


AValiação de EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A LED AZUL E A LASER VERMELHO DE BAIXA POTÊNCIA EM CULTURAS DE *ESCHERICHIA COLI* E PLASMÍDEOS

EVALUATION OF EFFECTS OF EXPOSURE TO LOW POWER BLUE LED AND RED LASER IN *ESCHERICHIA COLI* AND PLASMIDS

Mariana Costa Silva¹, Lucas Resende de Andrade da Cunha¹, Bruno Alves Quadro Gallotte¹, Adenilson de Souza da Fonseca² 

¹Acadêmica do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do UNIFESO, Teresópolis, RJ, ²Docente do Curso de Graduação em Medicina do UNIFESO, Teresópolis, RJ

Resumo

LEDs (*light emitting diodes*) e lasers (*light amplification by stimulated emission of radiation*) de baixa potência são fontes de radiação não ionizante utilizadas em protocolos terapêuticos para cicatrização de feridas, fraturas ósseas, lesões musculares e redução da dor com base na fotobiomodulação. Entretanto, ainda há dúvidas sobre seus mecanismos de ação em nível molecular e celular, bem como se estas radiações causam danos no DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar a sobrevivência e a forma de células em culturas de *Escherichia coli* proficientes e deficientes no reparo do DNA e o perfil eletroforético de plasmídeos expostos ao LED azul e ao laser vermelho de baixa potência. Para tal, culturas de *E. coli* proficientes (AB1157), deficientes em endonuclease III (JW1625) e endonuclease VIII (JW0704) e plasmídeos foram expostas ao LED azul (160, 320 e 640 J/cm²) e ao laser vermelho (3, 6 e 12 J/cm²). Alíquotas destas culturas foram diluídas, espalhadas em placas de Petri contendo meio nutritivo e as frações de sobrevivência foram calculadas. Outras alíquotas foram espalhadas em lâminas para microscópio para avaliação morfológica. Alíquotas de plasmídeos pUC19 foram expostas ao LED azul e ao laser vermelho, submetidas à eletroforese em gel de agarose e as formas plasmidiais foram avaliadas. Os resultados obtidos sugerem que a sobrevivência e a área das células em culturas de *E. coli* AB1157, JW1625 e JW0704 expostas ao LED azul de baixa potência não foram alteradas. Entretanto, a exposição simultânea ao LED azul e laser vermelho reduziu significativamente a sobrevivência e a área de células em culturas de *E. coli* JW0704. Não foram observadas alterações nas formas de plasmídeos expostos ao LED azul e ao laser vermelho. Nossa pesquisa sugere que a exposição ao LED azul e ao laser vermelho de baixa potência pode diminuir a sobrevivência em culturas de *E. coli* deficientes no reparo de lesões oxidativas no DNA.

Palavras-chave: *E. coli*, fotobiomodulação, laser, LED, DNA.

Abstract

Low power LEDs (*light emitting diodes*) e lasers (*light amplification by stimulated emission of radiation*) are non-ionizing radiation sources used in therapeutic protocols for wound healing, bone fractures, muscle injuries and pain relief based on photobiomodulation. However, there are doubts about their mechanisms of action at molecular and cellular levels as well as if these radiations cause damages in DNA. The objective of this study was to evaluate survival and morphology of cells in *Escherichia coli* cultures proficient and deficient in DNA repair and electrophoretic profile of plasmids exposed to low power blue LED and red laser. For this, proficient (AB1157), and deficient in endonuclease III (JW1625) and endonuclease VIII (JW0704), *E. coli* cultures and plasmids were exposed to low power blue LED (160, 320 e 640 J/cm²) and red laser (3, 6 e 12 J/cm²). Aliquots from these cultures were diluted, spread onto Petri dishes containing nutritive medium and the survival fractions were calculated. Other aliquots were spread on slices for microscopy for morphological evaluation. Aliquots of plasmid pUC19 were exposed to blue LED and red laser, submitted to electrophoresis in agarose gels and the plasmid forms were evaluated. Results obtained suggest that the survival and area of cells in *E. coli* AB1157, JW1625 e JW0704 cultures exposed to low power blue LED were not altered. However, simultaneous exposure to blue LED and red laser reduced significantly the survival and the area of cells in *E. coli* JW0704 cultures. No alterations were

obtained in plasmids exposed to blue LED and red laser. Our research suggests that exposure to low power blue LED and red laser decreases the survival in *E. coli* cultures deficient in repair of oxidative damages in DNA.

Keywords: *E. coli*, photobiomodulation, laser, LED, DNA.

Introdução

LEDs (acrônimo para *light emitting diodes*) são fontes de radiação quase monocromática (geralmente emitem numa faixa de comprimento de onda de 10 nm), não coerente e não colimada. Atualmente, estão comercialmente disponíveis LEDs de baixa potência para aplicações terapêuticas que emitem numa ampla faixa do espectro eletromagnético (do ultravioleta ao infravermelho). *Laser* (acrônimo para *light amplification by stimulated emission of radiation*) são fontes de radiação eletromagnética monocromática, coerente, de alta colimação e alta densidade de energia (SVELTO & HANNA, 1998). *Lasers* terapêuticos de baixa potência, em geral, emitem radiação do vermelho ao infravermelho (a chamada janela terapêutica), no modo contínuo ou pulsado (NIEMZ, 2007).

Os LEDs e *lasers* de baixa potência têm atraído grande atenção devido as suas aplicações terapêuticas. Estas aplicações se baseiam na chamada fotobioestimulação, cujo primeiro relato foi feito em 1967 por Endre Mester (MESTER & MESTER, 2017). De fato, *lasers* e LEDs de baixa potência vêm sendo utilizados em protocolos terapêuticos para cicatrização de feridas (VAGHARDOOST et al., 2018) e de fraturas ósseas (BAEK et al., 2017), lesões na cavidade oral (AHAD et al., 2017) e musculares (KISSELEV & MOSKVIN, 2019) e para reduzir a sensação álgica (TARADAJ et al., 2019). Estas terapias têm sido utilizadas com sucesso por fisioterapeutas, dentistas, enfermeiros e médicos para tratamento de diferentes doenças em tecidos moles e no tecido ósseo (HAMBLIN et al., 2016), bem como para tratamentos estéticos por biomédicos. Entretanto, seus efeitos biológicos necessitam ainda de estudos para que sejam melhor compreendidos e que suas aplicações

clínicas possam ser mais eficazes. Na literatura, são encontrados estudos sobre os efeitos biológicos dos LEDs e *lasers* de baixa potência em culturas de células procarióticas (FONSECA et al., 2010) e eucarióticas (TRAJANO et al., 2016), em animais (TRAJANO et al., 2015) e em humanos (ESLAMIAN et al., 2011), que seriam consequências dos efeitos fotofísicos, fotoquímicos e/ou fotobiológicos destas radiações não ionizantes (KARU, 2003).

Justificativa

Embora resultados importantes sobre os efeitos biológicos destes LEDs e *lasers* tenham sido obtidos, para muitos destes efeitos, a relação dose-resposta, potência-resposta ou frequência-resposta não foi ainda obtida e/ou os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pelos efeitos observados em doses utilizadas em protocolos terapêuticos não são completamente compreendidos. Além disso, atualmente, novos equipamentos estão comercialmente disponíveis, nos quais são propostas novos protocolos terapêuticos baseados na irradiação simultânea com LEDs e *lasers* de baixa potência. Em adição, há uma grande diversidade de protocolos e as diferentes condições de irradiação utilizadas nos estudos científicos e clínicos, bem como aquelas utilizadas na prática terapêutica dificultam a comparação dos resultados experimentais e clínicos.

Destá forma, apesar do significativo número de estudos encontrados na literatura, as informações sobre os efeitos da exposição às radiações emitidas por LEDs, *lasers* e, ainda menos, pela exposição simultânea às radiações emitidas por estas fontes em sistemas biológicos não são conclusivas, sendo, em sua maioria, relatos de casos clínicos ou observações com pouco embasamento científico. A maioria dos protocolos é

desenvolvida empiricamente, resultando em doses que variam de poucos a muitos Joules (DA FONSECA, 2019). Por um lado, a melhor compreensão do fenômeno fotobiológico e uma dosimetria adequada podem aprimorar e aumentar as aplicações clínicas seguras dos LEDs e *lasers* de baixa potência. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a sobrevivência e a forma de células em culturas de *Escherichia coli* proficientes e deficientes no reparo do DNA e o perfil eletroforético de plasmídeos expostos ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

Metodologia

LED e *laser* de baixa potência e reagentes químicos

Neste estudo, foi utilizado equipamento (modelo Fluence, HTM, Brasil) composto de aplicador com LED com emissão no espectro da luz azul (470 nm, 5,36/cm², *spot size* de 0,28 cm²) e *laser* com emissão no espectro da luz vermelha (658 nm, 0,80 W/cm², *spot size* de 0,13 cm²).

Ágar bacteriológico e caldo nutriente foram obtidos da HiMedia (Índia). Hidroximetil aminometano (TRIS), ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), ácido bórico, glicerol, xileno cianol, azul de bromofenol e agarose foram da Merck (EUA). Cloreto de sódio foi obtido da Vetec (Brasil). GelRed foi da Sigma (EUA) e plasmídeos pUC19 foi obtido da New England Biolabs (EUA).

Ensaio de sobrevivência bacteriana

Culturas de *E. coli* AB1157 (selvagem em relação aos mecanismos de reparo do DNA), JW1625 (deficiente em endonuclease III) e JW0704 (deficiente em endonuclease VIII) na fase estacionária de crescimento (10¹⁰ células/mL, 18 horas, 37 °C) foram expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência. As culturas foram centrifugadas (700xg, 15 minutos, centrífuga clínica) e suspensas duas vezes em solução salina (NaCl

0,9%) estéril. Em seguida, alíquotas das suspensões bacterianas foram expostas ao LED azul de baixa potência (nas fluências de 160, 320 e 640 J/cm²) e, simultaneamente, ao LED azul e ao *laser* vermelho (nas fluências de 3, 6 e 12 J/cm²). Suspensões bacterianas não expostas ao LED e ao *laser* foram utilizadas como controles. As fontes LED azul e *laser* vermelho foram posicionadas a 6 cm da superfície das alíquotas de suspensões bacterianas. Imediatamente após a irradiação, alíquotas das suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina (NaCl a 0,9%) estéril e espalhadas sobre placa de *Petri* contendo meio rico sólido (1,5% de ágar). As unidades formadoras de colônias, formadas durante a incubação de 18 horas a 37°C, foram contadas e as frações de sobrevivência foram calculadas (FONSECA et al., 2010; DA SILVA SERGIO et al., 2012). Os resultados foram representados como a média e desvio padrão das frações de sobrevivência obtidas em cinco ensaios independentes.

Análise da área de células bacterianas expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho

Para avaliar a área de células de *E. coli* AB1157, JW1625 e JW0704, culturas em fase estacionária de crescimento foram expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa intensidade como descrito no ensaio de sobrevivência bacteriana. Suspensões bacterianas não expostas ao LED e ao *laser* foram utilizadas como controles. Após a exposição, alíquotas foram espalhadas em lâminas para microscopia de luz e coradas segundo método de *Gram* (CAPPUCCINO & SHERMAN, 1999). As células bacterianas foram visualizadas em microscópio e fotografadas. As áreas das células bacterianas foram medidas através do *software Image J* e as razões de áreas das células foram calculadas dividindo-se a área de cada célula exposta ao LED azul e *laser* vermelho de baixa potência pela média das áreas das células não expostas ao LED azul e *laser* vermelho de baixa potência

(FONSECA et al., 2011). Os resultados foram expressos com a média e desvio padrão da razão de área das células expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho e não expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho (grupo controle). Os resultados foram obtidos em três experimentos independentes.

Perfil eletroforético, em géis de agarose, de plasmídeos expostos ao LED

Os perfis eletroforéticos de plasmídeos em géis de agarose foram utilizados como modelo experimental para avaliar lesões no DNA (FONSECA et al., 2010). Para tal, plasmídeos pUC19 (100ng, aproximadamente) foram expostos ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência, nas mesmas condições descritas no ensaio de sobrevivência bacteriana. Alíquotas de plasmídeos não expostas ao LED e ao *laser* foram utilizadas como controles. Em seguida, cada amostra de plasmídeo foi misturada a 2 μ L de tampão de carregamento (azul de bromofenol, xileno cianol, glicerol 30%), 2 μ L de corante GelRed e aplicado em gel de agarose a 0,8% em câmara horizontal de eletroforese com tampão TRIS-borato-EDTA (5,4g de tris, 2,75g de ácido bórico e 0,4775g de EDTA em 1 litro de água destilada). Após a eletroforese, as formas dos plasmídeos foram visualizadas sob fluorescência usando um sistema de transiluminação ultravioleta. As imagens dos géis foram capturadas através da câmera digital (Canon PowerShot S5IS, China) e as formas dos plasmídeos foram semiquantificadas usando o *software Image J* para obtenção das porcentagens das formas plasmídias (FONSECA et al., 2010; FONSECA et al., 2012). Os resultados foram representados como a média e desvio padrão das porcentagens das formas plasmídias obtidas em quatro ensaios independentes.

Análise estatística

Os valores de fração de sobrevivência, razão de área das células bacterianas e

porcentagens das formas plasmídias foram apresentados como média e desvio padrão. A distribuição normal dos dados foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e a comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de um critério seguida de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$ como menor nível de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o *software InStat Graphpad*.

Resultados

Avaliação da sobrevivência em culturas de E. coli expostas ao LED azul e ao laser vermelho de baixa potência

Culturas de *E. coli* AB1157, JW1625 e JW0704 foram expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências e a sobrevivência nestas culturas foi avaliada. Na figura 1, estão apresentadas as frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* AB1157 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências.

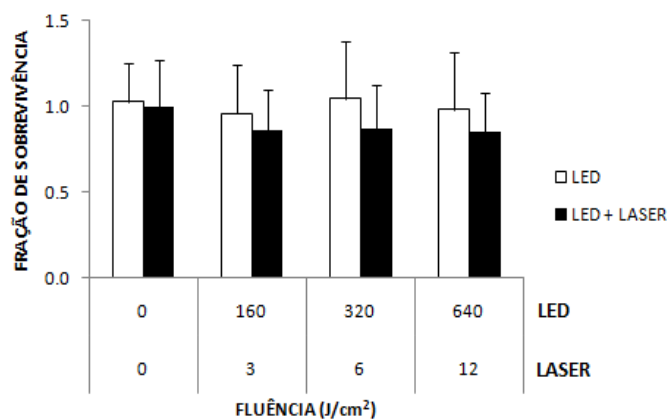


Figura 1: Frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* AB1157 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

Os resultados apresentados nesta figura sugerem que as frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* AB1157 expostas somente ao LED azul de baixa potência não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) quando comparadas com o grupo controle (culturas bacterianas não expostas ao LED azul e ao *laser*

vermelho). A exposição simultânea ao LED azul e ao *laser* vermelho também não foi capaz de diminuir significativamente ($p > 0,05$) a sobrevivência nestas culturas.

Na figura 2, estão apresentadas as frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* JW1625 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências.

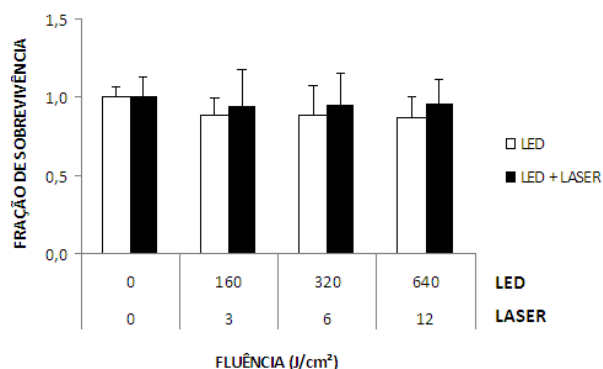


Figura 2: Frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* JW1625 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

Similar ao obtido com as culturas da cepa selvagem, os resultados apresentados nesta figura sugerem que as frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* JW1625 expostas somente ao LED azul, ou expostas simultaneamente ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência, não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) quando comparadas com o grupo controle (culturas bacterianas não expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho).

Na figura 3, estão apresentadas as frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* JW0704 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências.

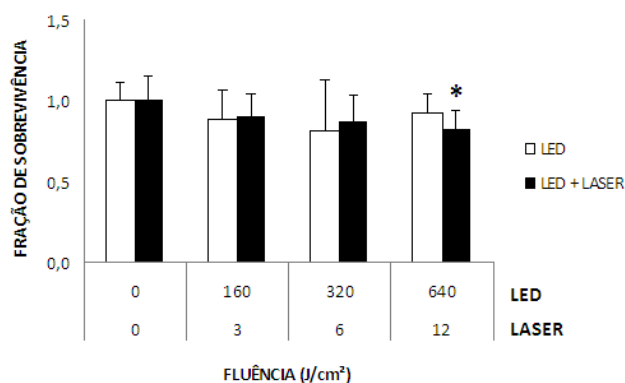


Figura 3: Frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* JW0704 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

Os resultados apresentados nesta figura sugerem que as frações de sobrevivência em culturas de *E. coli* JW0704 expostas ao LED azul de baixa potência não sofreram reduções significativas ($p < 0,05$) quando comparadas com o grupo controle (culturas bacterianas não expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho). Entretanto, a exposição simultânea ao LED azul e ao *laser* vermelho foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência nestas culturas na maior fluência utilizada.

Avaliação da área de células bacterianas expostas ao LED azul e ao laser vermelho

Alíquotas de suspensões bacterianas foram expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências, espalhadas em lâminas para microscopia de luz e coradas segundo o método de Gram, visualizadas em microscópio e fotografadas.

A figura 4 são fotografias de esfregaços de culturas de *E. coli* proficientes expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

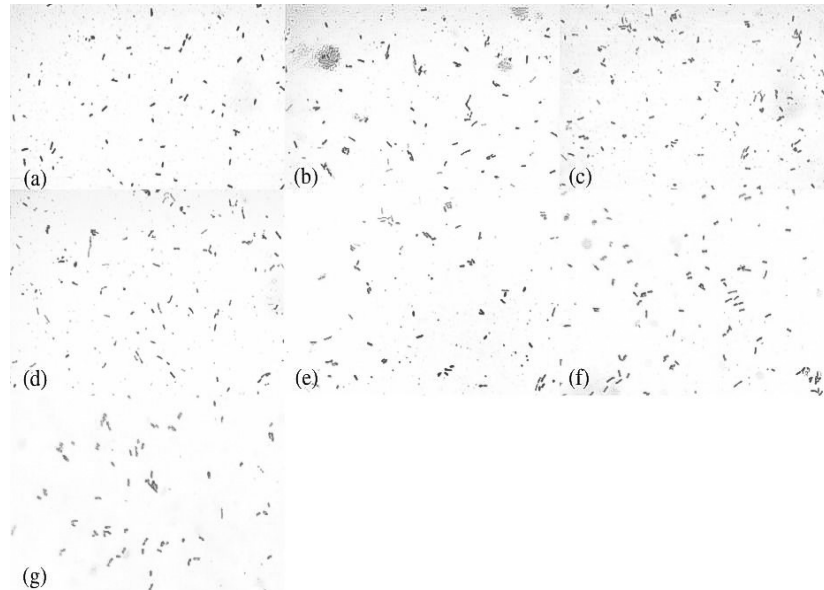


Figura 4: Fotografias representativas de esfregaços de culturas de *E. coli* AB1157: (a) grupo controle; (b) grupo LED 160J/cm²; (c) grupo LED 320J/cm²; (d) grupo LED 640J/cm²; (e) grupo LED 160J/cm² + *laser* 3J/cm²; (f) grupo LED 320J/cm² + *laser* 6J/cm²; (g) grupo LED 640J/cm² + *laser* 12J/cm². Fotografias obtidas com objetiva de aumento de 100 vezes.

Na figura 5, estão apresentadas as razões de área de *E. coli* AB1157 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências.

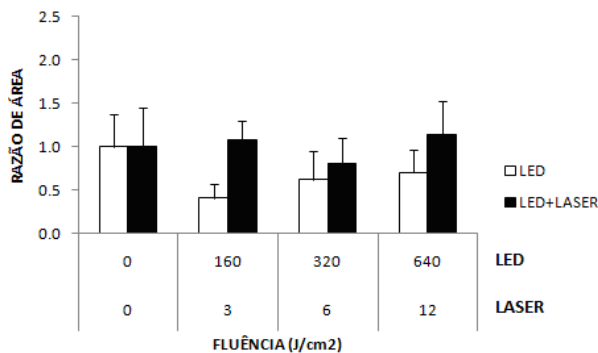


Figura 5: Razões de área de *E. coli* AB1157 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

Os resultados apresentados nesta figura sugerem que as células de *E. coli* AB1157 expostas somente ao LED de baixa potência não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) nas razões da área quando comparadas com o grupo controle (células não expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho). A exposição simultânea ao LED azul e ao *laser* vermelho também não foi capaz de causar alterações nas áreas destas células.

A figura 6 são fotografias representativas de esfregaços de culturas de *E. coli* JW1626 (deficientes em endonuclease III) expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

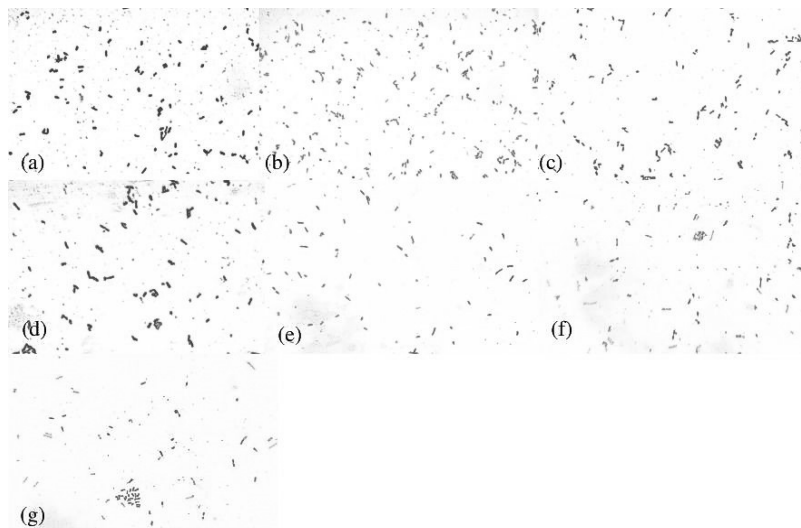


Figura 6: Fotografias representativas de esfregaços de culturas de *E. coli* JW1625: (a) grupo controle; (b) grupo LED 160J/cm²; (c) grupo LED 320J/cm²; (d) grupo LED 640J/cm²; (e) grupo LED 160J/cm² + *laser* 3J/cm²; (f) grupo LED 320J/cm² + *laser* 6J/cm²; (g) grupo LED 640J/cm² + *laser* 12J/cm². Fotografias obtidas com objetiva de aumento de 100 vezes.

Na figura 7, estão apresentadas as razões de área de *E. coli* JW1625 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho em diferentes fluências.

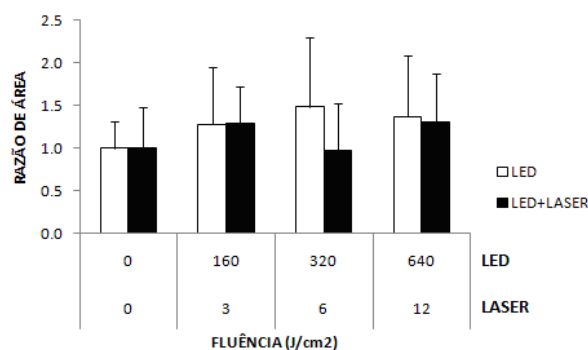


Figura 7: Razões de área de *E. coli* JW1625 expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

Similar aos resultados obtidos com a cepa selvagem, os resultados apresentados nesta figura sugerem que as células de *E. coli* JW1625 expostas somente ao LED azul, expostas simultaneamente ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência, não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) nas razões de área quando comparadas com o grupo controle (células não expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho).

A figura 8 são fotografias representativas de esfregaços de culturas de *E. coli* JW0704 (deficientes em endonuclease VIII) expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência.

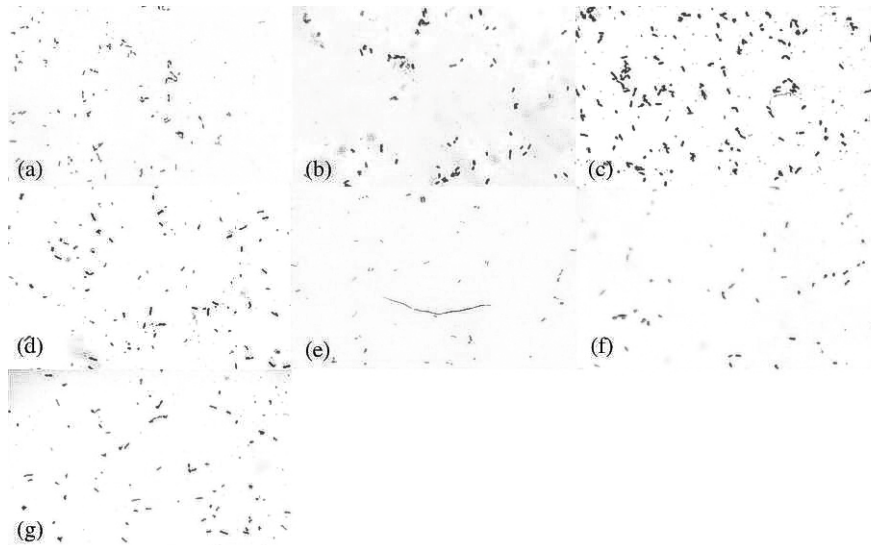


Figura 10: Fotografias de esfregaços de culturas de *E. coli* JW0704: (a) grupo controle; (b) grupo LED 160J/cm²; (c) grupo LED 320J/cm²; (d) grupo LED 640J/cm²; (e) grupo LED 160J/cm² + laser 3J/cm²; (f) grupo LED 320J/cm² + laser 6J/cm²; (g) grupo LED 640J/cm² + laser 12J/cm². Fotografias obtidas com objetiva de aumento de 100 vezes.

Na figura 9, estão apresentadas as razões de área de *E. coli* JW0704 expostas ao LED azul e ao laser vermelho em diferentes fluências.

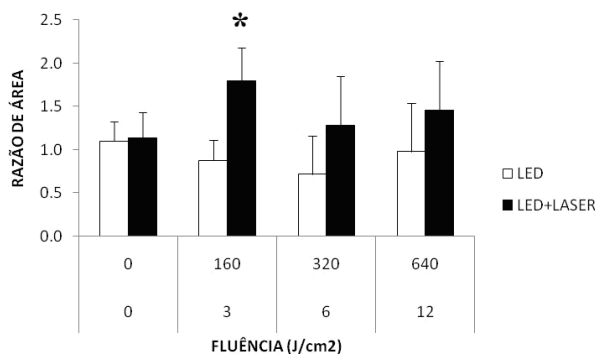


Figura 9: Razões de área de *E. coli* JW0704 expostas ao LED azul e ao laser vermelho de baixa potência. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o grupo exposto somente ao LED azul na fluência de 160 J/cm².

Os resultados apresentados nesta figura sugerem que as células de *E. coli* JW0704 expostas somente ao LED de baixa potência não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) na razão de área quando comparadas com o grupo controle (células não expostas ao LED azul e ao laser vermelho). Entretanto, a exposição simultânea ao LED azul na fluência de 160 J/cm² e ao laser vermelho na fluência de 3 J/cm² foi capaz de alterar significativamente ($p < 0,05$) as razões de área quando comparadas às razões de área das células expostas somente ao LED azul na fluência de 160 J/cm².

Avaliação do perfil eletroforético de plasmídeos pUC19 expostos ao LED azul e ao laser vermelho de baixa potência

Amostras de plasmídeos pUC19 foram expostas ao LED azul e ao laser vermelho em diferentes fluências e submetidas à eletroforese em gel de agarose (Figura 10).

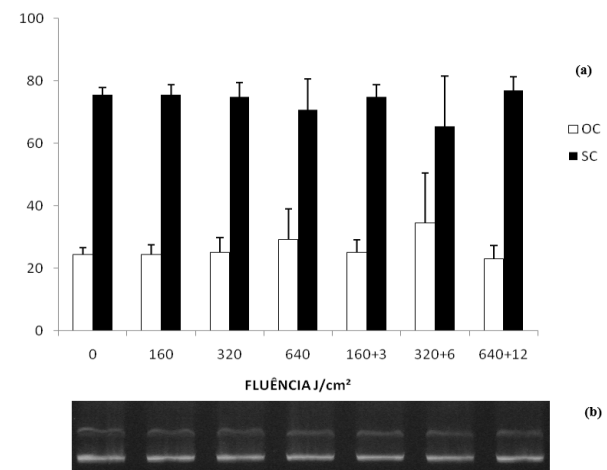


Figura 10: Gráfico das porcentagens de formas plasmidiais (a) e fotografia de gel de agarose (b) de plasmídeos expostos ao LED e ao laser de baixa potência. (0) controle, (160) LED 160J/cm², (320) LED 320J/cm², (640) LED 640J/cm², (160+3) LED 160J/cm² + laser 3J/cm², (320+6) LED 320J/cm² + laser 6J/cm², (640+12) LED 640J/cm² + laser 12J/cm².

Os resultados apresentados nesta figura sugerem que o perfil eletroforético dos plasmídeos pUC19 em géis de agarose expostos ao LED azul e ao laser vermelho de baixa potência não sofreram alterações significativas

quando comparadas com o grupo controle (amostras de plasmídeos não expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho).

Discussão

Neste estudo, foi avaliado os efeitos da exposição ao LED azul, simultaneamente ou não, ao *laser* vermelho de baixa potência em culturas de *E. coli*, proficientes e não proficientes em mecanismos de reparos de lesões oxidativas no DNA e em plasmídeos.

O efeito biomodulador dos LEDs e *lasers* tem sido avaliado através de protocolos experimentais baseados em cepas de *E. coli*. Nestes, foi sugerido que o efeito biomodulador de radiações emitidas por *lasers* de baixa potência apresenta uma relação dependente da fluência e da presença ou não dos mecanismos de reparo de DNA (MARCIANO et al., 2012; CANUTO et al., 2013; SERGIO et al., 2013).

Os resultados obtidos sugerem que a exposição à radiação azul emitida pelo LED de baixa potência não altera a sobrevivência em culturas de células proficientes em todos os mecanismos de reparo de lesões oxidativas no DNA (*E. coli* AB1157), ou seja, as frações de sobrevivência nestas culturas não foram alteradas de forma significativa (Figura 1). Estes resultados poderiam ser explicados pela presença dos mecanismos de reparo do DNA na cepa selvagem, conferindo-a maior resistência. De forma semelhante, os resultados sugerem que a exposição à radiação azul emitida por este LED não altera a sobrevivência em culturas de células deficientes em mecanismos de reparo de lesões oxidativas (*E. coli* JW1625 e JW0704) (Figuras 2 e 3). Estes resultados sugerem que a exposição à radiação azul emitida por LED de baixa potência não causaria lesões oxidativas no DNA. Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de *E. coli* deficientes em endonuclease III (JW1625) expostas simultaneamente à radiação azul e à radiação vermelha (Figura 2). Estes resultados estão em acordo com estudos realizados por Barboza et al. (2015), no qual foi verificada ausência de morte celular em culturas de *E. coli* JW1625

expostas ao *laser* vermelho. Entretanto, a exposição simultânea à radiação azul emitida pelo LED e à radiação vermelha emitida pelo *laser* foi capaz de reduzir a sobrevivência em culturas de *E. coli* deficientes em endonuclease VIII (JW0704) na maior fluência de LED (640 J/cm²) e de *laser* (12 J/cm²) (Figura 3). Estes resultados poderiam ser explicados pela maior sensibilidade desta cepa devido a falhas no mecanismo de reparo por excisão de bases. Como este mecanismo é o principal mecanismo envolvido no reparo de lesões oxidativas no DNA, estes resultados sugerem que a exposição às radiações emitidas pelo LED azul e o *laser* vermelho pode aumentar os níveis intracelulares de radicais livres. De fato, a sobrevivência em culturas de *E. coli* proficientes no mecanismo de reparo por excisão de bases (AB1157) expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho não foi alterada (Figura 1). Entretanto, nossos resultados não mostraram alteração da sobrevivência em culturas de *E. coli* deficientes em endonuclease III. Outros estudos realizados em nosso laboratório (FONSECA et al., 2010; MARCIANO et al. 2012; MARTINS et al., 2015) também sugeriram ausência de efeitos induzidos por *lasers* vermelho de baixa potência em culturas de *E. coli* deficientes no mecanismo de excisão de bases.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que células de *E. coli* proficientes nos mecanismos de reparo não apresentam alterações morfológicas quando expostas à radiação emitida pelo LED azul e à radiação emitida pelo *laser* vermelho de baixa potência (Figuras 4 e 5). Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de *E. coli* deficientes em endonuclease III (Figura 6 e 7). Estes resultados poderiam ser explicados novamente pela presença dos mecanismos de reparo por excisão de bases na cepa selvagem (AB1157) e pela presença da endonuclease VIII em células de *E. coli* JW1625. Martins et al. (2015) também reportaram a ausência de alterações na área de células proficientes em reparo por excisão de bases expostas ao *laser* vermelho de baixa potência. Entretanto, células de *E. coli*

deficientes em endonuclease VIII (JW0704) apresentaram alterações morfológicas quando expostas ao LED azul e ao *laser* vermelho (Figura 8 e 9). Estes resultados poderiam reforçar a hipótese de que a exposição simultânea ao LED azul e ao *laser* vermelho pode causar danos oxidativos nas células cujo reparo é dependente da endonuclease VIII. Pinheiro et al. (2014) também reportaram alteração morfológica (filamentação bacteriana) induzida pela exposição de culturas de *E. coli* JW0704 ao *laser* vermelho.

Para avaliar se a exposição às radiações emitidas pelo LED azul e pelo *laser* vermelho de baixa potência pode causar danos diretos ao DNA, plasmídeos pUC19 foram expostos a estas radiações e submetidos à eletroforese em gel de agarose. Os resultados obtidos sugerem que a exposição ao LED azul não altera o perfil eletroforético dos plasmídeos. Resultados semelhantes foram obtidos em amostras de plasmídeos expostos simultaneamente à radiação azul emitida pelo LED e ao *laser* vermelho de baixa potência (Figura 10). Estes resultados sugerem que a exposição a estas radiações, nas fluências avaliadas no presente estudo, não causaria quebras simples ou quebras duplas no DNA. Entretanto, outros resultados experimentais obtidos em nosso laboratório sugeriram que a exposição ao *laser* vermelho induz alterações no perfil eletroforético de plasmídeos bacterianos (FONSECA et al., 2010). Esta discrepância poderia ser explicada pela diferença de fluências utilizadas nos dois estudos.

Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a exposição ao LED azul e ao *laser* vermelho de baixa potência pode diminuir a sobrevivência e induzir alterações morfológicas em células de *E. coli* deficientes em endonuclease VIII. Portanto, nossa pesquisa sugere que os efeitos induzidos no DNA pela exposição simultânea às radiações emitidas pelo LED azul e pelo *laser* vermelho de baixa potência são dependentes da fluência e da

presença ou ausência dos mecanismos de reparo de lesões oxidativas no DNA.

Referências

- AHAD, A.; TASNEEM, S.; LAMBA, A. K.; KHAN, S. Healing of self-inflicted thermal injury of palatal mucosa by low-level laser therapy. **Spec Care Dentist** v. 37, p:314-317, 2017.
- BARBOZA, L. L.; CAMPOS, V. M. A.; MAGALHÃES, L. A. G.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on *Escherichia coli* cultures. **Braz J Med Biol Res** v.48 p:945-952, 2015.
- CANUTO, K. S.; SERGIO, L. P. S.; MARCIANO, R. S.; GUIMARÃES, O. R.; GELLER, M.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. DNA repair in bacterial cultures and plasmid DNA exposed to infrared laser for treatment of pain. **Laser Phys Lett** v.10 p:065606, 2013.
- CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. Benjamin Cummings Science Publishing: California, 1999.
- DA FONSECA, A. S. Is there a measure for low power laser dose? **Lasers Med Sci** v.34 p:223-234, 2019.
- DA SILVA SERGIO, L.P.; MARCIANO, R.; POLIGNANO, G. A. C.; GUIMARÃES, O. R.; GELLER, M.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-level Red Laser. **J Clin Exp Dermatol Res** v. 3 p:166, 2012.
- FONSECA, A. S.; GELLER, M.; VALENÇA, S.S.; PAOLI, F. Low Level Infrared Laser Effect on Plasmid DNA. **Lasers Med Sci** v.27, p:121-130, 2012.
- FONSECA, A. S.; MOREIRA, T. O.; PAIXÃO, D. L.; FARIA, F. M.; GUIMARÃES, O. R.; PAOLI, S.; GELLER, M.; PAOLI, F. Effect of Laser Therapy on DNA Damage. **Lasers Surg Med** v.42 p:481-488, 2010.

- FONSECA, A. S.; PRESTA, G. A.; GELLER, M.; PAOLI, F. Low Intensity Infrared Laser Induces Filamentation in Escherichia coli Cells. **Laser Phys** v.21, p:1829-1837, 2011.
- HAMBLIN, M. R.; SOUSA, M. V. P.; AGRAWAL, T. **Handbook of low-level laser therapy**. Pan Stanford Publishing Pte Ltd: New York, 2016.
- KARU, T. I. Low-Power *Laser* Therapy. In: VO-DINH, Tuan. **CRC Biomedical Photonics Handbook**. Crc Press: Boca Raton, p. 48-1-48-25, 2003.
- KISSELEV, S. B.; MOSKVIN, S. V. The Use of laser therapy for patients with fibromyalgia: a critical literary review. **J Lasers Med Sci** v.10 p:12-20, 2019.
- MARCIANO, R. S.; SERGIO, L. P. S.; POLIGNANO, G. A. C.; GUIMARÃES, O. R.; GELLER, M.; PAOLI, S.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Laser for treatment of aphthous ulcers on bacteria cultures and DNA. **Photochem Photobiol Sci** v.11 p:1476-1483, 2012.
- MARTINS, W. A.; POLIGNANO, G. A. C.; GUIMARÃES, O. R.; GELLER, M.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Dichromatic laser radiation effects on DNA of Escherichia coli and plasmids. **Laser Phys** v.25, p:045603, 2015.
- MESTER, A.; MESTER, A. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903-1984). **Photomed Laser Surg** V.35 P:393-394, 2017.
- NIEMZ, M. H. *Laser-tissue interactions: Fundamentals and applications*. Springer-Verlag: New York, 2007.
- PINHEIRO, C. C.; BARBOZA, L. L.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Low-level lasers affect cultures in hyperosmotic stress. **Laser Phys** v. 25 p:085602, 2015.
- SERGIO, L. P. S.; MARCIANO, R. S.; TEIXEIRA, G. R.; CANUTO, K. S.; POLIGNANO, G. A. C.; GUIMARÃES, O. R.; GELLER, M.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Therapeutic low-intensity red laser for herpes labialis on plasmid survival and bacterial transformation. **Photochem Photobiol Sci** v.12 p:930-935, 2013.
- SVELTO, O.; HANNA, D. C. *Principles of Laser*. Plenum Press: New York, 1998.
- TARADAJ, J.; RAJFUR, K.; RAJFUR, J.; PTASZKOWSKI, K.; PTASZKOWSKA, L.; SOPEL, M.; ROSIŃCZUK, J.; DYMAREK, R. Effect of laser treatment on postural control parameters in patients with chronic nonspecific low back pain: a randomized placebo-controlled trial. **Braz J Med Biol Res** v.52 p:e8474, 2019.
- TRAJANO, E. T. L.; TRAJANO, L. A. S. N.; SILVA, M. A. S.; VENTER, N. G.; PORTO, L. C. S.; FONSECA, A. S.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers Med Sci** v.30, p:1297-1304, 2015.
- TRAJANO, L. A. S. N.; STUMBO, A. C.; SILVA, C. L.; MENCALHA, A. L.; FONSECA, A. S. Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts. **Lasers Med Sci** v. 31, p:1161 - 1167, 2016.
- VAGHARDOOST, R.; MOMENI, M.; KAZEMIKHOO, N.; MOKMELI, S.; DAHMARDEHEI, M.; ANSARI, F.; NILFOROUSHZADEH, M. A.; SABR JOO, P.; MEY ABADI, S.; NADERI GHARAGHESHLAGH, S.; SASSANI, S. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial). **Lasers Med Sci** v.33 p:603-607, 2018.

Apoio financeiro:

PICPq – Plano de Iniciação Científica e Pesquisa do UNIFESO.
 CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.