



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA  
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**BÁRBARA SAMPAIO DIAS MARTINS MANSANO**

**DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) VERMELHA PARA  
MELHORAR A EFICIÊNCIA DA TERAPIA COM CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS**

**São Paulo, SP  
2020**



**BÁRBARA SAMPAIO DIAS MARTINS MANSANO**

**DIODOS EMISSORES DE LUZ (LED) VERMELHA PARA  
MELHORAR A EFICIÊNCIA DA TERAPIA COM CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutora em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

**São Paulo, SP  
2020**

Mansano, Bárbara Sampaio Dias Martins.

Diodos emissores de luz (LED) vermelho para melhorar a eficiência da terapia com células tronco mesenquimais. / Bárbara Sampaio Dias Martins Mansano. 2020.

90 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Andrey Jorge Serra.

1. Fotobiomodulação. 2. Células tronco mesenquimais. 3. Diodos emissores de luz. 4. Terapia celular.

I. Serra, Andrey Jorge. II. Título.

CDU 615.831

Sso Paulo, 11 de dezembro de 2020.

TERMO DE APROVACAO

Aluno (a): Barbara Sampaio Dias Martins Mansano

Título da Tese: "Diodos emissores de luz (LED) vermelho para melhorar a eficiência da terapia com células tronco mesenquimais".

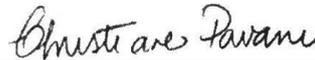


Presidente: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA \_\_\_\_\_

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS \_\_\_\_\_



Membro: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>^</sup>. CHRISTIANE PAVANI \_\_\_\_\_



Membro: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>^</sup>. ALESSANDRA MEDEIROS \_\_\_\_\_

Membro: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>^</sup>. JIMENA PAOLA HOCHMANN VALLS \_\_\_\_\_



Pela sua presença em todos os momentos bons e difíceis, dedico esta tese ao meu namorado Guilherme.

Pelo apoio moral e intelectual, também dedico este trabalho aos meus amigos Luiza e Vítor.

Vocês foram essenciais para que tudo isso acontecesse!

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto.

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e a todos os professores da pós graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, por toda a dedicação no meu processo de formação e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do doutorado.

Aos integrantes das bancas de qualificações e da defesa de tese, pela disponibilidade e por toda dedicação colocada neste trabalho. Todas as considerações realizadas foram de grande valia para a finalização da tese.

Ao Andrey, por ter sido meu orientador, pelas correções e ensinamentos que me ajudaram em um melhor desempenho nesta trajetória.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíacas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por me ajudarem a tornar esta pesquisa a mais completa possível.

À Martha, por ter me indicado para esta oportunidade de doutorado incrível e inesquecível, assim como por ter me ajudado na minha carreira profissional. Sempre irei te agradecer.

Ao Ednei, que sempre fez muito mais que o necessário e que desempenhou um papel de extrema importância nesta trajetória. Agradeço todos os ensinamentos e risadas durante esses anos.

Ao Vítor, o IC herdado que teve um papel gigantesco no meu doutorado, que o tempo todo me ensinou muito, que participou ativamente das correções desta tese e sempre se mostrou solícito para qualquer tipo de ajuda que eu necessitasse, que sempre fez muito mais que suas obrigações.

À Julia e à Nádia, as melhores e mais inteligentes ICs do mundo, por toda a ajuda psicológica e experimental. Agradeço por terem topado entrar nessa jornada comigo. Tenho certeza de que aprendi muito mais ensinando vocês que o contrário.

À Natália, pelo ombro amigo, carinho e toda a ajuda no laboratório de cultura. Agradeço toda a companhia, risadas e paciência de sempre.

Aos colegas de pós graduação, João Gabriel, Pâmella, Simone e Cláudia, pelas conversas e amizade. Vocês tornaram as aulas da pós muito mais leves e divertidas.

À Priscila, que de secretária da pós-graduação virou amiga. Agradeço pelas conversas, risadas e pelo quadrinho lindo. Seu talento é incrível.

Ao Luiz, amizade inusitada do intercâmbio. Quero te levar pro resto da vida. Agradeço todo o companheirismo, risadas e desabafos.

À Luiza, minha melhor amiga da vida, por sempre me apoiar e me ajudar em tudo. Sempre. Não tenho palavras para falar o quanto você é importante pra mim nem expressar o quanto agradeço por te ter em minha vida.

Ao Guilherme, meu namorado e companheiro de vida, por estar comigo nas minhas piores fases e me ajudar a enfrentar todas elas. Agradeço por sempre ser meu porto seguro, por ser a pessoa que me faz rir mesmo nas piores horas. Ainda bem que o destino permitiu que nos encontrássemos.

À Thaís, minha maior saudade de São Paulo, por toda a amizade, conversa e companheirismo. Agradeço pelas conversas, risadas, desabafos e por sempre estarmos nos apoiando. Te quero na minha vida pra sempre.

À Joana, um dos presentes mais inusitados que São Paulo me proporcionou, pelos passeios, conversas, apoio e amizade. Agradeço por todo o companheirismo. Fica na minha vida pra sempre.

À Coxinha, minha hamster, que virou estrela no começo do doutorado, mas que será lembrada pra sempre.

Ao Bernardo, meu filho felino, que não faz ideia do quanto é importante para mim.

E, por último, mas extremamente importante, a todos os ratinhos de laboratório, por estarem constantemente contribuindo para a pesquisa e para a evolução dos saberes da humanidade.

A todos, meus sinceros MUITO OBRIGADA. Sem vocês, nada disso seria possível.

## Stopping by Woods on a Snowy Evening

by Robert Frost

Whose woods these are I think I know.  
His house is in the village though;  
He will not see me stopping here  
To watch his woods, fill up with snow.

My little horse must think it queer  
To stop without a farmhouse near  
Between the woods and frozen lake  
The darkest evening of the year.

He gives his harness bells a shake  
To ask if there is some mistake.  
The only other sound's the sweep  
Of easy wind and downy flake.

The woods are lovely, dark and deep,  
But I have promises to keep,  
And miles to go before I sleep,  
And miles to go before I sleep.

## RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTM) são extensamente empregadas no tratamento de diversas doenças genéticas ou adquiridas, podendo ser encontradas na medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e placenta. Acredita-se que os benefícios do transplante das CTM são pautados principalmente na ação dos fatores de ação parácrina no microambiente, participando na proliferação celular local, angiogênese, imunossupressão e atenuação de apoptose e da formação de fibrose. Contudo, a baixa taxa de sobrevivência das células transplantadas e mau enxerto ainda são problemas a serem contornados. O decréscimo celular pode ocorrer por estresse mecânico inerente à preparação da suspensão de injeção, imunorrejeição, pobre aderência das CTM no tecido e morte celular causada pelo microambiente hostil do local transplantado. Assim, neste estudo, irradiamos as CTM com diodos emissores de luz (LED), buscando mudanças positivas no metabolismo celular e na secreção de citocinas e fatores de crescimento para melhorar a eficiência da terapia celular já existente. As CTM derivadas de tecido adiposo (CTMA) foram obtidas de ratos machos Fischer-344 e foram analisadas duas variantes: a repercussão de diferentes exposições radiantes (0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>) e a influência do número de irradiações (dose única ou uma vez a cada dois dias, totalizando três irradiações), utilizando irradiância de 15 mW/cm<sup>2</sup> e LEDbox de 630 nm (Biolambda, Brasil). O grupo controle foi mantido no escuro pelo mesmo tempo que o grupo 4 J/cm<sup>2</sup> e as análises foram realizadas 24 horas após a última irradiação. Com isso, obtivemos que as irradiações múltiplas tiveram uma melhor influência nas CTM em comparação à irradiação única. Nenhuma das exposições radiantes induziu estresse oxidativo, tanto nas concentrações de proteínas oxidadas quanto nas de MDA, danos ao DNA nem alterações na proliferação celular, secreção de TNF- $\alpha$ , proteínas de adesão celular ICAM-1 e L-selectina. A utilização de 0,5 e 2 J/cm<sup>2</sup> levou à uma queda na respiração mitocondrial sob estresse metabólico da basal, máxima e de vazamento de prótons. Ainda no grupo que recebeu irradiação de 0,5 J/cm<sup>2</sup>, observou-se aumento significativo dos níveis de VEGF, mas uma regulação negativa no nível de IL-10 em relação ao grupo não irradiado. A irradiação com 4 J/cm<sup>2</sup> melhorou a atividade mitocondrial nos marcadores de MTT e AlamarBlue, a produção de ATP e a secreção de IL-6, IGF-1 e índice NOx em relação ao Ct. Concluímos então, que o condicionamento com múltiplas irradiações de 4 J/cm<sup>2</sup> apresentou os melhores resultados para melhorar o metabolismo e os possíveis efeitos parácrinos das CTM, sendo bom candidato para a realização de futura terapia celular.

Palavras-chave: fotobiomodulação; células tronco mesenquimais; diodos emissores de luz; terapia celular.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are widely used in the treatment of various genetic or acquired diseases, and can be found in bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and placenta. It is believed that the benefits of transplanting MSCs are mainly based on the action of paracrine factors in the microenvironment, participating in local cell proliferation, angiogenesis, immunosuppression, and attenuation of apoptosis and the formation of fibrosis. However, the low survival rate of transplanted cells and poor grafting are still problems to be overcome. Cellular decrease can occur due to mechanical stress inherent to the preparation of the injection suspension, immune rejection, poor adherence of MSCs to tissue and cell death caused by the hostile microenvironment of the transplanted site. Thus, in this study, we irradiate MSCs with light emitting diodes (LED), looking for positive changes in cell metabolism and in the secretion of cytokines and growth factors to improve the efficiency of existing cell therapy. MSC derived from adipose tissue (CTMA) were obtained from male Fischer-344 rats and two variants were analyzed: the repercussion of different radiant exposures (0.5, 2 and 4 J/cm<sup>2</sup>) and the influence of the number of irradiations (dose single or once every two days, totalizing three irradiations), using irradiance of 15 mW/cm<sup>2</sup> and LEDbox of 630 nm (Biolambda, Brazil). The control group was kept in the dark for the same time as the 4 J/cm<sup>2</sup> group and the analyzes were performed 24 hours after the last irradiation. With that, we obtained that the multiple irradiations had a better influence on the MSC compared to the single irradiation. None of the radiant exposures induced oxidative stress, either in the concentrations of oxidized proteins and MDA, DNA damage or changes in cell proliferation and TNF- $\alpha$  secretion and cell adhesion proteins ICAM-1 and L-selectin. The use of 0.5 and 2 J/cm<sup>2</sup> led to a decrease in mitochondrial breathing under metabolic stress from baseline, maximum and proton leakage. Still in the group that received 0.5 J/cm<sup>2</sup> irradiation, a significant increase in VEGF levels was observed, but a negative regulation at the IL-10 level in relation to the non-irradiated group. Irradiation with 4 J/cm<sup>2</sup> improved mitochondrial activity in MTT markers and AlamarBlue, the production of ATP and the secretion of IL-6, IGF-1 and NOx index in relation to Ct. We conclude, then, that conditioning with multiple irradiations of 4 J/cm<sup>2</sup> presented the best results for improving the metabolism and the possible paracrine effects of MSCs, being a good candidate for future cell therapy.

Key words: photobiomodulation; mesenchymal stem cells; light emitting diode; cell therapy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Multipotência das CTM e suas origens.

Figura 2. Possíveis efeitos na terapia com CTM.

Figura 3. Fatores secretados pelas CTM e suas funções.

Figura 4. Procedimento de irradiação com LED.

Figura 5. Desenho experimental.

Figura 6. Preparação dos ensaios de citometria de fluxo para caracterização fenotípica das CTMA.

Figura 7. Caracterização fenotípica das CTMA.

Figura 8. Análise do estresse oxidativo em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 9. Análise qualitativa do DNA em CTMA sujeitas a uma (A) e três (B) irradiações com LED.

Figura 10. Secretoma de citocinas inflamatórias em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 11. Secretoma de fatores de crescimento em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 12. Secretoma de citocinas que participam da adesão celular em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 13. Dosagem da redução de nitrato para nitrito (índice NOx) secretado pelas CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 14. Conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 15. Atividade mitocondrial de CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 16. Proliferação por contagem de CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.

Figura 17. Respiração mitocondrial de CTMA sujeitas a três irradiações com LED.

## LISTA DE TABELA

Tabela 1. Parâmetros de irradiação com LED.

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Representação dos resultados das CTMA irradiadas em relação as não irradiadas dos experimentos realizados nas CTMA e no MC

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BSA – soro fetal bovino

C+ – controle positivo

CCCP – cianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona

CCO – citocromo c oxidase

CD – clusters de diferenciação

CEUA – comitê de ética no uso de animais

CT – células tronco

Ct – grupo controle

CTM – células tronco mesenquimais

CTMA – células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

CTMMO – células tronco derivadas de medula óssea

Ctrl – grupo controle

DMEM – modificação Dulbecco de meio mínimo essencial

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática

HGF – fator de crescimento de hepatócitos

hTERT – transcriptase reversa da telomerase humana

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL – interleucina

laser – amplificação de luz por emissão estimulada de radiação

LBI – laser de baixa intensidade

LED – diodos emissores de luz

L-selectina – molécula de adesão celular CD62L

MC – meio de cultura

MDA – malondialdeído

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO – óxido nítrico

NOx – soma de nitrato com nitrito

OCR – taxa de consumo de oxigênio

PBM – fotobiomodulação

PBS – tampão fosfato-salino

pH – potencial hidrogeniônico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SDS – dodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

TA – temperatura ambiente

TAE – tampão de Tris-Acetato-EDTA

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TE – solução de Tris-HCl e EDTA

TNES – tampão de Tris, NaCl e SDS

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

UNIFESP – universidade federal de são paulo

UNINOVE – universidade nove de julho

UV – ultra violeta

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{M}$  – micro molar

$\text{cm}^2$  - centímetro quadrado

h – hora

J – joules

M – molar

mA – miliamper

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mM – mili molar

mW – mili watts

nm – nano metro

nM – nano molar

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

rpm – rotação por minuto

s – segundo

V – volts

xg – força centrífuga relativa

# SUMÁRIO

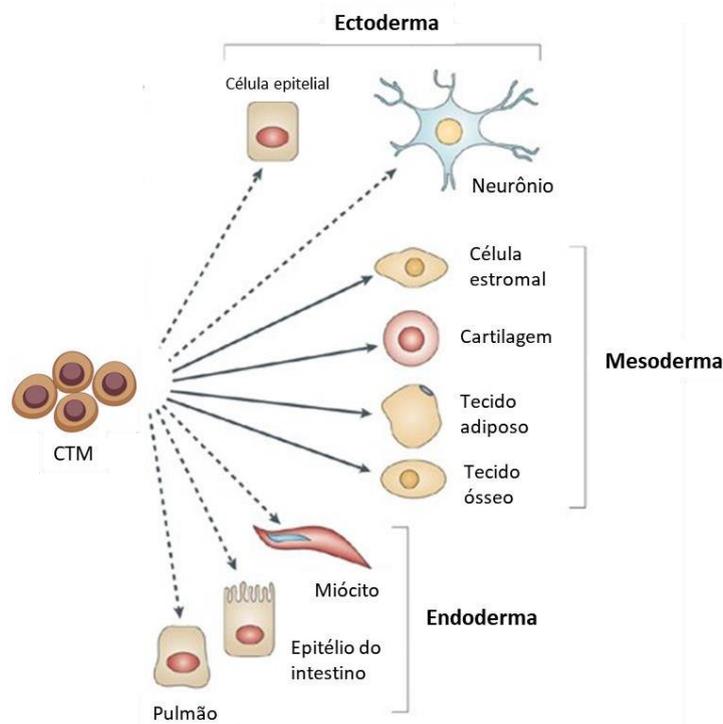
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 Células tronco mesenquimais (CTM)</b> .....	17
<b>1.1.1 Efeitos parácrinos das CTM</b> .....	18
<b>1.1.2 Terapias com CTM</b> .....	21
<b>1.1.3 Desafios no transplante de CTM</b> .....	22
<b>1.1.4 Abordagens para melhorar o transplante das CTM</b> .....	23
<b>1.2 Fotobiomodulação (PBM) e fontes de luz</b> .....	24
<b>1.2.1 Mecanismos moleculares da luz na ação celular</b> .....	25
<b>1.3 Efeitos da luz nas CTM</b> .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	27
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	27
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	28
<b>3.1 Extração e cultivo das CTMA</b> .....	28
<b>3.2 Irradiação com LED</b> .....	28
<b>3.3 Proliferação celular</b> .....	30
<b>3.4 Atividade mitocondrial</b> .....	30
<b>3.5 Extração e análise de dano do DNA</b> .....	31
<b>3.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	31
<b>3.7 Oxidação proteica</b> .....	32
<b>3.8 Teor de adenosina trifosfato (ATP)</b> .....	32
<b>3.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)</b> .....	32
<b>3.10 Dosagem de nitrato e nitrito (NOx)</b> .....	33
<b>3.11 Análise do estresse mitocondrial</b> .....	33
<b>3.12 Análise estatística</b> .....	34
<b>4. RESULTADOS</b> .....	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>ANEXO 1 – Termo de Aprovação pela CEUA</b> .....	68
<b>ANEXO 2 – Artigo submetido</b> .....	69

# 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 Células tronco mesenquimais (CTM)

Considerando os diferentes tipos de células tronco (CT), as CTM são extensamente empregadas no tratamento de diversas doenças genéticas ou adquiridas (1-4). Seu uso terapêutico é motivado por sua característica multipotente, facilidade técnica de isolamento e cultivo e destacada ação parácrina (5).

As CTM podem ser encontradas na medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e placenta. Durante nosso desenvolvimento, as CTM originam-se do mesoderma e, na presença de diferentes estímulos, se diferenciaram em diversas linhagens, como osteócitos, condrócitos, adipócitos, miócitos e estroma da medula. As CTM também possuem a capacidade de transdiferenciação por meio da camada germinativa, em linhagens da ectoderma e endoderma, como os neurônios e miócitos (Figura 1) (6, 7).



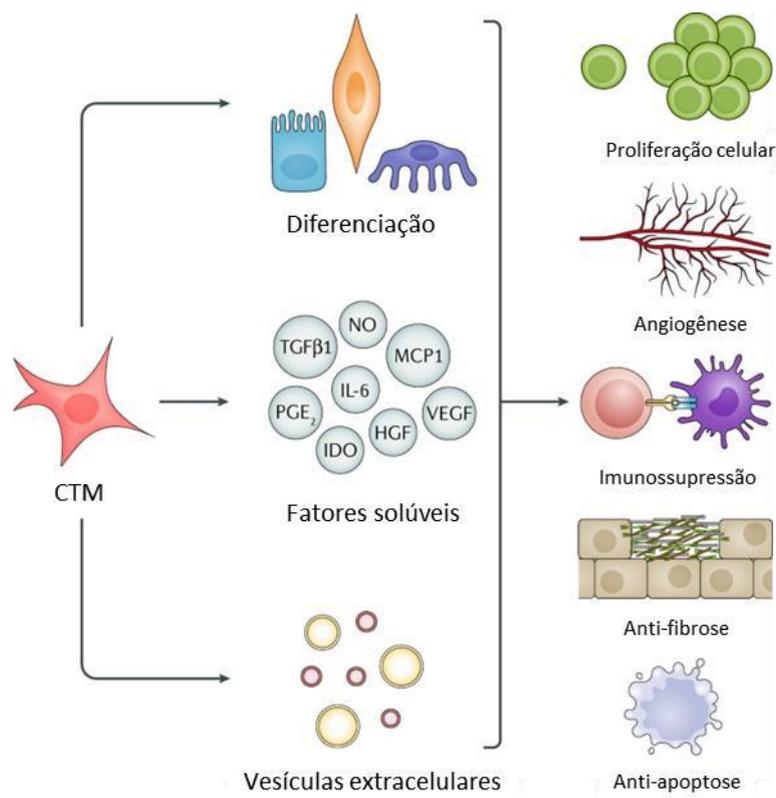
**Figura 1. Multipotência das CTM e suas origens.** Fonte: Modificado de: Uccelli e colaboradores (2008) (8).

As CTM de medula óssea (CTMMO) foram as primeiras a serem identificadas e isoladas em rato por Friedenstein e Petrakova (1966) (9). Essas células representam 0,001–0,01% da população total de células nucleadas na medula óssea (10, 11). Contudo, sua obtenção é invasiva, dolorosa, com potencial morbidade e baixo rendimento. Em contrapartida, a extração das CTM derivadas de tecido adiposo (CTMA) pode ser realizada facilmente com alta taxa de rendimento (12, 13). Além disso, ao comparar os dois tipos de CTM, Ikegame e colaboradores (2011) observaram maior produção dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de hepatócitos (HGF) por CTMA (14).

Resultados do nosso grupo de pesquisa ilustram que, no tratamento pós-infarto do miocárdio com CTM, o transplante de CTMMO em ratas infartadas aumentou a vascularização miocárdica, preveniu a expansão da área necrótica (15) e atenuou anormalidades estruturais, funcionais e moleculares cardíacas (16). Além disso, dados semelhantes foram recentemente obtidos com CTMA, em que observamos aumento da capilaridade, melhora da mecânica miocárdica, atenuação da disfunção ventricular e diminuição da cicatriz do infarto e apoptose de cardiomiócitos em ratas infartadas (3, 4).

### **1.1.1 Efeitos parácrinos das CTM**

Acredita-se que os benefícios do transplante das CTM são pautados em alguns mecanismos principais, como secreção de fatores parácrinos (solúveis e vesículas) no microambiente lesionado e indução de proliferação e de diferenciação endógena de CT e progenitores celulares (17). Com isso, estes mecanismos participariam na proliferação celular, angiogênese local, imunossupressão e atenuação de apoptose e da formação de fibrose (18) (Figura 2). Contudo, a possibilidade de as CTM participarem na promoção da proliferação e diferenciação celular ainda é controversa na literatura.

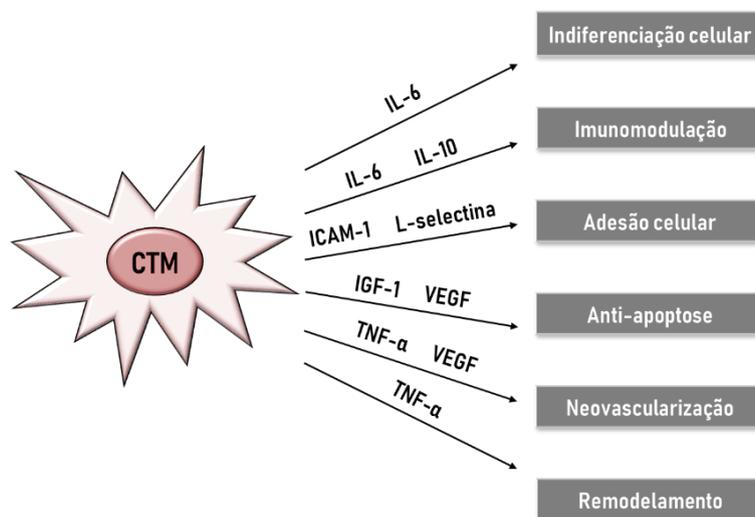


**Figura 2. Possíveis efeitos na terapia com CTM.** Fonte: Modificado de: Sun e colaboradores (2019) (18).

A atuação parácrina é o principal alvo de estudos com terapia de CTM (19-23). Tal ação pode ser mediada por fatores imunomodulatórios, como a interleucina 6 (IL-6) e a 10 (IL-10), angiogênicos, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), anti-apoptóticos, como o fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1) e VEGF, e de remodelamento cicatricial (TNF- $\alpha$ ) (Figura 3) (24-26). Dentre os fatores secretados pelas CTM, há aqueles que participam da indiferenciação, como a IL-6, da sobrevivência, como o IGF-1 e o VEGF, e da adesão celular no local transplantado, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a L-selectina.

Com isso, devido às CTM possuírem propriedades imunomodulatórias evidentes, elas são amplamente estudadas e usadas como nova ferramenta terapêutica em uma série de ensaios clínicos para o tratamento de doenças

como osteoartrite, osteogênica imperfeita, defeitos da cartilagem articular e fratura óssea (27).



**Figura 3. Fatores secretados pelas CTM e suas funções.** IL-6: Interleucina 6, IL-10: Interleucina 10, ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular 1, L-selectina: Molécula de Adesão Celular CD62L, IGF-1: Fator de Crescimento de Insulina 1, VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular, TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alfa. Fonte: Modificado de: Zhang e colaboradores (25) e Richardson e colaboradores (26).

Resultados importantes da literatura caracterizaram que a capacidade de secreção, das CTMA, de níveis significativamente altos de VEGF sob condições hipóxicas aumenta a densidade capilar e restaura a função do tecido danificado (28). Além disso, a secreção do IGF-1 pelas CTMA participam da proteção das células contra a apoptose via ativação da sinalização da fosfatidilinositol-3-OH-cinase e MEK1 (29). O grupo de Liu e colaboradores (2016) (30) também observaram expressão atenuada de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, um estudo mostrou que o transplante de CTM estimulou indiretamente células progenitoras endógenas por meio da secreção de HGF, VEGF e IGF-1 — fatores que despertam a ativação, proliferação e migração de células progenitoras residentes (31).

### 1.1.2 Terapias com CTM

O primeiro uso terapêutico das CTM foi documentado para o reparo de ossos e cartilagens, visto que já estão sendo utilizadas para atenuação de diversos distúrbios musculares e de outros tecidos conjuntivos (32).

O grupo de Horwitz (2002) (33) mostrou que o transplante de CTMMO em crianças com doenças ósseas graves resultou em aceleração da velocidade de crescimento durante os seis primeiros meses. Já Le Blanc e colaboradores (2005) (34) trataram doença óssea grave em um feto com transplante de CTM de origem hepática fetal incompatíveis na 32ª semana de gestação e observaram que as CTM eram capazes de enxertar e se diferenciar em osso no feto, sem provocar nenhuma doença enxerto contra hospedeiro na ausência de terapia imunossupressora.

Em relação à terapia celular para insuficiência cardíaca, a administração endovenosa pode melhorar a função no miocárdio em pacientes (35) devido a propriedade de migração para tecidos em hipóxia atraídos pela expressão local de CD44 (36-38) e CXCR-4 (39) no local. Acrescenta-se que nos estudos pré-clínicos com modelos animais de lesão cardíaca, as CTM apresentaram efeito benéfico no miocárdio infartado (40, 41).

Há, ainda, estudos promissores com transplante de CTM para reparo do fígado (42). No caso da cirrose hepática, pesquisas de fase I e II revelaram que CTM autólogas infundidas em veia periférica de pacientes induziu melhora da função do fígado sem qualquer efeito colateral (43, 44).

Além disso, alguns estudos são voltados para a introdução de DNA exógeno nas CTM. Como as células autólogas ou alogênicas não induzem imunorreatividade no hospedeiro após o transplante local ou administração sistêmica (45-48), elas são um carreador ideal para entregar genes nos tecidos de interesse para aplicações de terapia genética. Estudos demonstraram que as MSC podem ser transduzidas de maneira eficiente com vetores retrovirais e lentivirais e manter a expressão do transgene em muitas passagens e diferenciações específicas de linhagem, com menos complicações causadas por integrações virais (49-51). A transdução viral por adenovírus, pode gerar clones

de células estáveis com alta eficiência e baixa mortalidade celular. Por exemplo, as CTM infectadas com um vetor de adenovírus contendo um gene para formação de colágeno foram usadas para reparar o osso de indivíduos com osteogênese imperfeita (52). Já os métodos não virais de entrega de genes, como precipitação com fosfato de cálcio, lipofecção e eletroporação, têm mostrado pouco sucesso na entrega de DNA de plasmídeo em CTM, resultando em menos de 1% de eficiência de transfecção e alta mortalidade celular (53). Além disso, apenas 10% das células transfectadas retêm a expressão plasmidial após 3 semanas, devido ao plasmídeo não ser incorporado no genoma celular (54).

### **1.1.3 Desafios no transplante de CTM**

Os principais fatores limitantes da terapia com CTM são a baixa taxa de sobrevivência das células transplantadas e mau enxerto (19). O decréscimo celular pode ocorrer por estresse mecânico inerente à preparação da suspensão de injeção, imunorrejeição e pobre aderência das CTM no tecido (1, 55, 56).

A baixa taxa de sobrevivência celular pós-transplante é explicada devido ao ambiente hostil, como hipóxia, acidose, deficiência nutricional, espécie reativa de oxigênio e diferentes mediadores inflamatórios (57). Acredita-se que este ambiente contribua para a morte por apoptose das células transplantadas devido à disfunção mitocondrial com consequente ativação da caspase-3 (58). Considerando o inconveniente do mau enxerto, as CTM são hábeis a penetrar a vasculatura e migrar para órgãos remotos (59).

Além disso, vale acrescentar que as aplicações clínicas podem requerer grandes quantidades de células para alcançar um resultado bem-sucedido (60), sendo que a obtenção de CTM normalmente resulta em um número reduzido e limitado. Destaca-se que além do rendimento ser insuficiente para tais aplicações clínicas, as CTM adultas não possuem atividade da telomerase (61), atingindo rapidamente a senescência e perdendo o potencial de diferenciação multilinhagem.

#### 1.1.4 Abordagens para melhorar o transplante das CTM

As informações precedentes ilustram que o sucesso da terapia com CTM requer alternativas que aumentem a resiliência celular frente ao microambiente hostil, preservando sua integridade, melhorando sua aderência e funcionalidade em diferentes tecidos (62). Nessa perspectiva, diversas abordagens, incluindo manipulações genéticas, foram propostas para alterar positivamente as características das CTM e, por conseguinte, propiciar aumento da sobrevivência, proliferação, aderência, diferenciação e potencialização da ação parácrina (1). Dentre as abordagens não genéticas, o pré-condicionamento *ex vivo* das CTMA com agentes físicos, farmacológicos e fatores de crescimento constitui intervenção promissora para melhorar a eficiência da terapia celular (5).

Para prolongar a capacidade proliferativa das CTM sem prejudicar sua multipotencialidade, estudos mostraram que a expressão ectópica forçada da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) em CTM pós-natais pode estender sua expectativa de vida para mais de 260 duplicações populacionais, enquanto mantém seu potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica, adipogênica, neurogênica e estromal (63, 64). Também há CTM imortalizadas e transduzidas por hTERT, nas quais possuem cariótipo normal e não causam a formação de tumor, tornando-as uma fonte atraente para reparo e regeneração de tecidos. No entanto, essas CTM imortalizadas expressam níveis mais elevados de genes específicos da linhagem osteogênica, como *Cbfa1/Runx2*, *osterix* e *osteocalcina*, em comparação com CTM primárias (62), o que poderia comprometer sua capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares.

Nos últimos anos, as fontes de luz vêm sendo utilizadas por terem efeitos importantes na busca da melhoria na terapia com CTM. Como as fontes de luz causam efeitos biológicos diversos, poderiam ser aplicadas para superar as limitações atuais da terapia com CTM. Assim, o pré-condicionamento das CTM com fontes de luz antes do transplante pode apresentar efeitos benéficos que envolvem uma complexa rede de adaptações nas vias de sinalização, aprimoramento do metabolismo celular e secreção de fatores para aumentar a proliferação, viabilidade e diferenciação celular (65-71).

## 1.2 Fotobiomodulação (PBM) e fontes de luz

A PBM é um método de tratamento, bioestimulação ou bioinibição, baseado na irradiação com o uso de fontes de luz de baixa intensidade (laser ou LED) com diversos comprimentos de onda e que resulta em inúmeros efeitos fisiológicos em células, tecidos e seres vivos (72).

Laser (acrônimo para "amplificação de luz por emissão estimulada de radiação") é uma fonte de luz que emite, de maneira estimulada, um feixe de luz monocromático e coerente de baixa divergência (72), com o primeiro laser de trabalho inventado em 1960 por Theodore Maiman (73). Já os LED são fontes de luz baseadas no fenômeno de eletroluminescência de materiais semicondutores (74) e o primeiro LED visível foi criado em 1962 por Nick Holonyak Jr., sendo chamado de "pai dos diodos emissores de luz" (75).

Os estudos sobre PBM e LED são relativamente novos, sendo a maioria baseado em lasers. Isso se dá devido ao fato dos autores hipotetizarem que os efeitos fisiológicos benéficos da luz são dependentes de propriedades como luz monocromática, coerente e colimada. Contudo, estudos recentes mostram que os LED também despertam efeitos biológicos análogos aos observados com laser de baixa intensidade (LBI) (72, 76, 77).

O uso dos LED apresentam vantagens em relação ao menor custo, maior segurança e facilidade de adaptação para a irradiação de superfícies de diversos tamanhos (78). De modo geral, o custo por mW de energia óptica é aproximadamente cem vezes menor para os LED em comparação com os lasers. Além disso, vários LED podem ser organizados em matrizes planas, aumentando significativamente a área do feixe e facilitando a irradiação de grandes áreas do corpo, o que constitui limitação dos lasers que normalmente possuem tamanhos de feixe pequenos (72).

### 1.2.1 Mecanismos moleculares da luz na ação celular

As células são capazes de absorver a luz em vários comprimentos de onda por meio de diversos possíveis mecanismos. Dentre os espectros mais vistos na literatura, tem-se as luzes azul (440 a 500 nm), verde (500 a 565 nm), vermelha (625 a 740 nm) e infravermelha próxima (740 a 900 nm) (72). Em espectros de luz vermelha visível e infravermelho próximo, sugere-se que o fotorreceptor celular seja a citocromo c oxidase (CCO), proteína mitocondrial importante que funciona como unidade IV na cadeia de transporte de elétrons, promovendo o aumento do consumo de oxigênio e níveis de ATP após a irradiação (79, 80). A PBM utilizando comprimentos de onda maiores que 900 nm parece depender dos canais de cálcio dos receptores de potencial transitório (81). Os efeitos biológicos relacionados com a PBM utilizando as luzes azul e verde parecem ser mediados pelo CCO e canais de cálcio (65).

Os mecanismos moleculares relacionados com a interação célula-luz parecem ocorrer a partir da interação inicial entre os fotorreceptores celulares e a luz, sendo seguida pela ativação de diversos mediadores secundários. Esta ativação pode levar a mudanças na expressão gênica, sinalização e metabolismo celular, assim como secreção de citocinas e fatores de crescimento (82, 83). O conjunto de informações disponíveis atualmente na literatura leva à proposta de uma complexa cascata de sinalização, incluindo oxigênio *singlet*, proteína quinase ativada por mitogênio, da subfamília da proteína quinase regulada por sinal extracelular, e Janus quinase, um transdutor de sinal de espécies reativas de oxigênio (76, 84-88).

A repercussão da PBM é representada por seus efeitos na alteração de expressão de microRNAs, na promoção de diferenciação das CTMA em diversos nichos celulares e na estimulação da secreção de fatores com ações autócrinas (que afetam a própria célula que está produzindo estes fatores), como potencializadores da atividade mitocondrial, viabilidade e proliferação celular, e parácrina (que possuem ações nas células vizinhas), como moduladores da angiogênese, inflamação, apoptose e remodelamento tecidual (89-94).

### 1.3 Efeitos da luz nas CTM

Embora os efeitos das luzes azul e verde sejam parecidos, a azul parece desfavorecer a mitocôndria e causar aumento na produção de ROS, enquanto a verde parece estar mais relacionada à ativação do canal iônico e à redução do pH intracelular (95). Estudos relatam que o aumento do nível de ROS celular causado pela luz azul nas CTM, provavelmente, está relacionado com a inibição da proliferação celular (96, 97), redução dos níveis de ATP (95) e na indução da apoptose e citotoxicidade (98, 99). Além disso, Wang e colaboradores (2016) (65) observaram que os comprimentos de onda azul e verde foram mais eficazes na diferenciação osteogênica.

Já em relação às luzes vermelha e infravermelha próxima, a teoria proposta é de que são absorvidas pela CCO, estimulam a respiração mitocondrial, o aumento dos níveis de ATP intracelular, produção necessária de ROS, aumento da proliferação, mas não possuem efeitos na diferenciação celular (95, 100).

Com isso, considerando as informações precedentes nesta contextualização e levando em consideração a falta de estudos sobre os possíveis benefícios do pré-condicionamento de CTM como estratégia para melhorar a funcionalidade e resistência celular no ambiente hostil presente na maioria dos tecidos onde o transplante ocorrerá, este projeto de pesquisa visou aplicar o LED como abordagem fotobiomoduladora para condicionar benéficamente CTMA a fim de melhorar a terapia celular já existente. Para isso, a proposta deste trabalho objetivou investigar a repercussão do LED vermelho na viabilidade, proliferação, potencial energético e secreção de fatores com ação parácrina de CTMA, incluindo a determinação dos parâmetros de irradiação com efeitos biológicos mais evidentes. Esse estudo constitui base inicial para investigações futuras que transplatem CTMA irradiadas com LED para tratar os mais diversos distúrbios.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar o metabolismo celular e secreção de fatores de ação parácrina de CTMA irradiadas com LED vermelho (630 nm).

### 2.2 Objetivos Específicos

O estudo foi realizado *in vitro* para definir o parâmetro de irradiação que induziu de forma mais eficiente modificações biológicas positivas, na busca de melhorar os efeitos da terapia celular já existente.

Para isso, foram analisadas:

- Possíveis induções de estresse oxidativo
- Integridade do DNA genômico;
- Proliferação celular;
- Atividade mitocondrial;
- Dosagem de nitrato e nitrito;
- Dosagem da ATP intracelular total;
- Secreção de citocinas participantes da indiferenciação celular e da cascata da inflamação;
- Secreção de fatores de crescimento participantes da angiogênese, do recrutamento de células para o local lesionado e da resolução da resposta inflamatória;
- Secreção de moléculas de adesão e quimiotáticas;
- Análise da respiração celular sob condições de estresse metabólico.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Extração e cultivo das CTMA

Dez ratos isogênicos machos (linhagem Fisher 344) (CEUA 5883160218) foram anestesiados (i.p.) com mistura de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e o tecido adiposo subcutâneo da região medial e lateral das coxas foi extraído. O material foi lavado em PBS estéril (NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM; pH 7,4), dissociado sob agitação por 60min a 37°C em solução contendo 20 mg de colagenase IA, 200 mg BSA e 20 mL de PBS e centrifugado a 1500 rpm por 7min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura (MC; DMEM suplementado com 10% SFB e 1% Penicilina-Estreptomicina), plaqueadas em garrafas T75 contendo 20 mL de MC e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> até que fossem obtidas 90% de confluência, sendo o MC trocado a cada dois dias. As células, então, foram tripsinizadas com 5 mL de tripsina-EDTA 0,25% por 2 min a 37°C e a reação parada com adição do dobro de MC. Seguiu-se com centrifugação a 1500 rpm por 7min e ressuspensão das células em MC, as quais foram contadas na câmara de Neubauer com *TrypanBlue* e congeladas (90% SFB, 10% DMSO) na concentração de 1x10<sup>6</sup> por *vial*. As células foram fenotipadas por citometria de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ, EUA) para identificação dos seguintes marcadores de superfície: CD105<sup>+</sup>; CD90<sup>+</sup>; CD29<sup>+</sup>; CD31<sup>-</sup>; CD45<sup>-</sup> (Thermo Fisher Scientific, EUA).

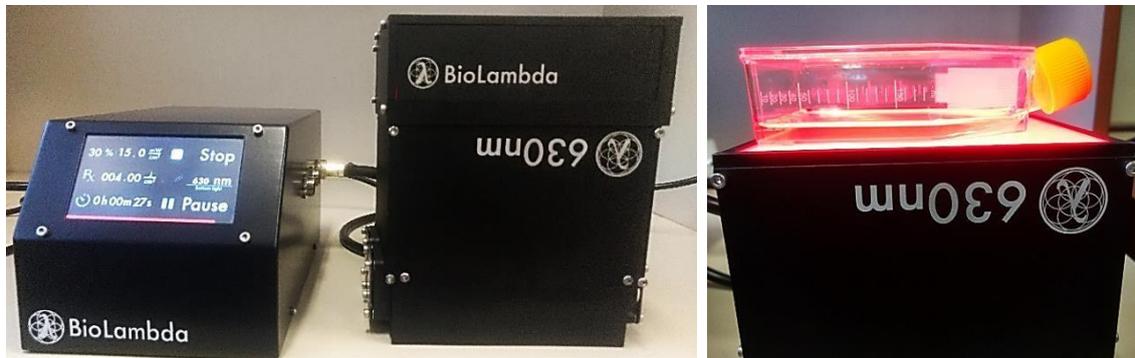
#### 3.2 Irradiação com LED

Todos os experimentos foram conduzidos com CTMA em P3 (101). As CTMA, aderidas em garrafas ou placas de cultura, foram irradiadas de baixo para cima (Figura 4) uma vez (dose única), permanecendo 48h em cultura, ou a cada 48 horas (76, 77), totalizando três irradiações (múltiplas doses), permanecendo 144 horas em cultura, fora do fluxo com o aparelho LEDbox (BioLambda LTDA, São Paulo, Brasil), sendo as análises realizadas 24 horas após a última

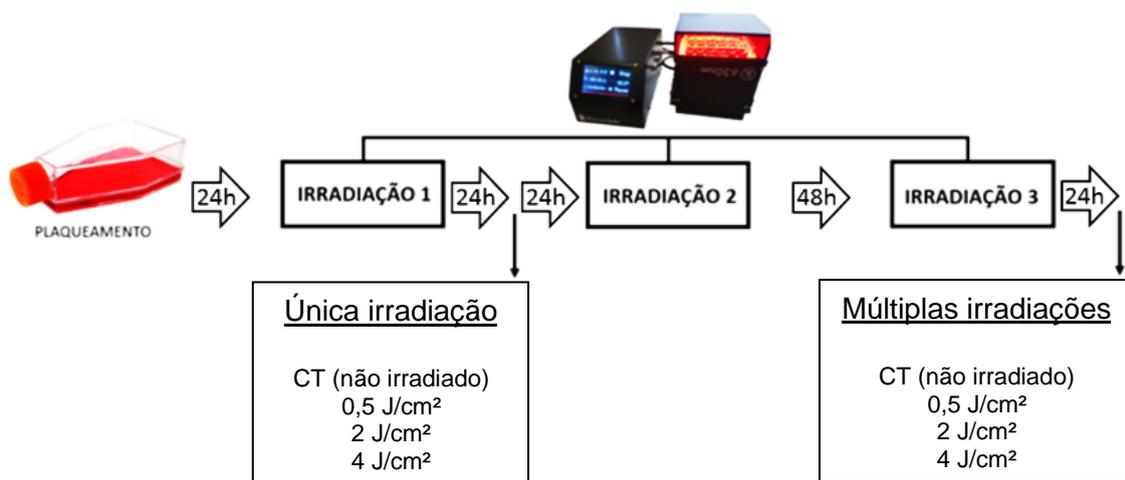
irradiação (Figura 5) e o MC não trocado após plaqueamento. Os parâmetros de irradiação foram expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros de irradiação com LED.

Comprimento de onda (nm)	630		
Área do feixe (cm <sup>2</sup> )	163,5		
Potência (mW)	2452,5		
Irradiância (mW/cm <sup>2</sup> )	15		
Energia (J)	81,75	327	654
Exposição radiante (J/cm <sup>2</sup> )	0,5	2	4
Tempo de irradiação (s)	33	132	264



**Figura 4.** Procedimento de irradiação com LED.



**Figura 5.** Desenho experimental.

### 3.3 Proliferação celular

O ensaio foi conduzido com o plaqueamento de  $2,5 \times 10^5$  células em garrafas T25 e realizado, após o término do protocolo de irradiação, com todas as células contidas em cada garrafa de cultura. As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS acrescido de 25  $\mu\text{L}$  da solução do quite para contagem de células, contendo beads para avaliação de células vivas e mortas (C36950, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As células foram avaliadas por citometria de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson, NJ, EUA). As análises foram realizadas conforme orientação do fabricante.

### 3.4 Atividade mitocondrial

Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; 5 mg/mL) ou AlamarBlue (0,15 mg/mL) (102) em placa de 96 poços contendo  $10^4$  células/poço em 100  $\mu\text{L}$  de MC e incubados a 37°C por 3h. Para o MTT, o MC foi retirado e as células ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO e a leitura da absorbância realizada a 570 nm em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA). Para o AlamarBlue, o MC foi transferido para placa de 96 poços preta opaca e a leitura da luminescência foi realizada a 560 nm para excitação e 590 nm para emissão. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA).

### 3.5 Extração e análise de dano do DNA

Para a obtenção de DNA genômico,  $1 \times 10^6$  CTMA foram acrescidas em 500  $\mu\text{L}$  de solução TNES [Tris-HCl 250 mM (pH: 7,5), NaCl 2 mM, EDTA 100 mM, SDS 2,5%] e agitadas no vórtex por 10s. Após, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg/ml) com seguinte agitação em vórtex e incubação a 65°C por 40min. A mistura foi colocada no gelo e recebeu 3  $\mu\text{L}$  de Ribonuclease A (4 mg/ml) e então misturada por inversão. Posteriormente, a solução foi incubada por 30min a 37°C. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M e, após ser agitada em vórtex por 10s, a solução foi centrifugada por 6min a 15.000 xg a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para tubo contendo 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol 100% gelado. As amostras foram novamente centrifugadas por 5min a 15.000 xg em TA. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao precipitado 600  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, seguido de centrifugação por 6min a 15.000 xg em TA. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco em estufa a 37°C por 20min e, então, ressuspensão em 30  $\mu\text{L}$  de solução TE (Tris-HCl 10mM, EDTA-NaOH 1mM, pH 8,0). 1  $\mu\text{g}$  do DNA foi analisado por eletroforese em géis de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A eletroforese foi realizada em cubas horizontais por 30min sob tensão elétrica de 90 V e corrente de 60 mA constantes. Imagens dos géis foram digitalizadas de um transiluminador UV. Controle positivo foi realizado com CTMA cultivadas com 50  $\mu\text{g}$  de doxorrubicina por 48h.

### 3.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de TBARS foram empregados como indicadores de peroxidação lipídica em CTMA ( $5 \times 10^4$  células). As CTMA foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M; SDS 0,5%; DTT 1 mM; pH 8,0). Foram preparadas misturas contendo 250  $\mu\text{L}$  de homogenato, 50  $\mu\text{L}$  de BHT 4%, 300  $\mu\text{L}$  de ácido acético 20%, pH 3,5, e 300  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de ácido tiobarbitúrico 0,78%. Em seguida, as misturas foram aquecidas a 95°C por 60min, centrifugadas a 12.000 rpm por 15min e o pigmento rosa formado,

pipetado em duplicata em placa de 96 poços para ser analisado em absorbância de 532 nm em espectrofotômetro Spectra MaxM5 (Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína total dosada pelo método de Bradford e expressos em  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína total. Controle positivo foi realizado com CTMA cultivadas com 50  $\mu\text{g}$  de doxorubicina por 48h.

### **3.7 Oxidação proteica**

O ensaio foi realizado em amostras de CTMA ( $1 \times 10^6$  células) por *western blotting* com kit da Abcam (ab178020, Abcam, Cambridge, MA, EUA) em homogenatos contendo 10  $\mu\text{g}$  de proteínas. As amostras foram preparadas e analisadas conforme orientação do fabricante, sendo marcadas todas as proteínas que contém grupo carbonila. Controle positivo foi realizado com CTMA cultivadas com 50  $\mu\text{g}$  de doxorubicina por 48h.

### **3.8 Teor de adenosina trifosfato (ATP)**

O ensaio foi realizado em placa de 12 poços com o plaqueio de  $5 \times 10^4$  células/poço em 3 mL de MC. O MC foi coletado e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  com inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para realização de análise posterior de fatores secretados pelas células. As células foram tripsinizadas e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de MC sem fenol. A dosagem de ATP foi realizada com o kit ATPlite (PerkinElmer, WA, EUA) e o ensaio foi conduzido conforme orientação do fabricante. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular devices, CA, EUA).

### **3.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)**

O ELISA foi realizado com o MC congelado conforme especificação do fabricante, utilizando quites para avaliação específica para ratos (R&D Systems, MN, EUA). Os seguintes analitos foram quantificados: fator de crescimento

semelhante à insulina 1 (IGF-1); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucina 6 (IL-6); interleucina 10 (IL-10); molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1); molécula de adesão celular CD62L (L-selectina). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA).

### **3.10 Dosagem de nitrato e nitrito (NOx)**

Em placa de 96 poços foram adicionados 50  $\mu$ L de reagente Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-naftil) etilenodiamina dihidroclorido e 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) em 50  $\mu$ L de amostra (MC congelado) e, após 5min de incubação em temperatura ambiente (TA), a absorbância do nitrato foi mensurada a 560 nm. Seguiu-se com a adição de 50  $\mu$ L/poço de mistura de vanádio (0,8% cloreto de vanádio III e HCl a 9 mM), 5min de incubação em TA e leitura da absorbância do nitrito a 560 nm. As absorbâncias foram mensuradas em espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA). O ensaio foi realizado no abrigo de luz direta. O índice NOx foi determinado pela soma dos resultados de nitrato e nitrito.

### **3.11 Análise do estresse mitocondrial**

As taxas de consumo de oxigênio (OCR) das CTMA foram determinadas em analisador XF24 (Seahorse Bioscience, MA, EUA). As células foram plaqueadas em microplaca XF24 de cultura de 24 poços revestidas com poli-lisina a  $5 \times 10^4$  células/poço em 300  $\mu$ L de MC e incubadas a 37°C em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Antes do ensaio, o meio foi removido e substituído por 500  $\mu$ L de DMEM sem suplementação. As placas foram mantidas durante 60min a 37°C em estufa sem CO<sub>2</sub>. A síntese de ATP dirigida pela respiração e a respiração baseada em vazamento de prótons foram determinadas pela adição de oligomicina (1  $\mu$ g/mL). Após três ciclos de análises, foram adicionados 5  $\mu$ M do carboneto cianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona (CCCP) para determinar a capacidade respiratória máxima. Depois de três ciclos adicionais de avaliação, 1  $\mu$ M de rotenona e 1  $\mu$ M de antimicina A foram

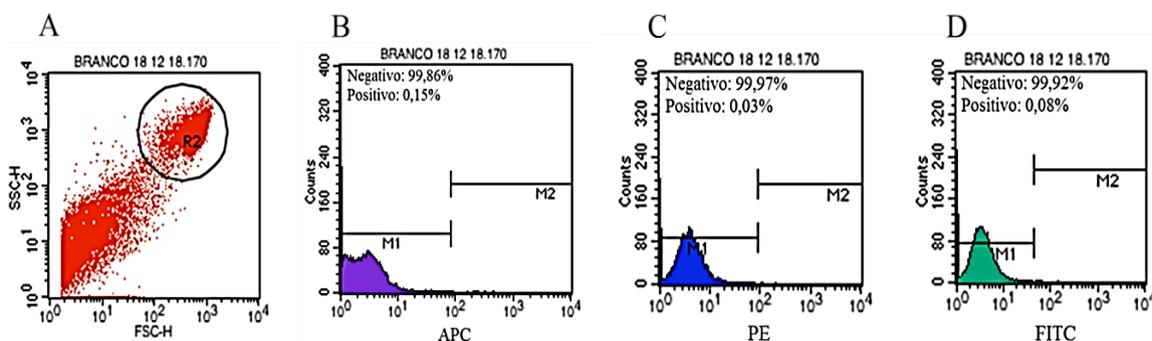
adicionados para bloquear o complexo I e III, respectivamente, cessando o consumo de oxigênio mitocondrial.

### **3.12 Análise estatística**

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A normalidade foi analisada com teste de Shapiro-Wilk. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados com ANOVA uma via (pós-teste de Newman-Keuls). Todas análises foram realizadas por meio do programa GraphPad Prism (versão 8.0.2). O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ . Os resultados foram expressos como % em relação ao grupo controle (não irradiado).

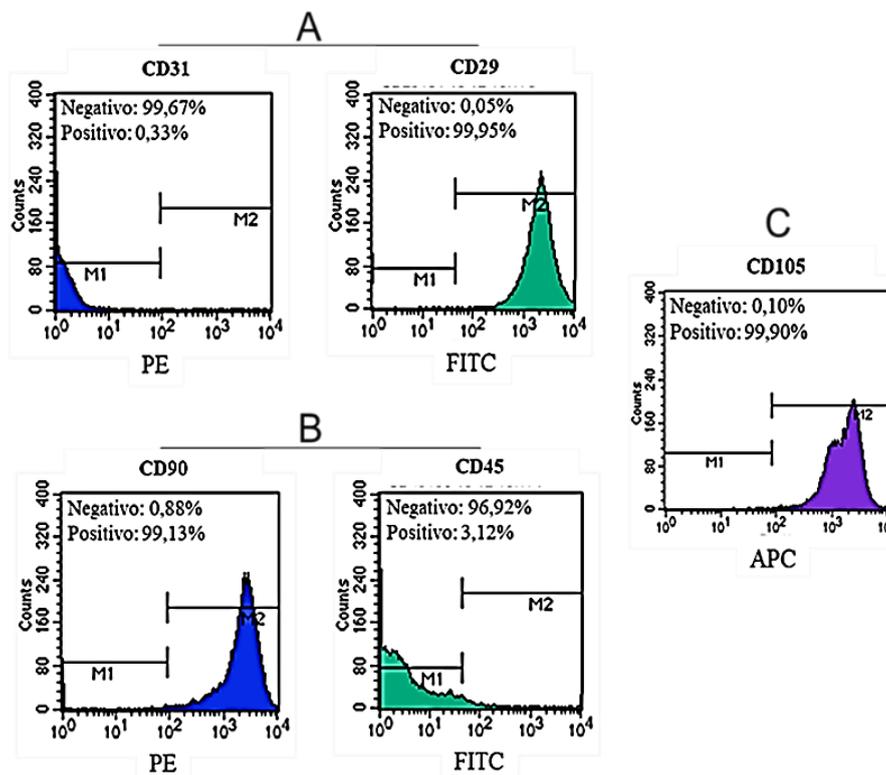
## 4. RESULTADOS

As CTMA foram fenotipadas por citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup> e CD45<sup>-</sup>. Primeiramente, as células não marcadas foram utilizadas para localização do *gate* desejado (Figura 6A) e ajuste dos canais alofococianina - APC (Figura 6B), R-ficoeritrina - PE (Figura 6C) e sotiocianato de fluoresceína - FITC (Figura 6D).



**Figura 6. Preparação dos ensaios de citometria de fluxo para caracterização fenotípica das CTMA.** *Gate* da população celular foi circundado na imagem (A). Leitura do branco (células não marcadas) nos canais da alofococianina (APC, B), R-ficoeritrina (PE, C) e sotiocianato de fluoresceína (FITC, D).

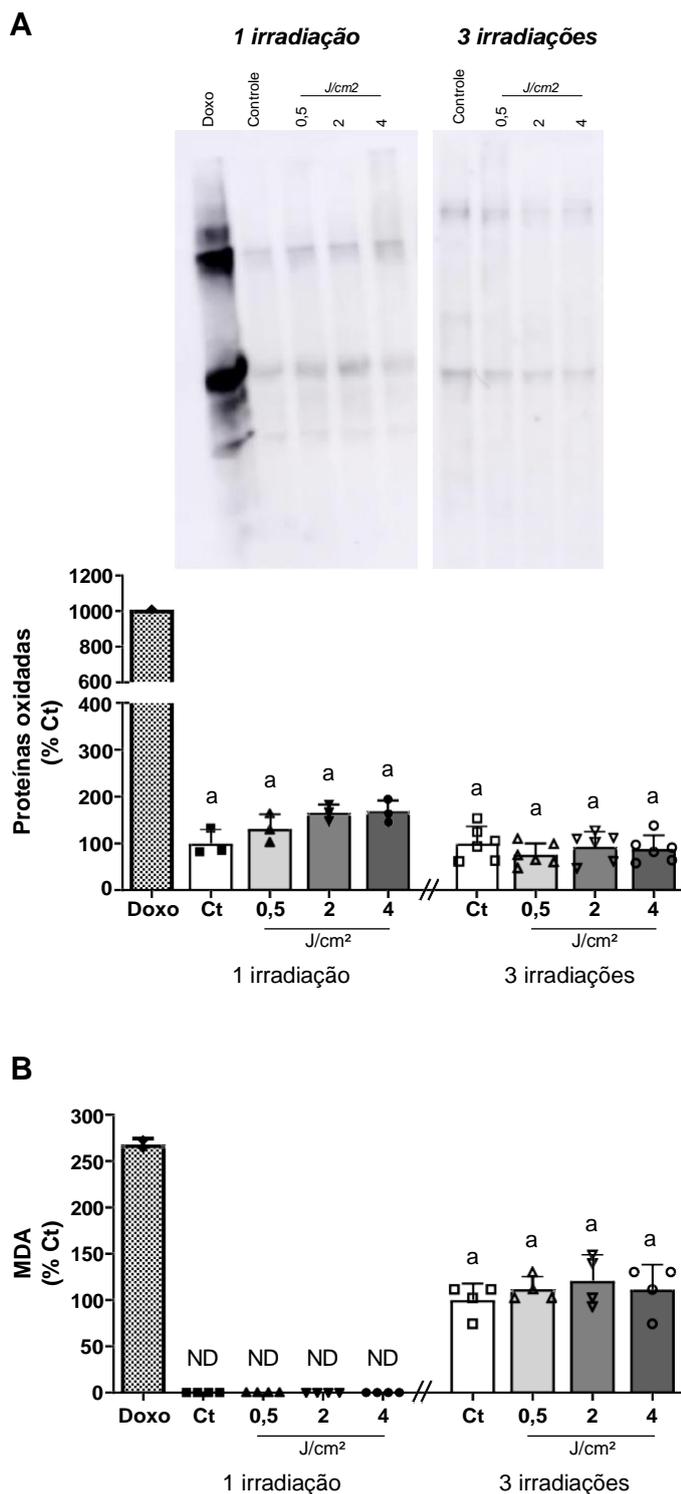
As células foram então incubadas com os anticorpos específicos, o que possibilitou confirmar que a população celular era de fato CTMA em acordo com o percentual de negatividade e positividade (Figura 7). Assim, as células foram 99,67% e 96,92% negativas para CD31 e CD45, respectivamente. Houve positividade de 99,95% para CD29, 99,13% para CD90 e 99,90% para CD105. Após composição do banco celular, seguimos com os experimentos *in vitro* com as CTMA em P3.



**Figura 7. Caracterização fenotípica das CTMA.** (A) CD31 e CD29; (B) CD90 e CD45; (C) CD105.

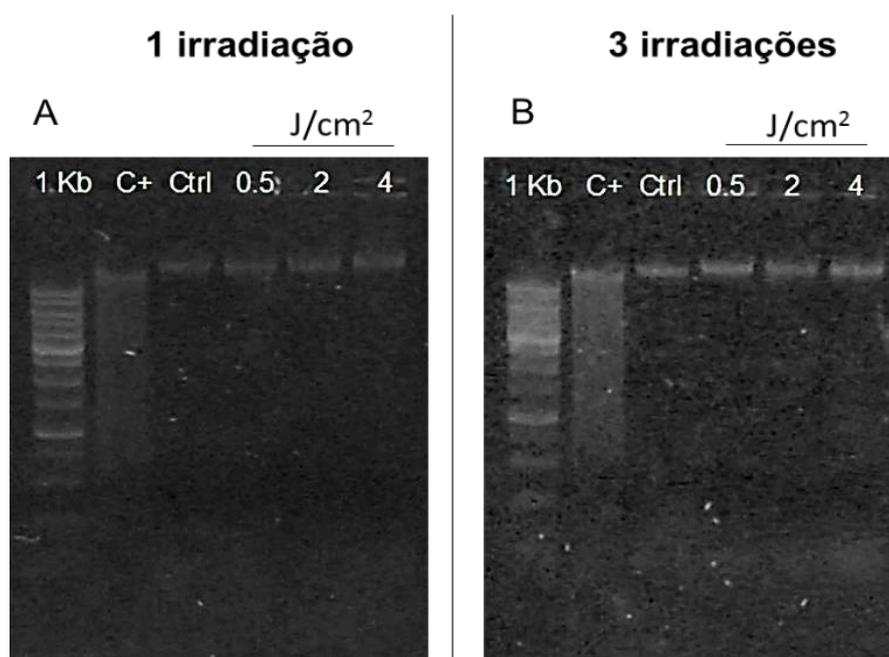
Seguiu-se com a análise do estresse oxidativo em CTMA, sendo realizadas dosagens de proteínas oxidadas via *western blotting* e de MDA via ensaio de TBARS. Como ilustrado na Figura 8A, as proteínas oxidadas das CTMA irradiadas não diferiram das não irradiadas (grupo Ct) em nenhuma exposição radiante e quantidade de irradiações utilizadas, mas diferiram do controle positivo ((C+ = 1010%; única dose: Ct = 100%±23,4; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 131,33%±25; 2 J/cm<sup>2</sup> = 165,33%±14,3; 4 J/cm<sup>2</sup> = 167%±20,3); (múltiplas doses: Ct = 100%±32,4; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 75,93%±22; 2 J/cm<sup>2</sup> = 92,85%±29; 4 J/cm<sup>2</sup> = 88,13%±26)).

Já na Figura 8B, a concentração de MDA após uma irradiação foi detectada somente nas amostras de controle positivo, sendo que na avaliação do impacto de três irradiações houve maior teor de MDA, porém as CTMA irradiadas exibiram níveis similares do aldeído em comparação à CTMA sem LED (C+ = 268,53%±4,1; múltiplas doses: Ct = 100±15,2; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 111,63%±11,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 120,93%±23,7; 4 J/cm<sup>2</sup> = 111,63%±22,8).



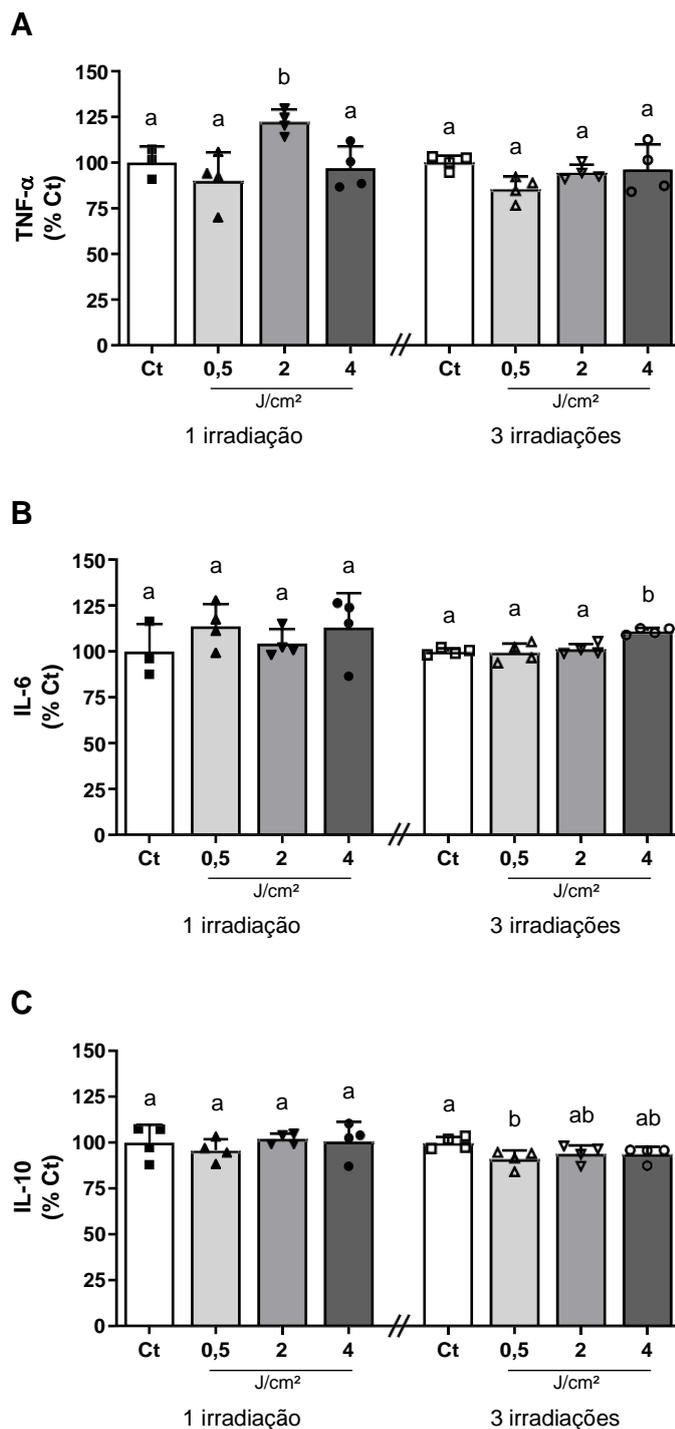
**Figura 8. Análise do estresse oxidativo em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.** Proteínas oxidadas (A); MDA, malondialdeído (B). Doxo, CTMA incubadas por 48 horas com 50  $\mu$ g de doxorubicina; Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4  $J/cm^2$ , respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significantes entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

A análise em eletroforese do DNA genômico das CTMA foi realizada para examinar possíveis alterações na integridade celular. Como ilustrado na Figura 9, é possível observar que não houve fragmentação de DNA em qualquer das quantidades de irradiação e exposições radiantes. Situação oposta foi observada em CTMA incubadas com doxorubicina, com nítido padrão em escada no gel de eletroforese.



**Figura 9. Análise qualitativa do DNA em CTMA sujeitas a uma (A) e três (B) irradiações com LED.** Bandas da esquerda para a direita no gel de agarose: 1 Kb, marcador de peso molecular; C+, CTMA incubadas por 48 horas com 50  $\mu\text{g}$  de doxorubicina; Ctrl, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , respectivamente. As imagens são ilustrativas para um tamanho amostral de três por grupo experimental.

Experimentos seguintes foram estruturados para caracterizar o secretoma das CTMA sujeitadas ao LED. Para isso, o meio de cultivo foi coletado para dosagem do teor de citocinas inflamatórias (Figura 10), proteínas quimiotáticas (Figura 11) e fatores de crescimento (Figura 12).



**Figura 10. Secretoma de citocinas inflamatórias em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.** TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa (A); IL-6, interleucina 6 (B); IL-10, interleucina 10 (C). Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

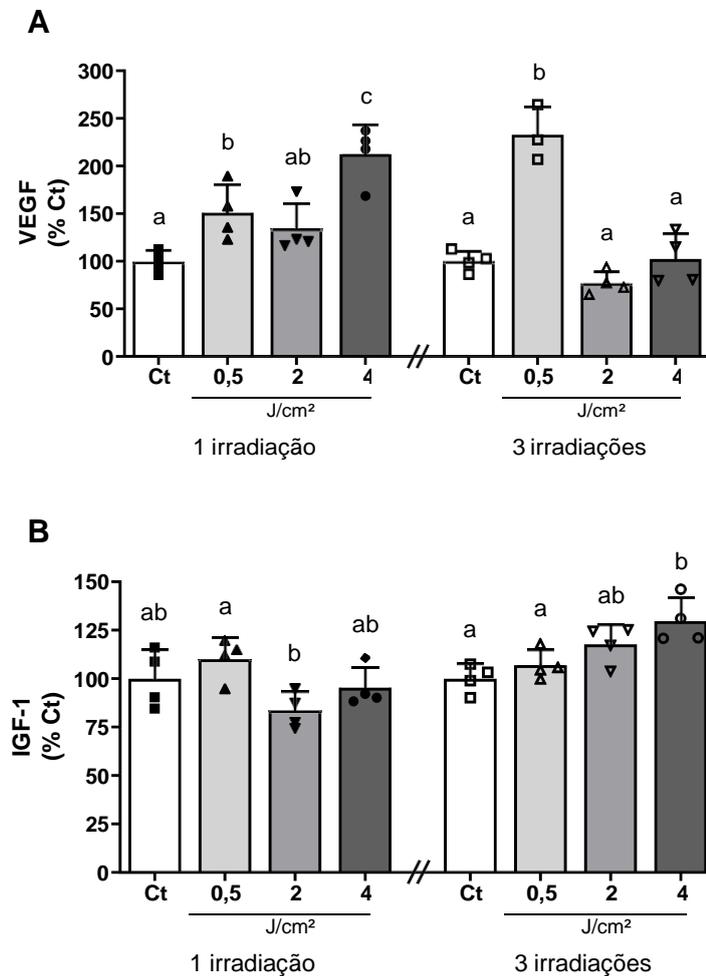
Na avaliação das citocinas participantes da cascata da inflamação, a aplicação de uma irradiação alterou somente o teor do TNF- $\alpha$  (Figura 10A), que foi significativamente maior em relação aos demais grupos somente para a exposição radiante de 2 J/cm<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ) (TNF- $\alpha$  (única dose): Ct = 100% $\pm$ 6,8; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 90,34% $\pm$ 12,9; 2 J/cm<sup>2</sup> = 122,36% $\pm$ 5,7; 4 J/cm<sup>2</sup> = 96,92% $\pm$ 10,1; IL-6 (única dose): Ct = 100% $\pm$ 12,1; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 113,66% $\pm$ 10,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 104,21% $\pm$ 6,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 112,98% $\pm$ 15,8; IL-10 (única dose): Ct = 100% $\pm$ 8; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 95,8% $\pm$ 5,2; 2 J/cm<sup>2</sup> = 101,99% $\pm$ 2,5; 4 J/cm<sup>2</sup> = 101,01% $\pm$ 8,5).

Por outro lado, três irradiações não modificaram os níveis de TNF- $\alpha$  (múltiplas doses: Ct = 100% $\pm$ 3,2; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 85,47% $\pm$ 5,6; 2 J/cm<sup>2</sup> = 94,6% $\pm$ 3,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 96,4% $\pm$ 11,5), mas resultaram em aumento significativo da IL-6 (Figura 10B) em CTMA irradiadas com 4 J/cm<sup>2</sup> ( $p \leq 0,001$ ) (múltiplas doses: Ct = 100% $\pm$ 1,4; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 99,34% $\pm$ 4,3; 2 J/cm<sup>2</sup> = 101,14% $\pm$ 2,4; 4 J/cm<sup>2</sup> = 111,09% $\pm$ 1,5). Em relação aos níveis de IL-10 (Figura 10C), foi observado redução com irradiações de 0,5 J/cm<sup>2</sup> quando comparado com o grupo Ct ( $p \leq 0,05$ ) (múltiplas doses: Ct = 100% $\pm$ 2,7; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 91,08% $\pm$ 4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 93,85% $\pm$ 4; 4 J/cm<sup>2</sup> = 93,7% $\pm$ 3,5).

Já em relação aos fatores de crescimento analisados, observou-se que a aplicação de uma irradiação resultou em aumento no VEGF (Figura 11A) com exposição radiante de 4 J/cm<sup>2</sup> em comparação a todos os outros grupos ( $p \leq 0,01$ ), sendo que o grupo 0,5 J/cm<sup>2</sup> obteve maior teor que o grupo Ct ( $p \leq 0,05$ ) (única dose: Ct = 100% $\pm$ 9,9; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 150,96% $\pm$ 25,2; 2 J/cm<sup>2</sup> = 134,11% $\pm$ 22,9; 4 J/cm<sup>2</sup> = 212,69% $\pm$ 26,3). A administração de única irradiação não alterou a expressão do IGF-1 (Figura 11B) em comparação ao grupo Ct, porém, o grupo 0,5 J/cm<sup>2</sup> teve maior teor que o grupo 2 J/cm<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ) (única dose: Ct = 100% $\pm$ 12,9; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 110,19% $\pm$ 9,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 83,78% $\pm$ 8,1; 4 J/cm<sup>2</sup> = 95,3% $\pm$ 9).

A realização de três irradiações com 0,5 J/cm<sup>2</sup> gerou maior secreção de VEGF pelas CTMA ( $p \leq 0,0001$ ) (múltiplas doses: Ct = 100% $\pm$ 9,1; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 232,99% $\pm$ 23,8; 2 J/cm<sup>2</sup> = 77,20% $\pm$ 10,2; 4 J/cm<sup>2</sup> = 102,33% $\pm$ 23), todavia, o teor de IGF-1 foi aumentado somente com a exposição radiante de 4 J/cm<sup>2</sup> em comparação com os grupos Ct e 0,5 J/cm<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ) (múltiplas doses: Ct =

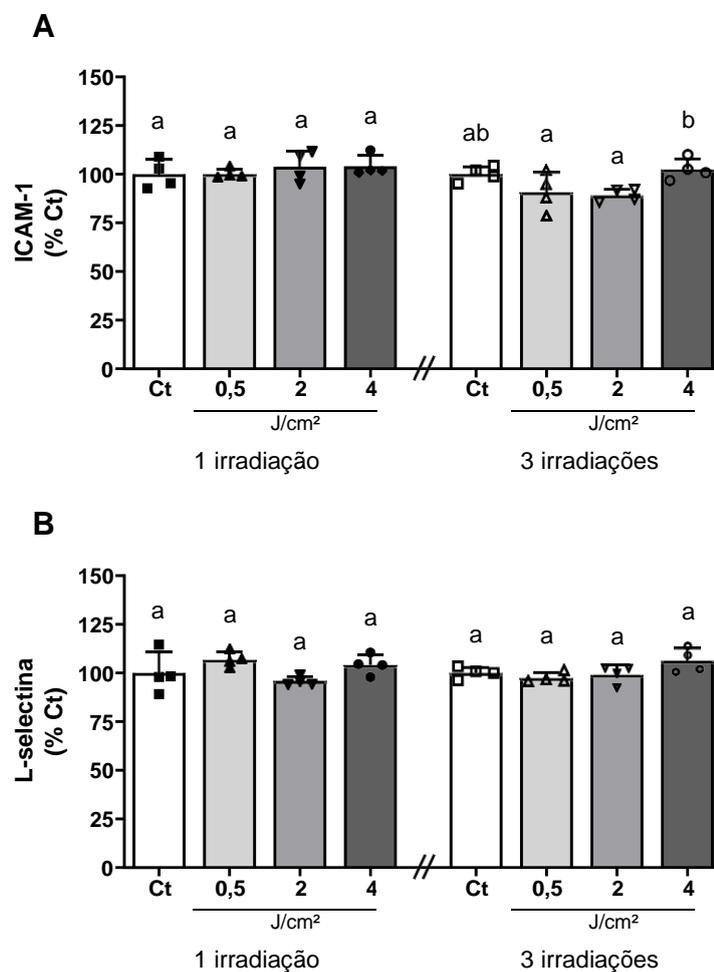
100%±6,4; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 107%±6,6; 2 J/cm<sup>2</sup> = 117,78%±8,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 129,82%±10,4).



**Figura 11. Secretoma de fatores de crescimento em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.** VEGF, fator de crescimento endotelial vascular (A); IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (B). Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significantes entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

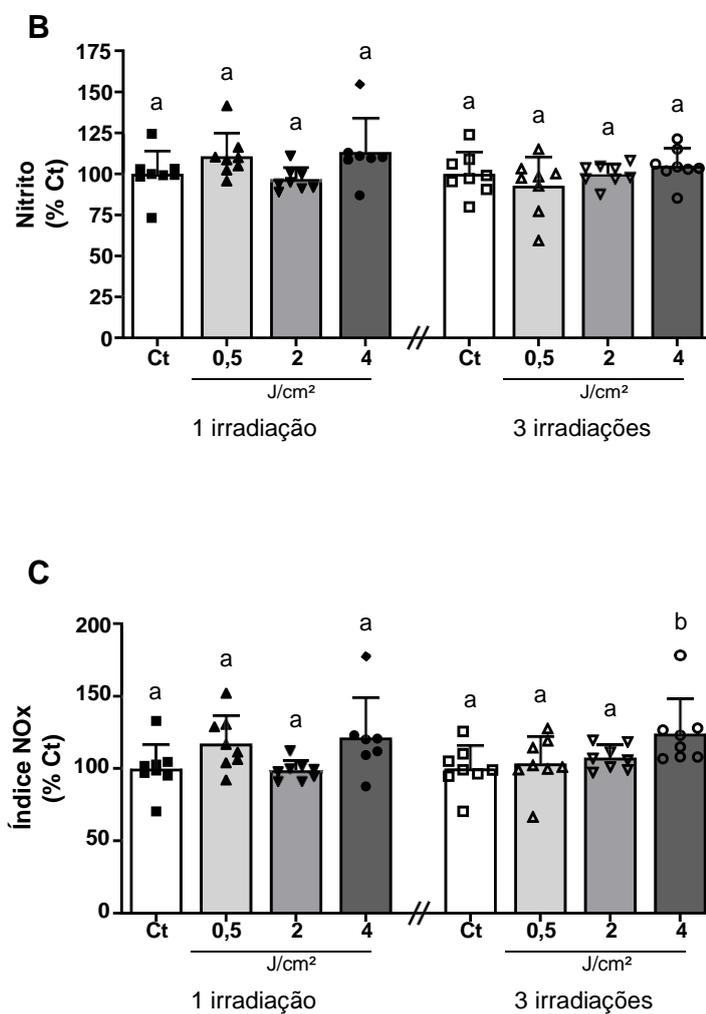
Na análise das proteínas quimiotáticas, independentemente do número de irradiações e de variações na exposição radiante, não houve efeito do LED sobre a secreção de ICAM-1 (Figura 12A) ((única dose: Ct = 100%±6,4; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 100,04%±2,2; 2 J/cm<sup>2</sup> = 103,95%±6,8; 4 J/cm<sup>2</sup> = 104,18%±4,7); (múltiplas

doses: Ct = 100%±3,3; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 90,9%±8,6; 2 J/cm<sup>2</sup> = 89,18%±2,7; 4 J/cm<sup>2</sup> = 102,53%±4,6)) e L-selectina (Figura 12B) ((única dose: Ct = 100%±9,2; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 106,89%±3,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 95,92%±1,9; 4 J/cm<sup>2</sup> = 104,2%±4,4); (múltiplas doses: Ct = 100%±2,4; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 97,64%±2,2; 2 J/cm<sup>2</sup> = 99,45%±4,1; 4 J/cm<sup>2</sup> = 106,41%±5,4)) em relação ao grupo Ct. Contudo, foi observado aumento significativo nos níveis de ICAM-1 no grupo 4 J/cm<sup>2</sup> em comparação aos outros grupos que sofreram três irradiações (p≤0,05).



**Figura 12. Secretoma de citocinas que participam da adesão celular em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED. ICAM-1, molécula de adesão intercelular (A); L-selectina, CD62L (B). Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significantes entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.**

A



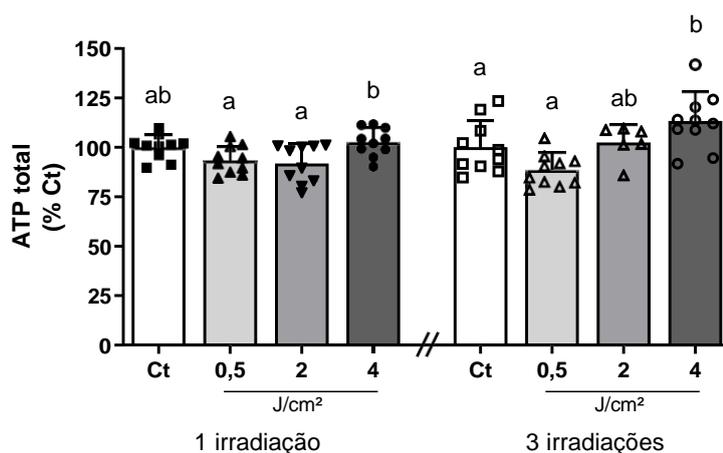
**Figura 13. Dosagem da redução de nitrato para nitrito secretado pelas CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED. Nitrato (A); Nitrito (B); índice NOx (soma do nitrato com nitrito) (C). Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significantes entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.**

A dosagem da redução de nitrato para nitrito secretado pelas CTMA (índice NO<sub>x</sub>) foi estudada por meio de ensaio colorimétrico utilizando reagente de Griess. Primeiramente, avaliamos que os níveis de nitrato (Figura 13A) permaneceram constantes nos grupos irradiados apenas uma vez (única dose: Ct = 100%±18,7; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 126,57%±26,7; 2 J/cm<sup>2</sup> = 102,06%±8,1; 4 J/cm<sup>2</sup> = 132,76%±35,7), sendo visto aumento no grupo irradiado múltiplas vezes com 4 J/cm<sup>2</sup> (p≤0,05) (múltiplas doses: Ct = 100%±18,6; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 116,75%±23,3; 2 J/cm<sup>2</sup> = 116,74%±13,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 147,67%±42,4).

Já em relação ao nitrito (Figura 13B), observamos que os níveis do analito permaneceram inalterados em quaisquer quantidades de irradiação e dose irradiada ((única dose: Ct = 100%±12,9; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 110,73%±12,8; 2 J/cm<sup>2</sup> = 96,69%±6,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 113,3%±18,7); (múltiplas doses: Ct = 100%±12,3; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 92,77%±16,1; 2 J/cm<sup>2</sup> = 99,82%±5,8; 4 J/cm<sup>2</sup> = 104,9%±9,9).

Para a determinação do índice NO<sub>x</sub> foi realizada a soma dos dados de nitrato e nitrito (Figura 13C), sendo encontrado que os grupos irradiados apenas uma vez não apresentaram diferenças estatísticas em relação a todos os grupos analisados (única dose: Ct = 100%±15,2; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 117,3%±17,7; 2 J/cm<sup>2</sup> = 98,9%±6,2; 4 J/cm<sup>2</sup> = 121,47%±25,4). Contudo, se tratando das células irradiadas múltiplas vezes, o grupo 4 J/cm<sup>2</sup> apresentou aumento significativo no índice NO<sub>x</sub> em comparação ao grupo Ct (p≤0,05) (múltiplas doses: Ct = 100%±14,6; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 103,61%±17,2; 2 J/cm<sup>2</sup> = 107,46%±7,9; 4 J/cm<sup>2</sup> = 124,2%±21,9).

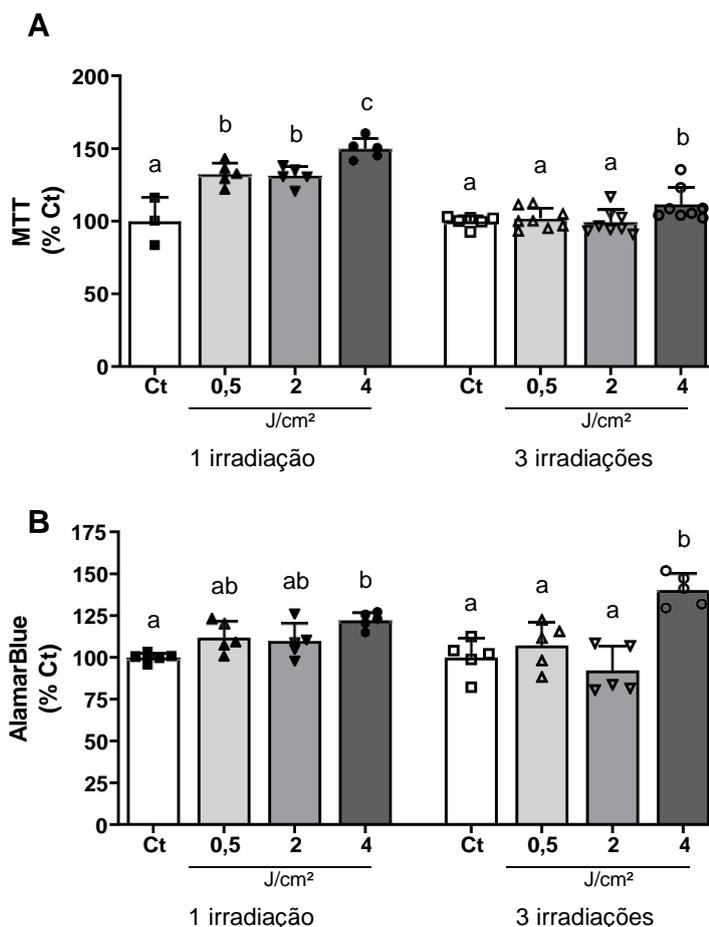
Sobre a dosagem de ATP, ilustrada na Figura 14, foi possível caracterizar que aumento dos níveis intracelulares após uma irradiação na comparação de 4 J/cm<sup>2</sup> com os grupos 0,5 e 2 J/cm<sup>2</sup> (p≤0,05) (única dose: Ct = 100%±5,8; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 93,35%±6,5; 2 J/cm<sup>2</sup> = 91,94%±9,1; 4 J/cm<sup>2</sup> = 102,8%±6,6). Já nas CTMA que receberam três irradiações, o grupo 4 J/cm<sup>2</sup> obteve concentração de ATP aumentada em comparação com os grupos Ct e 0,5 J/cm<sup>2</sup> (p≤0,05) (múltiplas doses: Ct = 100%±12,6; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 88,68%±8,1; 2 J/cm<sup>2</sup> = 102,49%±8,1; 4 J/cm<sup>2</sup> = 113,27%±14).



**Figura 14. Conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) em CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.** Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

A atividade mitocondrial foi avaliada com duas técnicas: marcação com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e com *AlamarBlue*. Todas as exposições radiantes despertaram aumento no MTT (Figura 15A) com uma aplicação do LED ( $p \leq 0,05$ ) (única dose: Ct = 100% ± 13,3; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 132,06% ± 6,9; 2 J/cm<sup>2</sup> = 131,27% ± 5,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 149,76% ± 6,3), situação que vigorou após três irradiações somente em CTMA expostas a 4 J/cm<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ) (múltiplas doses: Ct = 100% ± 3,2; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 102% ± 6,5; 2 J/cm<sup>2</sup> = 99,4% ± 7,9; 4 J/cm<sup>2</sup> = 111,4% ± 11).

Nos ensaios com *AlamarBlue* (Figura 15B), o grupo 4 J/cm<sup>2</sup> apresentou aumento significativo na atividade mitocondrial das CTMA tanto nas irradiações únicas ( $p \leq 0,01$ ) quanto nas múltiplas ( $p \leq 0,001$ ) quando comparado com o grupo Ct ((única dose: Ct = 100% ± 2,1; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 111,89% ± 8,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 109,81% ± 9,3; 4 J/cm<sup>2</sup> = 121,97% ± 4,2); (múltiplas doses: Ct = 100% ± 10; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 107,16% ± 12,3; 2 J/cm<sup>2</sup> = 92,23% ± 12,7; 4 J/cm<sup>2</sup> = 140,25% ± 8,5)).



**Figura 15. Atividade mitocondrial de CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.** MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (A); AlamarBlue (B). Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

A proliferação celular foi analisada por meio da contagem em citômetro de fluxo de CTMA irradiadas uma ou três vezes, sendo os dados expressos em % em relação ao grupo não irradiado (Figura 16). Em comparação com o grupo Ct, independentemente do número de irradiações e de variações na exposição radiante, não houve efeito do LED na taxa de proliferação celular ((única dose: Ct = 100%±4,9; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 111,43%±7,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 111,63%±4,4; 4 J/cm<sup>2</sup> = 103,1%±4); (múltiplas doses: Ct = 100%±13; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 94,3%±12,9; 2 J/cm<sup>2</sup> = 96,56%±2,6; 4 J/cm<sup>2</sup> = 110,79%±7)).

**Figura 16. Proliferação por contagem de CTMA sujeitas a uma e três irradiações com LED.** Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significantes entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

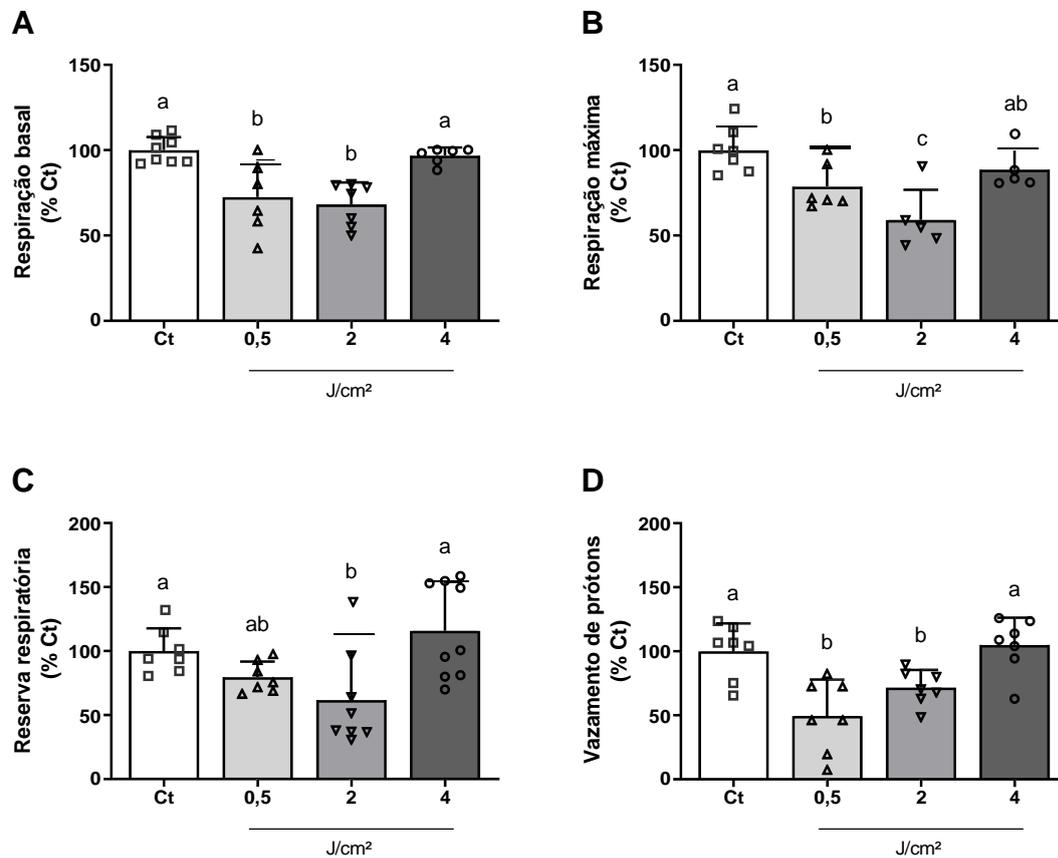
**Quadro 1. Representação dos resultados das CTMA irradiadas em relação as não irradiadas dos experimentos realizados nas CTMA e no MC.**

Análises		única dose			múltiplas doses		
		0,5 J/cm <sup>2</sup>	2 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup>	0,5 J/cm <sup>2</sup>	2 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup>
CTMA	Proliferação	=	=	=	=	=	=
	Viabilidade	=	=	↑	=	=	↑
	ATP total	=	=	=	=	=	↑
	Estresse oxidativo	=	=	=	=	=	=
	Integridade do DNA	=	=	=	=	=	=
MC	TNF- $\alpha$	=	↑	=	=	=	=
	IL-6	=	=	=	=	=	↑
	IL-10	=	=	=	↓	=	=
	VEGF	↑	=	↑	↑	=	=
	IGF-1	=	=	=	=	=	↑
	Moléculas de adesão	=	=	=	=	=	=
	Índice NOx	=	=	=	=	=	↑

Setas para cima significam aumento estatístico do analito do grupo irradiado em relação ao grupo Ct. Setas para baixo significam diminuição estatística do analito do grupo irradiado em relação ao grupo Ct. Sinal de igual significa não alteração estatística do grupo irradiado em relação ao grupo Ct.

Observando-se o Quadro 1, contendo uma síntese de todos os resultados demonstrados até agora, nota-se que as CTMA submetidas a três irradiações foi a condição que gerou alterações biológicas mais pronunciadas. Com isso,

realizamos a avaliação da respiração mitocondrial em tempo real em condições de estresse metabólico somente nas CTMA irradiadas múltiplas vezes.



**Figura 17. Respiração mitocondrial de CTMA sujeitas a três irradiações com LED.** (A) Respiração basal; (B) Respiração máxima; (C), Reserva respiratória; (D) Vazamento de prótons. Ct, CTMA não irradiadas; CTMA irradiadas com 0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significantes entre os grupos. Letras semelhantes ilustram ausência de significância nas comparações. O tamanho amostral de cada grupo é representado dentro das respectivas barras.

Como disposto na Figura 17, nota-se repercussão negativa da aplicação de exposições radiantes de menor magnitude, sendo que a respiração mitocondrial permaneceu intacta com a exposição radiante de 4 J/cm<sup>2</sup>. Em comparação com o grupo Ct, CTMA irradiadas com 0,5 e 2 J/cm<sup>2</sup> exibiram valores significativamente menores de respiração basal (Figura 17A) ( $p \leq 0,01$ ) (Ct = 100%±7,2; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 72,57%±19,5; 2 J/cm<sup>2</sup> = 68,29%±11,8; 4 J/cm<sup>2</sup> =

96,79%±4,4), de respiração máxima (Figura 17B) ( $p \leq 0,05$ ) ( $C_t = 100\% \pm 12$ ; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 78,72%±12,6; 2 J/cm<sup>2</sup> = 59,21%±15,8; 4 J/cm<sup>2</sup> = 88,64%±10,6) e de vazamento de prótons (Figura 17D) ( $p \leq 0,05$ ) ( $C_t = 100\% \pm 20,1$ ; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 49,48%±26,4; 2 J/cm<sup>2</sup> = 71,63%±12,7; 4 J/cm<sup>2</sup> = 104,84%±19,8). Achados similares foram observados com a irradiação de 2 J/cm<sup>2</sup> em adição a menor capacidade de reserva respiratória das CTMA (Figura 17C) ( $p \leq 0,05$ ) ( $C_t = 100\% \pm 16,4$ ; 0,5 J/cm<sup>2</sup> = 76,65%±11,3; 2 J/cm<sup>2</sup> = 61,73%±35,4; 4 J/cm<sup>2</sup> = 115,93%±35).

## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho trata-se de um estudo pré-clínico para compreensão dos mecanismos envolvendo a busca de melhorias na terapia com CTM já existente. Os experimentos realizados envolveram tanto as células quanto os fatores secretados por elas, sendo inédito na literatura. Em relação às análises celulares, observamos que somente os grupos irradiados com 4 J/cm<sup>2</sup> apresentaram melhora na atividade mitocondrial (única e múltiplas doses) e na quantidade produzida de ATP total (múltiplas doses) em relação ao grupo Ct (não irradiado). Já na avaliação do secretoma, observamos aumento de TNF- $\alpha$  (2 J/cm<sup>2</sup> com dose única), IL-6 (4 J/cm<sup>2</sup> com múltiplas doses), VEGF (0,5 e 4 J/cm<sup>2</sup> com dose única e 0,5 J/cm<sup>2</sup> com múltiplas doses), IGF-1 (4 J/cm<sup>2</sup> com múltiplas doses), índice NOx (4 J/cm<sup>2</sup> com única e múltiplas doses) e diminuição somente nos níveis de IL-10 no grupo 0,5 J/cm<sup>2</sup> irradiado múltiplas vezes, quando comparados os grupos irradiados com os grupos Ct.

A terapia celular utilizando CTM pode ser uma ferramenta promissora pelo seu potencial parácrino altamente documentado (24-26, 28-31), todavia desvantagens como baixa aderência e viabilidade dessas células no sítio transplantado ainda precisam ser contornadas (1, 19, 55, 56). Para isso, a submissão das CTM a fontes de luz, como os LED, surge como forma de potencialização das características biológicas, com estudos ilustrando resultados favoráveis para futura realização da terapia celular (72, 103).

Após uma extensa revisão de literatura sobre a abordagem de irradiação de CTM com LED (artigo submetido na revista "Oxidative Medicine and Cellular Longevity"), observou-se que a falta de dosimetria padronizada proporcionou trabalhos realizados com parâmetros de irradiação diversos, os quais, por consequência, ocasionaram resultados distintos (76, 77, 104-110). Nos artigos analisados, a maioria utilizou a luz na faixa vermelha, com irradiâncias de até 15 mW/cm<sup>2</sup> e exposição radiante variando de 0,075 a 4 J/cm<sup>2</sup> (76, 77, 105-110). Além disso, os estudos trabalharam com diferentes números de irradiações, com a melhor frequência de irradiações para as CTM ainda não elucidada. No

entanto, existem dados relatando que o efeito do LED com irradiação de dose única é temporário e múltiplos estímulos são necessários para a otimização das CTM (76).

Com isso, para a realização desta pesquisa, escolhemos os parâmetros com mais efeitos benéficos para as CTM descritos pelos estudos analisados em nossa revisão sistemática, sendo utilizado o LED vermelho (76, 77, 104-108, 110), sob irradiância constante de 15 mW/cm<sup>2</sup> (76) e avaliado duas variáveis: exposição radiante (0,5, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>) (76, 77, 104, 110) e número de irradiações (única ou múltiplas doses) (76, 77).

Ratos Fisher-344 machos foram utilizados para obtenção das CTMA por serem animais isogênicos, fator importante para contornar possíveis rejeições enxerto-hospedeiro em futura realização de estudos *in vivo* (111). A importância e o uso de ratos isogênicos é comum em estudos que analisam a repercussão do transplante celular (3, 4, 112-114). Além disso, o uso de CTMA foi pautado na fácil obtenção de tecido adiposo, abundante concentração celular, elevada capacidade de manutenção *in vitro* e na baixa probabilidade de imunorrejeição pós-transplante pelo tecido poder ser extraído do próprio paciente (23, 115).

Células foram obtidas da região medial e lateral das coxas dos ratos utilizando procedimento de extração e isolamento padronizado em nosso laboratório (3, 4, 116). Após, as células foram colocadas em cultivo e mantidas até P3, passagem utilizada em todos os experimentos deste trabalho, para análise de marcadores de superfície (CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>) utilizando a técnica citometria de fluxo. As células foram utilizadas somente após a confirmação de mais de 95% de compatibilidade com o perfil fenotípico de CTMA, como o ilustrado na Figura 7.

Após a fenotipagem, as CTMA foram submetidas aos protocolos de PBM e possíveis danos celulares causados pela aplicação do LED foram avaliados pelo teor de proteínas oxidadas (Figura 8A) e MDA (Figura 8B) e integridade do DNA genômico (Figura 9). Os experimentos não mostraram alterações, em todas as doses e números de irradiações, em relação ao grupo Ct. Assim, a fim de atestar a segurança do protocolo da irradiação LED, um grupo controle positivo

para estresse oxidativo e apoptose foi adicionado. Este grupo foi cultivado com doxorubicina (grupo Doxo), droga que possui efeito deletério bem documentado em CTMA (116). Vale e colaboradores (2017) (104) avaliaram diversos fatores estruturais das CTM irradiadas com LED vermelho, na qual observaram dano genômico em dose única com 4 J/cm<sup>2</sup>, contudo, vale ressaltar que a irradiância utilizada pelos pesquisadores foi de 37 mW/cm<sup>2</sup> por 1 min e 47 segundos, mais que o dobro de irradiância do empregado em nosso estudo e durante menos que o dobro de tempo de irradiação. Conseqüentemente, é possível considerar a hipótese de que a entrega rápida de energia pode ser prejudicial, cursando com indução de apoptose em CTM.

Em seguida, o secretoma presente no meio de cultivo foi caracterizado, no qual foram avaliadas diferentes citocinas (Figura 10), fatores de crescimento (Figura 11) e proteínas de adesão celular (Figura 12). Essas avaliações são de extrema importância, em virtude dos efeitos parácrinos e das funções reguladoras imunológicas secretadas pelas CTM terem papel decisivo para o sucesso da terapia celular em diversas doenças relacionadas a lesões teciduais (22, 117).

O perfil inflamatório foi avaliado por ELISA das citocinas TNF- $\alpha$  (Figura 10A), IL-6 (Figura 10B) e IL-10 (Figura 10C) secretadas pelas CTMAs. A importância desta caracterização se dá pelo fato de a terapia celular normalmente ocorrer em microambiente inflamado, favorecendo a deposição de colágeno e contribuindo para uma perda de função local (17, 118-120). Assim, quando as CTMA foram irradiadas uma única vez, os grupos 0,5 e 4 J/cm<sup>2</sup> não mostraram alterações significantes em relação ao grupo não irradiado, já o grupo 2 J/cm<sup>2</sup> apresentou um perfil mais pró-inflamatório com o aumento da secreção de TNF- $\alpha$ . No que diz respeito às CTMA irradiadas múltiplas vezes, o grupo 0,5 J/cm<sup>2</sup> teve diminuição na secreção da citocina anti-inflamatória IL-10, o grupo 2 J/cm<sup>2</sup> teve o perfil semelhante ao do grupo Ct e o grupo 4 J/cm<sup>2</sup> secretou mais IL-6. O papel da IL-6 é controverso na literatura mas, em relação às CT, este fator é de extrema importância para as células permanecerem indiferenciadas (121), podendo ser considerado uma boa alteração no perfil das CTMA que serão utilizadas em terapia celular.

A quantificação por ELISA dos fatores de crescimento VEGF (Figura 11A) e IGF-1 (Figura 11B) foi realizada devido ao primeiro ser responsável pela promoção de angiogênese local e o segundo participar do recrutamento de células para o músculo lesionado e resolução da resposta inflamatória (122, 123). Com isso, nossos resultados ilustram que, com uma única irradiação, os grupos 0,5 e 4 J/cm<sup>2</sup> secretaram mais VEGF, porém os valores de IGF-1 permaneceram inalterados. Já em células irradiadas múltiplas vezes, observou-se aumento dos níveis de VEGF no grupo 0,5 J/cm<sup>2</sup>, sendo essa maior secreção vista no grupo 4 J/cm<sup>2</sup> quando analisado o IGF-1.

O grupo de Kim e colaboradores (2019) (107) mostrou aumento nas concentrações de fatores de crescimento, como VEGF e bFGF, em CT irradiadas com LED vermelho. Contudo, também observaram aumento significativo em marcadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$  e MMP9, assim como maior marcação com anexina V, indicando maior taxa de apoptose nas células irradiadas. Com isso, a alteração no perfil de secreção de fatores pró-angiogênicos parece estar ligada a uma caracterização pró-inflamatória das células. Porém, a busca por células irradiadas que não possuem a tendência de exacerbar a inflamação do microambiente em que ocorrerá o transplante é de suma importância, pois pode aumentar o depósito de colágeno e levar a perda da função do tecido.

Também foram dosadas as proteínas quimiotáticas ICAM-1 (Figura 12A) e L-selectina (Figura 12B) por ELISA e observou-se que o perfil secretado não foi alterado com a aplicação de LED. Contudo, esta análise é inédita na literatura, não havendo evidências se fontes de luz teriam alguma participação nas vias de sinalização e secreção destes fatores. Acresça-se que estas são moléculas de aderência célula-célula ao invés de célula-matriz (124, 125), o que viabiliza a hipótese da luz vermelha não ter participação na regulação de proteínas responsáveis pela promoção da quimiotaxia de células sanguíneas para o local lesionado, mas contribuir para a secreção das moléculas que modulam a aderência das CTMA irradiadas no local transplantado, fato ainda inexplorado na literatura.

Adicionalmente, nitrato e nitrito foram dosados no meio de cultivo (Figura 13) e o ATP foi quantificado intracelularmente (Figura 14). A realização da

dosagem destes parâmetros foi baseada em resultados de trabalhos de Karu (2005 e 2010) (126, 127) que citam duas vias de sinalização importantes ligadas ao NO e a possibilidade de ele poder controlar as reações ativadas por irradiação que aumentam a adesão das células, e ao ATP e o fato de que mesmo pequenas mudanças em seu nível, causadas pelas irradiações, podem alterar significativamente o metabolismo celular. Assim, como resultado obtivemos que ambos analitos que aumentaram somente nos grupos 4 J/cm<sup>2</sup> irradiados com única ou múltiplas aplicações. Esses dados estão de acordo com o encontrado na literatura que mostra que a luz ativa a CCO, liberando óxido nítrico (NO), permitindo que o oxigênio se ligue novamente à CCO e retome a atividade da cadeia respiratória, levando à síntese de ATP e sinalização de cálcio (128). Ainda, foi proposto que esta liberação extracelular de NO e expressão intracelular de ATP pode mediar uma sinalização autócrina e resultar em respostas celulares benéficas induzidas pela luz (129, 130), constituindo circunstância favorável para as células empregadas na terapia celular.

Para avaliação da atividade mitocondrial utilizou-se os marcadores MTT (Figura 15A) e *AlamarBlue* (Figura 15B). Após irradiação única, taxas aumentadas de MTT foram vistas em todos os grupos, contudo, este dado só foi confirmado no *AlamarBlue* no grupo 4 J/cm<sup>2</sup>. Em múltiplas irradiações, somente o grupo 4 J/cm<sup>2</sup> aumentou os níveis dos analitos. Já na literatura, dados envolvendo a participação do LED de luz vermelha na atividade mitocondrial e possível relação com a viabilidade celular ainda são controversos. Os grupos de Holder e colaboradores (2012) (110) e Kim e colaboradores (2019) (107) mostraram aumento nestes parâmetros quando avaliados por MTT e potencial de membrana mitocondrial avaliado por citometria de fluxo, respectivamente. Todavia, Soltani e colaboradores (2016) (131) e do Vale e colaboradores (2017) (104) relataram que os grupos irradiados não diferiram dos grupos Ct quando visualizados com azul de tripan e potencial de membrana mitocondrial avaliado por citometria de fluxo, respectivamente. Contudo, cabe aqui relatar que os parâmetros de irradiação destes quatro autores foram completamente diferentes entre si, assim como não havia similaridade com os que foram utilizados neste trabalho.

Análises da contagem de CTMA por citometria de fluxo (Figura 16) revelaram que a taxa de proliferação celular não foi alterada em nenhuma aplicação de LED em relação ao grupo Ct. Duas hipóteses são encontradas na literatura para explicar o mecanismo que conduz ao estímulo de proliferação celular. A primeira é sustentada pelos estudos de Li e colaboradores (2010) (76) e Holder e colaboradores (2012) (110), em que o aumento da taxa da proliferação é associado à níveis mais altos de ATP e na atividade mitocondrial. A segunda teoria é apoiada Tuby e colaboradores (2006) (132), de Oliveira e colaboradores (2015) (94) e Kim e colaboradores (2019) (107), nos quais associam o estímulo da angiogênese com o aumento da capacidade de proliferação. Contudo, além dos protocolos utilizados por todos os autores serem diferentes, Holder e colaboradores (2012) (110) relataram que houve aumento na taxa de proliferação celular a partir do sétimo dia após a última irradiação e nossos experimentos foram realizados 24 horas após a última aplicação de LED.

Realizamos experimentos para avaliar a respiração mitocondrial sob condições de estresse metabólico das CTMA irradiadas múltiplas vezes (Figura 17), estimando a atividade bioenergética celular e mitocondrial pelo monitoramento do OCR (133). Nossos resultados ilustram que os grupos irradiados com 0,5 e 2 J/cm<sup>2</sup> apresentaram depleção da OCR, com respiração mitocondrial preservada sob estresse no grupo 4 J/cm<sup>2</sup>. Estudos neste equipamento são relativamente novos e inexistentes com CT que sofreram fotobiomodulação com luz vermelha, sendo difícil a realização de uma comparação de resultados. Contudo, o grupo de Serrage e colaboradores (2019) (134) utilizou mioblastos irradiados com LED em comprimentos de onda variando entre 400 e 830 nm, com irradiância entre até 23 e exposição radiante entre zero e 8 e relataram que a OCR nos grupos irradiados não variou em relação ao grupo sem irradiação.

Além disso, analisando todos os nossos resultados em conjunto, observamos que estão em concordância com os trabalhos de Huang e colaboradores (2009 e 2011) (128, 135) nos quais demonstram o efeito bifásico da dose-resposta das fontes de luz em culturas celulares e experimentação animal. Basicamente, sugere-se que a aplicação de uma energia insuficiente não

resultará em resposta, se mais energia for aplicada, a bioestimulação é alcançada, mas quando muita energia é aplicada, ocorre a bioinibição. Assim, vimos que as doses 0,5 e 2 J/cm<sup>2</sup> se mostram insuficientes na promoção de maiores alterações a nível celular, sendo que a irradiação com 4 J/cm<sup>2</sup> levou a mudanças benéficas vistas tanto nas células quanto em seus padrões de secreção.

Após a realização deste trabalho, é possível citar que as melhoras metabólicas e de secretoma das CTMA irradiadas com LED foram limitadas devido às células serem saudáveis e, por isso, não são favoráveis a produzir mais fatores do que necessitam. Neste caso, para estudos futuros, devemos realizar testes *in vitro* que mimetizem o microambiente dos locais de transplante, ou seja, microambientes onde há déficit nutricional e hipóxia para assim, futuramente, realizarmos testes *in vivo* utilizando o transplante destas células em diferentes doenças genéticas ou adquiridas. Ainda, acrescenta-se a possibilidade de realizar experimentos com exposições radiantes e quantidades de irradiações maiores, assim como testar tempos diferentes de análises após a última irradiação afim de definir o protocolo de irradiação com o maior efeito benéfico nas CTMA.

Além disso, embora ainda haja um pequeno número de estudos, nossos resultados sugerem que o LED vermelho pode ser uma abordagem eficaz para impulsionar a terapia com CTMA. Os efeitos benéficos envolvem uma complexa rede de adaptações em vias de sinalização, aprimoramento do metabolismo celular e secreção de fatores essenciais para a realização de uma futura terapia celular *in vivo*. No geral, as CTMA sujeitas ao LED vermelho mostraram parâmetros aprimorados de viabilidade, metabolismo celular e energético, atividade mitocondrial e fatores de crescimento em comparação às CTM não irradiadas.

## 6. CONCLUSÃO

Os dados *in vitro* possibilitaram considerar a utilização de LED a 630 nm, 15 mW/cm<sup>2</sup>, três irradiações e 4 J/cm<sup>2</sup> como possível parâmetro adotado para irradiar as CTMA antes da realização da terapia celular.

A base dessa escolha provém dos resultados de:

1. Aumento na secreção de IL-6, fator importante para as CTMA permanecerem indiferenciadas;
2. Aumento na secreção de IGF-1, fator que participa do recrutamento de células para o local lesionado e resolução da resposta inflamatória;
3. Aumento na secreção de NO;
4. Aumento na atividade mitocondrial com o emprego de dois marcadores (MTT e *AlamarBlue*);
5. Aumento nos níveis de ATP intracelular, analito importante para a sobrevivência celular;
6. Preservação dos perfis pró e anti-inflamatório;
7. Preservação da respiração celular sob estresse metabólico.

## REFERÊNCIAS

1. Karpov AA, Udalova DV, Pliss MG, Galagudza MM. Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved? Providing weapons and armour to cells. *Cell proliferation*. 2017;50(2).
2. Gautam M, Fujita D, Kimura K, Ichikawa H, Izawa A, Hirose M, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stem cells improves cardiac contractile function and electrical stability in a rat myocardial infarction model. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;81:139-49.
3. de Souza Vieira S, Antonio EL, de Melo BL, Portes LA, Montemor J, Oliveira HA, et al. Exercise Training Potentiates The Cardioprotective Effects of Stem Cells Post-infarction. *Heart Lung Circ*. 2019;28(2):263-71.
4. Souza Vieira S, Antonio EL, de Melo BL, Neves Dos Santos LF, Santana ET, Feliciano R, et al. Increased Myocardial Retention of Mesenchymal Stem Cells Post-MI by Pre-Conditioning Exercise Training. *Stem Cell Rev Rep*. 2020.
5. Der Sarkissian S, Lévesque T, Noiseux N. Optimizing stem cells for cardiac repair: Current status and new frontiers in regenerative cardiology. *World J Stem Cells*. 2017;9(1):9-25.
6. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95(1):9-20.
7. Si Y-L, Zhao Y-L, Hao H-J, Fu X-B, Han W-D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Research Reviews*. 2011;10(1):93-103.
8. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(9):726-36.
9. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1966;16(3):381-90.
10. Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011;7(3):569-89.
11. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental cell research*. 2004;295(2):395-406.
12. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
13. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
14. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, Mizuno H, Tawada M, You F, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy*. 2011;13(6):675-85.
15. dos Santos L, Santos AA, Goncalves GA, Krieger JE, Tucci PJ. Bone marrow cell therapy prevents infarct expansion and improves border zone remodeling after coronary occlusion in rats. *Int J Cardiol*. 2010;145(1):34-9.

16. dos Santos L, Goncalves GA, Davel AP, Santos AA, Krieger JE, Rossoni LV, et al. Cell therapy prevents structural, functional and molecular remodeling of remote non-infarcted myocardium. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):3829-36.
17. Khodayari S, Khodayari H, Amiri AZ, Eslami M, Farhud D, Hescheler J, et al. Inflammatory Microenvironment of Acute Myocardial Infarction Prevents Regeneration of Heart with Stem Cells Therapy. *Cell Physiol Biochem.* 2019;53(5):887-909.
18. Sun DZ, Abelson B, Babbar P, Damaser MS. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for regenerative urology. *Nature Reviews Urology.* 2019;16(6):363-75.
19. Ma T, Sun J, Zhao Z, Lei W, Chen Y, Wang X, et al. A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):124.
20. Christoforou N, Gearhart JD. Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49(6):396-413.
21. Cheng AS, Yau TM. Paracrine effects of cell transplantation: strategies to augment the efficacy of cell therapies. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;20(2):94-101.
22. Maacha S, Sidahmed H, Jacob S, Gentilcore G, Calzone R, Grivel JC, et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. *Stem Cells Int.* 2020;2020:4356359.
23. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 2006;13(2):77-81.
24. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2007;21(12):3197-207.
25. Zhang Y, Liang X, Lian Q, Tse HF. Perspective and challenges of mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. *Expert review of cardiovascular therapy.* 2013;11(4):505-17.
26. Richardson JD, Nelson AJ, Zannettino AC, Gronthos S, Worthley SG, Psaltis PJ. Optimization of the cardiovascular therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells-taking the next step. *Stem Cell Rev Rep.* 2013;9(3):281-302.
27. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(1):2.
28. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation.* 1994;89(5):2183-9.
29. Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, Li P, Wang Y, Schmitz W, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation.* 2001;104(17):2088-94.

30. Liu R, Shen H, Ma J, Sun L, Wei M. Extracellular Vesicles Derived from Adipose Mesenchymal Stem Cells Regulate the Phenotype of Smooth Muscle Cells to Limit Intimal Hyperplasia. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2016;30(2):111-8.
31. Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, Hagino I, Mori H, Sawa Y, et al. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(1):11-6.
32. Das M, Sundell IB, Koka PS. Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy. *Journal of stem cells.* 2013;8(1):1-16.
33. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8932-7.
34. Blanc KL, Götherström C, Ringdén O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation.* 2005;79(11):1607-14.
35. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine.* 2007;167(10):989-97.
36. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nature Medicine.* 2008;14(2):181-7.
37. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney international.* 2007;72(4):430-41.
38. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2006;24(4):928-35.
39. Wang Y, Deng Y, Zhou GQ. SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain research.* 2008;1195:104-12.
40. Zhang S, Ge J, Sun A, Xu D, Qian J, Lin J, et al. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem.* 2006;99(4):1132-47.
41. Jiang S, Haider H, Idris NM, Salim A, Ashraf M. Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair. *Circ Res.* 2006;99(7):776-84.
42. Sun J, Yuan Y, Qin H, Ying C, Liu W, Zhang J, et al. Serum from hepatectomized rats induces the differentiation of adipose tissue mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells and upregulates the expression of hepatocyte growth factor and interleukin-6 in vitro. *International journal of molecular medicine.* 2013;31(3):667-75.
43. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Archives of Iranian medicine.* 2007;10(4):459-66.

44. Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2009;21(10):1199-205.
45. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85(10):1927-35.
46. Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2004;127(5):1293-300.
47. Deng Y, Guo X, Yuan Q, Li S. Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4lg gene delivery into mesenchymal stem cells. *Chinese medical journal*. 2003;116(11):1649-54.
48. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000;6(11):1282-6.
49. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Aires-Barros MR, da Silva CL, et al. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010:735349.
50. Komarova S, Roth J, Alvarez R, Curiel DT, Pereboeva L. Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor. *Journal of ovarian research*. 2010;3:12.
51. Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European cells & materials*. 2010;20:121-33.
52. Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5661):1198-201.
53. Song L, Chau L, Sakamoto Y, Nakashima J, Koide M, Tuan RS. Electric Field-Induced Molecular Vibration for Noninvasive, High-Efficiency DNA Transfection. *Molecular Therapy*. 2004;9(4):607-16.
54. Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ, et al. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Molecular Biotechnology*. 2005;30(1):9-19.
55. Surder D, Manka R, Moccetti T, Lo Cicero V, Emmert MY, Klersy C, et al. Effect of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Treatment, Early or Late After Acute Myocardial Infarction: Twelve Months CMR and Long-Term Clinical Results. *Circ Res*. 2016;119(3):481-90.
56. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *European heart journal*. 2006;27(9):1114-22.
57. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, O'Brien T, Samali A, Barry F, et al. Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(5):1325-36.

58. Das R, Jahr H, van Osch GJ, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(2):159-68.
59. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I150-6.
60. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004;8(3):301-16.
61. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*. 2003;17(6):1146-9.
62. Gronthos S, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(4):716-22.
63. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature biotechnology*. 2002;20(6):592-6.
64. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, et al. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nature biotechnology*. 2002;20(6):587-91.
65. Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels. *Sci Rep*. 2016;6:33719.
66. de Oliveira HA, Antonio EL, Arsa G, Santana ET, Silva FA, Júnior DA, et al. Photobiomodulation Leads to Reduced Oxidative Stress in Rats Submitted to High-Intensity Resistive Exercise. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:5763256.
67. Manchini MT, Serra AJ, Feliciano Rdos S, Santana ET, Antônio EL, de Tarso Camillo de Carvalho P, et al. Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PloS one*. 2014;9(7):e101270.
68. Rosso MPO, Buchaim DV, Kawano N, Furlanette G, Pomini KT, Buchaim RL. Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review. *Bioengineering (Basel)*. 2018;5(2).
69. Stancker TG, Vieira SS, Serra AJ, do Nascimento Lima R, Dos Santos Feliciano R, Silva JA, Jr., et al. Can photobiomodulation associated with implantation of mesenchymal adipose-derived stem cells attenuate the expression of MMPs and decrease degradation of type II collagen in an experimental model of osteoarthritis? *Lasers Med Sci*. 2018;33(5):1073-84.
70. Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 2003;21(2):67-74.

71. Whelan HT, Smits RL, Jr., Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 2001;19(6):305-14.
72. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2018;17(8):1003-17.
73. Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*. 1960;187(4736):493-4.
74. Renk KF. *Basics of Laser Physics* 2012.
75. Kim WS, Calderhead RG. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser therapy*. 2011;20(3):205-15.
76. Li WT, Leu YC, Wu JL. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg*. 2010;28 Suppl 1:S157-65.
77. Peng F, Wu H, Zheng Y, Xu X, Yu J. The effect of noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):645-53.
78. Schubert EF, Kim JK. Solid-state light sources getting smart. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5726):1274-8.
79. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 1999;49(1):1-17.
80. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2005;81(2):98-106.
81. Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810nm and 980nm lasers operates via different mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta General subjects*. 2017;1861(2):441-9.
82. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE journal of selected topics in quantum electronics : a publication of the IEEE Lasers and Electro-optics Society*. 2016;22(3).
83. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2012;237(11):1241-8.
84. Kim HJ, Park JS. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Dev Reprod*. 2017;21(1):1-10.
85. Rhee YH, Moon JH, Jung JY, Oh C, Ahn JC, Chung PS. Effect of photobiomodulation therapy on neuronal injuries by ouabain: the regulation of Na, K-ATPase; Src; and mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *BMC neuroscience*. 2019;20(1):19.
86. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H. Photobiomodulation at 660nm stimulates proliferation and migration of diabetic wounded cells via the expression of epidermal growth factor and the JAK/STAT pathway. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2018;179:74-83.
87. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of biomedical science*. 2009;16(1):4.

88. Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):909-16.
89. Yin K, Zhu R, Wang S, Zhao RC. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2017;26(10):762-75.
90. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):237-49.
91. Ong WK, Chen HF, Tsai CT, Fu YJ, Wong YS, Yen DJ, et al. The activation of directional stem cell motility by green light-emitting diode irradiation. *Biomaterials.* 2013;34(8):1911-20.
92. Peat FJ, Colbath AC, Bentsen LM, Goodrich LR, King MR. In Vitro Effects of High-Intensity Laser Photobiomodulation on Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Viability and Cytokine Expression. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(2):83-91.
93. Mostafavinia A, Dehdehi L, Ghoreishi SK, Hajihossainlou B, Bayat M. Effect of in vivo low-level laser therapy on bone marrow-derived mesenchymal stem cells in ovariectomy-induced osteoporosis of rats. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology.* 2017;175:29-36.
94. de Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT, Bassaneze V, Krieger JE, de Tarso Camillo de Carvalho P, et al. Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. *Lasers Med Sci.* 2015;30(1):217-23.
95. Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):7781.
96. Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers in surgery and medicine.* 2015;47(2):210-5.
97. Mamalis A, Koo E, Jagdeo J. Resveratrol Prevents Reactive Oxygen Species-Induced Effects of Light-Emitting Diode-Generated Blue Light in Human Skin Fibroblasts. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al].* 2016;42(6):727-32.
98. Yoshida A, Yoshino F, Makita T, Maehata Y, Higashi K, Miyamoto C, et al. Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology.* 2013;129:1-5.
99. Arnault E, Barrau C, Nanteau C, Gondouin P, Bigot K, Viénot F, et al. Phototoxic action spectrum on a retinal pigment epithelium model of age-related macular degeneration exposed to sunlight normalized conditions. *PLoS one.* 2013;8(8):e71398.
100. Sharma SK, Kharkwal GB, Sajo M, Huang YY, De Taboada L, McCarthy T, et al. Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. *Lasers in surgery and medicine.* 2011;43(8):851-9.

101. Dinardo CL, Venturini G, Omae SV, Zhou EH, da Motta-Leal-Filho JM, Dariolli R, et al. Vascular smooth muscle cells exhibit a progressive loss of rigidity with serial culture passaging. *Biorheology*. 2012;49(5-6):365-73.
102. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the alamarBlue Assay. *Cold Spring Harbor protocols*. 2018;2018(6).
103. Barboza CA, Ginani F, Soares DM, Henriques AC, Freitas Rde A. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*. 2014;12(1):75-81.
104. Vale KLD, Maria DA, Picoli LC, Deana AM, Mascaro MB, Ferrari RAM, et al. The Effects of Photobiomodulation Delivered by Light-Emitting Diode on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Study on the Relevance to Pluripotent Stem Cell Viability and Proliferation. *Photomed Laser Surg*. 2017;35(12):659-65.
105. Babaee A, Nematollahi-Mahani SN, Dehghani-Soltani S, Shojaei M, Ezzatabadipour M. Photobiomodulation and gametogenic potential of human Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;514(1):239-45.
106. Babaee A, Nematollahi-Mahani SN, Shojaei M, Dehghani-Soltani S, Ezzatabadipour M. Effects of polarized and non-polarized red-light irradiation on proliferation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504(4):871-7.
107. Kim K, Lee J, Jang H, Park S, Na J, Myung JK, et al. Photobiomodulation Enhances the Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cells to Mitigate Radiation-Induced Enteropathy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
108. Park IS, Chung PS, Ahn JC, Leproux A. Human adipose-derived stem cell spheroid treated with photobiomodulation irradiation accelerates tissue regeneration in mouse model of skin flap ischemia. *Lasers Med Sci*. 2017;32(8):1737-46.
109. Lipovsky A, Oron U, Gedanken A, Lubart R. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*. 2013;28(4):1113-7.
110. Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR. Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res*. 2012;91(10):961-6.
111. Adams DH, Russell ME, Hancock WW, Sayegh MH, Wyner LR, Karnovsky MJ. Chronic rejection in experimental cardiac transplantation: studies in the Lewis-F344 model. *Immunological reviews*. 1993;134:5-19.
112. Khan M, Meduru S, Mohan IK, Kuppusamy ML, Wisel S, Kulkarni A, et al. Hyperbaric oxygenation enhances transplanted cell graft and functional recovery in the infarct heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(2):275-87.
113. Khan M, Meduru S, Pandian RP, Rivera BK, Kuppusamy P. Effect of oxygenation on stem-cell therapy for myocardial infarction. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011;701:175-81.
114. Leblanc AJ, Nguyen QT, Touroo JS, Aird AL, Chang RC, Ng CK, et al. Adipose-derived cell construct stabilizes heart function and increases microvascular perfusion in an established infarct. *Stem cells translational medicine*. 2013;2(11):896-905.
115. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011;4(2):145-53.

116. de Lima RDN, Vieira SS, Antonio EL, Camillo de Carvalho PT, de Paula Vieira R, Mansano B, et al. Low-level laser therapy alleviates the deleterious effect of doxorubicin on rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2019;196:111512.
117. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2020;77(14):2771-94.
118. Broughton KM, Wang BJ, Firouzi F, Khalafalla F, Dimmeler S, Fernandez-Aviles F, et al. Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. *Circ Res*. 2018;122(8):1151-63.
119. Jiang B, Liao R. The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(4):410-6.
120. Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, Chen WCW, Mansurov N, Issabekova A, et al. Role of the immune system in cardiac tissue damage and repair following myocardial infarction. *Inflamm Res*. 2017;66(9):739-51.
121. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem*. 2009;108(3):577-88.
122. Mourkioti F, Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*. 2005;26(10):535-42.
123. Haider KH, Ashraf M. Preconditioning approach in stem cell therapy for the treatment of infarcted heart. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;111:323-56.
124. Elangbam CS, Qualls CW, Jr., Dahlgren RR. Cell adhesion molecules--update. *Veterinary pathology*. 1997;34(1):61-73.
125. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer investigation*. 1998;16(3):176-82.
126. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(2):159-60.
127. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers in surgery and medicine*. 2005;36(4):307-14.
128. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. Dose-response : a publication of International Hormesis Society. 2009;7(4):358-83.
129. Zheng J, Wen Y, Austin JL, Chen DB. Exogenous nitric oxide stimulates cell proliferation via activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biology of reproduction*. 2006;74(2):375-82.
130. Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers in surgery and medicine*. 2009;41(4):298-304.
131. Dehghani Soltani S, Babae A, Shojaei M, Salehinejad P, Seyedi F, JalalKamali M, et al. Different effects of energy dependent irradiation of red and green lights on proliferation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Lasers Med Sci*. 2016;31(2):255-61.
132. Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers in surgery and medicine*. 2006;38(7):682-8.

133. Yépez VA, Kremer LS, Iuso A, Gusic M, Kopajtich R, Koňářiková E, et al. OCR-Stats: Robust estimation and statistical testing of mitochondrial respiration activities using Seahorse XF Analyzer. *PloS one*. 2018;13(7):e0199938.
134. Serrage HJ, Joannis S, Cooper PR, Palin W, Hadis M, Darch O, et al. Differential responses of myoblasts and myotubes to photobiomodulation are associated with mitochondrial number. *J Biophotonics*. 2019;12(6):e201800411.
135. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 2011;9(4):602-18.

## ANEXO 1 – Termo de Aprovação pela CEUA



### Comissão de Ética no Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) PODE MELHORAR A EFICIÊNCIA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM MELHORAR A FUNÇÃO CARDÍACA PÓS-INFARTO?", protocolada sob o CEUA nº 5883160218, sob a responsabilidade de **Bárbara Sampaio Dias Martins Mansano** e equipe; *Ednei Luiz Antonio; Ighor Luiz Azevedo Teixeira; Paulo José Ferreira Tucci* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 26/04/2018.

We certify that the proposal "Light Emitting Diode (LED) Can Improve Mesenchymal Stem Cell Efficiency In Post-Myocardial Infarction Cardiac Function?", utilizing Isogenic rats, protocol number CEUA 5883160218, under the responsibility of **Bárbara Sampaio Dias Martins Mansano** and team; *Ednei Luiz Antonio; Ighor Luiz Azevedo Teixeira; Paulo José Ferreira Tucci* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/26/2018.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 12/2020      Área: *Cardiologia/medicina*

Origem: *Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME*

Espécie: *Ratos isogênicos*      sexo: *Machos e fêmeas*      idade: *12 a 25 semanas*      N: *---*

Linhagem: *Fisher 344-EPM*      Peso: *150 a 260 g*

Local do experimento: *Laboratório de Fisiologia Cardíaca - UNIFESP Laboratório de Biofotônica - UNINOVE*

São Paulo, 07 de agosto de 2018

Prof. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Daniela Santoro Rosa  
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## ANEXO 2 – Artigo submetido



Bárbara Mansano <barbarasdm@gmail.com>

---

### Manuscript submitted to Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Oxidative Medicine and Cellular Longevity <mahalakshmi.lakshmanan@hindawi.com>  
Para: barbarasdm@gmail.com

3 de novembro de 2020 10:08



Dear Dr. Sampaio Dias Martins Mansano,

The manuscript titled "Enhancing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells with light-emitting diode: implications and molecular mechanisms" has been submitted to Oxidative Medicine and Cellular Longevity by Andrey J. Serra.

To confirm the submission and view the status of the manuscript, please verify your details by clicking the link below.

Thank you for submitting your work to Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

[LOGIN](#)

Kind regards,  
Mahalakshmi Lakshmanan  
Oxidative Medicine and Cellular Longevity

This email was sent to [barbarasdm@gmail.com](mailto:barbarasdm@gmail.com). You have received this email in regards to the account creation, submission, or peer review process of a submitted paper, published by Hindawi Limited.

Hindawi Limited, 3rd Floor, Adam House, 1 Fitzroy Square, London, W1T 5HF, United Kingdom

Hindawi respects your right to privacy. Please see our [privacy policy](#) for information on how we store, process, and safeguard your data.

## **Enhancing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells with light-emitting diode: implications and molecular mechanisms**

Barbara Sampaio Dias Martins Mansano<sup>1</sup>, Vitor Pocani da Rocha<sup>2</sup>, Ednei Luiz Antonio<sup>2</sup>, Daniele Fernanda Peron<sup>1</sup>, Rafael do Nascimento de Lima<sup>1</sup>, Paulo Jose Ferreira Tucci<sup>2</sup>, Andrey Jorge Serra<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Biophotonics Applied to Health Science, Nove de Julho University, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Medicine, Cardiology Division, Federal University of São Paulo, SP, Brazil

### **Abstract**

This study evaluated the effects of light-emitting diode (LED) on mesenchymal stem cells (MSCs). An electronic search was conducted in PubMed/MEDLINE, Scopus, and Web of Science database for articles published from 1980 to February 2020. Ten articles met the search criteria and were included in this review. The risk of bias was performed to report quality, safety, and environmental standards. MSCs derived from adipocyte, bone marrow, tooth pulp, gingiva, and umbilical cord. Protocols for cellular irradiation used red and blue spectrum light with variations of the parameters. The beneficial effect of red LED included increases cellular viability, proliferation, differentiation, and secretion of growth factors. The set of information available leads to proposing a complex signaling cascade for the action of photobiomodulation, including angiogenic factors, singlet oxygen, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase, Janus kinase/signal transducer, and reactive oxygen species. In conclusion, although our results suggest that LED can boost MSCs, a nonuniformity in the experimental protocol, bias, and the limited number of studies included reduces the power of systematic review. Further research is essential to find the optimal LED irradiation parameters to boost MSCs function and evaluate its impact in the clinical setting.

**Keywords:** biotechnology, light-emitting diode, mesenchymal stem cells, photobiomodulation, regenerative medicine

### **Introduction**

Photobiomodulation (PBM) employs non-ionizing forms of light sources, which encompass laser and light-emitting diode (LED) for a broad visible and infrared spectrum, and PBM-based therapy has been successfully applied in treatment of several diseases, injuries and disorders [1]. Acquaintance with the mechanisms subjacent the effects of PBM has been of considerable interest, and a well-accepted view is that the light energy delivered to tissues is absorbed by the cell chromophores, favouring the production of adenosine triphosphate (ATP) [2, 3]. Nevertheless, beneficial effects on inflammation, oxidative stress, survival, and the regeneration of tissues have been reported by several researchers [4-7].

Concerning LED, when the first one was developed in 1998 by Harry Whelan and his group at the NASA space medicine laboratory [8], this technology had some characteristics that diverge them from lasers devices. While LED are noncoherent and quasimonochromatic light sources [9] based on the phenomenon of electroluminescence of semiconductor materials [10], laser emits, in a stimulated manner, a monochromatic and coherent light beam of low divergence [11]. Besides that, it is important to quote that those different properties would still photoactivate cells without causing heat changes or damage. Notwithstanding, benefits are perceptible in LED usage when in comparison to lasers, such as increased safety and durability, lower cost, ease of use, and more flexibility in the irradiated area size [11, 12] although the detected effects on irradiated cells are similar in both irradiations with laser and LED [13, 14]. LED phototherapy has either been well-proven to have an effective benefit in a wide variety of clinical indications such as pain relief, skin injuries, rheumatological diseases, muscle disorders, and infections, suggesting as well that LED might have a powerful role to play in the clinical practice for a variety of conditions. [7, 15-27].

In the last years, LED emerged to have important effects on mesenchymal stem cells (MSCs) [28], easily cultivated multipotent stem-cells which can be isolated from various adult tissues, therefore opening a new window for PBM application into strategies being currently pursued to improve therapy with MSCs. Among the advantages of MSCs usage, like ubiquitous sources, extensive proliferation ability, multilineage differentiation ability, easy procurement and collection from various tissues, low immunogenicity, and paracrine potential [29, 30]. Although being a promising therapy, mostly to the poor engrafting of implanted cells, low

survival rates are common for long periods and MSCs therapy has generated unsatisfactory results in numerous clinical conditions [31, 32]. Hence, since LED was referred to have the biological effects mentioned above, it could be applied to overcome the current limitations of MSCs therapy more easily. Thereby, preconditioning of MSCs with LEDs before transplantation may be a usual procedure to improve tissue engineering and cell therapy in the future [33, 34]. To the best of our knowledge, most of the articles evaluated the repercussion of PBM on MSCs, as illustrated in different systematic reviews [28, 35-37], and the MSCs response to LED irradiation remains unclear. Therefore, based on the plethora of biology actions that makes the MSCs promising to regenerative medicine [29] and the possible cytoprotective effect of the PBM, we aimed this systematic review to summarize the current evidence about the effects of LED in mesenchymal stem cells (MSCs) and to identify the underlying mechanisms found to underpin this effect.

## Materials and Methods

### Search strategy

The study was carried out according to PRISMA guidelines (Figure 1). The search for published articles into the effect of LEDs on MSCs was conducted in Pubmed, Scopus, and Web of Science databases. The articles retrieved were limited to the English language and were for the period from January 1980 to February 2020. The MeSH terms and Scopus international data lines were used to find keywords related to: “photobiomodulation”, “phototherapy”, “light-emitting diode”, “stem cells” and “mesenchymal stem cells”. MeSH terms were used individually or combined to increase the findings. Data extraction involved MSCs experimental methodology, LED parameters, and results. Duplicate articles from the database search results were removed.

### Study selection

Screening for potentially eligible studies was examined by considering the title and abstracts closeness to the keywords regarding the theme. Additionally, two independent reviewers applied predetermined inclusion criteria to full studies. Conflicts were solved by a third independent researcher. Articles investigating in vitro procedural or methodological applications of LED were accepted. The

application of the irradiation could be to any plate or culture bottle. At the end of the selection process, after reading the full texts, articles that matched inclusion criteria: a quantitative or semi-quantitative measure; English language; LED irradiation was provided as an intervention to at least one of the treatment groups; MSCs were experimentally analyzed; to report a minimum of LED parameters, or the missing parameter had to be calculable using alternate parameters. Exclusion criteria were as follows: established cell lines; missing LED parameters or not possible to calculate; papers not published in the English language; phototherapy not using LED; review articles with or without meta-analysis. Figure 1 shows the process of study selection.

### Risk of bias

Potentially eligible articles were printed, reviewed, and critically judged by three independent reviewers. Bias is a reliable method to assess quality, safety, and environmental standards of clinical and experimental studies [38]; therefore, the studies were analyzed using an adapted version for cellular research [39]. Risk of bias included selection (systematic differences in the comparison groups), performance (systematic differences introduced during the study), detection (systematic differences in the outcome assessment between groups), attrition (systematic differences in excluding study units between groups), reporting (systematic omission of results in the study documentation/publication), confounding (systematic differences in factors potentially influencing the results between groups), appropriate statistical methods and other bias.

## Results

### Study Selection

Figure 1 shows a flowchart of the search, conducted using the three databases. Overall, 1933 articles were found in an early screening. From the initial potentially relevant articles identified, 1880 were excluded because they did not meet the inclusion criteria as follow: no LED irradiation (n = 970); systematic reviews (n = 666); established cell lines (n = 104); no English language (n = 63); congress abstracts (n = 77). After this, 53 articles remained, and they were fully examined to check closely exclusion criteria. Then, 27 repeated studies were excluded as

well as 16 other papers with lost or impossible to calculate LED parameters. Finally, 10 articles served as the basis for this systematic review.

#### Risk of bias

Figure 2A illustrates the risk of bias evaluated for each included study. Firstly, articles were surveyed for the presence or absence of key sections: 40% did not mention ethical statement and 10% did not give a description of measurement precision and variability. Then, low and high risk of bias was judged as illustrated in Figure 2B, in which the categories that presented more studies (i.e. 100%) in low risk were: other bias; appropriate statistical methods; confounding bias; reporting bias; selection bias – “allocation concealment” and “appropriate control group selection”. Some categories expressed 100% concerning high risk: detection and performance bias. Selection bias (“randomization”) was 60% at high risk.

#### Interventions

Table 1 describes in detail the methodology of MSCs used in seven articles. MSCs were derived from two animal species (60% human, 40% rodents) and several sources (30% bone marrow, 30% umbilical cord, 20% tooth pulp, 10% adipocyte, and 10% gingiva). Cell concentration and passages had high variance. One study did not specify the rodent strain used for obtaining MSCs and three papers did not report the cellular passage. Five studies did not report donor genders. Table 2 shows the LED parameters used in the articles. Studies showed a huge variety of irradiating primary MSCs using LEDs. Wavelengths were the majority within the red spectrum, ranging from 620 to 800 nm. One study considered irradiating cells at the blue wavelength (400 to 480 nm and another paper has applied irradiations in a broad spectrum of light, ranging from 400 to 800 nm. Many studies have not reported dimensions for flasks, dishes, or culture wells. In this regard, approximate growth surface areas were considered in the basic dimension guide (e.g. <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-209.pdf>): 96-well plate (0.32 cm<sup>2</sup>); 24-well plate (1.9 cm<sup>2</sup>); 35 mm or 3.5 cm plate (9 cm<sup>2</sup>); T75 bottles (75 cm<sup>2</sup>). Thus, the irradiance area varied from 0.32 to 75 cm<sup>2</sup>. Potency reached 0.848 to 900 mW, whereas the irradiance varied from 1.65 to 100 mW/cm<sup>2</sup>, appearing differently when distinct authors. Energy varied from

0.102 to 450 J, and radiant exposure reached 0.075 to 32 J/cm<sup>2</sup>. Irradiation time reported reached 10 to 3636 seconds, appearing differently when distinct authors. Single irradiation was most used, and the timeline varied between 1 to 28 days.

The main results are presented in Table 3. Most studies that assessed viability, proliferation, and differentiation showed that the cells responded positively to LED. These findings were accompanied by the increased metabolic potential of the cells, as illustrated by higher ATP content and mitochondrial activity. MSCs were also more secretive of growth factors (i.e. fibroblast growth factor (FGF); hepatocyte growth factor (HGF); vascular endothelial growth factor (VEGF); and nitric oxide (NO)). There was no effect of LED on scratch, with one study reporting increased levels of genetic self-renewal markers. Only one study has reported an adverse effect of LED to increased DNA fragmentation. Moreover, the only study that has used blue wavelengths reported decreased viability using 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay.

## Discussion

Most of the therapeutic effects of MSCs transplantation are unsatisfactory because implanted cells have low engrafting and do not survive for a long time. In light of these undesirables, genetic approaches were used to improve survival, engraftment, proliferation, and differentiation of MSCs [40]. MSCs preconditioning has been another strategy to enhance functionally and cellular resistance into the hostile tissue [40]. In this setting, the present study was carried out to systematically review the literature on the effectiveness of LED in optimizing the therapeutic potential of MSCs.

In respect to the irradiation approach, most studies have applied LED in the red band, varying between 620 and 800 nm [13, 41-48]. The red light was chosen because it has been well-reported to rise the proliferation rate of various MSCs lines [41, 42, 49]. Besides, the majority of LED applications on MSCs were performed with irradiances of up to 15 mW/cm<sup>2</sup> and radiant exposure ranging from 0.075 to 4 J/cm<sup>2</sup> [13, 41-44, 47, 48]. This LED exposure programming is very helpful to enhance cell proliferation [13, 41, 44, 50], showing to be in line with the findings described in Table 3. MSCs proliferation was positively

influenced by LED as analyzed by different assays. On the other hand, the only study that used LEDs at 420-480 nm wavelength reported a lower rate of proliferation compared to non-irradiated MSCs over the 28-day follow-up [51], indicating that blue light does not seem subtle to enhance MSCs.

The greatest cell proliferation was accompanied by a range of up-regulated cellular responses by red-light, including clonogenic potential [41, 48], osteogenic differentiation [41], gametogenesis [47], and endothelial as well as epithelial cell formation [43]. Only one study has reported that LED can induce negative effects as determined by MTT assay [51] and DNA fragmentation [45]. This may be a result of the high irradiance applied to the cells, which was much higher than most studies included in the review that has applied red-light. High irradiance has also been used by Lipovsky et al. [46] with increased cell proliferation; however, the authors have not examined any apoptosis marker. Finally, the studies vary differently from the number of irradiation (see Table 2). The better frequency of irradiations affecting MSCs has not yet been determined; however, there are data reporting that LED effect on the proliferation by single-dose irradiation is temporary, and multiple stimuli are necessary for the optimization of MSCs growth [41, 52].

Biological mechanisms of light therapy are not yet fully understood and many of the data come from investigations of low-level laser role on MSCs [53, 54]. It is difficult to assume a directly comparable effect of laser with LED because these light sources have some different features. Notwithstanding, in recent years it has become that LED performs equally to medical lasers [55], with a suitable alternative without the laser's disadvantages such as heat production, narrow beam width, and high charges [56]. Mitochondrial respiratory chain activation is a well-described mechanism of red-light to increase ATP production which may accelerate mitosis [41, 57-59], and three studies in this review have reported increased proliferation associated with higher ATP level and mitochondrial activity [41, 42, 48]. The set of information available leads to proposing a complex signaling cascade, including singlet oxygen, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase, Janus kinase/signal transducer, and reactive oxygen species [41, 60-64].

In this review, two studies have reported a significant increase in VEGF, FGF, HGF, and NO content, respectively [42, 43, 46, 48]. These paracrine effects and immune regulatory functions of MSCs have been used to successfully treat a variety of tissue injury-related diseases [65, 66]. Moreover, the stimulation of angiogenesis is a very important effect of red-light to increase proliferation capacity [67, 68]. Thus, Szymanska et al. [69] reported an increased endothelial cell proliferation after light stimulation as possibly mediated by VEGF.

Therefore, red LED may be associated with a pro-survival signal in the MSCs, which added to the increased production of ATP, and growth factor secretion would lead to greater cell response to proliferation and differentiation. We summarize this network of red LED-light irradiation in Figure 3.

Although LED therapy could bring benefits in MSCs engineering, there was no unanimity regarding the source, nor the quantity and passage used in the experiments. Moreover, quality guidelines criteria revealed that many of the included manuscripts had a high risk for detection, performance, and selection bias. These bias categories may be associated with problems in adhering to the study protocol, systematic differences introduced during the study, and lack of blinding results to study group or exposure level [39]. It is intended that a high risk of bias can potentially compromise the confidentiality of studies and influence the translation of findings *in vitro* to experiments using animals or clinical trials in the future.

## Conclusion

Although the small number of studies limits the power of systematic review on photobiomodulation, evidence was found to suggest that red-LED with a radiant exposure up to 7.2 J/cm<sup>2</sup>, can be an effective approach to boost MSCs therapy on a clinical perspective. In this range of radiant exposure (0.075 – 7.2 J/cm<sup>2</sup>), the effects of LED therapy on MSCs seem to follow the Arndt–Schulz law (i.e. small doses stimulate). Concerning the optimal LED settings (potency, irradiance, energy, radiant exposure, and frequency/duration of irradiations) to improve MSCs function and evaluate its impact on clinical scenario, further research is essential. The information on the irradiation parameters reported in the studies is of quality, giving research plenty of conditions for replicating the studies.

Additionally, this shows to be investigated how different types of light can alter the therapeutic potential of MSCs. Overall, MSCs subjected to LED have shown improved parameters of viability, proliferation, differentiation, cell metabolism, and angiogenic factors compared to non-irradiated MSCs. Therefore, for improving the triad of tissue engineering along with stem cells, scaffolds, and growth factors, PBM therapy could be applied as a fourth element.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Funding statement

This work was supported by the São Paulo Research Foundation - FAPESP [grant 2018/06865-7] and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development - CNPq [grant 305527/2017-7]. Funding sources were not involved in the study design, collection, analysis, or interpretation of data. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the funding sources.

#### References

1. Tsai, S.R. and M.R. Hamblin, Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B*, 2017. 170: p. 197-207.
2. Ginani, F., et al., Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci*, 2015. 30(8): p. 2189-94.
3. Wang, Y., et al., Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 33719.
4. de Oliveira, H.A., et al., Photobiomodulation Leads to Reduced Oxidative Stress in Rats Submitted to High-Intensity Resistive Exercise. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. 2018: p. 5763256.
5. Manchini, M.T., et al., Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PLoS One*, 2014. 9(7): p. e101270.

6. Rosso, M.P.O., et al., Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review. *Bioengineering (Basel)*, 2018. 5(2).
7. Stancker, T.G., et al., Can photobiomodulation associated with implantation of mesenchymal adipose-derived stem cells attenuate the expression of MMPs and decrease degradation of type II collagen in an experimental model of osteoarthritis? *Lasers Med Sci*, 2018. 33(5): p. 1073-1084.
8. Whelan, H.T., et al., Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin Laser Med Surg*, 2003. 21(2): p. 67-74.
9. Whelan, H.T., et al., Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*, 2001. 19(6): p. 305-14.
10. Renk, K.F., *Basics of Laser Physics*. 2012.
11. Heiskanen, V. and M.R. Hamblin, Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2018. 17(8): p. 1003-1017.
12. Tam, S.Y., et al., Review on the Cellular Mechanisms of Low-Level Laser Therapy Use in Oncology. *Front Oncol*, 2020. 10: p. 1255.
13. Peng, F., et al., The effect of noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*, 2012. 27(3): p. 645-53.
14. Ruan, Y., et al., Irradiation by high-intensity red light-emitting diode enhances human bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation and mineralization through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Lasers in medical science*, 2020.
15. Calderhead, R.G., et al., Adjunctive 830 nm light-emitting diode therapy can improve the results following aesthetic procedures. *Laser Ther*, 2015. 24(4): p. 277-89.
16. Yeh, N.G., C.-H. Wu, and T.C. Cheng, Light-emitting diodes—Their potential in biomedical applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010. 14(8): p. 2161-2166.
17. Kim, W.S. and R.G. Calderhead, Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther*, 2011. 20(3): p. 205-15.

18. Serhal, R., et al., Effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma: In vitro inhibition of carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 2019. 25(5): p. 567-583.
19. Jing, W., et al., Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells producing IL15 eradicate established pancreatic tumor in syngeneic mice. *Mol Cancer Ther*, 2014. 13(8): p. 2127-37.
20. Kao, T.C., et al., Suppression of cancer-initiating cells and selection of adipose-derived stem cells cultured on biomaterials having specific nanosegments. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014. 102(3): p. 463-76.
21. Iplik, E.S., et al., An answer to colon cancer treatment by mesenchymal stem cell originated from adipose tissue. *Iran J Basic Med Sci*, 2018. 21(5): p. 465-468.
22. Yuan, Y., et al., Suppression of tumor cell proliferation and migration by human umbilical cord mesenchymal stem cells: A possible role for apoptosis and Wnt signaling. *Oncol Lett*, 2018. 15(6): p. 8536-8544.
23. Bruno, S., et al., Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth. *Stem Cells Dev*, 2013. 22(5): p. 758-71.
24. Shafei, A.E., et al., Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction. *J Gene Med*, 2017. 19(12).
25. Karamini, A., et al., Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells in Rheumatoid Arthritis: a Systematic Review of In Vivo Studies. *Stem Cell Rev Rep*, 2020. 16(2): p. 276-287.
26. Chen, Y., et al., Clinical potential and current progress of mesenchymal stem cells for Parkinson's disease: a systematic review. *Neurol Sci*, 2020. 41(5): p. 1051-1061.
27. AdiwinataPawitan, J., Exploring the Most Promising Stem Cell Therapy in Liver Failure: A Systematic Review. *Stem Cells International*, 2019. 2019: p. 2782548.
28. Marques, M.M., et al., Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg*, 2016. 34(11): p. 500-508.

29. Tsuji, W., J.P. Rubin, and K.G. Marra, Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells*, 2014. 6(3): p. 312-21.
30. Rühle, A., et al., The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Chemotherapy-Induced Tissue Damage. *Stem Cell Rev Rep*, 2019. 15(3): p. 356-373.
31. Samper, E., et al., Cardiac cell therapy: boosting mesenchymal stem cells effects. *Stem Cell Rev Rep*, 2013. 9(3): p. 266-80.
32. Wu, J.Y., et al., Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- $\kappa$ B activity. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e54067.
33. Wang, L., et al., Low-level laser irradiation modulates the proliferation and the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under healthy and inflammatory condition. *Lasers Med Sci*, 2019. 34(1): p. 169-178.
34. Castilho-Fernandes, A., et al., Adipogenic differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells induced by visible light via photo- induced biomodulation. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2019. 25: p. 119-127.
35. Bayat, M., et al., Comparison of the in vitro effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy on bony cells and stem cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 2018. 133: p. 36-48.
36. Fekrazad, R., et al., Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. *Photomed Laser Surg*, 2016. 34(11): p. 533-542.
37. Ahrabi, B., et al., The Effect of Photobiomodulation Therapy on the Differentiation, Proliferation, and Migration of the Mesenchymal Stem Cell: A Review. *J Lasers Med Sci*, 2019. 10(Suppl 1): p. S96-s103.
38. Sterne, J.A.C., et al., RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *Bmj*, 2019. 366: p. l4898.
39. Samuel, G.O., et al., Guidance on assessing the methodological and reporting quality of toxicologically relevant studies: A scoping review. *Environ Int*, 2016. 92-93: p. 630-46.
40. Karpov, A.A., et al., Can the outcomes of mesenchymal stem cell-based therapy for myocardial infarction be improved? Providing weapons and armour to cells. *Cell Prolif*, 2017. 50(2).

41. Li, W.T., Y.C. Leu, and J.L. Wu, Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg*, 2010. 28 Suppl 1: p. S157-65.
42. Holder, M.J., et al., Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res*, 2012. 91(10): p. 961-6.
43. Park, I.S., et al., Human adipose-derived stem cell spheroid treated with photobiomodulation irradiation accelerates tissue regeneration in mouse model of skin flap ischemia. *Lasers Med Sci*, 2017. 32(8): p. 1737-1746.
44. Babaei, A., et al., Effects of polarized and non-polarized red-light irradiation on proliferation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. 504(4): p. 871-877.
45. Vale, K.L.D., et al., The Effects of Photobiomodulation Delivered by Light-Emitting Diode on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Study on the Relevance to Pluripotent Stem Cell Viability and Proliferation. *Photomed Laser Surg*, 2017. 35(12): p. 659-665.
46. Lipovsky, A., et al., Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*, 2013. 28(4): p. 1113-7.
47. Babaei, A., et al., Photobiomodulation and gametogenic potential of human Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. 514(1): p. 239-245.
48. Kim, K., et al., Photobiomodulation Enhances the Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cells to Mitigate Radiation-Induced Enteropathy. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(5).
49. Yuan, Y., et al., Effects of Blue Light Emitting Diode Irradiation On the Proliferation, Apoptosis and Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2017. 43(1): p. 237-246.
50. Dehghani Soltani, S., et al., Different effects of energy dependent irradiation of red and green lights on proliferation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Lasers Med Sci*, 2016. 31(2): p. 255-61.
51. Zhu, T., et al., Irradiation by blue light-emitting diode enhances osteogenic differentiation in gingival mesenchymal stem cells in vitro. *Lasers Med Sci*, 2019. 34(7): p. 1473-1481.

52. Li, W.T. and Y.C. Leu, Effects of low level red-light irradiation on the proliferation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2007. 2007: p. 5830-33.
53. Mvula, B., T.J. Moore, and H. Abrahamse, Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci*, 2010. 25(1): p. 33-9.
54. Tuby, H., L. Maltz, and U. Oron, Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med*, 2007. 39(4): p. 373-8.
55. Hamblin, M.R., Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol*, 2018. 94(2): p. 199-212.
56. Priglinger, E., et al., Photobiomodulation of freshly isolated human adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells by pulsed light-emitting diodes for direct clinical application. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. 12(6): p. 1352-1362.
57. Ekizer, A., et al., Light-emitting diode photobiomodulation: effect on bone formation in orthopedically expanded suture in rats--early bone changes. *Lasers Med Sci*, 2013. 28(5): p. 1263-70.
58. Eells, J.T., et al., Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*, 2004. 4(5-6): p. 559-67.
59. Mamalis, A., D. Siegel, and J. Jagdeo, Visible Red Light Emitting Diode Photobiomodulation for Skin Fibrosis: Key Molecular Pathways. *Curr Dermatol Rep*, 2016. 5: p. 121-128.
60. Dall Agnol, M.A., et al., Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci*, 2009. 24(6): p. 909-16.
61. Gao, X. and D. Xing, Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*, 2009. 16(1): p. 4.
62. Jere, S.W., N.N. Houreld, and H. Abrahamse, Photobiomodulation at 660nm stimulates proliferation and migration of diabetic wounded cells via the expression of epidermal growth factor and the JAK/STAT pathway. *J Photochem Photobiol B*, 2018. 179: p. 74-83.

63. Kim, J.E., et al., Wnt/ $\beta$ -catenin and ERK pathway activation: A possible mechanism of photobiomodulation therapy with light-emitting diodes that regulate the proliferation of human outer root sheath cells. *Lasers Surg Med*, 2017. 49(10): p. 940-947.
64. Rhee, Y.H., et al., Effect of photobiomodulation therapy on neuronal injuries by ouabain: the regulation of Na, K-ATPase; Src; and mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *BMC Neurosci*, 2019. 20(1): p. 19.
65. Maacha, S., et al., Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis. *Stem Cells Int*, 2020. 2020: p. 4356359.
66. Fan, X.L., et al., Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci*, 2020. 77(14): p. 2771-2794.
67. de Oliveira, T.S., et al., Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. *Lasers Med Sci*, 2015. 30(1): p. 217-23.
68. Tuby, H., L. Maltz, and U. Oron, Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med*, 2006. 38(7): p. 682-8.
69. Szymanska, J., et al., Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *J Physiol Pharmacol*, 2013. 64(3): p. 387-91.

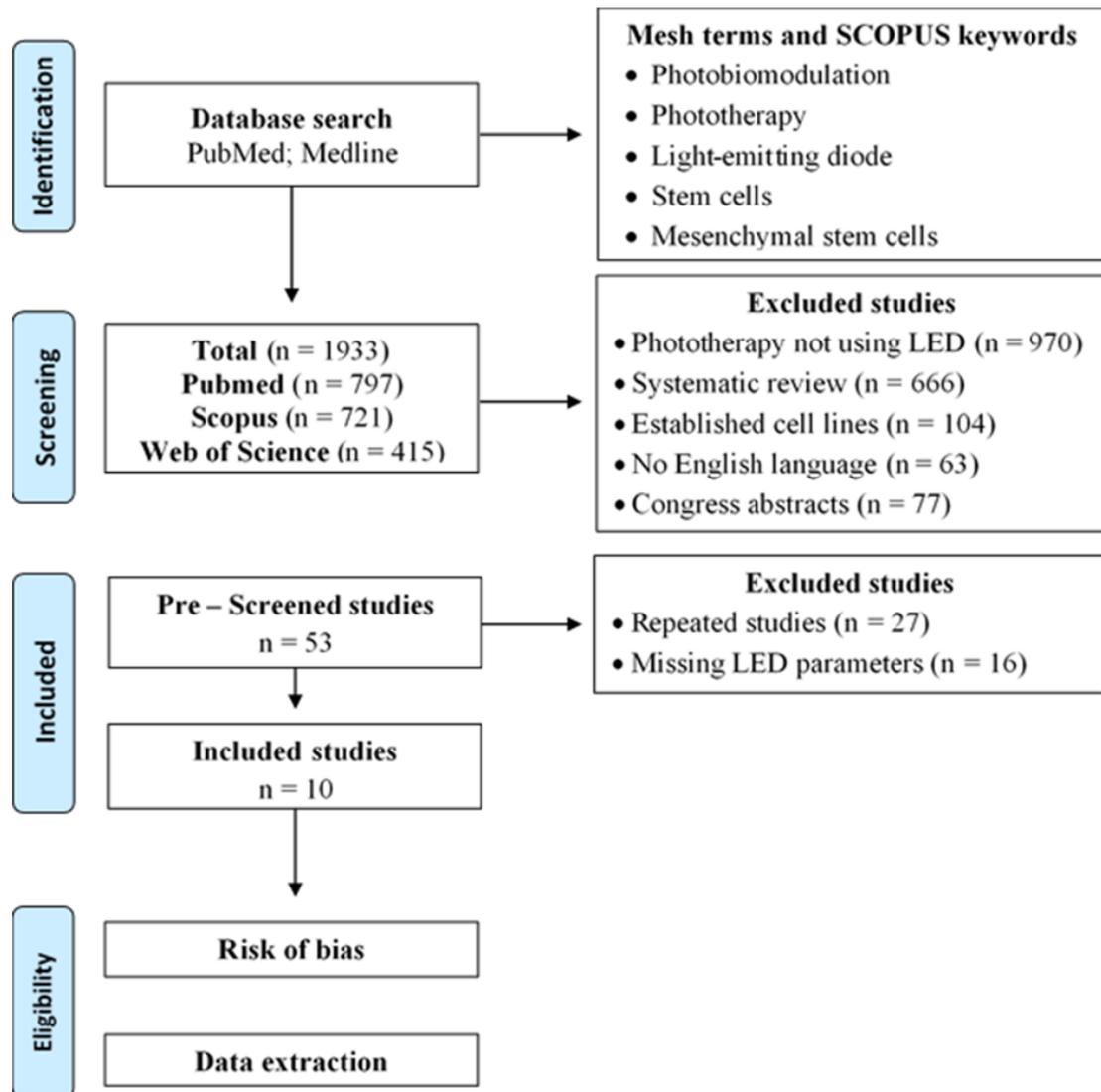


Figure 1. Flow chart diagram for selection of studies.

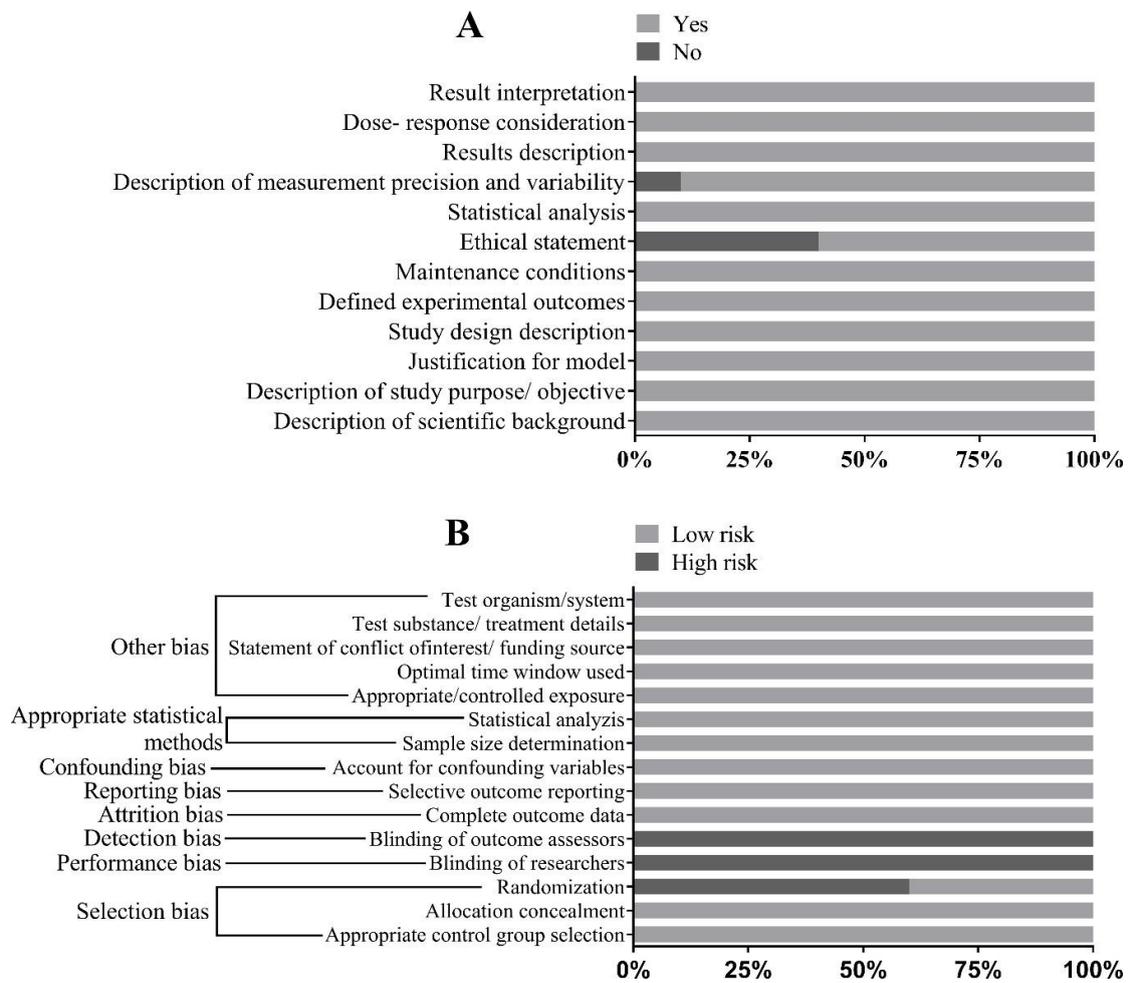


Figure 2. (A) Risk of bias summary: review authors judgements about each risk of bias item for each included study. (B) Risk of bias graph: review authors judgements about each risk of bias item presented as percentages across all included studies.

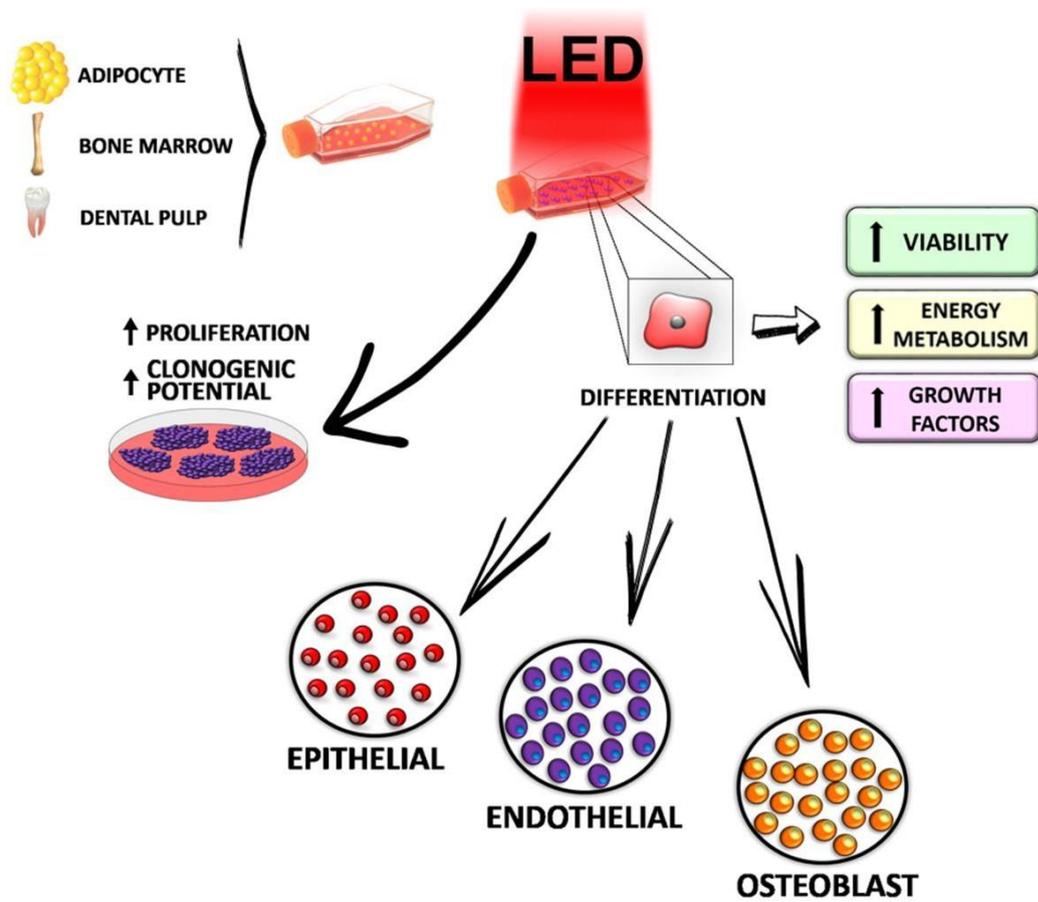


Figure 3. Main effects of LED irradiation to boost MSCs.

**Table 1.** Overall characteristics of selected studies for LED effects in mesenchymal stem cells.

References	Source	Species	Gender	Quantity/Concentration*	Experimental Passage
[22]	bone marrow	rat	female	100 cells/well (low density) 1,000 cells/well (high density)	P3
[23]	tooth pulp	rodent (NR)	NR	2.5x10 <sup>4</sup> cells/plate	P2 - P3
[24]	adipocyte	human	NR	1.5x10 <sup>6</sup> cells	P5 - P8
[25]	bone marrow	rat	NR	8x10 <sup>5</sup> cells/plate 3x10 <sup>3</sup> cells/well	NR
[26]	umbilical cord	human	fresh neonatal	1x10 <sup>4</sup> cell/plate	P3 – P5
[27]	tooth pulp	human	male and female	10 <sup>4</sup> cells	P3 - P6
[28]	bone marrow	rat	male	1.3x10 <sup>6</sup> cells/cm <sup>2</sup>	NR
[29]	umbilical cord	human	NR	5x10 <sup>4</sup> cells/dish	P3 – P5
[30]	umbilical cord	human	NR	5x10 <sup>3</sup> cells/well 5x10 <sup>5</sup> cells/well 1x10 <sup>6</sup> cells/well 1x10 <sup>5</sup> cells/well 200 cells/well	P3 – P5
[33]	gingiva	human	NR	2x10 <sup>4</sup> cells/mL 2.5x10 <sup>4</sup> cells/well	NR

NR, not reported. \*Cell number varied according to each variable analyzed in the respective study.

*Missing parameters have been calculated. #Data were calculated on the culture flasks/dishes/wells areas.	[33] 420-480 9# 900*  100  9* 18* 36* 54*  1 2 4 6  10 20 40 60 multiples 28	[30] 633 75# 534*  1.65  22.5* 75* 225* 450* 22.5*  0.3 1 2 6 0.3  182 606 1818 3636 once 10	[29] 625 9# 47.7*  5.3  17.1*  1.9  360  once 21	[28] 400- 9# 360*  40  21.6* 43.2* 64.8*  2.4 4.8 7.2  60 120 180 once 7	[27] 630 1.9# 70.3*  37  3.8* 7.6* 15.2* 30.4* 60.8*  2 4 8 16 32  54 107 214 428 856 once 1	[26] 625 0.32# 0.848*  2.65  0.102* 0.204* 0.305*  0.318 0.636 0.954  120 240 360 once 14	[25] 620 0.32# 2.13*  6.67  0.32* 0.64* 0.128*  1 2 4  150 300 600 multiples 21	[24] 660 1.9# 19*  10  1.9* 3.8* 11.4* 17.1*  1 3 6 9  600  once 14	[23] 653 9# 33.57*  3.73  0.675* 1.341* 2.016* 3.024* 4.032*  0.075 0.149 0.224 0.336 0.448  20 40 60 90 120 once 15	[22] 630 0.32 1.6* 4.8* 5 15 0.64* 1.28*  0.64* 1.28*  2 4  2 4  400 800  133 multiples 28	<b>References</b> <b>Wavelength (nm)</b> <b>Irradiation area (cm<sup>2</sup>)</b> <b>Potency (mW)</b>  <b>Irradiance (mW/cm<sup>2</sup>)</b>  <b>Energy (J)</b>  <b>Radiant exposure (J/cm<sup>2</sup>)</b>  <b>Time of irradiation (sec)</b>  <b>Irradiation quantity</b> <b>Timeline (days)</b>
---	--	--	--	---	---	--	--	---	---	--	---

**Table 2.** Irradiation protocol of selected studies.

	[33]	[30]	[29]	[28]	[27]	[26]	[25]	[24]	[23]	[22]	References	Table 3. Main effects of LED irradiation on mesenchymal stem cells.
NE, not evaluated; ↑, increase; ↓, reduction; =, not changed.												
ALP, alkaline phosphatase; ATP, adenosine 5'-triphosphate; Bglap, osteocalcin; BrdU, 5-bromo-2-deoxyuridine; CFU-F, colony-forming unit fibroblasts; Col1α1, collagen type I; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte	↓MTT (1, 2, 4 and J/cm <sup>2</sup> )	↑WST-1 ↑CFU-F (7.12 mW/cm <sup>2</sup> : 1 J/cm <sup>2</sup> )	NE	↑ cell counts (2.4, 4.8 and 7.2 J/cm <sup>2</sup> )	↑ S phase (16 J/cm <sup>2</sup> ) ↑ fragmented DNA (4 and 32 J/cm <sup>2</sup> )	↑ Hoechst staining ↑ WST-1 (0.954 J/cm <sup>2</sup> ) = trypan blue	↑ WST-8 (1, 2 and 4 J/cm <sup>2</sup> ) ↑ EdU staining (2 J/cm <sup>2</sup> )	NE	↑ cell counts ↑ BrdU	↑ cell counts (Liu's staining; multiple LED applications: 5 and 15mW/cm <sup>2</sup> ; 2 and 4	<b>Viability, proliferation, and DNA damage</b>	
	↑ osteogenic (ALP activity; gene expression: gene	= adipogenic (red oil; gene expression: PPARγ, LPL)	↑ gametogenic (gene/protein expression: DAZL and SCP3)	NE	NE	NE	= osteogenic (ALP activity; Alp1, Bglap, Col1α1, Runx2 and gene expression	↑ endothelial cells (CD31, CD34 and KDR)	NE	↑ osteogenic (ALP activity; osteocalcin expression; (multiple LED applications: 15mW/cm <sup>2</sup> ;	<b>Differentiation</b>	
	NE	↑ mitochondrial activity (7.12 mW/cm <sup>2</sup> : 1 J/cm <sup>2</sup> )	NE	↑ ROS	= mitochondrial membrane potential	NE	NE	NE	↑ mitochondrial activity ↑ ATP	↑ ATP (single LED application: 15mW/cm <sup>2</sup> ; 4 J/cm <sup>2</sup> )	<b>Metabolism</b>	
	NE	↑ FGF and VEGF	NE	↑ NO (nitrite) (4.8 and 7.2 J/cm <sup>2</sup> )	NE	NE	NE	↑ FGF, HGF and VEGF (6 J/cm <sup>2</sup> )	↑ NO (nitrite)	NE	<b>Secretome</b>	