidney. *J Photochem Photobiol B.* 2010 May 3;99(2):105-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.03.002.

Lindahl T. The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1996 Nov 29;351(1347):1529-38. doi: 10.1098/rstb.1996.0139.

Ling Q, Meng C, Chen Q, Xing D. Activated ERK/FOXO1 pathway by low-power laser irradiation inhibits UVB-induced senescence through down-regulating p21 expression. *J Cell Physiol.* 2014 Jan;229(1):108-16. doi: 10.1002/jcp.24425.

Lionel D, Christophe L, Marc A, Jean-Luc C. Oral mucositis induced by anticancer treatments: pathophysiology and treatments. *Ther Clin Risk Manag.* 2006 Jun;2(2):159-68. doi: 10.2147/tcrm.2006.2.2.159.

Liu JL, Huang WS, Lee KC, Tung SY, Chen CN, Chang SF. Effect of 5-fluorouracil on excision repair cross-complementing 1 expression and consequent cytotoxicity regulation in human gastric cancer cells. *J Cell Biochem.* 2018 Nov;119(10):8472-8480. doi: 10.1002/jcb.27073.

Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):497-512. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.028. PMID: 15734682.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):330-8. doi: 10.1038/nrc1074.

Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy.* 1994 Jan-Feb;40(1):8-15. doi: 10.1159/000239163.

López-González A, Ibeas Millán P, Provencio M. DNA Damage and Repair in Cancer Therapy. *J Cancer Sci Ther.* 2012, 1-7. doi: 10.4172/1948-5956.S8-002.

Matsunaga T, Tsuji Y, Kaai K, Kohno S, Hirayama R, Alpers DH, Komoda T, Hara A. Toxicity against gastric cancer cells by combined treatment with 5-fluorouracil and mitomycin c: implication in oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010 Aug;66(3):517-26. doi: 10.1007/s00280-009-1192-5.

Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Grivicich I, Garcia-Santos D, Chies JA, Saffi J, Larsen AK, Henriques JA. 5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line. *J Appl Toxicol.* 2009 May;29(4):308-16. doi: 10.1002/jat.1411.

Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Soares DG, Grivicich I, Saffi J, Larsen AK, Henriques JA. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochem Pharmacol.* 2010 Jan 15;79(2):147-53. doi: 10.1016/j.bcp.2009.08.016.

Mbene AB, Houreld NN, Abrahamse H. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16 J/cm². *J Photochem Photobiol B.* 2009 Feb 9;94(2):131-7. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.002.

McCord JM. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose Response.* 2008;6(3):223-38. doi: 10.2203/dose-response.08-012.McCord. Epub 2008 Aug 6.

Migliorati C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, Estilo CL, Hodgson B, Lopes NN, Schubert MM, Bowen J, Elad S; Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer.* 2013 Jan;21(1):333-41. doi: 10.1007/s00520-012-1605-6.

Minchom A, Aversa C, Lopez J. Dancing with the DNA damage response: next-generation anti-cancer therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol.* 2018 Jul 13;10:1758835918786658. doi: 10.1177/1758835918786658.

Mochizuki-Oda N, Kataoka Y, Cui Y, Yamada H, Heya M, Awazu K. Effects of near-infra-red laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. *Neurosci Lett.* 2002 May 3;323(3):207-10. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00159-3.

Møller P. Measurement of oxidatively damaged DNA in mammalian cells using the comet assay: Reflections on validity, reliability and variability. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2022 Jan;873:503423. doi: 10.1016/j.mrgentox.2021.503423.

Musstaf RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLL) on biological systems: a review. *Int J Radiat Biol*. 2019 Feb;95(2):120-143. doi: 10.1080/09553002.2019.1524944.

Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem*. 2003 Aug 15;278(33):31426-33. doi: 10.1074/jbc.M212549200.

Nikitaki Z, Hellweg CE, Georgakilas AG, Ravanat JL. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem*. 2015 Jun 2;3:35. doi: 10.3389/fchem.2015.00035.

Noren Hooten N, Evans MK. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J Vis Exp*. 2017 May 1;(123):55533. doi: 10.3791/55533.

O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015 Nov 19;60(4):547-60. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.040.

Parker WB, Cheng YC. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther*. 1990;48(3):381-95. doi: 10.1016/0163-7258(90)90056-8.

Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. 2011 Mar 1;25(5):409-33. doi: 10.1101/gad.2021311.

R Core Team [homepage on the Internet]. Vienna: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):222-39. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.

Ramos Silva C, Cabral FV, de Camargo CF, Núñez SC, Mateus Yoshimura T, de Lima Luna AC, Maria DA, Ribeiro MS. Exploring the effects of low-level laser therapy

on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11-12):1157-1166. doi: 10.1002/jbio.201600107.

Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9463-8. doi: 10.1073/pnas.94.17.9463.

Ribeiro BG, Alves AN, Dos Santos LA, Cantero TM, Fernandes KP, Dias Dda S, Bernardes N, De Angelis K, Mesquita-Ferrari RA. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. *PLoS One*. 2016 Apr 15;11(4):e0153618. doi: 10.1371/journal.pone.0153618.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.

Rosin FCP, Novaes CP, Dos Santos AF, Deboni MCZ, Corrêa L. Photobiomodulation Therapy Minimizes the DNA Damage in 5FU-Treated Gingival Fibroblasts. *Photochem Photobiol*. 2022 Feb 21. doi: 10.1111/php.13609.

Rosin FCP. Resistência de células de carcinoma epidermóide bucal à terapia fotodinâmica mediada pelo ácido 5-aminolevulínico. [Tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. [citado 2022-11-07]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23154/tde-24052016-161523/pt-br.php>.

Rothkamm K, Horn S. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*. 2009;45(3):265-71.

Rupel K, Zupin L, Colliva A, Kamada A, Poropat A, Ottaviani G, Gobbo M, Fanfoni L, Gratton R, Santoro M, Di Lenarda R, Biasotto M, Zacchigna S. Photobiomodulation at Multiple Wavelengths Differentially Modulates Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Nov 11;2018:6510159. doi: 10.1155/2018/6510159.

Sampath D, Rao VA, Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):9063-74. doi: 10.1038/sj.onc.1207229.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med*. 2000 Sep;48(5):312-26.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671-5. doi: 10.1038/nmeth.2089.

Senturk E, Manfredi JJ. p53 and cell cycle effects after DNA damage. *Methods Mol Biol*. 2013;962:49-61. doi: 10.1007/978-1-62703-236-0_4.

Sergio LP, Campos VM, Vicentini SC, Mencialha AL, de Paoli F, Fonseca AS. Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue. *Lasers Med Sci*. 2016 Apr;31(3):429-35. doi: 10.1007/s10103-016-1870-6.

Shiloh Y, Lehmann AR. Maintaining integrity. *Nat Cell Biol*. 2004 Oct;6(10):923-8. doi: 10.1038/ncb1004-923.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

Sperandio FF. Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermoide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade. [Tese] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012 [citado 2022-11-07]. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-13042013-102741/pt-br.php>.

Srinivas US, Dyczkowski J, Beißbarth T, Gaedcke J, Mansour WY, Borgmann K, Dobbstein M. 5-Fluorouracil sensitizes colorectal tumor cells towards double stranded DNA breaks by interfering with homologous recombination repair. *Oncotarget*. 2015 May 20;6(14):12574-86. doi: 10.18632/oncotarget.3728.

Subramaniam S, Subramaniam S, Shyamala Devi CS. Erythrocyte antioxidant enzyme activity in CMF treated breast cancer patients. *Cancer Biochem Biophys*. 1994 Oct;14(3):177-82.

Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg*. 2008 Aug;26(4):323-8. doi: 10.1089/pho.2007.2184.

Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR, Damasceno Maia F, do Nascimento NR, Driusso P, Parizotto NA. Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Nov;164:96-102. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.017.

Trajano ET, Mencalha AL, Monte-Alto-Costa A, Pôrto LC, de Souza da Fonseca A. Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red laser. *Lasers Med Sci*. 2014 Nov;29(6):1953-7. doi: 10.1007/s10103-014-1612-6.

Trajano LADSN, Sergio LPDS, Stumbo AC, Mencalha AL, Fonseca ASD. Low power lasers on genomic stability. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Mar;180:186-197. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.02.010.

Trajano LASN, Sergio LPS, Silva CL, Carvalho L, Mencalha AL, Stumbo AC, Fonseca AS. Low-level laser irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts. *Laser Phys. Lett*. 2016 May;13(7):075601. doi: 10.1088/1612-2011/13/7/075601.

Trajano LASN, da Silva Sergio LP, de Oliveira DSL, Trajano ETL, Dos Santos Silva MA, de Paoli F, Mencalha AL, da Fonseca AS. Low-power infrared laser modulates mRNA levels from genes of base excision repair and genomic stabilization in heart tissue from an experimental model of acute lung injury. *Photochem Photobiol Sci*. 2022 Jul;21(7):1299-1308. doi: 10.1007/s43630-022-00221-3.

Watters JL, Satia JA, da Costa KA, Boysen G, Collins LB, Morrow JD, Milne GL, Swenberg JA. Comparison of three oxidative stress biomarkers in a sample of healthy adults. *Biomarkers*. 2009 Dec;14(8):587-95. doi: 10.3109/13547500903183954.

Wongsirisin P, Limpakan Yamada S, Yodkeeree S, Punfa W, Limtrakul P. Association of DNA Repair and Drug Transporter in Relation to Chemosensitivity in Primary Culture of Thai Gastric Cancer Patients. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(3):360-367. doi: 10.1248/bpb.b17-00688.

Woods D, Turchi JJ. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. *Cancer Biol Ther*. 2013 May;14(5):379-89. doi: 10.4161/cbt.23761.

Wu YH, Wang J, Gong DX, Gu HY, Hu SS, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers Med Sci*. 2012 Mar;27(2):509-19. doi: 10.1007/s10103-011-0995-x.

Wyatt MD, Wilson DM 3rd. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Mar;66(5):788-99. doi: 10.1007/s00018-008-8557-5.

Xiao H, Xiong L, Song X, Jin P, Chen L, Chen X, Yao H, Wang Y, Wang L. Angelica sinensis Polysaccharides Ameliorate Stress-Induced Premature Senescence of Hematopoietic Cell via Protecting Bone Marrow Stromal Cells from Oxidative Injuries Caused by 5-Fluorouracil. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 28;18(11):2265. doi: 10.3390/ijms18112265.

Yadav A, Verma S, Keshri GK, Gupta A. Role of 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation on nitroxidative stress and redox homeostasis in burn wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2020 May;36(3):208-218. doi: 10.1111/phpp.12538.

Yahyapour R, Motevaseli E, Rezaeyan A, Abdollahi H, Farhood B, Cheki M, et al. Mechanisms of Radiation Bystander and Non-Targeted Effects: Implications to Radiation Carcinogenesis and Radiotherapy. *Curr Radiopharm.* 2018;11(1):34-45. doi: 10.2174/1874471011666171229123130.

Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, Lee MC. Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One.* 2013 Dec 20;8(12):e82834. doi: 10.1371/journal.pone.0082834.

Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol.* 2014 Dec;6(6):442-57. doi: 10.1093/jmcb/mju045. Epub 2014 Nov 17.

Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, Epstein JB, Elad S, Hamblin MR, Barasch A, Migliorati CA, Milstein DM, Genot MT, Lansaat L, van der Brink R, Arnabat-Dominguez J, van der Molen L, Jacobi I, van Diessen J, de Lange J, Smeele LE, Schubert MM, Bensadoun RJ. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. *Support Care Cancer.* 2016 Jun;24(6):2793-805. doi: 10.1007/s00520-016-3153-y.

Zhang JD, Biczok R, Ruschhaupt M (2022). ddCt: The ddCt Algorithm for the Analysis of Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). (2022). R package version 1.52.0.

Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol*. 2003 May;120(5):849-57. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12133.x.

Ziegler V, Albers A, Fritz G. Lovastatin protects keratinocytes from DNA damage-related pro-apoptotic stress responses stimulated by anticancer therapeutics. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1863(6 Pt A):1082-92. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.02.009.

APÊNDICE A – Padronização da dose e exposição ao agente quimioterápico 5-fluorouracil

Realizou-se a padronização da concentração do 5FU para se atingir uma dose letal entre 30% e 50% por meio do ensaio de MTS realizado nos períodos de 24, 48 e 72 horas após o início da incubação com o quimioterápico. Para isso, as células HaCaT (10^4 células por poço) foram cultivadas com 200 μ l em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e 1% de L-Glutamina, em placas de 96 poços e então tratadas com 8 concentrações de 5FU obtidas por intermédio de diluição seriada. Os resultados da atividade mitocondrial celular encontram-se na Tabela 4.3.

Primeiramente, foi realizada a solução de estoque do 5FU a 300,31 mM, diluída diretamente em DMSO. Partindo-se desta solução, foi obtida a solução intermediária a 1mM, diluída em meio de cultura. A solução de 1mM foi então diluída a 200 μ M, sendo esta a maior concentração da curva. A partir da concentração de 200 μ M, foi realizada a diluição seriada em meio de cultura (1:1), obtendo-se as 8 concentrações da curva (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.12 μ M e 1.56 μ M).

Tabela 4.3 - Média (\pm desvio-padrão) da atividade mitocondrial celular obtida a partir do ensaio de MTS realizado nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h após o início da exposição das células HaCaT com 8 diferentes concentrações testadas de 5FU. Os valores foram normalizados pelo controle (células expostas ao DMSO).

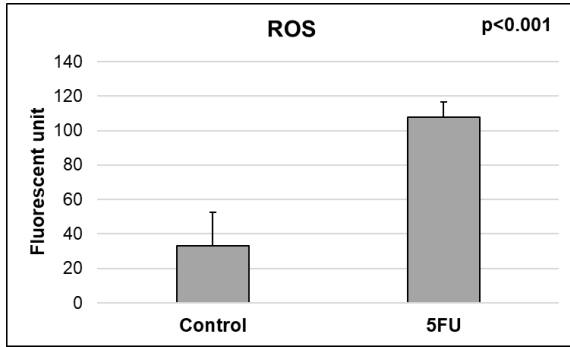
Concentrações testadas (μ M)	Média \pm DP 24h	Média \pm DP 48h	Média \pm DP 72h
1.56	85.8 \pm 8.7	87.0 \pm 4.6	69.7 \pm 4.4
3.12	118.5 \pm 16.2	90.9 \pm 10.9	82.5 \pm 19.7
6.25	89.3 \pm 8.0	98.5 \pm 2.2	88.9 \pm 11.5
12.5	85.6 \pm 9.0	73.4 \pm 9.5	77.0 \pm 8.2
25	91.1 \pm 6.0	76.6 \pm 14.2	83.4 \pm 11.0
50	82.9 \pm 11.9	69.3 \pm 4.3	77.0 \pm 15.0
100	77.6 \pm 12.7	64.0 \pm 14.0	73.2 \pm 1.5
200	75.4 \pm 12.7	63.0\pm5.5	59.4 \pm 10.4

Todo o experimento foi realizado em quadruplicata amostral.

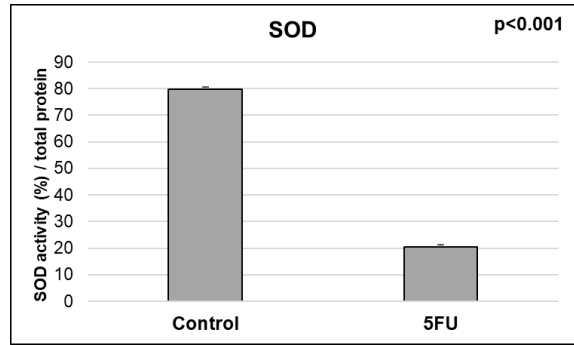
Fonte: A autora.

APÊNDICE B – Comparação do grupo 5FU em relação ao grupo Controle (células expostas somente ao DMSO). Os métodos adotados para quantificação foram os mesmos descritos no item Material e Métodos.

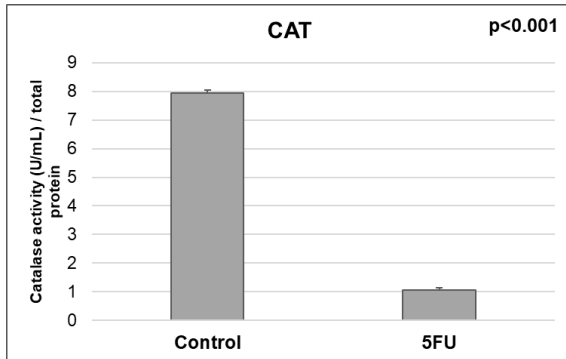
Média (\pm desvio-padrão) da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos grupos controle e 5FU. Valor de p pelo teste t de Student.



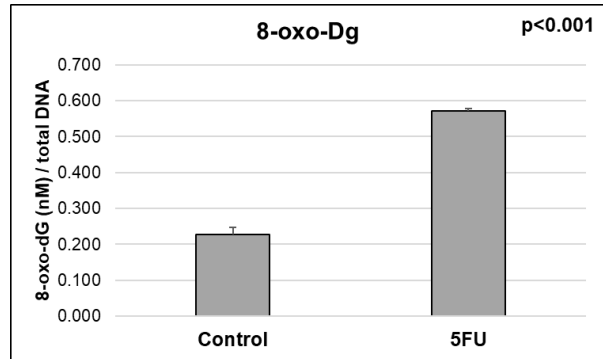
Média (\pm desvio-padrão) da atividade de superóxido dismutase (SOD) nos grupos controle e 5FU. Os dados foram normalizados pelo total de proteínas nos dois grupos. Valor de p pelo teste t de Student.



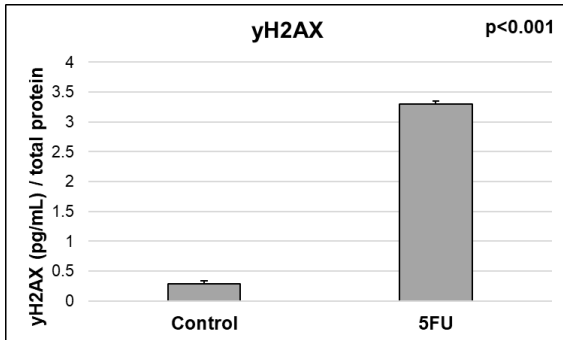
Média (\pm desvio-padrão) da atividade de catalase (CAT) nos grupos controle e 5FU. Os dados foram normalizados pelo total de proteínas nos dois grupos. Valor de p pelo teste t de Student.



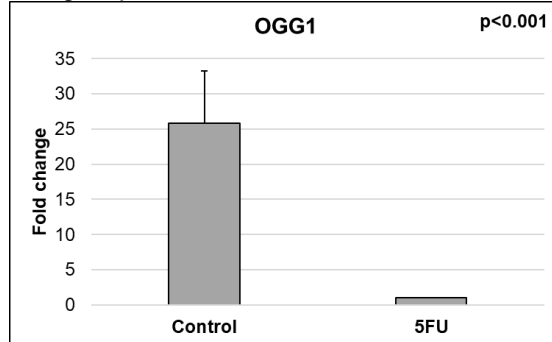
Média (\pm desvio-padrão) da expressão de 8-oxo-Dg nos grupos controle e 5FU. Valor de p pelo teste t de Student.



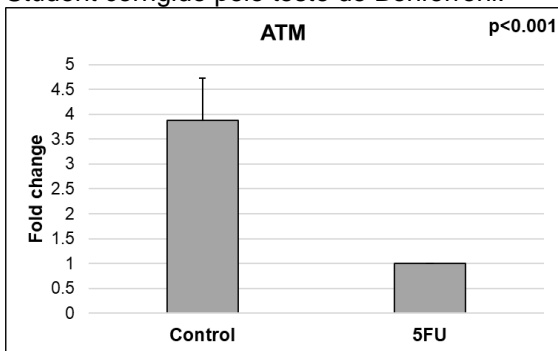
Média (\pm desvio-padrão) da expressão de γ H2AX nos grupos controle e 5FU. Valor de p pelo teste t de Student.



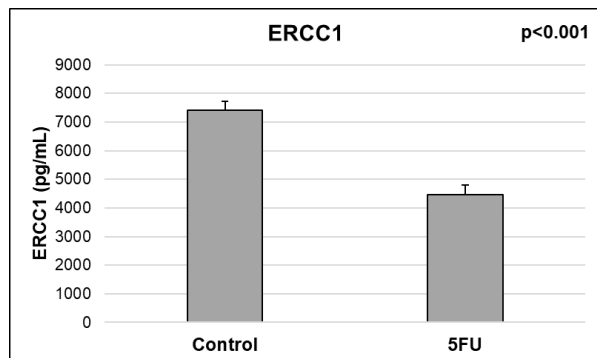
Média (\pm desvio-padrão) da expressão relativa do gene OGG1 do grupo controle em relação ao 5FU. ** $p < 0.01$. Valor de p pelo teste t de Student corrigido pelo teste de Bonferroni.



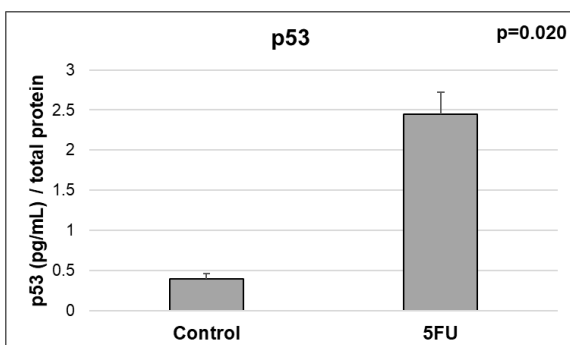
Média (\pm desvio-padrão) da expressão relativa do gene ATM do grupo controle em relação ao 5FU. ** $p < 0.01$. Valor de p pelo teste t de Student corrigido pelo teste de Bonferroni.



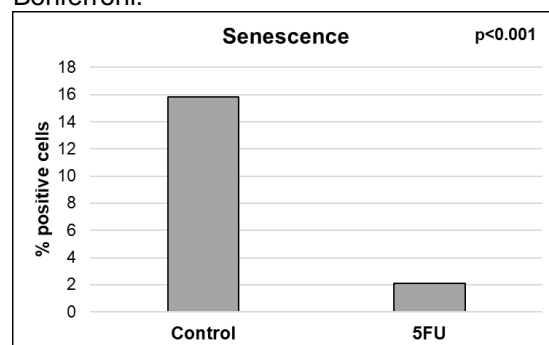
Média (\pm desvio-padrão) da expressão de ERCC1 nos grupos controle e 5FU. Valor de p pelo teste t de Student.



Média (\pm desvio-padrão) da expressão de p53 nos grupos controle e 5FU. Valor de p pelo teste t de Student.



Frequência (%) de células exibindo senescência nos grupos controle e 5FU. Valor de p obtido pelo teste do qui-quadrado com correção de Bonferroni.



ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da laserterapia de baixa potência sobre o estresse oxidativo e o reparo no DNA em células da mucosa oral expostas a agentes quimioterápicos e a radiação gama: estudo in vitro

Pesquisador: Luciana Corrêa

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08332519.8.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.311.752

Apresentação do Projeto:

Este trabalho será experimental, serão utilizados queratinócitos isolados a partir de fragmentos de gengiva saudável de pacientes com indicação de exodontia de terceiros molares inclusos e semi-inclusos na qual há necessidade de retalho gengival. Os fragmentos serão coletados em meio de DMEM e serão transferidos, onde serão submetidos a digestão enzimática com dispase e tripsina para isolamento dos queratinócitos gengivais. Os queratinócitos serão então submetidos ao tratamento com radioterapia ou quimioterapia. Serão feitas três sessões de laserterapia, nos tempos de 24, 48 e 72h após os tratamentos. Os demais testes de avaliação do efeito da laserterapia, serão realizados após 24h de finalizada a última sessão de FBM. Serão realizados os ensaios de MTS, TUNEL, senescência celular e cometa. Será avaliado também a quantificação de espécies reativas de oxigênio, da guanina oxidada 8oxodG e das proteínas superóxido dismutase, catalase, glutatona redutase. Será quantificado também a expressão das proteínas -H2AX, ERCC1, OGG1, ATM e p53.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar o efeito de diferentes densidades de energia de laserterapia de baixa potência sobre o estresse oxidativo e os danos/reparo no DNA de queratinócitos orais expostos a radiação gama e

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.311.752

a agentes quimioterápicos. Objetivo Secundário: Verificar o efeito da laserterapia de baixa potência (0,6J - 6,67J/cm²; 1,2J - 13,33J/cm²; 3J - 33,33J/cm², 6J - 66,67J/cm²) sobre a produção de EROs, 8oxodG e expressão de proteínas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase) em queratinócitos tratados com radioterapia, melfalano, 5-FU e metotrexato; b) verificar o efeito da laserterapia de baixa potência sobre a fragmentação do DNA e a expressão de H2AX, ERCC1, OGG1, ATM e p53, em queratinócitos tratados com os agentes antineoplásicos citados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A doação de fragmentos de gengiva para essa pesquisa representa um risco mínimo, sem implicação de ordem física ou psicológica. Depois de serem extraídos, os fragmentos de gengiva serão armazenados e levados para o laboratório para que as células sejam retiradas.

Benefícios:

Essa pesquisa visa analisar o efeito da laserterapia em células isoladas dos fragmentos de gengiva e tratadas com radioterapia e quimioterapia, sem benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os resultados da pesquisa poderão contribuir para o entendimento do mecanismo de FBM sobre a mucosa oral agredida com agentes antineoplásicos genotóxicos, demonstrando qual densidade de energia pode ser considerada segura em termos de estabilidade genômica dos queratinócitos orais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

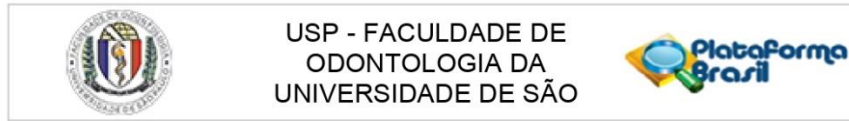
TCLE, projeto detalhado, folha de rosto, carta do biobanco, autorização da clínica e cronograma.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227	CEP: 05.508-900
Bairro: Cidade Universitária	
UF: SP	Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814
	E-mail: cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 3.311.752

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1289903.pdf	12/04/2019 13:57:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	12/04/2019 13:54:13	Flávia Cristina Perillo Rosin	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	12/04/2019 13:53:44	Flávia Cristina Perillo Rosin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	12/04/2019 13:53:23	Flávia Cristina Perillo Rosin	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	14/03/2019 17:05:21	Flávia Cristina Perillo Rosin	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	15/02/2019 09:03:01	Flávia Cristina Perillo Rosin	Aceito
Outros	Autorizacaoclinica.pdf	13/02/2019 18:33:29	Flávia Cristina Perillo Rosin	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Maio de 2019

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br