



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

KALINE DE BRITO SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED AMBAR
SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS POLARIZADOS PARA FENÓTIPOS PRÓ OU
ANTI-INFLAMATÓRIO**

São Paulo, SP

2020



KALINE DE BRITO SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED AMBAR
SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS POLARIZADOS PARA FENÓTIPOS PRÓ OU
ANTI-INFLAMATÓRIO**

Tese de Doutorado Apresentada a
Universidade Nove de Julho para Obtenção do
Título de Doutora em Biofotônica Aplicada às
Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa Dra Kristianne Porta Santos Fernandes

Co-orientadora: Profa Dra Maria Fernanda Setubal D. Rodrigues

São Paulo, SP

2020

FICHA CATALOGRAFICA

Sousa, Kaline de Brito.

“Análise do Efeito da Fotobioinodulação com Led Ambar Sobre Linfocitos Humanos Polarizados para Fenótipo de Afta Inflamatória”. / Kaline de Brito Sousa 2020.

111 f.

Tese (doutorado)—Universidade de Julho - UNINOVE. São Paulo. 2020.

Orientador (a). Prof^a Dr^a. Kristianne Porta Santos Fernandes.

1. Monócitos. 2. Linfócitos. 3. Nutrição. 4. Prati-inflamatórios.

1. Fernandes, Kristianne Porta Santos. IL Título.

IDU 15.831

São Paulo, 17 de março de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

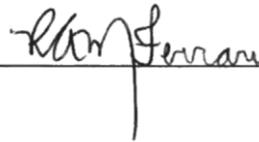
Aluno (a): Kaline de Brito Sousa

Título da Tese: 'Avaliação do efeito da fotobiomodulação com LED ambar sobre leucócitos humanos polarizados para os fenótipos pró ou anti-inflamatório'

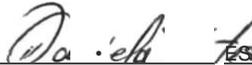
Presidentes: PROFA. DRA. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES



Membro: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. DANIELA DE FATIMA TEIXEIRA DA SILVA



Membro: PROFA. DRA. ANA CLAUDIA MUNIZ RENNO



Membro: PROF. DR. JOSE ANTONIO SILVA JUNIOR



DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Maria Anunciada e Carlos Sousa, que muitas vezes se doaram e renunciaram tantas coisas para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço a paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. Muitíssimo obrigada.



AGRADECIMENTOS

Escrever uma tese durante três anos só é possível graças ao apoio de muitas pessoas. Tive a chance e o privilégio de poder contar com a ajuda de muitos amigos, colegas, professores e pesquisadores, e por este motivo devo lembrar algumas pessoas que, com certeza, influenciaram muito o meu desenvolvimento acadêmico.

*Antes de tudo, quero agradecer a **Deus**, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.*

*Agradeço aos meus pais, **Carlinho de Sousa Balbino** e **Maria Anunciada de Brito Sousa**, por terem me apoiado para chegar até aqui e por serem modelos de coragem que me inspira todos os dias. Obrigada por me educarem e me ensinarem o quanto é digno ter humildade e respeito com próximo. Agradeço ao meu irmão, **Cailan Sousa** e minha cunhada **Layla Rodrigues**, pelo carinho e companheirismo de sempre; por estarem torcendo pelas minhas conquistas a todo instante. Obrigada pelo apoio e incentivo incondicional. Gostaria ainda de agradecer aos meus sobrinhos por todo o amor que proporcionam, sem dúvidas, esse é o meu combustível para seguir em frente!!!*

*Agradeço à professora **Dr^a Kristianne Porta Santos Fernandes**, a oportunidade de tê-la como minha orientadora de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado durante esses 07 anos que se passaram. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pelo carinho, pelos conselhos e paciência. A senhora é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Seus orientados sabem que sempre terão uma amiga e um lugar onde encontrarão apoio e palavras de sabedoria. Muito obrigada por todos os ensinamentos e todas as oportunidades durante esse caminho, agradeço principalmente em tê-la sempre ao meu lado, me acolhendo e me levantando nos momentos mais difíceis! Com toda certeza, hoje me sinto uma pessoa realizada por tudo que já conseguimos conquistar juntas. E que eu possa sempre contar com o privilégio dos seus ensinamentos!!!*

Agradeço a minha co-orientadora **Profª Drª Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues** pela paciência, compreensão e atenção em me orientar em cada passo de conclusão desse trabalho. Obrigada por me ensinar as metodologias e por me incentivar nesse caminho tão gratificante da pesquisa científica. Foi um convívio muito prazeroso e enriquecedor. Gostaria de registrar aqui toda a minha admiração pelo seu caráter, ética e postura profissional.

Aos professores, **Drª Anna Rennó, Drª Daniela Teixeira, Drª Raquel Agnelli Mesquita Ferrari e Dr José Antônio**, professores pelos quais tenho muito respeito e admiração e por este motivo, sou muito grata por aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.

Aos professores, **Drª Daniela Teixeira** pela oportunidade de aprendizado em análises de absorbância, por toda a paciência em me ensinar a realizar as normalizações, e acima de tudo, gostaria de agradecer o carinho e apoio que recebi em todos os momentos. Ao **Prof. Alessandro Deana** pela colaboração no trabalho e disposição do LED, agradeço por todos os cálculos que me foram ensinados e todos os conhecimentos de fontes de luz.

Não poderia deixar de agradecer a Professora **Drª Sandra Kalil Bussadori**, profissional extremamente competente e cheia de amor. Agradeço o apoio, o incentivo e todos os ensinamentos. Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Biofotônica que sempre estiveram prontos a me auxiliar nas análises experimentais.

Deixo também uma palavra de agradecimento ao **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, do departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), por nos permitir realizar toda a parte experimental de avaliação gênica e proteica no laboratório pelo qual é responsável. Agradeço aos técnicos que me receberam com muito carinho e disposição em ajudar, **Edna, Adriana, Juvani**, serei eternamente grata por tudo que sempre fizeram por mim na USP.

As minhas mais que queridas amigas **Katia do Vale e Tatiana Dias** (madrinha), pessoas muito especiais, com quem tive a honra de conviver desde a iniciação

científica. Agradeço pelos maravilhosos momentos que tivemos juntas. Vocês são exemplos de determinação, força, generosidade e bondade. Sinto muito amor e carinho por vocês!! Obrigada por sempre me guiarem e me aconselharem durante todas as decisões mais difíceis! Essa nossa amizade representa muito na minha vida!!

*Agradeço em especial a **Mônica Pereira** e **Carolina Rodini** (pós-doutorandas) que me ajudaram muito na realização desse estudo. Agradeço por estarem sempre me ajudando em todas as correções e desenvolvimento de metodologias. Muito Obrigada!!!*

*Agradeço ainda aos **amigos do laboratório** de pesquisa da UNINOVE, **Lucas, Andreia, Solange, Angela, Marlene, Juliana, Renata, Ana Melissa, Karen**, obrigada pela amizade, por toda ajuda, pela paciência e por todo o apoio necessário, indispensável para a finalização do trabalho, deixo registrada toda minha admiração e carinho. Em especial **Rodrigo Barbosa**, por sempre estar ao meu lado, desde a graduação, obrigada por compartilhar comigo todos os momentos de alegria e preocupação. Você sempre será uma fonte de inspiração!! Agradeço aos alunos de iniciação científica que tanto me ajudaram no início da realização do trabalho.*

*Como também não poderia deixar de agradecer as minhas queridas amigas **Tamiris** e **Tainá**, minhas miguinhas de Doutorado. Uma das coisas que me deixa mais triste nesse momento é de pensar que não estaremos mais todas as tardes juntas, que iremos nos ver com menos frequência, mesmo tendo a certeza que continuaremos conectadas pelas redes sociais, vou sentir muito a falta de vocês!! Vocês são uma das coisas mais valiosas que eu recebi nesses últimos anos (amizade verdadeira e especial). Obrigada por me ouvirem, chorarem comigo, me aconselharem, me mostrarem o quanto é importante a nossa sintonia. Agradeço imensamente por toda a ajuda na realização desse trabalho, “Tami” obrigada por me ajudar nos Elisás, por todas as vezes que você foi até a USP me levar o LED (rsrsrsrs), por todos os áudios de 5 minutos compartilhando suas experiências (sempre foram muitos válidos para acrescentar no meu conhecimento clínico), aprendi muito com você, te admiro demais por toda a sua dedicação e força de vontade, e “Tá” obrigada por me ajudar na confecções das figuras, pela sua concepção nos resultados, pelas ideias propostas, dúvidas esclarecidas, por estar sempre disponível aos fins de semana*

para me ajudar com estatística, rsrsrsrs. Eu amo muito vocês duas, de todo meu coração!!!

*Gostaria de Agradecer a Professora **Rebecca Hennig**, a quem tenho enorme admiração tanto profissional como pessoal. A Rebecca contribui muito para o meu crescimento científico, foram muitas correções de trabalhos em inglês, aulas de treinamento de apresentações em congressos internacionais, agradeço tanto pela sua paciência, seu carinho e amizade!!! Rebecca serei eternamente grata por tudo que sempre fez para me ajudar ao longo dessa jornada.*

*Aos **funcionários do laboratório de Pesquisa** da UNINOVE, em especial **Haryanne, Nubia, Priscila, Camila, Dani, Vanessa, Nurya** por todo carinho, apoio emocional do qual sempre precisamos, colaboração, convívio, paciência e amizade construída.*

*A todos os meus **amigos** que não estão citados nominalmente, mas que participam da minha vida, das minhas alegrias, angústias e vitórias. Muito obrigada!*

*À **UNINOVE** pela bolsa de estudos concedida e por todo suporte necessário. A **CAPES** pela concessão da bolsa de Doutorado que me ajudou a chegar até aqui com dedicação ao laboratório.*

(Henry Ford)

***“O insucesso é apenas uma
oportunidade para recomeçar de
novo com mais inteligência.”***

RESUMO

A plasticidade fenotípica dos leucócitos nas diferentes fases do processo de inflamação e reparo, faz com que essas células sejam consideradas peças chaves no seu controle. Os efeitos da fotobiomodulação (FBM) no tratamento de lesões teciduais tem sido bastante descrito, mas pouco se conhece a respeito do seu papel sobre a polarização dos leucócitos. Este projeto objetivou avaliar o espectro de absorvância óptica de monócitos, neutrófilos e linfócitos humanos e os efeitos da FBM com LED ambar de 590 nm sobre a expressão gênica e proteica de mediadores produzidos por essas células polarizadas para os fenótipos pró ou anti-inflamatório/regulador. Leucócitos de sangue humano periférico foram cultivados em RPMI com soro fetal bovino 5% ou 10% (para ativar os fenótipos pró ou anti-inflamatório respectivamente), polarizados com LPS ou IL-4+LPS por 2h e irradiados com LED ambar 590 nm (4J; 70 mW; 23,3 mW/cm²; 2,66 J/cm²), utilizando uma aplicação após 2h ou duas aplicações após 2h e 6h. As culturas foram coletadas para avaliação do espectro de absorvância óptica (neutrófilos após 12h e monócitos e linfócitos após 24h) e análise de expressão de mRNA das citocinas *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17*, *TNF- α* , *IFN γ* e *VEGF* por meio de qPCR (após 4h para neutrófilos e 24h para monócitos e linfócitos). Os sobrenadantes das culturas foram usados para avaliação proteica por imunensaio enzimático (neutrófilos: *IL-1 β* , *TNF α* e *IL-10*; linfócitos: *IFN γ* , *IL-17* e *IL-10* e monócitos: *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF α* e *IL-10*). Foram realizados pelo menos 3 experimentos (3 indivíduos) em duplicata amostral. Células não irradiadas e não polarizadas serviram como controle. Monócitos e neutrófilos apresentaram pico de absorção entre 520-570 nm e os linfócitos pico de absorção entre 450-570 nm e 770-900 nm. A irradiação com LED ambar nas células polarizadas para o perfil pró-inflamatório gerou nos monócitos redução na síntese proteica das citocinas pró-inflamatórias *IL-6* e *TNF α* , nos neutrófilos a redução da produção de *TNF α* e nos linfócitos aumento na produção de *IL-17*. Nos leucócitos polarizados para o perfil anti-inflamatório/regulador, a irradiação com LED ambar reduziu a produção de *IL-10* em monócitos e linfócitos. Esses resultados evidenciam que os leucócitos apresentam pico de absorção em regiões do espectro ainda pouco exploradas na FBM e que o LED ambar é capaz de modular a expressão de citocinas importantes na modulação dos processos de inflamação e reparo podendo vir a

contribuir para otimização dos processos inflamatórios, bem como nos tratamentos de imunoterapia.

Palavras-chave: Monócitos, Linfócitos, Neutrófilos, Pró-inflamatório, Anti-inflamatório, Absorbância, Ledterapia.

ABSTRACT

The phenotypic plasticity of leukocytes in the different phases of the inflammation and repair process, is the reason these cells are considered key players in their control. The effects of Photobiomodulation (PBM) on the treatment of tissue lesions have been widely described, but little is known about their role on leukocyte polarization. This project aimed to evaluate the optical absorbance spectrum of monocytes, neutrophils and human lymphocytes as well as the effects of PBM with amber LED with 590 nm on the gene and protein expression of mediators produced by these cells, which have been polarized to either the pro- or anti-inflammatory / regulatory phenotype. Peripheral human blood leukocytes were cultured in RPMI with 5% or 10% fetal bovine serum (to activate the pro- or anti-inflammatory phenotypes respectively), polarized with LPS or IL-4+LPS for 2 hours and irradiated with amber LED 590 nm (4J; 70 mW; 23.3 mW / cm²; 2.66 J / cm²), using one application after 2h or two applications after 2h and 6h. The cultures were collected to evaluate the optical absorbance spectrum (neutrophils after 12 hours and monocytes and lymphocytes after 24 hours) and for the analysis of mRNA expression of the cytokines *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17*, *TNF- α* , *IFN γ* and *VEGF* using qPCR (after 4 hours for neutrophils and 24 hours for monocytes and lymphocytes). The culture supernatants were used for protein evaluation via enzyme immunoassay (neutrophils: *IL-1 β* , *TNF α* and *IL-10*; lymphocytes: *IFN γ* , *IL-17* and *IL-10* and monocytes: *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF α* and *IL-10*). At least 3 experiments (samples from 3 individuals) were carried out in duplicate. Non-irradiated and non-polarized cells served as controls. Monocytes and neutrophils showed peak absorption between 520-570 nm and lymphocytes peak absorption between 450-570 nm and 770-900 nm. Irradiation with amber LED, applied to cells polarized to the pro-inflammatory profile, generated a decrease in the protein synthesis of the pro-inflammatory cytokines *IL-6* and *TNF α* in the monocytes, a decrease in the production synthesis of *TNF α* in neutrophils and, in the lymphocytes, an increase in the production of *IL-17*. In leukocytes polarized to the anti-inflammatory / regulatory profile, irradiation with amber LED reduced the production of *IL-10* in monocytes and lymphocytes. These results show that leukocytes present peak absorption in regions of the spectrum which remain mostly unexplored in PBM. In addition, they show that amber LED is capable of modulating

the expression of cytokines which are important to the modulation of inflammation and repair processes; this may contribute to the optimization of inflammatory processes, as well as immunotherapy treatments.

Keywords: Monocytes, Lymphocytes, Neutrophils, Pro-inflammatory, Anti-inflammatory, Absorbance, LED therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema Representativo do Processo de Hematopoese	23
Figura 2. Presença de Células Imunes Durante o Reparo Tecidual	26
Figura 3. Mecanismos de ação da fotobiomodulação.....	30
Figura 4. Fluxograma Experimental.....	40
Figura 5. Representação esquemática de separação de Células Mononucleares e Polimorfonucleares de Sangue Periférico Humano	41
Figura 6. Irradiações de Leucócitos com LED Ambar.....	45
Figura 7. Absorbância Óptica de Monócitos Humanos.....	54
Figura 8. Absorbância Óptica de Linfócitos Humanos	55
Figura 9. Absorbância Óptica de Neutrófilos Humanos	56
Figura 10. Dosagem Proteica de IL-6 por Monócitos Humanos	57
Figura 11. Expressão Gênica de <i>IL-6</i> por Monócitos Humanos.....	58
Figura 12. Dosagem Proteica de IL-1 β por Monócitos Humanos	59
Figura 13. Expressão Gênica de <i>IL-1β</i> por Monócitos Humanos.....	60
Figura 14. Dosagem Proteica de TNF α por Monócitos Humanos.....	61
Figura 15. Dosagem Proteica de IL-10 por Monócitos Humanos	62
Figura 16. Dosagem Proteica de IL-17 por Linfócitos Humanos.....	63
Figura 17. Expressão Gênica de <i>IL-17</i> por Linfócitos Humanos.....	64
Figura 18. Dosagem Proteica de IFN γ por Linfócitos Humanos	65
Figura 19. Expressão Gênica de <i>IFNγ</i> por Linfócitos Humanos	66
Figura 20. Dosagem Proteica de IL-10 por Linfócitos Humanos.....	67
Figura 21. Dosagem Proteica de IL-1 β por Neutrófilos Humanos	68
Figura 22. Expressão Gênica de <i>IL-1β</i> por Neutrófilos Humanos.....	69
Figura 23. Dosagem Proteica de TNF α por Neutrófilos Humanos.....	70
Figura 24. Dosagem Proteica de IL-10 por Neutrófilos Humanos.....	71
Figura 25. Análise de Separação de Células Mononucleares	95
Figura 26. Análise Temporal de Polarização de Monócitos com LPS+IFN γ	96
Figura 27. Análise de Polarização de Monócitos com LPS Associado ao IFN γ em Duas Diferentes Concentrações.....	97
Figura 28. Curva-dose resposta de Polarização de Monócitos com IFN γ para Perfil Pró-inflamatório	98

Figura 29. Curva-dose resposta de Polarização de Monócitos com LPS para Perfil Pró-inflamatório	99
Figura 30. Curva-dose resposta de Polarização de Monócitos com IL-4 ou IL4+ LPS para Perfil Anti-inflamatório	100
Figura 31. Irradiações de Leucócitos com os LEDs 850 nm e 590 nm.....	101
Figura 32. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irrradiados com LED Infravermelho de 850 nm com Aplicação Única	103
Figura 33. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irrradiados com LED Infravermelho de 850 nm com Duas Aplicações	104
Figura 34. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irrradiados com LED Ambar de 590 nm com Aplicação Única	105
Figura 35. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irrradiados com LED Ambar de 590 nm com Duas Aplicações	106
Figura 36. Carta de Aprovação de Câmaras de Leucorredução.....	107
Figura 37. Parecer e Termo de Aprovação Comitê de Ética em Humanos	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão Fenotípica Clássica para Monócitos, Linfócitos e Neutrófilos Humanos: Ativação, Produção e Função	28
Tabela 2. Parâmetros Dosimétricos do LED de Escolha para Desenvolvimento do Estudo	45
Tabela 3. Descrição dos Grupos Experimentais	46
Tabela 4. Mediadores a serem avaliados por cada tipo celular por ELISA	48
Tabela 5. Genes Alvos Utilizados para Amplificação por q-RT-PCR	51
Tabela 6. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-6</i> por Monócitos Humanos.....	58
Tabela 7. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-1β</i> por Monócitos Humanos.....	60
Tabela 8. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>TNFα</i> por Monócitos Humanos.....	61
Tabela 9. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-10</i> por Monócitos Humanos.....	63
Tabela 10. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-17</i> por Linfócitos Humanos.....	64
Tabela 11. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IFNγ</i> por Linfócitos Humanos.....	66
Tabela 12. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-10</i> por Linfócitos Humanos.....	67
Tabela 13. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-1β</i> por Neutrófilos Humanos.....	69
Tabela 14. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>TNFα</i> por Neutrófilos Humanos.....	71
Tabela 15. Descrição dos Valores de Média de Expressão Gênica e Proteica de <i>IL-10</i> por Neutrófilos Humanos.....	72
Tabela 16. Parâmetros Dosimétricos de LEDs Infravermelho e Ambar	102
Tabela 17. Revisão de Artigos com FBM em Leucócitos.....	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Síntese de Expressão Gênica e Proteica de Perfil Pró-inflamatório de Monócitos, Linfócitos e Neutrófilos	73
Quadro 02. Síntese de Expressão Gênica e Proteica de Perfil Anti-inflamatório de monócitos, Linfócitos e Neutrófilos	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	do inglês, <i>actin beta</i>
AMPc	3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
CC	Quimiocina C-C
CD	do inglês, <i>Clusters of Differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
B-Actina	Beta-actina
ELISA	Imunoensaio do inglês, <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
FBM	Fotobiomodulação
GaAIs	Arseneto de Gálio-Alumínio
GM-CSF	do inglês, <i>Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor</i>
GAPDH	do inglês, <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GSH	Glutathiona
h	horas
He-Ne	do inglês, <i>Helium–Neon Laser</i>
HIF-1 α	Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa
HTLV	do inglês, Human T lymphotropic virus
HIV	do inglês, Human Immunodeficiency Virus
IFN γ	Interferon gamma
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
J	Joule

J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
J774	Cultura de macrófagos de camundongos Balb/c
L1	Linfócitos pró-inflamatórios
L2	Linfócitos anti-inflamatórios
LED	Light-Emitting Diode
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Monócitos pró-inflamatórios
M2	Monócitos anti-inflamatórios
mm	Milímetro
min	Minuto
mL	Mililitro
mW	Miliwatt
mW/cm ²	Milliwatt por centímetro quadrado
N1	Neutrófilos pró-inflamatórios
N2	Neutrófilos anti-inflamatórios
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator de transcrição (do inglês, <i>Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of Activated B Cells</i>)
ng	Nanograma
NK	Células <i>Natural Killer</i>
nm	Nanometro
NO	do inglês, <i>Nitric Oxide</i>
PBMC	do inglês, <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGC-1β	do inglês, <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta</i>
PMA	Acetato de forbol miristato
qPCR	do inglês, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
QLlum	Quimiluminescência dependente de luminol
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
ROS	do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotação por minuto

RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT-PCR	do inglês, <i>Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
S	Segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β	do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i>)
Th1	do inglês, <i>T helper 1</i>
Th2	do inglês, <i>T helper 2</i>
THP-1	Linhagem de Monócitos Humanos
TLR	<i>Receptores Toll-Like</i>
TNF- α	do inglês, Tumor Necrosis Factor α
U937	Linhagem de Monócitos Humanos isolados de Linfoma
VEGF	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	23
1.1. Hematopoese	23
1.2. Leucócitos e Inflamação	24
1.3. Fotobiomodulação (FBM)	28
1.4. Efeitos da Fotobiomodulação sobre Leucócitos Humanos	31
1.4.1. <i>Artigos que avaliaram a FBM sobre neutrófilos</i>	31
1.4.2. <i>Artigos que avaliaram a FBM sobre monócitos</i>	32
1.4.3. <i>Artigos que avaliaram a FBM sobre linfócitos</i>	34
1.5. Efeitos da Fotobiomodulação Ambar no Âmbito Terapêutico	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivos	39
4. METODOLOGIA	40
4.1. Fluxograma	40
4.2. Isolamento de Leucócitos Mononucleares e Polimorfonucleares	41
4.3. Plaqueamento de Leucócitos Humanos	42
4.4. Polarização de Leucócitos Humanos	43
4.5. Fotobiomodulação com LED em Leucócitos Polarizados para os Fenótipos Pró ou Anti-inflamatório	44
4.6. Grupos Experimentais	45
4.7. Avaliação do Espectro de Absorbância de Leucócitos Humanos	46
4.8. Avaliação da Produção Proteica por Imunoensaio ELISA	47
4.9. Avaliação de Expressão Gênica	48
4.9.1. <i>Isolamento e Integridade de RNA</i>	49
4.9.2. <i>Síntese do DNA complementar e qPCR</i>	49
4.10. Análise Estatística	51
5. RESULTADOS	53
5.1. Espectros de Absorbância Óptica de Leucócitos Humanos	53
5.1.1. Análise de Absorbância óptica de Monócitos	53
5.1.2. Análise de Absorbância óptica de Linfócitos	54
5.1.3. Análise de Absorbância Óptica de Neutrófilos	56

5.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de Leucócitos Humanos.....	57
5.2.1. Monócitos	57
5.2.1.1. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-6.....	57
5.2.1.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-1β.....	59
5.2.1.3. Produção Proteica e Expressão Gênica de TNFα	60
5.2.1.4. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-10.....	62
5.2.2. Linfócitos	63
5.2.2.1. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-17.....	63
5.2.2.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de IFNγ	65
5.2.2.3. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-10.....	66
5.2.3. Neutrófilos	68
5.2.3.1. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-1β.....	68
5.2.3.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de TNFα	69
5.2.3.3. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-10.....	71
5.3. Apresentação de Resultados de Síntese Gênica e Proteica	72
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÃO	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
9. APÊNDICES	95
9.1. Análise de Separação de Células Mononucleares	95
9.2. Curva dose-resposta de Polarização de Monócitos Humanos com LPS para Perfil Pró-inflamatório	95
9.3. Curva dose-resposta de Polarização de Monócitos Humanos com IL-4 ou IL-4+LPS para Perfil Anti-inflamatório	99
9.4. Curva dose-resposta para definição dos parâmetros Dosimétricos	100
9.4.1. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irradiados com LED Infravermelho de 850 nm com Aplicação Única	102
9.4.2. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irradiados com LED Infravermelho de 850 nm com Duas Aplicações	103
9.4.3. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irradiados com LED Ambar de 590 nm com Aplicação Única	104
9.4.4. Produção Proteica de IL-6 por Monócitos Irradiados com LED Ambar de 590 nm com Duas Aplicações	105
10. ANEXOS	107

10.1.	Carta de Aprovação Fornecimento de Câmaras de Leucorredução.....	107
10.2.	Parecer e Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Humanos	108
10.3.	Revisão de Artigos com Fotobiomodulação em Leucócitos Humanos	110

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Hematopoese

As células-tronco hematopoiéticas são originadas na medula óssea pelo processo chamado de hematopoese (Figura 1) que consiste na formação, desenvolvimento e maturação de células sanguíneas por meio de células progenitoras iniciais, capazes de produzir precursores específicos dedicados à diferenciação e produção de células maduras, incluindo eritrócitos, megacariócitos e leucócitos (Orkin & Zon 2008, Jagannathan-Bogdan & Zon 2013, García-García et al. 2015, Abbas et al. 2018).

Os leucócitos são células imunológicas de origem mieloide (monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) ou linfóide (linfócitos B, linfócitos T e células NK) que apresentam um papel muito importante tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa (Zhao et al. 2012, Scheiermann et al. 2015, Abbas et al. 2018).

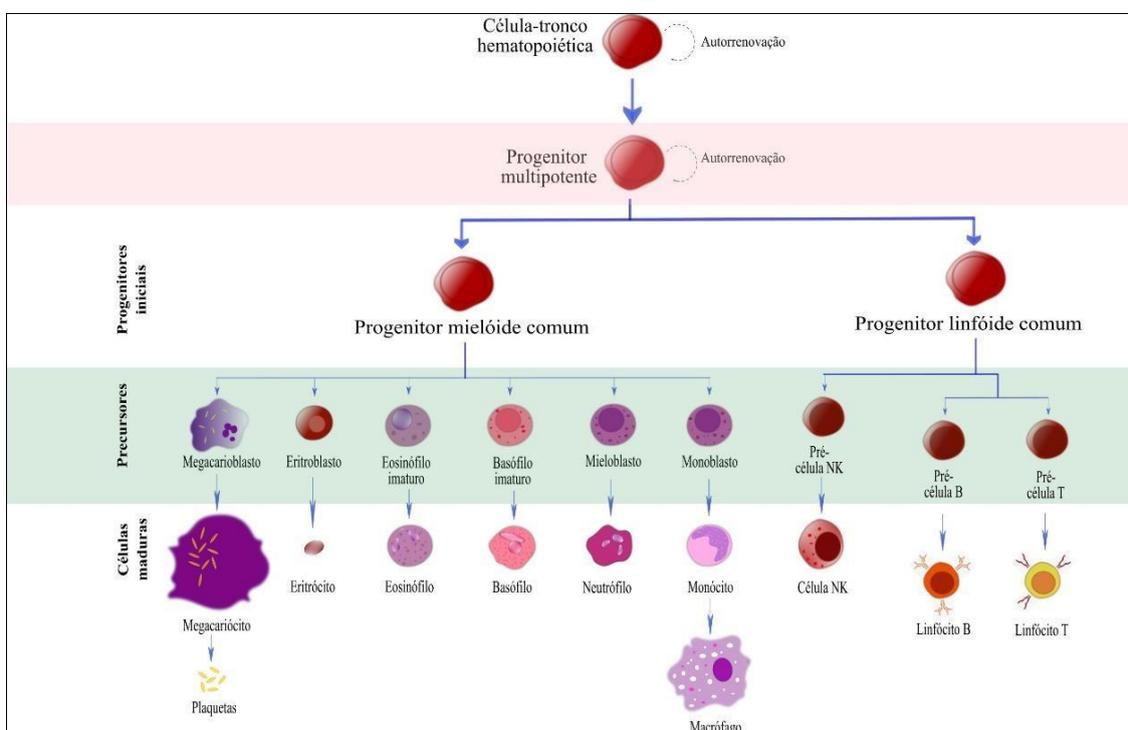


Figura 1: Esquema Representativo do Processo de Hematopoese em Humanos (Adaptação Orkin & Zon 2008 e Abbas et. al 2018).

1.2. Leucócitos e Inflamação

Na fase inicial da inflamação, ocorrem alterações vasculares que envolvem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo e migração de leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos envolvidos (Butterfield et al. 2006, Scheiermann et al. 2015). A plasticidade dos leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) em resposta aos sinais advindos do microambiente, nas diferentes fases do processo de inflamação e reparo, faz com que essas células assumam características inflamatórias ou imunoregulatórias que caracterizam, respectivamente, os fenótipos classicamente chamados de pró e anti-inflamatório (Filardy 2010, Beyrau et al. 2012, Mills 2012, Deniset & Kubes 2016, Fan & Rudensky 2016, Yang 2016).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do sangue (40-60%), as primeiras células imunes que migram para o local da infecção/lesão tecidual, duram de 1 a 2 dias e podem apresentar dois fenótipos distintos sendo classificados como neutrófilos pró-inflamatórios (N1) ou neutrófilos anti-inflamatórios (N2) (Karlmark et al 2012, Neely et al. 2014, Kobayashi 2015, Ma et al 2016, Yang 2016, Abbas et al. 2018).

Os neutrófilos do tipo N1 já estão presentes nas primeiras horas após a ocorrência da lesão tecidual e são responsáveis principalmente pela fagocitose (do possível agente invasor e/ou na eliminação e degradação de restos celulares oriundos do processo inflamatório), síntese de peptídeos antimicrobianos, geração de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, e produção de quimiocinas e mediadores inflamatórios (como CCL3, CCL5, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF α) que estão relacionados com a migração e ativação de células dendríticas, monócitos e macrófagos M1 (Tsuda et al. 2004, Arnardottir et al. 2012, Yang 2016, Seely et al. 2003, Mayadas et al. 2014, Amantea 2016).

Os neutrófilos do tipo N2 surgem aproximadamente 7h após a ocorrência da lesão e produzem principalmente IL-10, TGF β , VEGF, e expressam receptores do tipo TLR2, TLR4, TLR7, TLR9. Estas células também estão relacionadas com a ativação de monócitos e macrófagos de perfil M2 (Arnardottir et al. 2012, Neely et al. 2014, Wang et al. 2014, Deniset & Kubes 2016, Yang et al. 2016).

Os neutrófilos são conhecidos como as primeiras células imunes a participar de qualquer infecção/lesão (em poucas horas). E os monócitos são considerados os principais reguladores da inflamação que também podem apresentar plasticidade no seu perfil. Os monócitos representam 2-8% dos leucócitos humanos e quando recrutados para os tecidos se diferenciam em macrófagos (Geissmann et al. 2010, Karlmark et al 2012, Abbas et al. 2018).

Macrófagos derivados de monócitos inflamatórios desempenham um papel central na inflamação entre o período de 2 a 4 dias (Figura 2), atuando principalmente na fagocitose de microorganismos e degradação de células mortas. Macrófagos de perfil inflamatório (M1) ativados, secretam citocinas (como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α) que atuam sobre as células endoteliais do revestimento dos vasos sanguíneos, intensificando o recrutamento de mais monócitos e outros leucócitos do sangue para os sítios de infecção, amplificando assim a resposta protetora contra os microorganismos (Duque and Descoteaux 2014, Tidball 2017, Okabe 2018, Souza et al. 2018). Por outro lado, os macrófagos de perfil anti-inflamatório/regulatório (M2) aparecem no período de 4 a 7 dias após o início de uma lesão tecidual (Figura 2) e secretam citocinas do (como IL-4 e IL-10) e fatores de crescimento (como TGF β e VEGF) que estimulam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e a síntese de matriz extracelular (Duque and Descoteaux 2014, Tidball 2017, Okabe 2018, Souza et al. 2018).

Durante a fase de resolução da inflamação, os monócitos/macrófagos atuam na fagocitose de neutrófilos apoptóticos, processo no qual tem como consequência uma diminuição na produção de IL-23 por outros macrófagos, bem como, IL-17 pelos linfócitos, consequentemente reduzindo a produção de G-CSF e de neutrófilos N1 (Mayadas et al. 2014). Além disso, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por células mononucleares do sangue também estimula os macrófagos a produzirem IL-10 e reduzirem a produção de IL-12, assumindo assim um fenótipo M2 (Filardy et al. 2010).

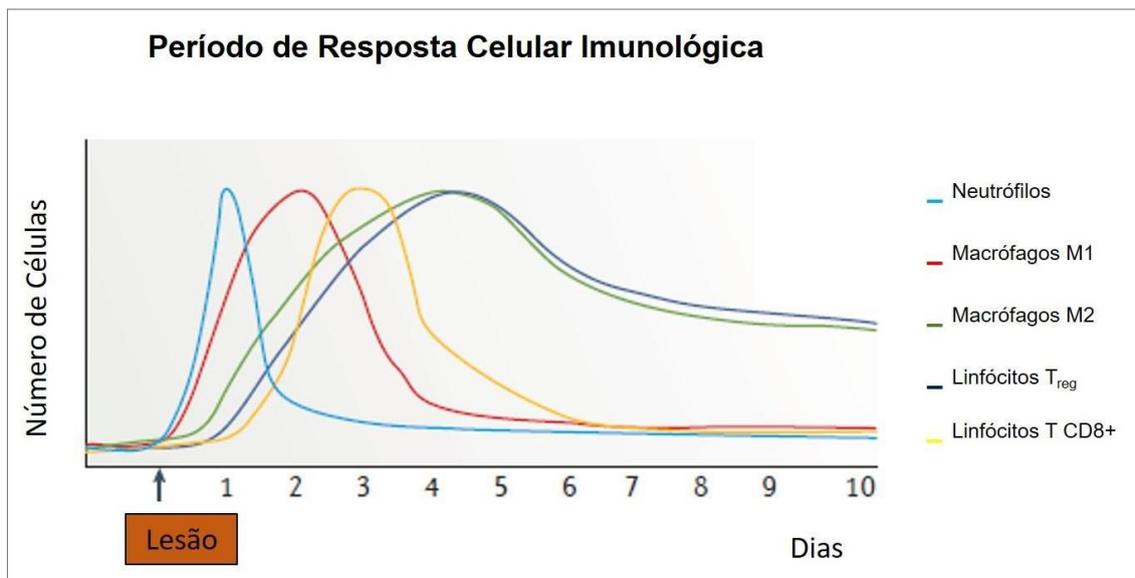


Figura 2: Presença de Células Imunes durante o Reparo Tecidual (Adaptação de Tidball et. al, 2017).

Os linfócitos representam 20-40% dos leucócitos e são responsáveis principalmente pelas respostas imunes adaptativas (Xu et al. 2004, Koyasu and Moro 2012). As principais classes de linfócitos são os do tipo T e B. Os linfócitos T são mediadores de imunidade celular que se originam na medula óssea e amadurecem no timo. Essas células apresentam diferentes subpopulações, das quais se destacam os linfócitos auxiliares CD4+, responsáveis pela secreção de citocinas que atuam na ativação de outras células imunológicas (como linfócitos e macrófagos) e linfócitos citotóxicos CD8+, responsáveis pelo reconhecimento e morte de células infectadas ou células tumorais. Por outro lado, os linfócitos B são células responsáveis principalmente pela produção de anticorpos no organismo, atuando ativamente na imunidade humoral (Luckheeram et al. 2012, Golubovskaya & Wu 2016, Abbas 2018).

Os linfócitos Th (CD4+) podem ser classificados ainda em pelo menos 2 subtipos efetores: perfil pró-inflamatório Th1 e perfil anti-inflamatório/regulador Th2. Essa heterogeneidade na fenotipagem dos linfócitos representa um mecanismo de controle na modulação de citocinas durante as fases da inflamação e do reparo, uma vez que, assim como ocorre com os neutrófilos e macrófagos, respostas excessivas podem levar a danos teciduais (Berger 2000, Xu et al. 2004, Mesquita Junior et al. 2010, Abbas et al. 2018).

A ação dos linfócitos Th1 é essencial para o controle de patógenos intracelulares, por meio de uma grande produção de IL-2, citocina indutora de

proliferação de outros linfócitos que potencializa o sistema de defesa. Além da IL-2, os linfócitos Th1 também são grandes produtores de IFN γ . Essa citocina por sua vez, é um importante mediador na ativação de macrófagos, que assumem um papel relevante na ativação de Linfócitos CD8. Somado a isso, o IFN γ consegue ativar Linfócitos para resposta pró-inflamatória, inibindo assim, a secreção de citocinas anti-inflamatórias/regulatórias (Xu et al. 2004, Mesquita Júnior et al. 2010). Em contraste, as citocinas derivadas de linfócitos Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) exibem funções anti-inflamatórias/regulatórias inibindo as respostas Th1 em diferentes doenças. Na prática clínica, os linfócitos são de grande importância na contribuição de resposta inflamatória de doenças reumáticas autoimunes como por exemplo, artrite reumatoide e esclerose múltipla (Stadler et al. 2000, Biedermann et al. 2004, Mesquita Júnior et al. 2010, Musawi et al. 2016). Dessa forma, direcionar a polarização das células Th também poder ser uma estratégia potencialmente importante para o tratamento de doenças mediadas por células Th1.

Como exposto, nas diferentes fases dos processos de inflamação e reparo, a mudança no fenótipo dos leucócitos é um fenômeno importante e que vem ganhando cada dia mais atenção dos pesquisadores. A polarização prolongada ou ineficiente irá determinar atraso no reparo e em muitos casos impedir a ocorrência da regeneração tecidual (Filardy 2010, Mills 2012, Fernandes et al. 2015, Ma et al. 2016, Yang et al. 2016). Do mesmo modo, o grau de intensidade da ativação pode potencializar o dano e dificultar a fase final do reparo (Butterfield 2006, Arnardottir 2012, Sousa 2019). A Tabela 1 resume as características clássicas dos principais fenótipos leucocitários (Tsuda et al. 2004, Xu et al. 2014, Mesquita Júnior et al. 2010, Arnardottir et al. 2012, Karlmark et al 2012, Neely et al. 2014, Kobayashi 2015, Amantea 2016, Ma et al 2016, Yang 2016).

Tabela 1: Divisão fenotípica clássica para monócitos, linfócitos e neutrófilos humanos: ativação, produção e função.

Fenótipos	Ativação	Produção	Função
Monócitos M1	LPS	IL-2, IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8, CXCL10, TNF- α , IFN- γ , NF κ β , iNOS,	Resposta Inata, Inflamação
Monócitos M2	IL-4, IL-10, IL-13	IL-10, TGF β -1	Resposta Adaptativa, Imunoregulador
Neutrófilos N1	Ligantes TLR2, TLR4, TLR5, TLR8, LPS	CCL3, CCL5, CXCL12, IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12, TNF α , NO, ROS, CRAMP, mieloperoxidase	Fagocitose, Ativação de monócitos e macrófagos M1
Neutrófilos N2	Ligantes TLR2, TLR4, TLR7, TLR9, IL-4, IL-10	CCL2, CCL17, IL-4, IL-10, VEGF, TGF β 1, Arginase	Imunoregulador, Ativação de monócitos e macrófagos M2, Resolução de Inflamação
Linfócitos Th1	LPS	IL-2, IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ	Ativação de Fagócitos, produção de anticorpos opsonizantes
Linfócitos Th2	IL-4, IL-10	IL-4, IL-6, IL-10, TGF β -1	Proliferação e diferenciação de Células B, Ativação de eosinófilos

Diversas modalidades terapêuticas têm sido pesquisadas no intuito de proporcionar uma modulação adequada das células que regulam o reparo tecidual. Dentre estas modalidades, a fotobiomodulação (FBM) vem demonstrando resultados promissores no tratamento de lesões teciduais evidenciando sua capacidade de atuar sobre os processos de inflamação e reparo, modulando a expressão de diversos mediadores pró e anti-inflamatórios (Baptista et al. 2011, Assis et al. 2013, Fernandes et al. 2013, Alves et al. 2014, Hamblin 2017).

1.3. Fotobiomodulação (FBM)

A fotobiomodulação (FBM) consiste no uso de terapêutico de fontes de luz para reduzir a inflamação, aliviar a dor e estimular o reparo. As fontes de luz usadas para FBM são do tipo não ionizante e incluem lasers, diodos emissores de luz (LEDs) e/ou luz de banda larga, nos espectros eletromagnéticos visíveis (400 a 700 nm) e infravermelho próximo (700 a 1100 nm). As aplicações da FBM são numerosas e estão sendo exploradas experimentalmente na ciência básica e nos níveis pré-clínico e clínico (Anders et al. 2015, Hamblin 2017).

As fontes laser e LED são semelhantes em relação à monocromaticidade, embora o LED tenha maior largura espectral. A diferença básica dessas fontes está no fato de que a luz emergente do LED não é colimada e nem coerente. Apesar destas diferenças, a FBM com uso de LED vem sendo bastante usada como alternativa ao uso do laser, pois, além de atuar de modo eficiente na redução de processos inflamatórios e cicatrização de feridas, possibilita o tratamento de áreas extensas com baixo custo (Wong-riley 2001, Weiss et al. 2005b, Siqueira et al. 2009, Yeh et al. 2010, Chaves et al. 2014).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos da FBM nos tecidos em estudos *in vitro* e *in vivo*. A hipótese mais aceita é que a luz absorvida interage com moléculas orgânicas, chamadas de cromóforos, localizados dentro dos tecidos desencadeando uma sequência de respostas intracelulares que são denominadas como reações primárias. Os principais cromóforos identificados até o momento, são a citocromo C oxidase nas mitocôndrias e os canais de íons de cálcio (Huang et al. 2011, Farivar et al. 2014, Freitas & Hamblin 2016) (Figura 3).

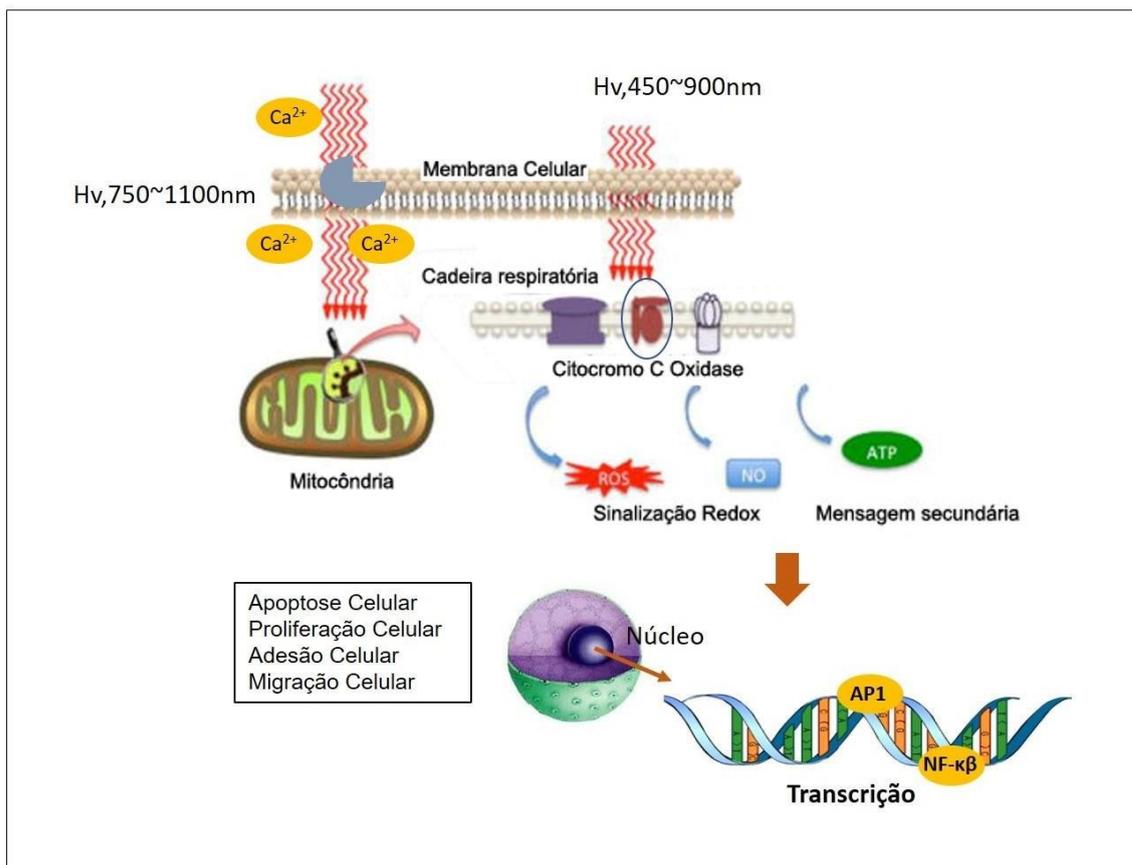


Figura 3: Mecanismos de ação da fotobiomodulação. Imagem adaptada do estudo publicado por Hamblin 2016: Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders.

Os efeitos causados por essa absorção de fótons dão início às reações secundárias que incluem o aumento na produção de ATP, de AMPc, de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico e ainda a modulação dos níveis de cálcio. Já o chamado efeito terciário inclui a ativação de diversos fatores de transcrição, que podem gerar efeitos estimulantes (aumento da sobrevivência, da proliferação e da migração celular) ou inibitórios (inibição da síntese de proteínas e espécies reativas de oxigênio) dependendo da quantidade e da maneira pela qual a energia for entregue ao tecido/célula alvo (Anders et al. 2015, Freitas et al 2017, Hamblin 2017) (Figura 3).

Apesar de a FBM ter sido bastante estudada nos últimos anos pela sua capacidade de modular a expressão de genes e proteínas envolvidos no processo de reparo tecidual, poucos estudos avaliaram o efeito da fototerapia isoladamente sobre os diferentes fenótipos de leucócitos humanos (monócitos, linfócitos e neutrófilos) e não foi possível encontrar estudos sobre o espectro de absorção de luz destas células. Os artigos que avaliaram o efeito da FBM com

laser ou LED sobre monócitos isolados de sangue periférico humanos (cultura primária) ou monócitos humanos de linhagem polarizados para resposta pró ou anti-inflamatória estão sumarizados a seguir.

1.4. Efeitos da Fotobiomodulação sobre Leucócitos Humanos

Até esta data foi possível localizar 2 artigos que avaliaram o efeito da FBM sobre neutrófilos, 8 que avaliaram sobre monócitos/macrófagos e 2 artigos que avaliaram em linfócitos. A busca literária foi realizada utilizando base de dados como Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde (LILACS), PUBMED e Web of Science. Os principais termos de busca foram: leucócitos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, pró-inflamatório, anti-inflamatório, M1, M2, L1, L2, N1, N2, fotobiomodulação, laser, LED, absorvância e absorção de luz. A tabela 17 com o resumo descritivo destes artigos está no item anexo 10.3.

1.4.1. Artigos que avaliaram a FBM sobre neutrófilos

No estudo de Fujimake et al. 2003 foi descrito o efeito da fototerapia com laser de diodo infravermelho de 830 nm (150 mW/cm^2) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando o teste de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) e expressão de CD11b e CD16 por citometria de fluxo em neutrófilos isolados de sangue periférico de pacientes fumantes. Os resultados mostraram que a resposta do QLlum dos neutrófilos foi reduzida pela irradiação com laser 60 min antes da estimulação com zimosan opsonizado e ionóforo de cálcio. O efeito atenuador da FBM foi maior em neutrófilos de fumantes do que em não fumantes, enquanto a quantidade de ROS produzida foi maior em neutrófilos de fumantes. A expressão de CD11b e CD16 na superfície dos neutrófilos não foi afetada com a FBM.

Recentemente Cerdeira et al. 2016 avaliaram o efeito dos lasers de 660 nm ou 780 nm (potência de 40 mW e energias até 19,2 J) sobre neutrófilos coletados de sangue de pacientes incubados ou não com *C. albicans* (em período de análise de 3h). Foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade fungicida/microbicida destes neutrófilos, por meio de avaliação de geração de radicais hidroxila, ânions hipoclorito e ânions superóxido. Os resultados mostraram que a FBM foi capaz de excitar os neutrófilos para um perfil funcional mais elevado, que foi traduzido como

produção superior de ROS e maior capacidade fungicida. A energia mais eficaz foi de 19,2 J e o laser de 660 nm foi ainda mais eficaz do que o laser de 780 nm no aumento da explosão respiratória de neutrófilos e da capacidade fungicida.

1.4.2. Artigos que avaliaram a FBM sobre monócitos

Young *et al.* (1989) irradiaram culturas de monócitos humanos da linhagem U-937 com diodo laser (GaAlAs) utilizando emissores de luz não coerente (LED) pulsado, de comprimentos de onda de 660, 870 e 880 nm e luz coerente (laser) de 820 nm. Os autores avaliaram os efeitos das diferentes fontes de luz sobre a proliferação dos monócitos (após 12 horas) e os efeitos dos sobrenadantes colhidos destas culturas e aplicados sobre fibroblastos. A fotobiomodulação, nos diferentes parâmetros de LED avaliados, não alterou a viabilidade dos monócitos, mas, os sobrenadantes de monócitos tratados com os comprimentos de onda de 660 e 870 nm estimularam a proliferação de fibroblastos e além disso, o sobrenadante que mais ativou a proliferação de fibroblastos após quatro dias de cultivo foi com uso da irradiação com luz coerente de 660 nm. Os sobrenadantes derivados de culturas de monócitos irradiadas com luz não coerente de 880 nm mostraram efeitos inibitórios sobre o crescimento dos fibroblastos. A irradiação laser (820nm), em baixa densidade de energia e baixa potência, mostrou-se capaz de aumentar a proliferação dos monócitos somente no período de 36 h de cultivo e o sobrenadante dos monócitos tratados com esta luz demonstrou efeito proliferativo sobre fibroblastos após 60h de cultivo.

Em 1990, o mesmo grupo de pesquisadores (Bolton *et al.* 1990) repetiu o modelo experimental (linhagem de monócitos humanos U-937), mas desta vez usando somente a luz pulsada não coerente (LED) de 660 nm e fluências de 2,4 a 9,6 J/cm². Foi observado que, mesmo os sobrenadantes das culturas não irradiadas de monócitos eram capazes de estimular o crescimento dos fibroblastos. Porém o efeito positivo sobre o crescimento foi mais acentuado nas culturas tratadas com sobrenadantes de células irradiadas com a fluência de 7,2 J/cm² e menos efetivo nas culturas tratadas com sobrenadantes de células irradiadas com 9,6 J/cm² demonstrando efeito dependente dos parâmetros densidade de energia e energia total para a luz não coerente pulsada.

Posteriormente, o mesmo grupo (Bolton *et al.* 1991) avaliou no modelo descrito, os efeitos da luz coerente pulsada e polarizada (laser) no comprimento

de 820 nm nas densidades de potência de 400 ou 800 mW/cm² e nas fluências de 2,4 e de 7,2 J/cm² sobre monócitos humanos da linhagem U-937. Os sobrenadantes destes monócitos irradiados foram incubados com fibroblastos e após 4 dias de cultivo, foi verificado que o sobrenadante das células irradiadas com energia total de 0,3 J (2,4 J/cm²; 800 mW/cm²; 3 s) gerou uma proliferação celular estatisticamente maior nos fibroblastos do que os sobrenadantes de monócitos tratados com a mesma energia de 0,3 J totais com dosimetria de 2,4 J/cm²; 400 mW/cm²; 6 s, este que foi semelhante ao sobrenadante do grupo controle não irradiado. Mas o melhor estímulo proliferativo para os fibroblastos foi o tratamento com dose de energia de 0,9 J (7,2 J/cm², 400 mW/cm²; 18 s).

Lindgard *et al.* (2007) avaliaram o efeito da luz não coerente (LED) de 634 nm sobre a produção de óxido nítrico (NO), a ativação das enzimas óxido nítrico sintases (induzível e endotelial) e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares por monócitos humanos isolados com Ficoll ativados com acetato de forbol miristato (PMA). Os autores observaram que a irradiação resultou em diminuição dos níveis intracelulares de ROS, assim como, provocou um aumento nos níveis de liberação de óxido nítrico sem o proporcional aumento na expressão de mRNA para as enzimas produtoras deste gás, sugerindo que a irradiação seria capaz de induzir a liberação de estoques pré-sintetizados de NO.

Mehrsai *et al.* (2009) irradiaram monócitos humanos isolados com Ficoll (estimulados ou não com fitohemaglutinina) com laser (He-Ne) 632,8 nm e dosaram a produção das citocinas IL-2, IL-12, TGF- β e IFN- γ após 3, 5 e 8 dias de cultivo. Em todos os períodos avaliados, os autores observaram uma redução significativa na produção proteica de todas as citocinas avaliadas nos grupos ativados e irradiados quando comparados com os grupos somente ativados.

Na avaliação de células THP-1 (linhagem tumoral de monócitos) irradiadas com laser vermelho de 660 nm ou infravermelho de 808 nm, foi observado que após 24h, ambas as irradiações 660 ou 808 nm (1 e 2 J/cm²) aumentaram a expressão do mRNA de CCL2/MCP-1 quando as células THP-1 foram ativadas com LPS. Porém, a dose de energia 3 J/cm² (660 nm e 808 nm) provocou uma redução na expressão deste gene. A expressão gênica de CXCL10 e TNF α foram aumentadas após irradiação com 660 nm (1 J/cm²), mas, foram diminuídas com a irradiação de 808 nm (1 J/cm²). Além disso, foi avaliada

a produção proteica (24 h após a irradiação com 660 nm - 1 J/cm²), e foi observado um aumento significativo na produção de CCL2, CXCL10 e TNF α nestes monócitos ativados (Chen *et al.* 2014).

Souza *et al.* 2014 observaram que a irradiação com FBM usando laser de 660 nm (30mW) reduziu a produção proteica de IL-8 e TNF α em monócitos da linhagem U937 ativados com LPS por 24h (as células foram irradiadas 1h após adição de LPS e não foi feita troca de meio). Após 24h, os sobrenadantes foram coletados para dosagem proteica.

Carvalho *et al.* (2016) demonstraram que a fotobiomodulação com laser de 660 nm gerou redução dos mediadores inflamatórios: TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (expressão gênica e produção proteica), CCL2 e CXCL10 (síntese proteica), HIF-1 α (expressão mRNA), ROS e NF- κ B (síntese) e um aumento nos níveis de mediadores M2 como a IL-10 (expressão gênica e produção proteica), arginase-1 e PGC-1 β (expressão mRNA) e glutatona/GSH (síntese) em monócitos da linhagem U-937 tratados com LPS.

1.4.3. Artigos que avaliaram a FBM sobre linfócitos

Stadler *et al.* (2000) aplicaram laser de 660 nm em humanos de forma sistêmica (seguido de coleta de sangue para isolamento de linfócitos), no intuito de comparar o mecanismo da FBM nessas células em relação a linfócitos irradiados apenas após isolamento. Para o experimento controle, os linfócitos foram inicialmente isolados e só depois irradiados no mesmo comprimento de onda e fluência (0 ou 5 J/cm²). A proliferação de linfócitos foi significativamente maior em amostras irradiadas na presença de sangue total em comparação com os linfócitos irradiados após isolamento. A produção de radicais livres e peróxido lipídico também aumentou significativamente quando as amostras foram irradiadas na presença dos glóbulos vermelhos. O estudo ressalta a hipótese de que o mecanismo de ação do laser 660 nm possa ser estimulado pela presença da hemoglobina, resultando na produção de mais radicais livres de oxigênio.

Musawi *et al.* (2017) estudaram o efeito da FBM sobre a contagem de linfócitos em sangue total de humanos *in vitro*. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes e cada amostra foi dividida em duas alíquotas iguais para ser usada como amostra controle (não irradiada) e amostra irradiada. As

irradiações foram realizadas utilizando laser com diferentes comprimentos de onda de 405, 589 e 780 nm e diferentes fluências de 36, 54, 72 e 90 J/cm², com uma irradiância fixa de 30 mW/cm². Após análise, foi observado que as contagens de linfócitos apresentaram aumento quando tratadas com FBM ambar de 589 nm (fluência de 72 J/cm²) quando comparadas com amostras não irradiadas. Esta dosimetria também gerou um aumento significativo de linfócitos CD45 e de células natural killer (CD16, CD56), mas não houve alterações significativas nos linfócitos T CD3, células supressoras T (CD3, CD8), T-helper (CD3, CD4) e linfócitos B CD19 quando comparados com os seus homólogos não irradiados na análise por citometria de fluxo.

1.5. Efeitos da Fotobiomodulação Ambar no âmbito Terapêutico

Embora não tenham sido encontrados estudos que avaliassem a FBM ambar (570-595 nm) em todos os fenótipos de leucócitos humanos, no âmbito clínico alguns estudos descrevem os efeitos do uso da luz ambar no rejuvenescimento, inflamação, reparo, dor e edema.

Uma breve descrição dos trabalhos que avaliaram a luz ambar em diferentes modelos experimentais, pode ser encontrada a seguir. A coleta de dados foi realizada (até o presente momento) por meio de busca de artigos publicados entre 2004-2020. Foram utilizadas bases de dados como LILACS, PUBMED e Web of Science e os principais termos de busca foram: luz ambar, fotobiomodulação ambar, fotobiomodulação 570-595 nm, laser 590 nm e LED 590 nm.

Weiss *et al.* (2004) relataram que 93 pacientes tratados com LED de 590 nm mostraram melhora dos sinais de fotoenvelhecimento em 90%. A maioria dos pacientes demonstrou melhora nas rugas periorbitais, redução na classificação do fotoenvelhecimento, textura global da pele e eritema de fundo e pigmentação.

Novamente o mesmo grupo de autores (Weiss *et al.* 2005a) relatam que o uso do LED de 590 nm teve efeito positivo em mais de 300 pacientes que buscavam rejuvenescimento facial e atribuíram os resultados ao componente anti-inflamatório e ativador desta luz.

Em outro relato, o grupo (Weiss *et al.* 2005b) descreve o uso do LED de 590 nm para tratar peles foto envelhecidas. Os autores avaliaram os indivíduos 4, 8, 12, 18 semanas e 6 e 12 meses após uma série de 8 tratamentos

administrados ao longo de 4 semanas. Os resultados mostraram uma redução dos sinais de fotoenvelhecimento em 90% dos indivíduos que apresentavam pele com textura mais lisa, redução das rugas peri-orbitais e redução de eritema e pigmentação, além de uma melhoria de 10% nas medições topográficas da superfície da pele. Os dados das biopsias mostraram que nos pacientes tratados com LED houve um aumento acentuado de colágeno na derme papilar, aumento de 28% de colágeno I, e redução média de 4% na marcação da metaloproteinase MMP -1.

DeLand *et al.* (2007) relataram que o tratamento com LED (590 nm) reduziu a ocorrência e a severidade de radiodermite em pacientes com câncer de mama tratados por radioterapia.

Ozcelik *et al.* (2008) avaliaram o efeito combinado da aplicação de uma proteína derivada da matriz do esmalte dental combinada com laser de 588 nm sobre a dor e o reparo de defeitos ósseos no osso alveolar de pacientes portadores de doença periodontal. Os resultados mostraram que a associação do laser com a proteína resultou em menos perda de inserção gengival, dor e edema quando comparado aos resultados da aplicação da proteína isoladamente.

Alster & Wanitphakdeedecha (2009) trataram o eritema e edema faciais causados pela aplicação de laser fracionado de alta potência com cluster de LED ambar (590 nm) e concluíram que o tratamento com LED foi capaz de diminuir a intensidade e duração do processo inflamatório nos pacientes.

Wu *et al.* (2012) observaram que a irradiação com LED ambar (570-590 nm) pulsado com 18 J/cm² foi capaz de induzir a proliferação e promover a expressão de mRNAs de pró-colágeno em culturas fibroblastos humanos.

Fernandes *et al.* (2015) mostraram que o pico de absorção de macrófagos da linhagem J774 está entre 550 e 600 nm que caracteriza a luz ambar/amarela.

Já Merry *et al.* (2017) relataram resultados funcionais e anatômicos positivos quando do tratamento de pacientes portadores de degeneração macular relacionada à idade com uso de LED que combinava os comprimentos de onda ambar (590 nm), vermelho (670 nm) e infravermelho (790 nm)

2. JUSTIFICATIVA

Na Fotobiomodulação, para que exista um efeito terapêutico, os fótons emitidos precisam ser absorvidos por um cromóforo presente nas células do tecido alvo (Anders et al. 2015, Freitas et al 2017, Hamblin 2017). Os leucócitos, em especial neutrófilos, monócitos e linfócitos são apontados como células alvo para as intervenções terapêuticas pela sua plasticidade e capacidade de coordenar as diferentes fases dos processos de inflamação e reparo (Mesquita Junior et al. 2010, Duque and Descoteaux 2014, Ma et al. 2016, Tidball 2017, Abbas et al. 2018, Okabe 2018, Souza 2018). Porém, não foi possível encontrar estudos que avaliaram o espectro de absorbância de leucócitos humanos. Somente um estudo descreveu que o pico de absorção de macrófagos da linhagem J774 (linhagem comercial de macrófagos derivados de sarcoma de camundongos Balb/c), está entre 550 e 600 nm (Fernandes et al. 2015), que caracteriza a luz ambar/amarela. Existem pouquíssimos relatos na literatura com relação ao uso de irradiação ambar (570-595 nm) sobre os leucócitos, apenas um estudo foi encontrado na análise de linfócitos humanos, mas não avaliou polarização e interação com luz (descrito no item 1.4.3; e na tabela 17 do anexo 10.3). Contudo, o mercado tem mostrado uma tendência de explorar novos comprimentos de onda para a FBM e já disponibiliza equipamentos terapêuticos que emitem luz ambar. Porém, é importante avaliar a absorbância dos tipos celulares a serem estudados, no intuito de verificar em qual faixa do espectro essas células absorvem mais, assim como, qual tipo de luz é mais absorvida nas diferentes fases do processo de inflamação e reparo. Com relação ao tipo de fonte, vários estudos estão evidenciando que o LED atua de modo tão eficiente quanto o laser na redução de processos inflamatórios e na cicatrização de feridas, tendo como vantagens a possibilidade de tratamento de áreas extensas, o baixo custo e o fato de ser mais seguro possibilitando o uso pelo próprio paciente de maneira fácil e em local de sua preferência (Wong-Riley et al. 2001, Weiss et al. 2005b, Siqueira et al. 2009, Yeh et al. 2010, Chaves et al. 2014, Hamblin 2017, Heiskanen & Hamblin 2018).

Dessa forma, este projeto procurou elucidar este tema por meio da avaliação do espectro de absorvância dos leucócitos humanos e dos efeitos da FBM com LED ambar sobre a produção gênica e proteica de citocinas por monócitos, linfócitos e neutrófilos humanos polarizados para os fenótipos pró ou anti-inflamatório.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos

Avaliar o espectro de absorvância de monócitos, linfócitos e neutrófilos humanos polarizados para os fenótipos pró ou anti-inflamatórios na presença ou ausência de fotobiomodulação com LED ambar 590 nm e o efeito dessa irradiação sobre a expressão gênica e proteica de mediadores inflamatórios.

4. METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Nove de Julho com parecer de número 3.506.480 (anexo 10.2).

4.1. Fluxograma Experimental

Os leucócitos foram isolados a partir de câmaras de leucorredução de sangue periférico humano obtidas a partir de doadores de plaquetaférese do Banco de Sangue do Instituto de Hemoterapia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz (documento anexado no item 10.1). Para cada bolsa de sangue são realizados exames sorológicos obrigatórios como Hepatites B e C, HIV (AIDS), HTLV, Sífilis, Doença de Chagas e o exame (não sorológico) de Eletroforese de Hemoglobina (informações apresentadas no manual de doação do hospital). Os pacientes selecionados para esse estudo foram todos do sexo masculino com idade entre 25-54 anos e o fluxograma está representado na figura 4.

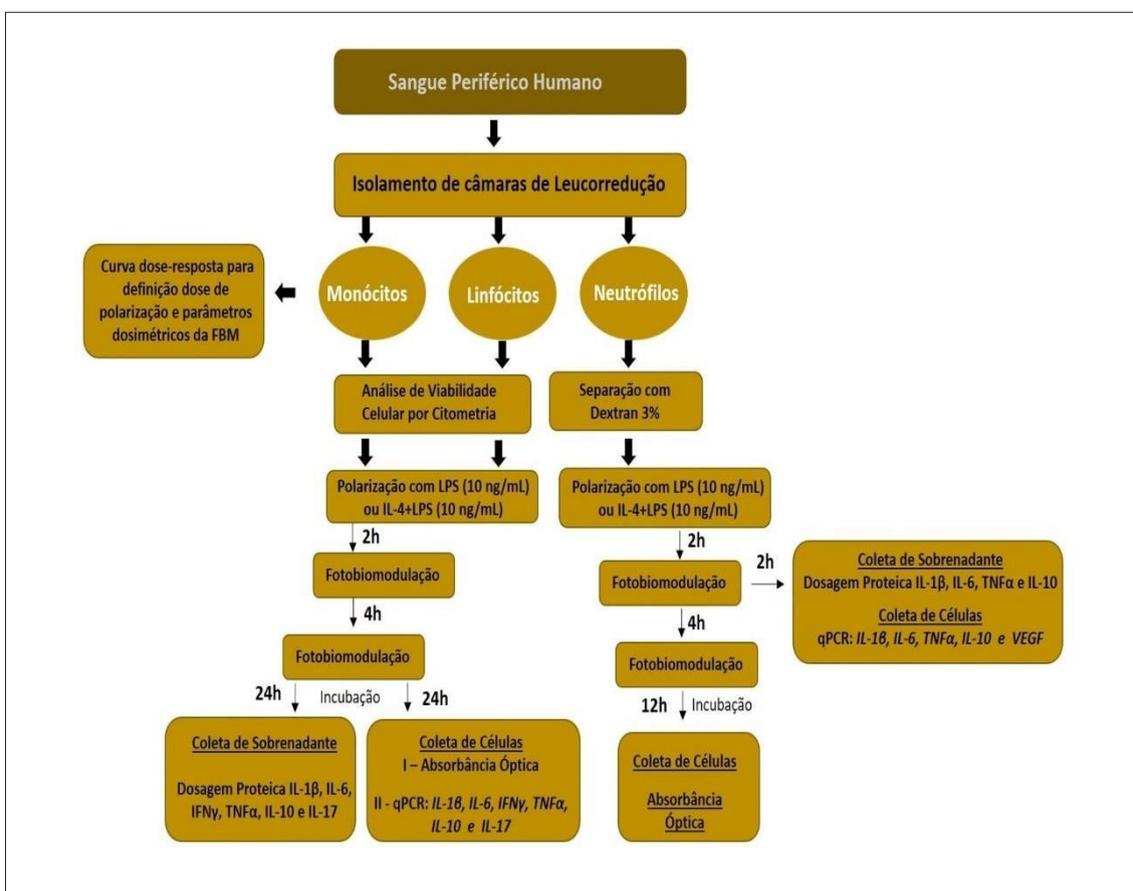


Figura 4 – Desenho Experimental do Estudo (M – Monócitos; L – Linfócitos; N – Neutrófilos).

4.2. Isolamento de Leucócitos Mononucleares e Polimorfonucleares

Para isolamento das células, as câmaras de leucorredução de 3 pacientes diferentes foram lavadas separadamente com 10 mL de PBS 1X (Gibco® - Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, EUA). Em seguida, se adicionou 30 mL de PBS para diluição de cada amostra (diluição proporcional de 1:3). A solução foi então dividida cuidadosamente em 2 tubos contendo 10 mL de Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare - Chicago, Illinois, EUA) que foram centrifugados à 400 G por 30 minutos, 20 °C. Após centrifugação, o sangue total foi separado em 5 fases: Plasma, Leucócitos Mononucleares, Ficoll, Leucócitos Polimorfonucleares e Eritrócitos (Figura 5).

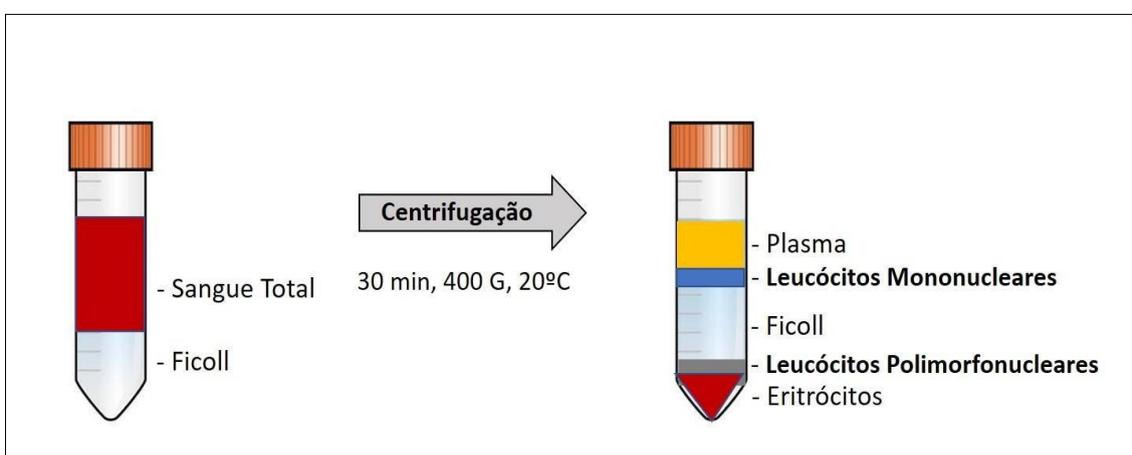


Figura 5 – Representação esquemática de separação de Células Mononucleares e Polimorfonucleares de Sangue Periférico Humano utilizando Ficoll-Paque (Imagem adaptada do estudo publicado por Murray & Rajeevan 2013).

Os leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) foram coletados com uma pipeta Pasteur a partir da nuvem formada pelas células localizadas entre o Ficoll e o Plasma. Essas células foram transferidas para um novo tubo de 50 mL estéril, onde foi adicionada solução salina (PBS) para completar um volume final de 40 mL. Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação à 100 G, 10 min, 20 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, sendo realizada mais uma lavagem com 40 mL de PBS, seguida por centrifugação (100 G, 10 min, 20 °C) no intuito de eliminar possíveis plaquetas coletadas no momento da separação das células. As quantificações e as checagens de viabilidade celular foram realizadas a partir de uma solução de células com azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich - San Luis, Missouri, EUA) analisadas em Câmara de Neubauer, sob microscópio óptico. Para realização dos experimentos foram

utilizadas somente suspensões com 95% de viabilidade celular. A avaliação do sucesso de separação de células mononucleares do sangue foi realizada por citometria de fluxo (Figura 25, no apêndice 9.1) em três diferentes pacientes. A análise foi feita no aparelho BD FACSCanto™ II (BD Biosciences - EUA).

Para isolamento de Leucócitos Polimorfonucleares (neutrófilos), foi se aspirada a nuvem de leucócitos mononucleares e o sobrenadante de Ficoll. Apenas os leucócitos polimorfonucleares e eritrócitos permaneceram nos tubos Falcon. Foi-se adicionado então, PBS 1X até completar um volume de 25 mL e foi realizada uma homogeneização cuidadosa. Em seguida, Dextran 3% em PBS (Sigma- Aldrich) foi adicionado para completar um volume de 50 mL. Logo após, foi realizada mais uma homogeneização suavemente, e o tubo Falcon (contendo eritrócitos + polimorfonucleares + PBS + Dextran 3%) foi mantido em repouso por 20 min em temperatura ambiente. Após esse período, o sobrenadante com as células polimorfonucleares (neutrófilos) foi transferido para um outro tubo Falcon de 50 mL que recebeu adição de PBS até completar um volume de 50 mL, e foi realizada uma centrifugação à 500 G; 10 min, 4 °C (baixa temperatura para que os neutrófilos não sofressem ativação). Após a centrifugação, foi realizado procedimento de lise hipotônica para eliminação de possíveis hemácias (o número de repetições de lise em cada paciente foi realizado de acordo com a eliminação total de eritrócitos). A lise hipotônica foi realizada com solução de NaCl 0,2% e NaCl 1,6 % em água Milli-q. As células restantes foram contadas com azul de Trypan, e as suspensões com 95% de viabilidade foram utilizadas para realização dos experimentos.

4.3. Plaqueamento de Leucócitos Humanos

Para os experimentos com células mononucleares, 1 mL de solução celular na concentração de 5×10^6 células/mL foi adicionado em placas de Petri de 35 mm (Kasvi - São José dos Pinhais – Paraná - Brasil), que foram mantidas em estufa à 37 °C e 5% de CO² por 2 horas para aderência dos monócitos. Após este período, os sobrenadantes, contendo os linfócitos, foram coletados das placas e transferidos para um tubo cônico de 50 mL. Como os monócitos permanecem aderidos à placa, estas foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS, e em seguida receberam 1,5 mL meio de cultura RPMI suplementado com 5% de Soro fetal bovino - SFB (Gibco® - Thermo Fisher Scientific) para os grupos

polarizados para perfil pró-inflamatório ou contendo 10% de SFB para os grupos de perfil anti-inflamatório (conforme descrição no item 4.4.). Os grupos controles também foram suplementados com 10% de SFB.

Os linfócitos coletados foram centrifugados (453 G, 10 min, 20 °C), lavados uma vez com PBS, e ressuspensos em meio RPMI para contagem. Posteriormente os linfócitos foram plaqueados na quantidade de $3,5 \times 10^6$ em 1,5 mL de meio suplementado com 5% ou 10% de SFB com os devidos agentes de polarização (item 4.4.) em placas de Petri de 35 mm (Kasvi).

Os neutrófilos foram plaqueados na quantidade de 3×10^6 em 1,5 mL de meio RPMI com 5 ou 10% de SFB de acordo com o perfil, assim como os monócitos e linfócitos, com os devidos meios de polarização também em placas de 35 mm (Kasvi).

4.4. Polarização de Leucócitos Humanos

Para determinar a metodologia de polarização de perfil pró-inflamatório, foi realizada inicialmente uma curva dose-resposta de avaliação de produção proteica de IL-6 (Biolegend, San Diego–California EUA) por monócitos polarizados com LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - Sigma) + IFN γ (Sigma) nas concentrações de 100 ng/mL em períodos de 2, 9 e 24 h (Suzuki 2000, Adib-Conquy & Cavaillon 2002, Plevin et al. 2016) (Figura 26, no apêndice 9.2). Em seguida, com o objetivo de observar o efeito do IFN γ , foram avaliadas duas concentrações do mesmo (10 e 100 ng/mL) associadas a uma única concentração de LPS (100 ng/mL) por um período de 24h (Figura 27, no apêndice 9.2). Mais adiante, foram realizadas mais duas curvas-dose resposta para avaliar o efeito de polarização com LPS ou IFN γ isolados individualmente (em diferentes concentrações) por um período menor de 2 h (Figuras 28 e 29 no apêndice 9.2). A citocina de escolha para padronização do estudo foi a IL-6 por ser uma citocina bastante descrita na literatura no contexto inflamatório (Fernandes et al. 2015, Carvalho et al. 2016, Sousa et al. 2019). Após todas as análises, foi definido o método de ativação de perfil pró-inflamatório para monócitos, linfócitos e neutrófilos utilizando somente o LPS na concentração de 10 ng/mL por um período de 2 horas. Esses grupos foram cultivados em RPMI com 5% de SFB.

Para padronização do método de ativação do perfil anti-inflamatório, foi realizada uma avaliação proteica da produção da citocina IL-10 (kit ELISA 430601 – Biolegend) com base no estudo de Woodward et al 2012. Os monócitos foram testados com estimulação por IL-4 (Sigma) ou IL-4 associada ao LPS por um período de 2 horas (conforme mostra a figura 30, no apêndice 9.3). Os resultados mostraram que os monócitos ativados com IL-4 associado ao LPS apresentavam uma maior produção da citocina anti-inflamatória IL-10 quando comparados com monócitos não polarizados. Logo, o método de polarização de escolha para monócitos de perfil anti-inflamatório foi 10 ng/mL de LPS + 10 ng/mL de IL-4 por um período de 2h. Essa padronização também foi aplicada para polarizar linfócitos e neutrófilos isolados do sangue. Os grupos ativados com LPS+IL-4 foram cultivados em RPMI com 10% de SFB.

4.5. Fotobiomodulação com LED em Leucócitos Polarizados para os Fenótipos Pró ou Anti-inflamatório

Após o período de polarização, os leucócitos isolados (monócitos, linfócitos e neutrófilos) foram lavados uma vez com PBS, ressuspensos em meio RPMI fresco com 5% ou 10% de SFB (de acordo com o perfil de ativação: pró ou anti-inflamatório) e imediatamente irradiados. Na figura 6, observa-se o processo de irradiação dos leucócitos em placas (35mm) utilizando um protótipo constituído por diodos emissores de luz LED ambar 590 nm conectados a uma fonte de energia (MPS-3005B – MINIPA, São Paulo -SP, Brasil). Os parâmetros dosimétricos foram definidos por curva dose-resposta (Apêndice 9.4 - Tabela 2).

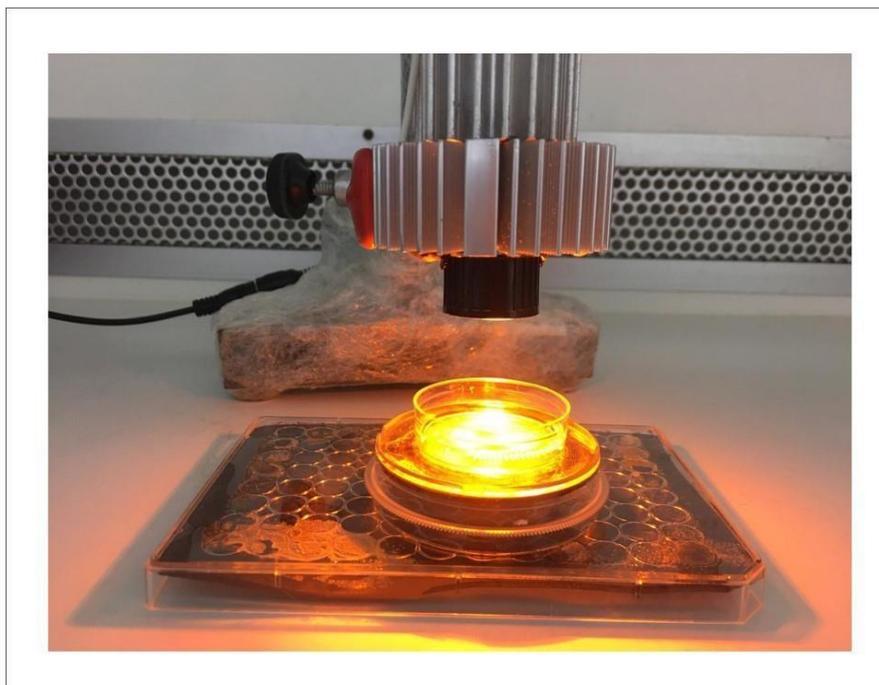


Figura 6 – Irradiações de leucócitos com os LED ambar de 590 nm.

Tabela 2 - Parâmetros Dosimétricos do LED de Escolha para Desenvolvimento do Estudo

Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Área cabeçote (cm ²)	Irradiância (mW/cm ²)	Exposição Radiante (J/cm ²)	Tempo (s)	Quantidade de Aplicações	Energia por Aplicação (J)	Energia total (J)
590 ± 20	70	3	23,3	2,66	60	2	4	8

As irradiações foram realizadas diretamente na parte superior das placas, para que o feixe de LED conseguisse atingir todas as células. A fonte de luz distou 3 cm do fundo das placas e a potência foi checada utilizando medidor (Field Max II-TO Coherent, Santa Clara – Califórnia, Estados Unidos), considerando a perda de fótons pelo meio de cultura (Silva et al. 2012). Os experimentos foram realizados em ambiente de obscuridade parcial para não sofrer nenhum tipo de interferência de outras fontes de luz.

4.6. Grupos Experimentais

Os 18 grupos (experimentais e respectivos controles) deste projeto estão descritos na Tabela 3. Os grupos controle descritos como M0, L0 e N0 são células não polarizadas e não irradiadas, os grupos descritos como M0+LED, L0+LED e N0+LED são células irradiadas, mas não polarizadas. Os grupos polarizados são identificados com: número 1 (M1, L1 e N1) para células que receberam tratamento para indução de perfil pró-inflamatório e M1+LED,

L1+LED e N1+LED para células polarizadas e irradiadas com LED; ou número 2 (M2, L2 e N2) são células que receberam tratamento para indução de perfil anti-inflamatório e M2+LED; L2+LED e N2+LED são as células polarizadas e irradiadas com LED. Os parâmetros do LED utilizados estão descritos no item 4.5. e a metodologia de polarização no item 4.4.

Tabela 3 – Descrição dos Grupos Experimentais

Monócitos	Linfócitos	Neutrófilos
M0	L0	N0
M0 + LED 590 nm	L0 + LED 590 nm	N0 + LED 590 nm
M1	L1	N1
M1 + LED 590 nm	L1 + LED 590 nm	N1 + LED 590 nm
M2	L2	N2
M2 + LED 590 nm	L2 + LED 590 nm	N2 + LED 590 nm

M = monócitos, L = linfócitos e N = neutrófilos

4.7. Avaliação do Espectro de Absorbância de Leucócitos Humanos

Após os períodos de polarização, as culturas de leucócitos foram coletadas e contadas para avaliação da absorção de luz. As células não polarizadas também passaram pelo mesmo procedimento. Foram avaliadas culturas de monócitos e neutrófilos na quantidade de 1×10^5 de células ressuspensas em 1,5 mL de PBS nas seguintes condições experimentais: culturas polarizadas com LPS ou IL4+LPS por 2h; não polarizadas; não polarizadas e irradiadas com LED ambar 590 nm e culturas polarizadas e irradiadas. Os linfócitos foram avaliados na quantidade de $0,5 \times 10^5$ em 1,5 mL de PBS nas mesmas condições experimentais que os monócitos e neutrófilos (descrição de todos os grupos de leucócitos na tabela 3 no item 4.6).

O período de avaliação de monócitos e linfócitos foi de 24 horas após as polarizações e ambos receberam duas irradiações após 2h e 6h de polarização. Já os neutrófilos foram avaliados após 12 horas, pois essas células apresentam menor viabilidade ao longo do tempo, embora tenham recebido duas irradiações após 2h e 6h. Para a coleta dos monócitos aderidos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, removidas das placas com auxílio de tripsina 0,3% (Sigma) por 10 min em estufa à 37 °C, sendo centrifugadas à 453 G por 5 min e depois quantificadas em Câmara de Neubauer. Os linfócitos e neutrófilos foram

obtidos a partir da coleta dos sobrenadantes, que foram lavados com PBS e centrifugados à 453 G por 5 min. Os três tipos celulares foram distribuídos na mesma quantidade para análise no espectrofotômetro.

A análise da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (OceanOptics, modelo USB-2000, Florida, Estados Unidos) com auxílio do software SpectraSuite. Inicialmente realizou-se a calibração do equipamento para excluir qualquer tipo de interferência externa. Após a calibração e leitura do branco (PBS + cubeta), as amostras de células foram colocadas em cubetas plásticas descartáveis de 4,5 mL (Kasvi) e introduzidas no equipamento para avaliação de absorvância de luz pelas células desde o comprimento de onda 450 nm-900nm.

4.8. Avaliação da Produção Proteica por Imunoensaio ELISA

Após as irradiações, as culturas de monócitos e linfócitos permaneceram em estufa por um período de 24h com meio de cultura RPMI suplementado com 5% ou 10 % de SFB (dependendo do tipo de polarização que tinham recebido) à 37°C e 5% de CO₂. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados em tubos de 1,5 mL (Kasvi) à 453 G por 5 min, 20°C. O *pellet* celular foi processado conforme descrito no item 4.9, e os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação proteica utilizando-se kits comerciais conforme descrito na Tabela 4: IL-1 β (437004 - Biolegend), IL-6 (430501 – Biolegend), IL-10 (430601 – Biolegend), TNF- α (430204 – Biolegend), IFN γ (430104 – Biolegend) e IL-17 (433914 – Biolegend), de acordo com os protocolos do fabricante. Os experimentos foram realizados em duplicata amostral utilizando células de pelo menos três pacientes para cada análise (triplicata biológica).

As culturas de neutrófilos foram polarizadas por um período de 2 horas para perfil pró ou anti-inflamatório e depois foram irradiadas com LED. Após irradiação, as células permaneceram em estufa por mais 2 horas à 37°C. Passado o período de 4 horas após a polarização, as culturas foram coletadas para avaliação gênica e o sobrenadante foi coletado para avaliação proteica. Os neutrófilos foram avaliados por um período menor (4h), pois essas células apresentam menor viabilidade e se destacam por liberação precoce dos mediadores envolvidos. Logo, foram analisados em 4h e receberam apenas uma aplicação de LED (após 2h de polarização) para avaliação dos mediadores

inflamatórios (Fujimake et al. 2013, Neely et al. 2014, Cerdeira et al. 2016, Ma et al. 2016, Yang et al. 2016).

A escolha dos produtos a serem avaliados para cada grupo foi baseada em evidências literárias que estudaram o perfil de expressão genica e proteica de cada tipo celular. Para avaliação dos linfócitos L1, foram avaliados dados referentes a IL-17 e IFN- γ , assim como, de IL-10 para linfócitos L2 (Filardy et al. 2010, Mesquita Júnior et al. 2010, Mayadas et al. 2014). Para os neutrófilos N1 foram avaliados IL-1 β e TNF α , e para neutrófilos N2, IL-10 (Arnardottir et al. 2012, Neely et al. 2014, Wang et al. 2014, Deniset & Kubes 2016, Ma et al. 2016, Yang et al. 2016). Para avaliação dos monócitos M1, foram analisados IL-1 β , IL-6 e TNF α , enquanto IL-10 será o produto de escolha para avaliação dos monócitos M2 (Filardy et al. 2010, Karlmark et al 2012, Ma et al. 2016).

Tabela 4 – Mediadores a serem avaliados por cada tipo celular por ELISA

Tipo Celular	Mediadores
Monócitos M1	IL-1 β , IL-6, TNF α
Monócitos M2	IL-10
Linfócitos L1	IL-17, IFN- γ
Linfócitos L2	IL-10
Neutrófilos N1	IL-1 β , TNF α
Neutrófilos N2	IL-10

4.9. Avaliação de Expressão Gênica

Após coleta dos sobrenadantes para dosagem das proteínas, os *pellets* celulares foram congelados para a avaliação quantitativa da expressão genica dos mediadores citados na Tabela 5.

O RNA dos linfócitos foi extraído a partir de *pellets* contendo $3,5 \times 10^6$ células que estavam nas placas onde os sobrenadantes foram coletados. Foi feita extração das amostras frescas, imediatamente após coleta. Para isso, os *pellets* foram lavados com PBS e centrifugados novamente à 453 G por 5 min, 20 °C. Com auxílio de uma pipeta, os sobrenadantes foram descartados, e foram adicionados 350 μ L de RLT + β -mercaptoetanol diretamente nos *pellets* celulares e realizada a lise das células com seringa descartável de 1 mL (Descarpack13X0, São Paulo - Brasil). Os lisados celulares foram armazenados no freezer -80 °C.

Para a coleta dos monócitos, as placas foram lavadas duas vezes com PBS, e em seguida foram adicionados 350µL de RLT + β-mercaptoetanol (Qiagen, Hilden-Alemanha) para coleta dos monócitos aderidos. Com uma pipeta volumétrica, as células foram homogeneizadas e transferidas para tubos de coleta de 1,5 mL. Em seguida, foi realizada lise celular utilizando seringa de 1 mL (S1MND – Descarpack, São Paulo SP). Para homogeneização e lise dos neutrófilos, 1mL de TRIzol® foi adicionado diretamente nos *pellets* celulares na densidade de 3×10^6 células, os lisados foram coletados e armazenados em freezer -80 °C.

4.9.1. Isolamento e Integridade de RNA

O RNA das amostras de linfócitos e monócitos foi extraído utilizando-se o kit RNEasy Micro kit (Qiagen, Hilden-Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e pureza das amostras foram determinadas com auxílio do equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) em comprimento de onda de 260 e 280nm.

O RNA dos neutrófilos foi extraído utilizando 1mL de TRIzol®, seguido de adição de 250 µL de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína), por meio de centrifugação à 453 G, 15 min, 4°C. Foi realizada a transferência da fase aquosa superior contendo o RNA total para um novo microtubo, onde foram adicionados 650 µL de isopropanol. Foi realizada centrifugação (453 G, 10 min, 4°C), o isopropanol foi descartado e 900µL de etanol foi adicionado. As amostras foram centrifugadas novamente e o etanol foi descartado para formação do precipitado de RNA total. O RNA total foi ressuspenso em água livre de RNase e a quantificação foi feita em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

4.9.2. Síntese do DNA complementar e qPCR

O DNA complementar utilizado para a reação de PCR foi obtido a partir da transcrição reversa de 25 ng de RNA de monócitos, 100 ng de RNA de linfócitos e 250 ng de RNA de neutrófilos, utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas com uso do reagente SYBR Green Kit Mastermix (Applied Biosystems, California, EUA) em termociclador (Applied Biosystems 7500, Foster City, California, EUA) utilizando

Oligonucleotídeos iniciadores (“primers forward e reverse”) específicos para os genes de interesse (Tabela 5). Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC e os materiais plásticos e vidraria utilizados receberam tratamento contra RNase, novos ou lavados com água livre de RNase e DNase.

Para normalização dos dados foram utilizados primers específicos de controle endógeno do tipo *Beta-actina Operon*. A identificação dos melhores genes endógenos é de fundamental importância para validação dos resultados obtidos na análise de RT-PCR. Na literatura os genes mais utilizados são GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e ACTB (actin beta) (De Jonge et al. 2007). Para este estudo ambos foram testados e foi observado que a *Beta-actina* apresentou melhores resultados para todas as amostras. Já foi visto que a FBM pode alterar de forma significativa o metabolismo das células e dessa forma, talvez interferir na expressão do gene GAPDH que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, importante para o metabolismo dos carboidratos (Zhang et al. 2003, Silveira et al. 2009, Peplow & Baxter 2013).

Após definição do gene constitutivo, as condições de ciclagem foram padronizadas de acordo com cada primer a ser utilizado (descrição na tabela 5). Seguida à amplificação, todas as amostras foram submetidas à análise estatística.

Na fase de comparação entre os dados dos grupos de monócitos, linfócitos e neutrófilos, unidades arbitrárias foram calculadas da seguinte forma:

O ponto inicial do ciclo (CT) do *real-time* RT-PCR foi avaliado em duplicata para cada amostra dos 03 diferentes pacientes. Os valores de CT correspondem ao número do ciclo do PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto do RT-PCR amplificado do gene alvo e são inversamente proporcionais ao conteúdo de mRNA da amostra. O valor da variação de CT (Δ CT) foi calculado subtraindo-se o valor de CT do gene de interesse do valor de CT do gene usado como referência (*β -actina Operon*). Para se reduzir as variações entre as amostras, todas elas foram normalizadas pela média da variação do valor de CT (Δ CT) dos grupos controle (sem nenhum tipo de ativação) originando um valor chamado de $\Delta\Delta$ CT. A expressão relativa de todos

os genes foi calculada utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ e é representada em unidades arbitrárias (Livak & Schmittgen 2001).

$$\text{Unidade Arbitrária} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

- $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{gene controle endógeno } \beta\text{-actina})$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{controle})$

CT: “threshold cycle”

Tabela 5 – Genes alvos utilizados para amplificação por q-RT-PCR

Gene	Primers 5' > 3'	Condições de Ciclagem
B-Actina Operon	F: AGGGTGTGATGGTGGGTATG R: TGCCGTGTTCAATGGGGTAC	400 nM 95 °C - 15 s 60° C - 1 min
IL-1β	F: AATCTGTACCTGTCCTGCGTGTT R: TGGGTAATTTTTGGGATCTACTCT	400 nM 95 °C - 5 s 60° C - 1 min
IL-6	F: TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC R: GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG	200 nM 95 °C - 5 s 62° C - 45 s
IL-10	F: GCCTAACATGCTTCGAGATC R: TGATGTCTGGGTCTTGGTTC	400 nM 95 °C - 15 s 60° C - 1 min
IL-17	F: TCCCTCTGTGATCTGGGAGG R: GGATCTCTTGCTGGATGGGG	200 nM 95 °C - 15 s 60° C - 1 min
TNFα	F: GCCCACGTTGTAGCCAATGTCAAA R: GTTGTCTTTTCAGCTTCAGGCCGTT	400 nM 95 °C - 15 s 60° C - 1 min
IFNγ	F: GTCGCCAGCAGCTAAAACAG R: ATTGCAGGCAGGACAACCAT	400 nM 95 °C - 15 s 60° C - 1 min
VEGFA	F: CTTGCCTTGCTGCTCTACCT R: AGCTGCGCTGATAGACATCC	400 nM 95 °C - 15 s 60° C - 1 min

4.10. Análise Estatística

Os dados de produção proteica e expressão gênica foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.01. Os valores de expressão gênica ou síntese proteica dos grupos controles (não polarizados) foram comparados com os grupos controles irradiados com LED e com os grupos polarizados para perfil pró ou anti-inflamatório. Da mesma forma, os grupos somente polarizados foram comparados com os grupos não polarizados, mas irradiados e com os grupos polarizados e irradiados com LED. Foram realizados os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para todas as variáveis seguidos de teste T com correção de Welch para os dados

paramétricos e Mann Whitney para os dados não paramétricos (comparação entre dois grupos). O intervalo de confiança foi ajustado para 95% ($\alpha=0,05$). Os resultados de absorvância obtidos foram transferidos para o software OriginPro (versão 2017 SR2, Massachusetts, EUA) para confecção dos gráficos, estando no eixo X o comprimento de onda (nm) e no eixo Y os valores da absorvância (em unidades arbitrárias - U.A). Foi calculada a média de absorção dos 03 pacientes e os dados foram normalizados para apresentação gráfica.

5. RESULTADOS

5.1. Espectros de Absorbância Óptica de Leucócitos Humanos

5.1.1 *Análise de Absorbância Óptica de Monócitos*

Nos resultados apresentados na figura 7, é possível observar que as culturas de monócitos são capazes de absorver luz desde o comprimento de onda 450 nm até 900 nm, e que todos os grupos avaliados se comportaram de forma semelhante, apresentando pico de absorção entre 520-570 nm. Todos os grupos apresentam uma boa absorbância no comprimento de onda ambar (590 nm) utilizado neste trabalho. Além disso, os monócitos polarizados para perfil M1 mostraram maior absorbância nas regiões do espectro entre 600-825nm do que os monócitos não polarizados (M0).

A irradiação com LED ambar praticamente não alterou o espectro de absorbância dos monócitos não polarizados (M0). Já os monócitos M1 irradiados com LED ambar passam a absorver menos luz na faixa entre 625 nm e 850 nm (o que incluiria as fontes vermelhas e infravermelhas próximas) em relação aos grupos somente polarizados M1. De forma semelhante, os monócitos M2 irradiados com LED também passam a absorver menos luz nos comprimentos de onda entre 600-725nm do que os monócitos M2 não irradiados, porém de forma mais discreta que os monócitos M1.

Na comparação de absorção entre M1 e M2 foi visto que os monócitos M1 absorvem mais luz nos comprimentos de onda vermelho e principalmente infravermelho em relação aos monócitos M2 (Figura 7).

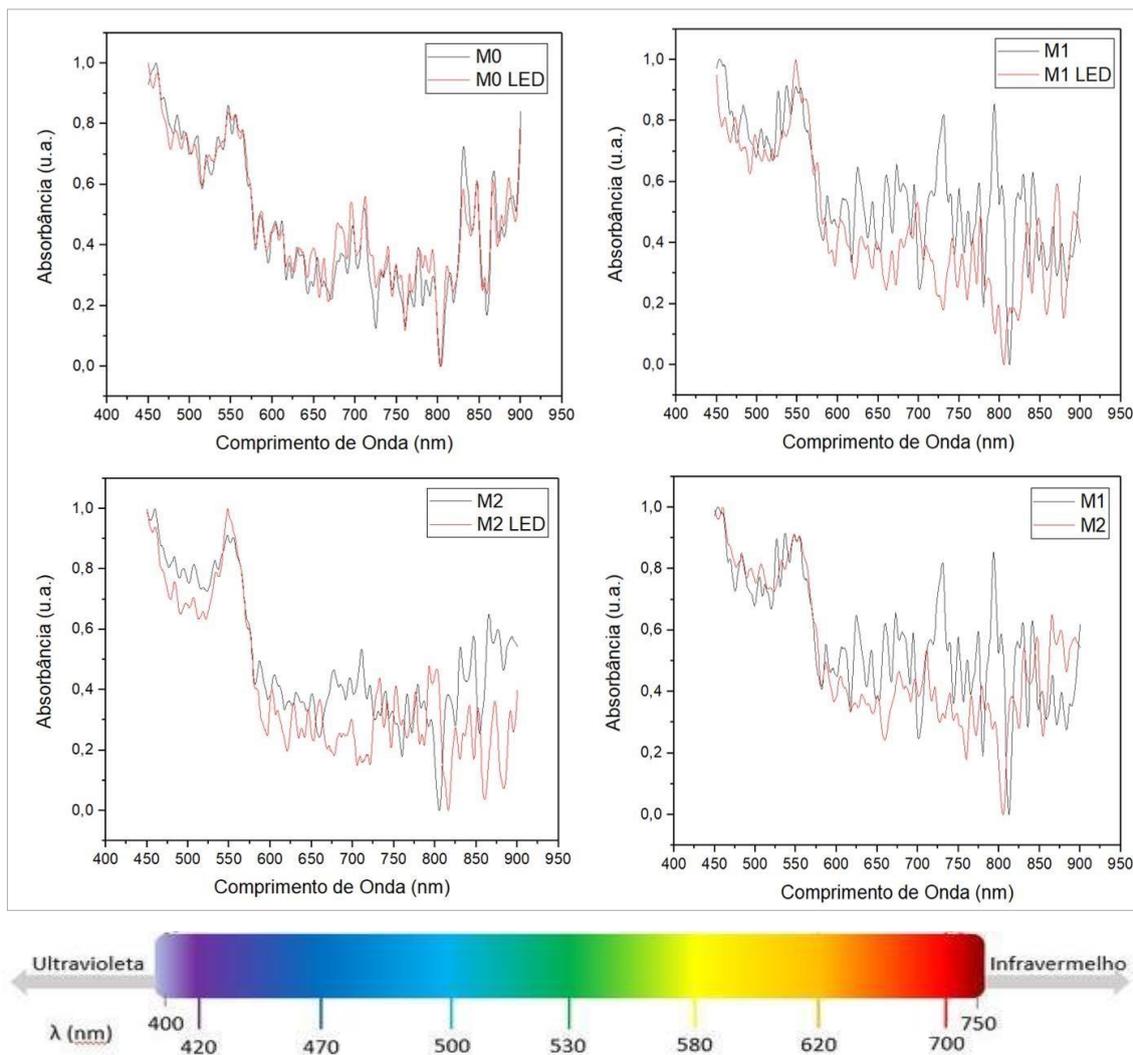


Figura 7: Absorbância óptica de monócitos: culturas celulares polarizadas ou não para perfil pró ou anti-inflamatório com LPS ou IL4+LPS, respectivamente, por um período de 2h. Após esse período, as culturas foram irradiadas com LED ambar de 590 nm (4J com 2 aplicações) e coletadas após 24h. Gráfico apresentado com a média da absorbância de 03 pacientes.

5.1.2. Análise de Absorbância Óptica de Linfócitos

Assim como os monócitos, os linfócitos (Figura 8) também foram capazes de absorver luz por todo o espectro avaliado (desde o comprimento de onda de 450 nm até 900 nm), sendo que se observou maiores absorbâncias no início (450-570nm) e no final do espectro avaliado (infravermelho 770-900nm). Todos os grupos apresentam uma boa absorbância no comprimento de onda ambar (590 nm) testado por este estudo.

Os linfócitos não polarizados (L0) apresentaram pico de absorção em comprimentos de onda acima 850 nm. A polarização tanto com LPS como com

LPS+IL-4 praticamente não alterou o espectro de absorbância dos linfócitos em comparação com o estado não polarizado.

Após irradiação com LED ambar os linfócitos L1 e L2 não demonstraram diferenças no padrão de absorbância. Já os linfócitos L0 irradiados com LED passaram a apresentar pico de absorção principalmente a partir de 700 nm, conforme a figura 8.

A absorção dos linfócitos L1 e L2 foi semelhante, embora em algumas regiões os linfócitos L1 tenham apresentado maior pico de absorção do que os linfócitos L2 (na luz âmbar em 550 nm e na luz infravermelha a partir de 750 nm).

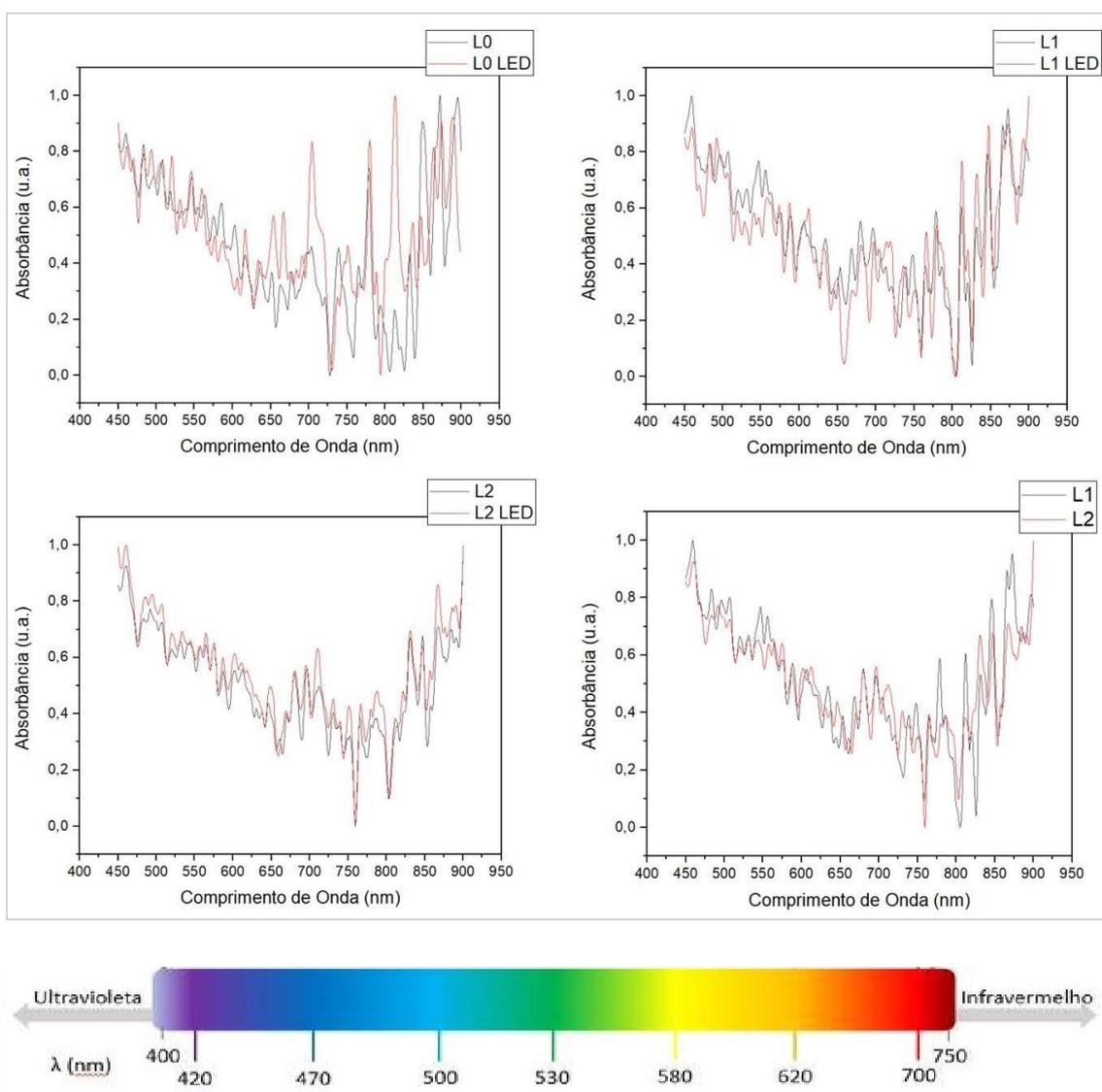


Figura 8: Absorbância óptica de linfócitos: culturas celulares polarizadas ou não para perfil pró ou anti-inflamatório com LPS ou IL4+LPS, respectivamente, por um período de 2h. Após esse período, as culturas foram irradiadas com LED ambar de 590 nm (4J com 2 aplicações) e coletadas após 24h. Gráfico apresentado com a média da absorbância de 03 pacientes.

5.1.3. Análise de Absorbância Óptica de Neutrófilos

Na avaliação de absorção de luz por neutrófilos (Figura 9), observa-se que as culturas de neutrófilos também são capazes de absorver luz por todo o espectro analisado (desde o comprimento de onda de 450 nm até 900 nm), sendo que o pico de absorção entre 520-570nm, sendo que eles absorvem no comprimento de onda avaliado aqui (ambar 590 nm).

As polarizações para perfil inflamatório ou anti-inflamatório e as irradiações com LED praticamente não alteraram o padrão de absorção de neutrófilos (figura 9). Na comparação de absorção entre N1 e N2 não foi observada diferença, ambos apresentaram pico entre 520-570 nm, sendo que o pico de neutrófilos N1, ainda foi mais evidente (Figura 9).

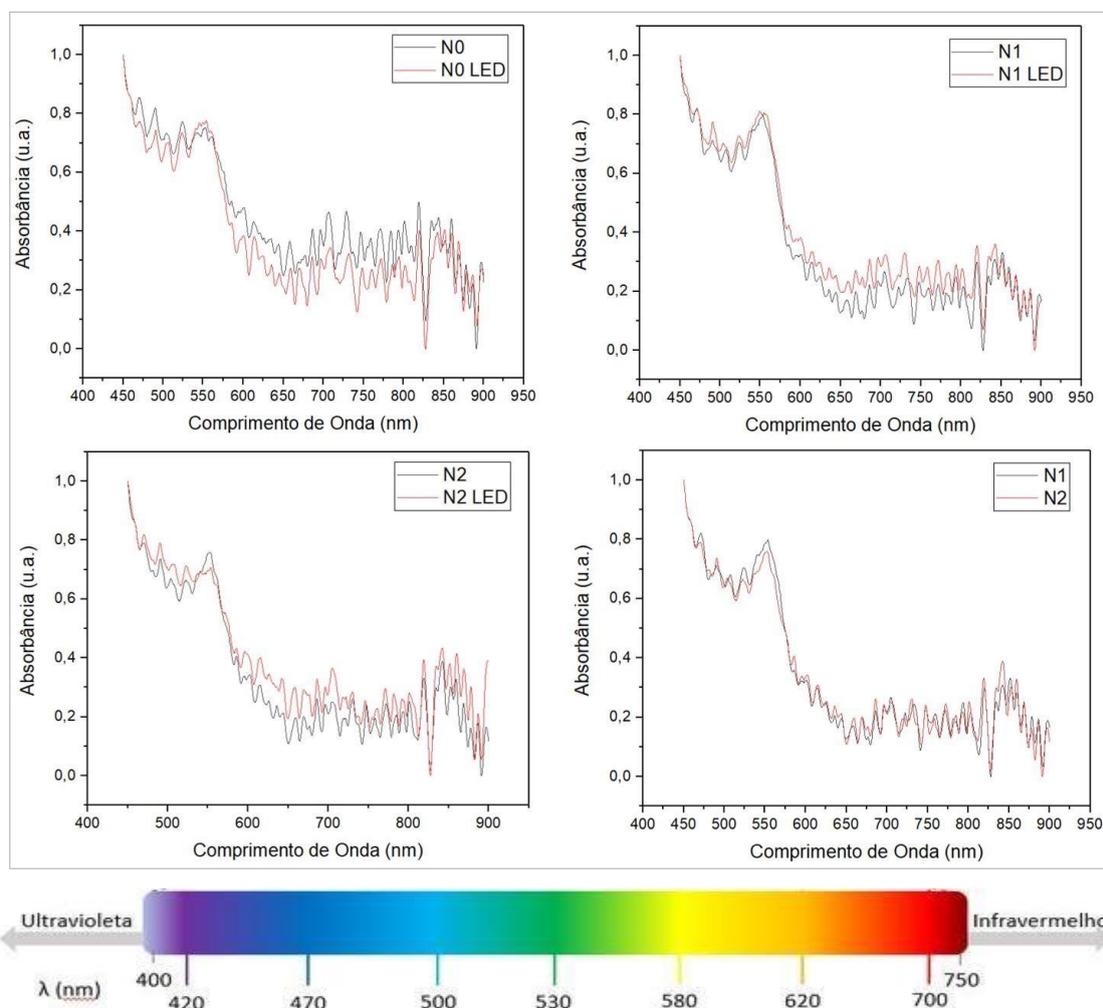


Figura 9: Absorbância óptica de neutrófilos: culturas celulares polarizadas ou não para perfil pró ou anti-inflamatório com LPS ou IL4+LPS, respectivamente, por um período de 2h. Após esse período, as culturas foram irradiadas com LED ambar de 590 nm (4J com uma aplicação) e coletadas após 4h. Gráfico apresentado com a média da absorbância de 03 pacientes.

5.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de Leucócitos Humanos

5.2.1. Monócitos Humanos

5.2.1.1. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-6

Na avaliação proteica, os monócitos polarizados com LPS (M1) por um período de 2 horas produziram uma quantidade maior da citocina IL-6 em relação aos monócitos não polarizados (M0) ou monócitos não polarizados e irradiados com LED (M0+LED); $p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente. O tratamento com LED ambar de 590 nm proporcionou uma redução significativa ($p < 0.001$) na produção de IL-6 nos grupos de monócitos polarizados para perfil pró-inflamatório M1 (tabela 6 e Figura 10). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os monócitos não polarizados (M0) e os monócitos não polarizados e irradiados (M0+LED) para essa análise.

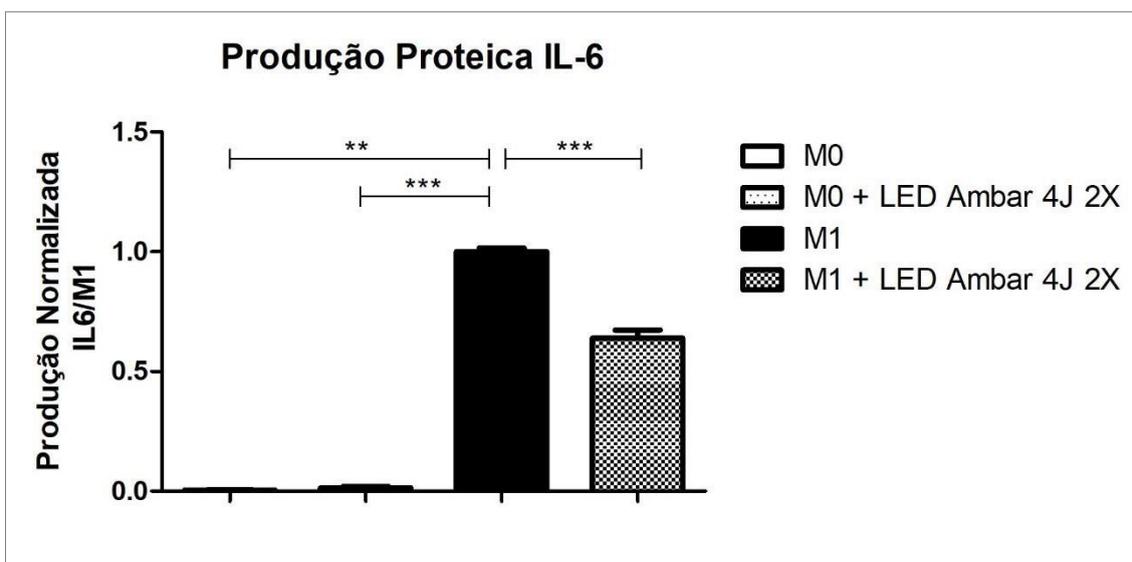


Figura 10. Produção proteica de IL-6, após 2 horas da polarização, normalizada pela produção do grupo M1 ($n=6$). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de monócitos (5×10^6) dos grupos M0 (não polarizados), M0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), M1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e M1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos M0 x M0+LED, M0 x M1, M0+LED x M1, M1 x M1+LED. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$.

Na avaliação de expressão gênica (Figura 11), os monócitos polarizados com LPS por 2h (M1) mostraram uma maior expressão do mRNA de *IL-6* em comparação com os monócitos não polarizados (M0) ou não polarizados e

irradiados com LED (M0+LED); $p < 0.05$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os monócitos não polarizados (M0) e os monócitos não polarizado e irradiados (M0+LED) para essa análise. Apesar de observar uma menor expressão do mRNA de *IL-6* em monócitos M1 irradiados com LED em relação aos monócitos M1 não irradiados, ainda não foi destacada uma diferença estatisticamente significativa (valores descritos na tabela 6).

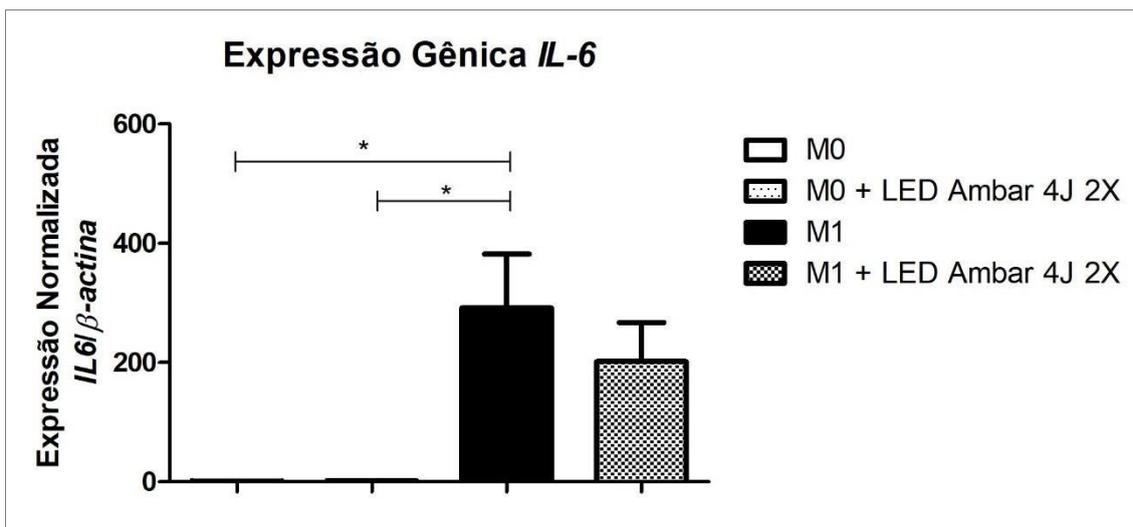


Figura 11. Expressão gênica de *IL-6*, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao controle endógeno β -actina. Avaliação realizada pelo método de qPCR em culturas de monócitos (5×10^6) dos grupos M0 (não polarizados), M0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), M1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e M1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos M0 x M0+LED, M0 x M1, M0+LED x M1, M1 x M1+LED. * $P < 0.05$.

Tabela 6: Descrição dos valores de expressão gênica e proteica de *IL-6* (média \pm desvio padrão) de monócitos dos grupos controle (M0), M0+LED e grupos polarizados M1 ou M1+LED.

Produção Proteica e Expressão Gênica de <i>IL-6</i> por Monócitos em 24 h		
Grupos	Produção Proteica	Expressão Gênica
	média (pg/mL) \pm desvio padrão	Média (u.a.) \pm desvio padrão
M0	640 \pm 993	1,06 \pm 0,38
M0+LED	849 \pm 672	1,59 \pm 0,45
M1	109873 \pm 61839	291 \pm 221
M1+LED	72119 \pm 41314	201 \pm 160

5.2.1.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-1 β

Na figura 12, é possível observar que a polarização de monócitos com 10 ng/mL de LPS (M1) gerou um aumento significativo na produção de IL-1 β em relação aos monócitos não polarizados (M0) ou monócitos não polarizados e irradiados com LED ($p < 0.01$). Os demais grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa na produção desta citocina.

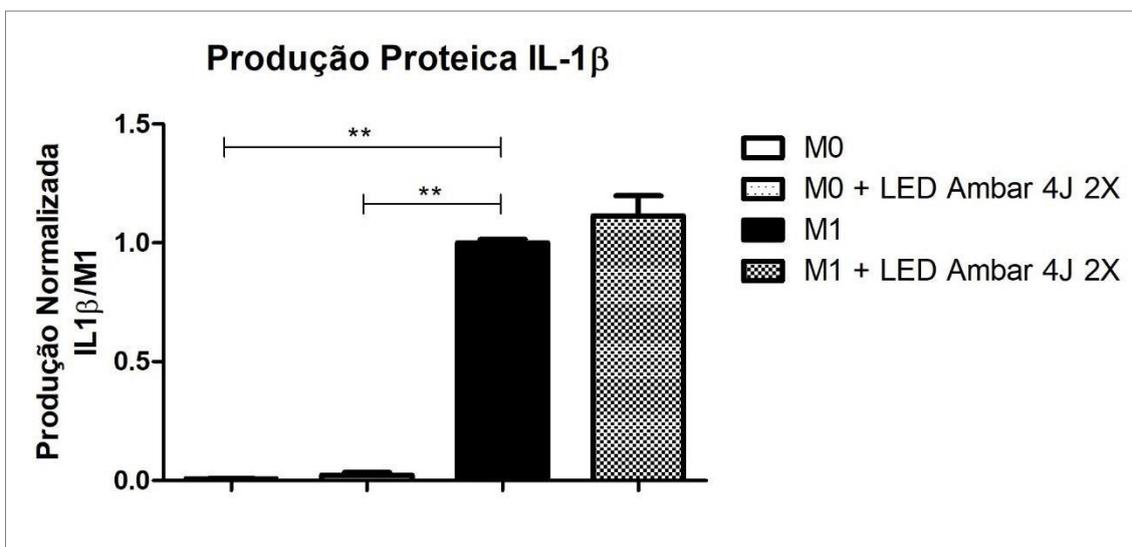


Figura 12. Produção proteica de IL-1 β , após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo M1 ($n=6$). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de monócitos (5×10^6) dos grupos M0 (não polarizados), M0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), M1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e M1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos M0 x M0+LED, M0 x M1, M0+LED x M1, M1 x M1+LED. ** $P < 0.01$.

Da mesma forma, o mRNA de *IL-1 β* foi muito mais expresso por monócitos polarizados com LPS (M1) por 2h em comparação com monócitos não polarizados (M0) ou não polarizados e irradiados com LED ($p < 0.05$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os monócitos não polarizados (M0) e os monócitos não polarizados e irradiados (M0+LED) para essa análise. Assim como, os monócitos polarizados para perfil pró-inflamatório (M1) tratados com LED não mostraram diferença estatisticamente na expressão do mRNA de *IL-1 β* em relação aos monócitos apenas polarizados (Figura 13).

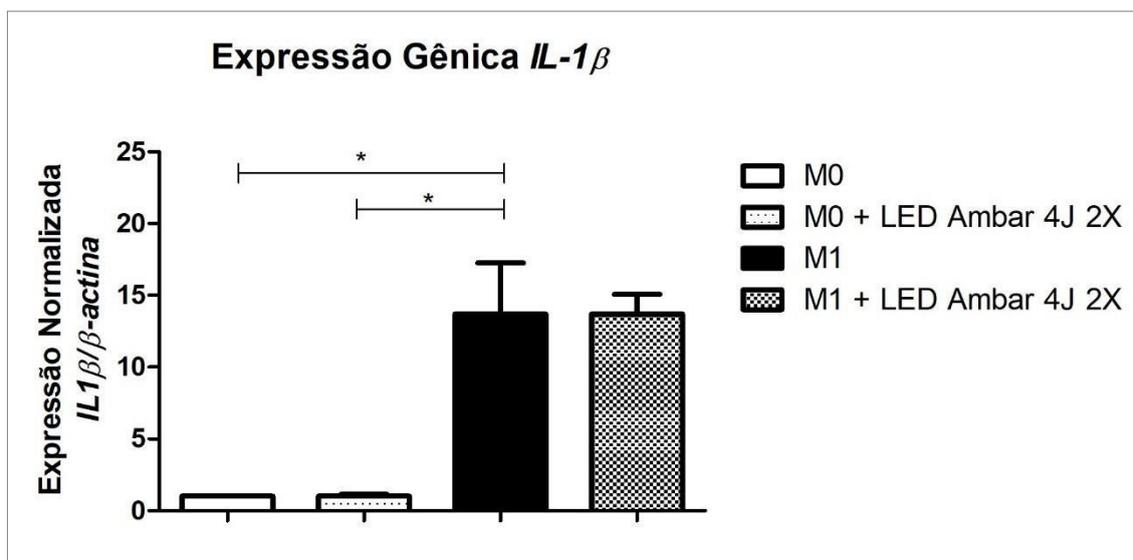


Figura 13. Expressão gênica de *IL-1β* normalizada em relação ao controle endógeno *β-actina* após 2 horas da polarização. Avaliação realizada pelo método de qPCR em culturas de monócitos (5×10^6) dos grupos M0 (não polarizados), M0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), M1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e M1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos M0 x M0+LED, M0 x M1, M0+LED x M1, M1 x M1+LED. * $P < 0.05$.

Tabela 7: Descrição dos valores de expressão gênica e proteica de IL-1β (média ± desvio padrão) de monócitos dos grupos controle (M0), M0+LED e grupos polarizados M1 ou M1+LED

Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-1β por Monócitos em 24 h		
Grupos	Produção Proteica média (pg/mL) ± desvio padrão	Expressão Gênica Média (u.a.) ± desvio padrão
M0	107±60	1,00±0,06
M0+LED	221±201	1,02±0,32
M1	14293±5217	13,70±8,71
M1+LED	16763±8022	13,70±3,35

5.2.1.3. Produção Proteica e Expressão Gênica de TNFα

Os monócitos polarizados com LPS (M1) apresentaram uma maior produção da citocina TNFα em relação aos monócitos não polarizados (M0) ou monócitos não polarizados e irradiados (M0+LED); $p < 0.001$. Em contrapartida, não houve diferença estatisticamente significante na produção de TNFα entre os grupos M0 e M0+LED. Já os monócitos polarizados para perfil pró-inflamatório

(M1) tratados com LED mostraram uma produção menor de $TNF\alpha$ ($p < 0.01$) em relação aos monócitos apenas polarizados M1 (Figura 14).

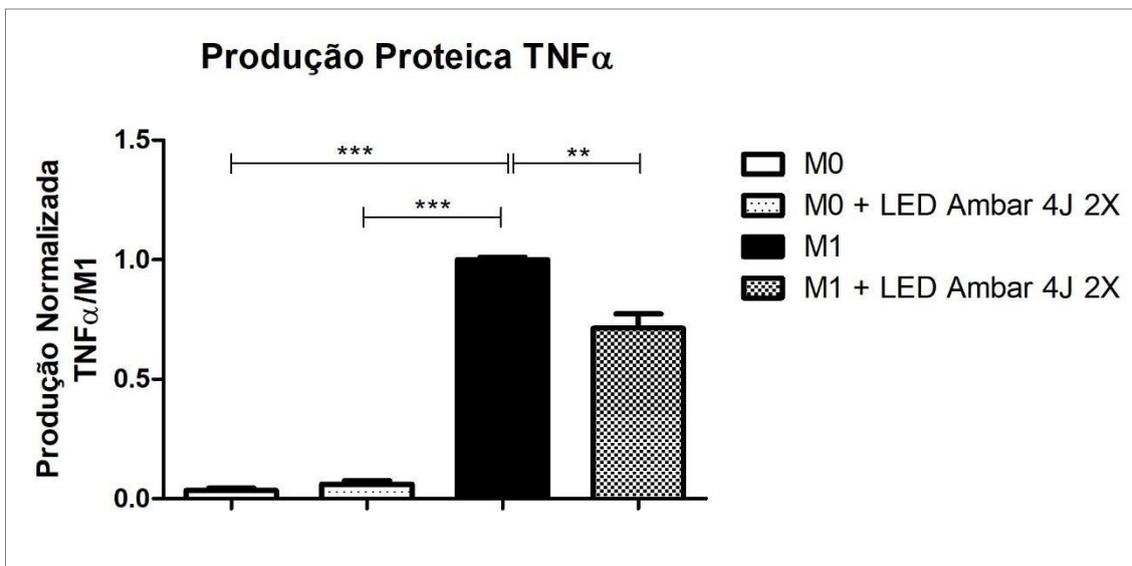


Figura 14. Produção proteica de $TNF\alpha$, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo M1 ($n=6$). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de monócitos (5×10^6) dos grupos M0 (não polarizados), M0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), M1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e M1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos M0 x M0+LED, M0 x M1, M0+LED x M1, M1 x M1+LED. ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$.

Embora tenha sido realizada análise de expressão do mRNA de $TNF\alpha$ pelos controles positivos, a expressão deste mediador não foi detectada pelos monócitos nos diferentes grupos experimentais (M0, M0+LED, M1 ou M1+LED) no período de avaliação em questão de 24h.

Tabela 8: Descrição dos valores de produção proteica de $TNF\alpha$ (média \pm desvio padrão) de monócitos dos grupos controle (M0), M0+LED e grupos polarizados M1 ou M1+LED

Produção Proteica de $TNF\alpha$ por Monócitos em 24 h	
Grupos	média (pg/mL) \pm desvio padrão
M0	41 \pm 42
M0+LED	53 \pm 31
M1	1024 \pm 438
M1+LED	723 \pm 300

5.2.1.4. Produção Proteica e Expressão Gênica IL-10

Os resultados mostraram que os monócitos polarizados para perfil anti-inflamatório M2 (LPS + IL-4 10 ng/mL) mostraram uma maior produção da citocina IL-10 em relação aos monócitos não polarizados (M0) ou monócitos não polarizados e irradiados com LED (M0+LED); $p < 0.001$. Mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os monócitos não polarizados (M0) e os monócitos não polarizados e irradiados (M0+LED). O tratamento com LED ambar de 590 nm proporcionou uma redução significativa ($p < 0.001$) na produção de IL-10 nos grupos de monócitos polarizados para perfil anti-inflamatório M2 (Figura 15).

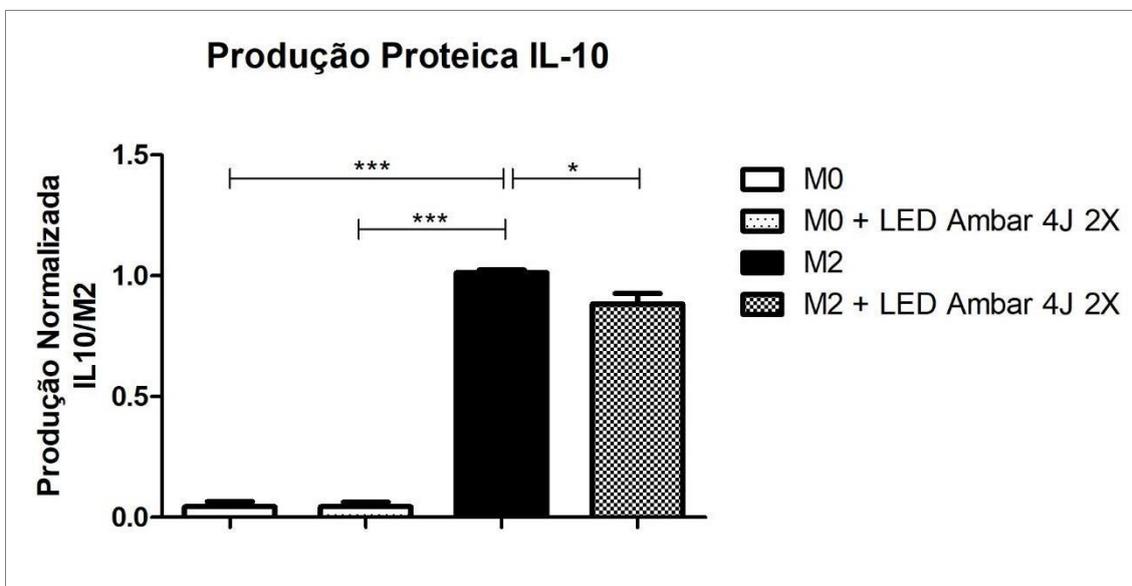


Figura 15. Produção proteica de IL-10, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo M2 ($n=6$). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de monócitos (5×10^6) dos grupos M0 (não polarizados), M0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), M2 (polarizados com LPS +IL-4 10ng/mL) e M2+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos M0 x M0+LED, M0 x M1, M0+LED x M1, M1 x M1+LED. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$.

Embora tenha sido realizada análise de expressão do mRNA de *IL-10* pelos controles positivos, a expressão deste mediador não foi detectada pelos monócitos nos diferentes grupos experimentais (M0, M0+LED, M2 ou M2+LED) no período de avaliação de 24h.

Tabela 9: Descrição dos valores de produção proteica de IL-10 (média \pm desvio padrão) de monócitos dos grupos controle (M0), M0+LED e grupos polarizados M2 ou M2+LED

Produção Proteica de IL-10 por Monócitos em 24 h	
Grupos	média (pg/mL) \pm desvio padrão
M0	8,37 \pm 8,37
M0+LED	8,23 \pm 8,08
M2	144 \pm 99
M2+LED	132 \pm 94

5.2.2. Linfócitos Humanos

5.2.2.1. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-17

Na dosagem da proteína IL-17, foi observado que os linfócitos polarizados com LPS por 2 horas (L1) não apresentaram diferença estatisticamente significativa na produção dessa citocina em relação aos linfócitos não polarizados (L0) ou não polarizados e irradiados com LED (L0+LED). Também não houve diferença entre os grupos L0 e L0+LED. Por outro lado, os linfócitos polarizados com LPS (L1) que receberam irradiação com LED ambar produziram muito mais IL-17 ($p < 0.05$) que os linfócitos apenas polarizados L1 (Figura 16).

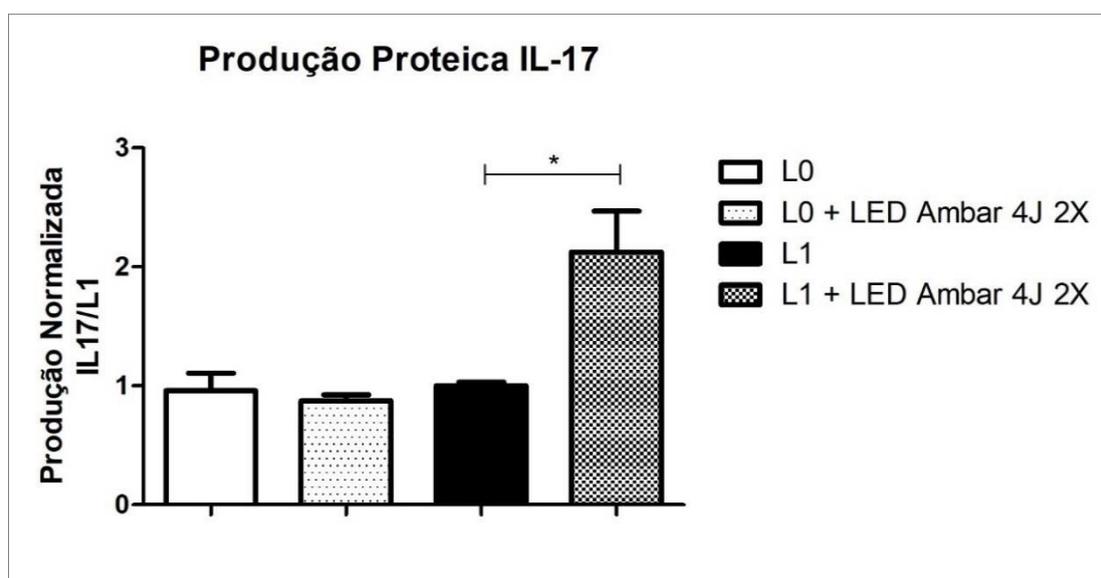


Figura 16. Produção proteica de IL-17, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo L1 ($n=6$). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de linfócitos ($3,5 \times 10^6$) dos grupos L0 (não polarizados), L0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), L1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e L1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos L0 x L0+LED, L0 x L1, L0+LED x L1, L1 x L1+LED. * $P < 0.05$.

Embora os valores de expressão do mRNA de *IL-17* por linfócitos polarizados L1 tenha sido maior que os valores expressos por linfócitos não polarizados (L0) ou não polarizados e irradiados (L0+LED), não houve diferença estatisticamente significativa (tabela 10). Assim como, não houve diferença significativa na expressão deste mediador entre os grupos de linfócitos não polarizados (L0) e os não polarizados e irradiados com LED ou entre os linfócitos polarizados L1 e os grupos L1 irradiados com LED (Tabela 10), Figura 17.

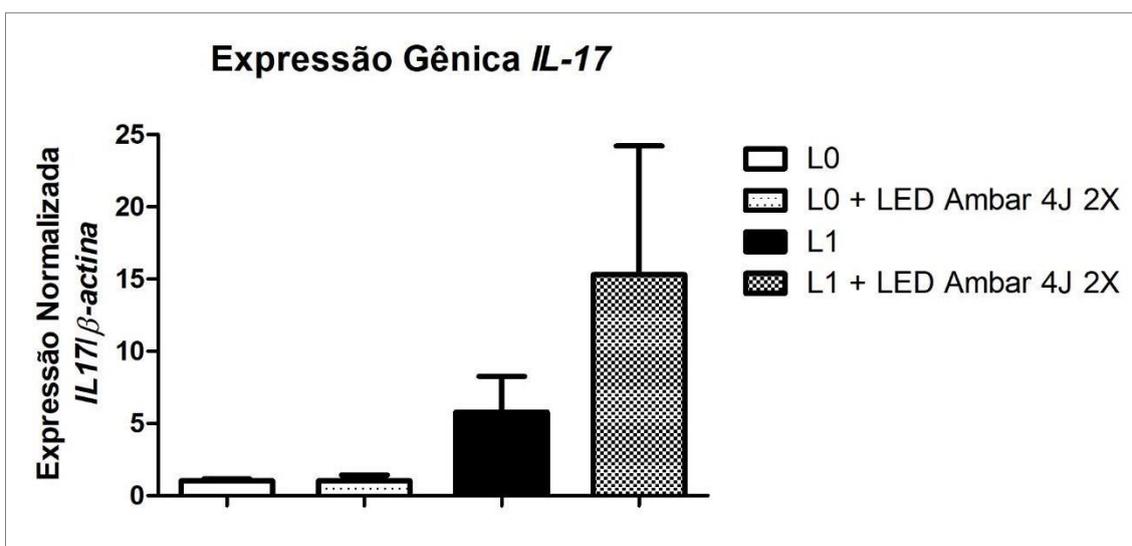


Figura 17. Expressão gênica de *IL-17*, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao controle endógeno *β-actina*. Avaliação realizada pelo método de qPCR em culturas de linfócitos ($3,5 \times 10^6$) dos grupos L0 (não polarizados), L0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), L1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e L1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos L0 x L0+LED, L0 x L1, L0+LED x L1, L1 x L1+LED. * $P < 0.05$.

Tabela 10: Descrição dos valores de expressão gênica e proteica de *IL-17* (média ± desvio padrão) de linfócitos dos grupos controle (L0), L0+LED e grupos polarizados L1 ou L1+LED

Produção Proteica e Expressão Gênica de <i>IL-17</i> por Linfócitos em 24 h		
Grupos	Produção Proteica	Expressão Gênica
	média (pg/mL) ± desvio padrão	média (u.a.) ± desvio padrão
L0	2,34±0,83	1,03±0,29
L0+LED	2,14±0,30	1,02±1,01
L1	2,46±0,38	5,81±6,03
L1+LED	5,11±1,81	15,31±21,81

5.2.2.2 Produção Proteica e Expressão Gênica de *IFN γ*

Os linfócitos humanos polarizados com LPS (L1) apresentaram maior produção da citocina *IFN γ* em relação aos linfócitos não polarizados (L0) ou não polarizados e irradiados com LED (L0+LED); $p < 0.01$. Os demais grupos não mostraram diferença estatística significativa na avaliação deste mediador (Figura 18).

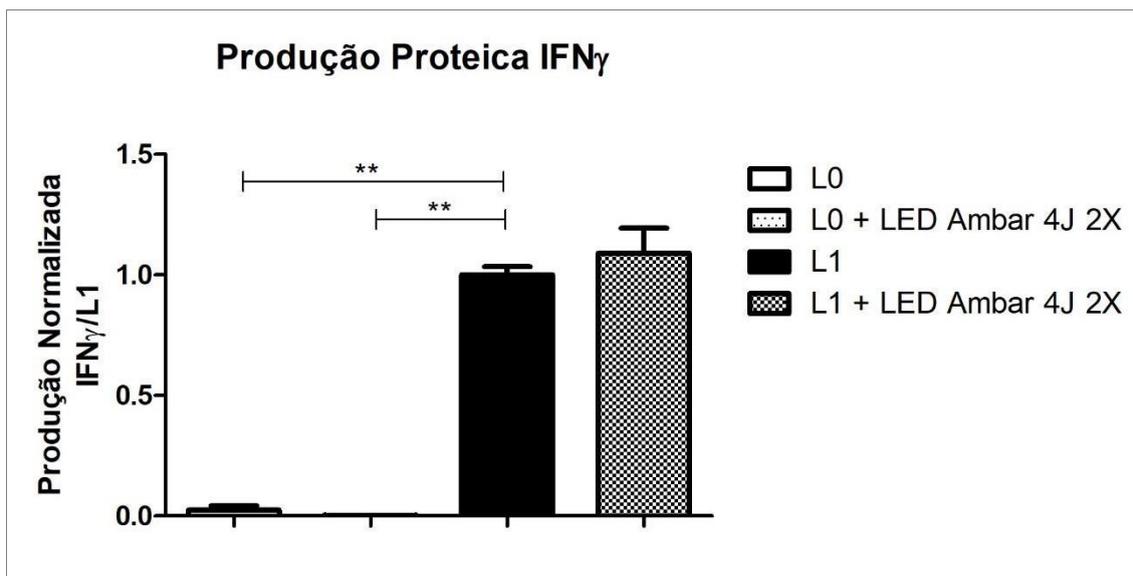


Figura 18. Produção proteica de *IFN γ* , após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo L1 (n=6). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de linfócitos ($3,5 \times 10^6$) dos grupos L0 (não polarizados), L0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), L1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e L1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos L0 x L0+LED, L0 x L1, L0+LED x L1, L1 x L1+LED. ** $P < 0.01$.

No período avaliado de 24 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na expressão do mRNA de *IFN γ* entre os grupos de linfócitos polarizados com LPS (L1) e linfócitos não polarizados (L0) ou não polarizados e irradiados (L0+LED), mesmo observando maior valor de expressão pelo grupo L1 em relação aos demais (tabela 11). Também não foi observada diferença estatística significativa na expressão de mRNA de *IFN γ* entre linfócitos L1 tratados com LED ambar comparados aos linfócitos apenas polarizados L1 (Figura 19).

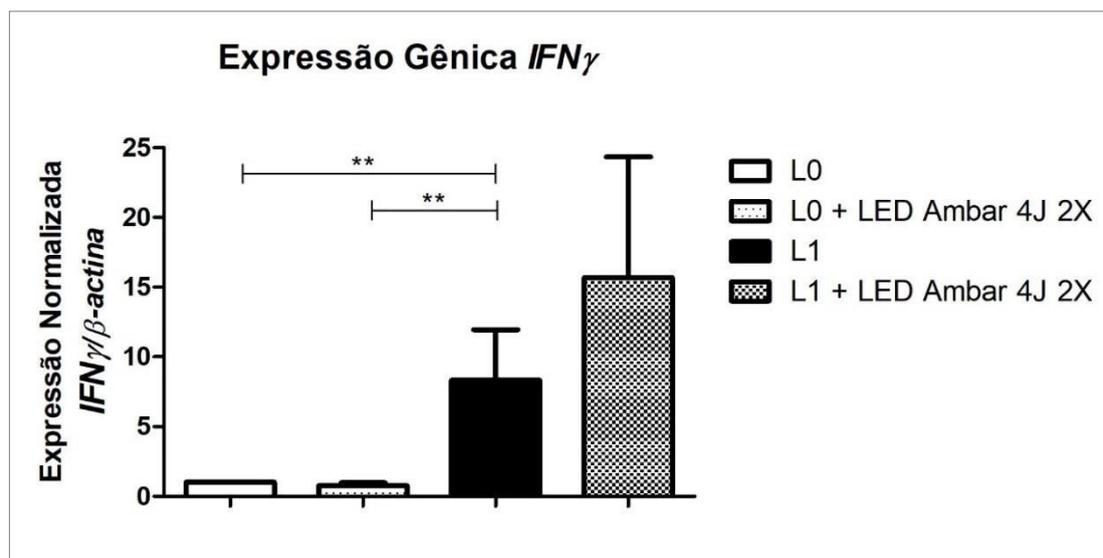


Figura 19. Expressão gênica de *IFN γ* , após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao controle endógeno *β -actina*. Avaliação realizada pelo método de qPCR em culturas de linfócitos ($3,5 \times 10^6$) dos grupos L0 (não polarizados), L0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), L1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e L1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos L0 x L0+LED, L0 x L1, L0+LED x L1, L1 x L1+LED. ** $P < 0.01$.

Tabela 11: Descrição dos valores de expressão gênica e proteica de *IFN γ* (média \pm desvio padrão) de linfócitos dos grupos controle (L0), L0+LED e grupos polarizados L1 ou L1+LED

Produção Proteica e Expressão Gênica de <i>IFNγ</i> por Linfócitos em 24 h		
Grupos	Produção Proteica média (pg/mL) \pm desvio padrão	Expressão Gênica média (u.a.) \pm desvio padrão
L0	6,17 \pm 7,25	1,00 \pm 0,07
L0+LED	1,77 \pm 3,12	0,76 \pm 0,52
L1	324 \pm 442	8,32 \pm 8,89
L1+LED	280 \pm 368	15,67 \pm 21,24

5.2.2.3. Produção Proteica e Expressão Gênica de *IL-10*

Na análise de perfil de linfócitos polarizados com LPS+IL4 (10 ng/mL), foi visto que os grupos polarizados para perfil L2 mostraram uma maior produção da citocina *IL-10* em relação aos linfócitos não polarizados (L0) ou não polarizados e irradiados com LED (L0+LED); $p < 0.01$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os linfócitos não polarizados (L0) e os linfócitos não polarizados e irradiados (L0+LED) para essa análise. Por outro

lado, o tratamento com LED ambar de 590 nm proporcionou uma redução significativa ($p < 0.05$) na produção de IL-10 nos grupos de linfócitos polarizados para perfil anti-inflamatório L2 (Figura 20).

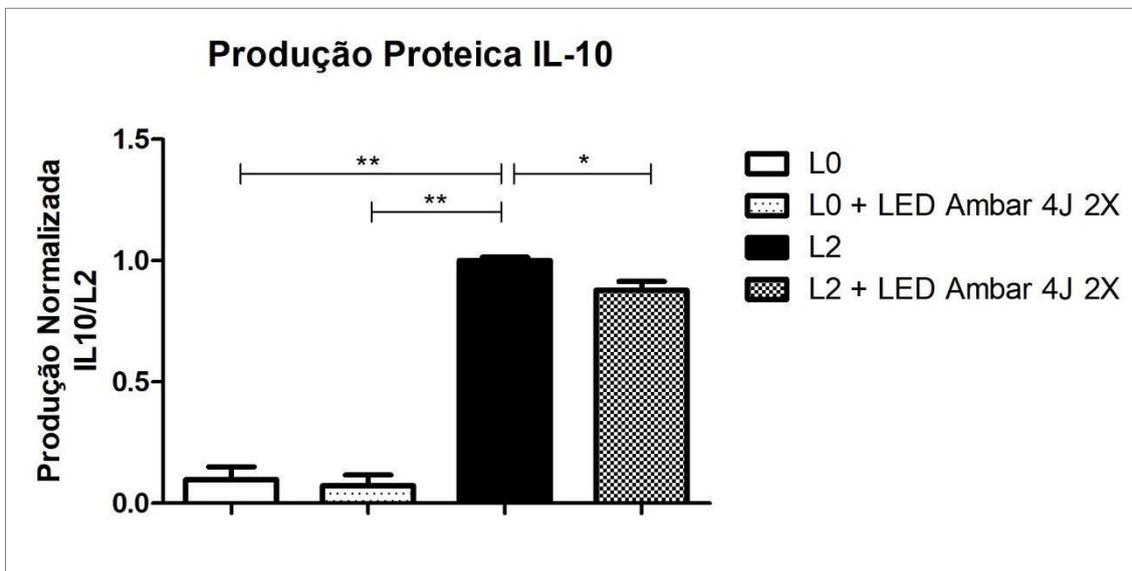


Figura 20. Produção proteica de IL-10, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo L2 ($n=6$). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de linfócitos ($3,5 \times 10^6$) dos grupos L0 (não polarizados), L0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), L2 (polarizados com LPS+IL-4 10ng/mL) e L2+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 24h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos L0 x L0+LED, L0 x L1, L0+LED x L1, L1 x L1+LED. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$.

Embora tenha sido realizada análise de expressão do mRNA de *IL-10* pelos controles positivos, a expressão deste mediador não foi detectada pelos linfócitos nos diferentes grupos experimentais (L0, L0+LED, L2 ou L2+LED) no período de avaliação de 24h.

Tabela 12: Descrição dos valores de produção proteica de IL-10 (média \pm desvio padrão) de linfócitos dos grupos controle (L0), L0+LED e grupos polarizados L2 ou L2+LED

Produção Proteica de IL-10 por Linfócitos em 24 h	
Grupos	média (pg/mL) \pm desvio padrão
L0	5,96 \pm 6,16
L0+LED	4,18 \pm 5,29
L2	166 \pm 129
L2+LED	152 \pm 131

5.2.3. Neutrófilos Humanos

5.2.3.1. Produção Proteica e Expressão Gênica de *IL-1 β*

Na figura 21, é possível observar que a polarização de neutrófilos com 10 ng/mL de LPS (N1) ocasionou um aumento significativo na produção de *IL-1 β* ($p < 0.05$) comparando com neutrófilos não polarizados, mas que receberam irradiação com LED (N0+LED). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente na produção desse mediador entre os grupos de neutrófilos polarizados (N1) e não polarizados (N0) ou entre os grupos não polarizados (N0) e N0+LED. Adicionalmente, não foi observada diferença estatística entre os grupos polarizados com LPS (N1) e os grupos polarizados e irradiados com LED (N1+LED).

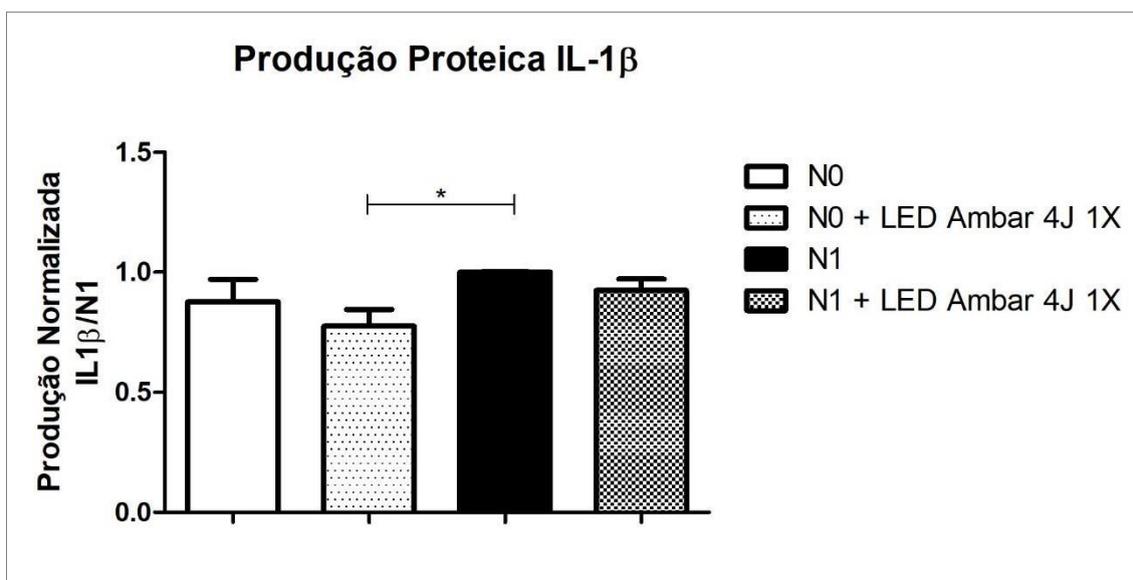


Figura 21. Produção proteica de *IL-1 β* , após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo N1 (n=6). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de neutrófilos (3×10^6) dos grupos N0 (não polarizados), N0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), N1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e N1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 4h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos N0 x N0+LED, N0 x N1, N0+LED x N1, N1 x N1+LED. * $P < 0.05$.

Avaliando a expressão do mRNA de *IL-1 β* , não foi possível observar nenhuma diferença estatística entre os grupos de neutrófilos N0 (não polarizados), N0+LED (polarizados e irradiados com LED), N1 (polarizados com

LPS) e N1+LED (polarizados e irradiados), embora a média de expressão de N1 tenha sido maior que a média dos demais grupos (Tabela 13 e Figura 22).

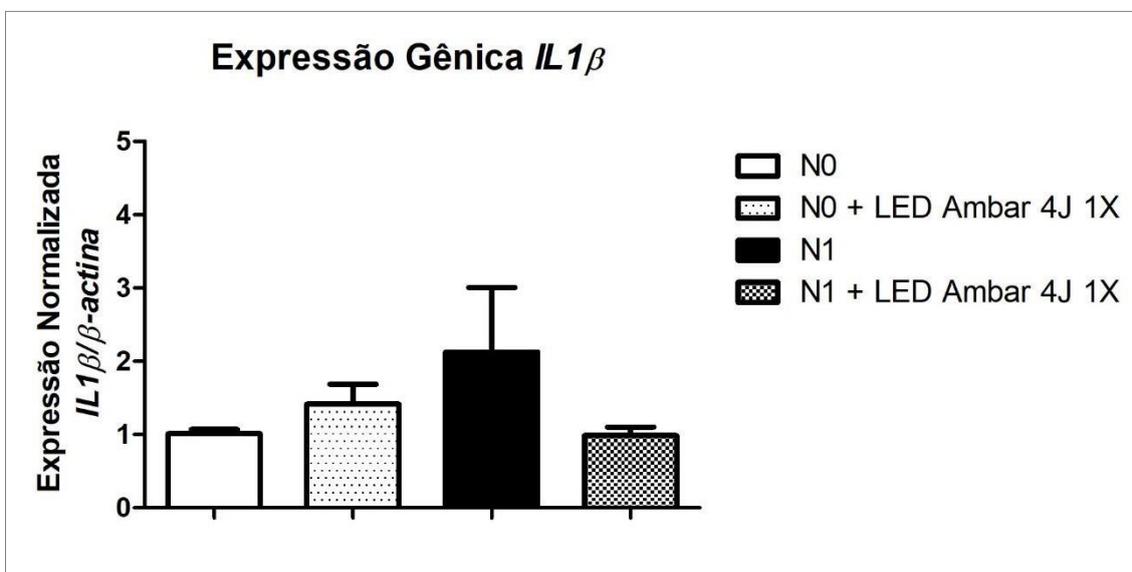


Figura 22. Expressão gênica de $IL-1\beta$, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao controle endógeno $\beta\text{-actina}$. Avaliação realizada pelo método de qPCR em culturas de neutrófilos (3×10^6) dos grupos N0 (não polarizados), N0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), N1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e N1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 4h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos N0 x N0+LED, N0 x N1, N0+LED x N1, N1 x N1+LED.

Tabela 13: Descrição dos valores de expressão gênica e proteica de $IL-1\beta$ (média \pm desvio padrão) de neutrófilos dos grupos controle (N0), N0+LED e grupos polarizados N1 ou N1+LED

Produção Proteica e Expressão Gênica de $IL-1\beta$ por Neutrófilos em 24 h		
Grupos	Produção Proteica	Expressão Gênica
	média (pg/mL) \pm desvio padrão	média (u.a.) \pm desvio padrão
N0	321 \pm 137	1,01 \pm 0,14
N0+LED	284 \pm 117	1,41 \pm 0,66
N1	353 \pm 81	2,13 \pm 2,16
N1+LED	328 \pm 86	0,99 \pm 0,29

5.2.3.2. Produção Proteica e Expressão Gênica de $TNF\alpha$

Os neutrófilos polarizados com LPS (N1) por um período de 2h, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na síntese da proteína

TNF α comparando com os neutrófilos que não foram polarizados (N0) ou que não foram polarizados, mas foram irradiados (N0+LED). Similarmente, os neutrófilos não polarizados (N0) também não mostraram diferença nessa produção em relação aos neutrófilos N0 irradiados com LED. Entretanto, os neutrófilos N1 tratados com LED mostraram uma menor produção dessa citocina comparados com os neutrófilos apenas induzidos para perfil pró-inflamatório (N1), $P < 0.05$ (Figura 23).

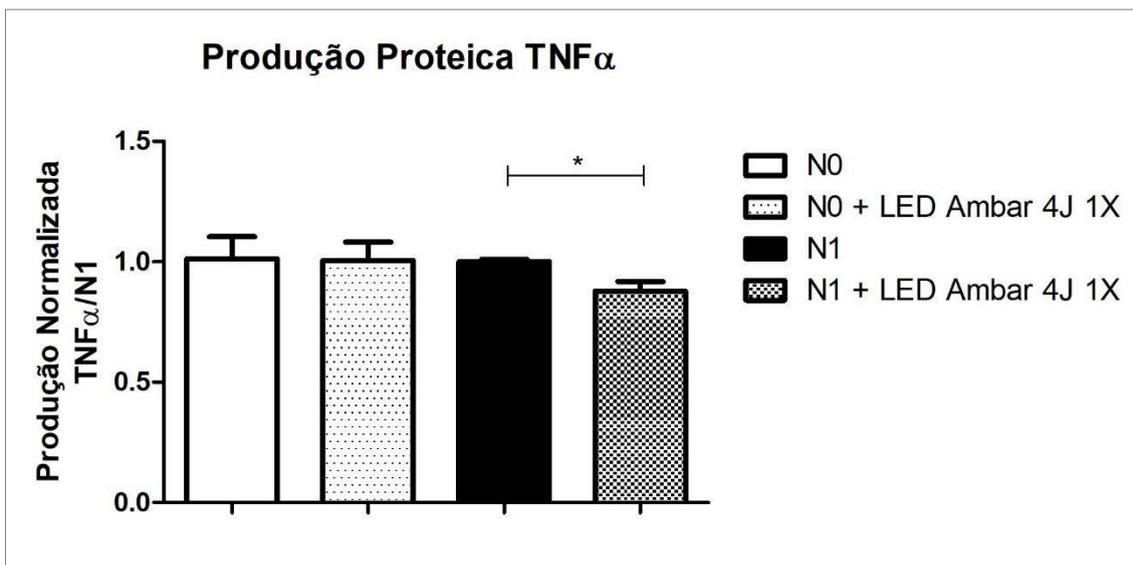


Figura 23. Produção proteica de TNF α , após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo N1 (n=6). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de neutrófilos (3×10^6) dos grupos N0 (não polarizados), N0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), N1 (polarizados com LPS 10ng/mL) e N1+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 4h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos N0 x N0+LED, N0 x N1, N0+LED x N1, N1 x N1+LED. * $P < 0.05$.

Embora tenha sido realizada análise de expressão do mRNA de TNF α pelos controles positivos, a expressão deste mediador não foi detectada pelos neutrófilos nos diferentes grupos experimentais (N0, N0+LED, N1 ou N1+LED) no período de avaliação de 4 horas.

Tabela 14: Descrição dos valores de produção proteica de TNF α (média \pm desvio padrão) de neutrófilos dos grupos controle (N0), N0+LED e grupos polarizados N1 ou N1+LED

Produção Proteica de TNF α por Neutrófilos em 24 h	
Grupos	média (pg/mL) \pm desvio padrão
N0	102 \pm 30
N0+LED	103 \pm 32
N1	104 \pm 31
N1+LED	91 \pm 29

5.2.3.3. Produção Proteica e Expressão Gênica de IL-10

Na dosagem da citocina anti-inflamatória IL-10, foi observado que os grupos de neutrófilos polarizados com IL4+LPS (N2) apresentaram um valor de média de produção mais elevado que os neutrófilos não polarizados (N0) ou não polarizados irradiados com LED, porém, não houve diferença estatisticamente significante (Tabela 15). Além disso, apesar dos neutrófilos (N2) polarizados e tratados com LED apresentarem maior produção dessa citocina, também não foi observada diferença estatisticamente significante como observado na figura 24.

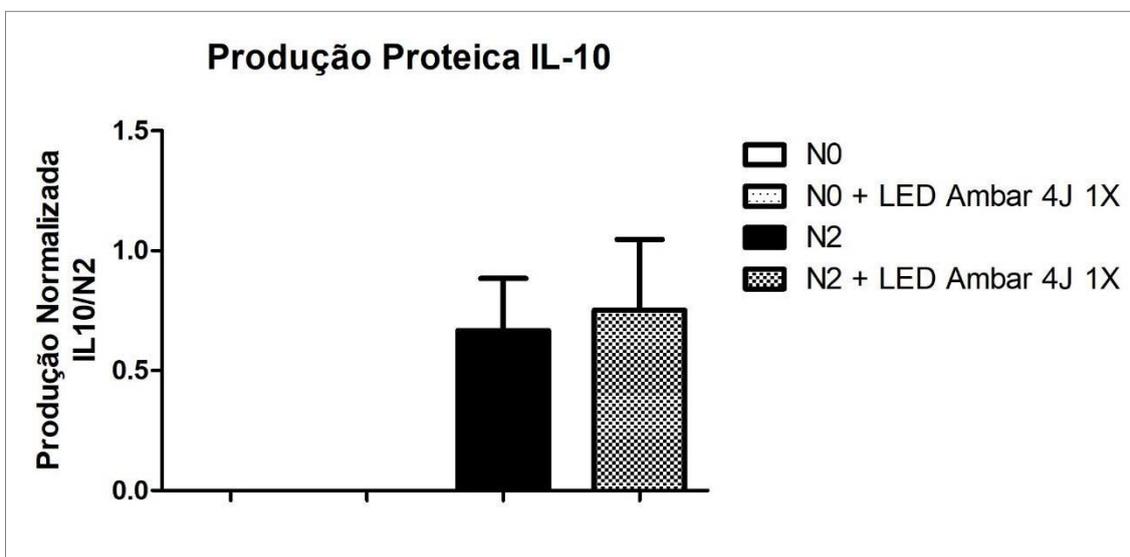


Figura 24. Produção proteica de IL-10, após 2 horas da polarização, normalizada em relação ao grupo N2 (n=6). Avaliação realizada pelo método de ELISA em culturas de neutrófilos (3×10^6) dos grupos N0 (não polarizados), N0+LED (não polarizados, mas irradiados com LED ambar 590 nm), N2 (polarizados com LPS+IL-4 10ng/mL) e N2+LED (polarizados e irradiados). Coleta após 4h. Dados de 3 pacientes com amostras plaqueadas em duplicata. Barras representam médias e desvio padrão. Foi feita a comparação entre os grupos N0 x N0+LED, N0 x N1, N0+LED x N1, N1 x N1+LED.

Embora tenha sido realizada análise de expressão de mRNA das citocinas *IL-10* e *VEGF* pelos controles positivos, a expressão destes mediadores não foi detectada pelos neutrófilos nos diferentes grupos experimentais (N0, N0+LED, N2 ou N2+LED) no período de avaliação de 4 horas.

Tabela 15: Descrição dos valores de produção proteica de IL-10 (média \pm desvio padrão) de neutrófilos dos grupos controle (N0), N0+LED e grupos polarizados N2 ou N2+LED

Produção Proteica de IL-10 por Neutrófilos em 24 h	
Grupos	média (pg/mL) \pm desvio padrão
<i>N0</i>	0,00 \pm 0,00
<i>N0+LED</i>	0,01 \pm 0,04
<i>N2</i>	0,99 \pm 0,79
<i>N2+LED</i>	1,10 \pm 1,03

5.3. Síntese dos resultados de expressão gênica e proteica

Os resultados obtidos nas avaliações de expressão gênica e proteica de monócitos, linfócitos e neutrófilos polarizados (ou não polarizados) para perfil pró ou anti-inflamatório irradiados com LED (ambar de 590 nm) estão descritos resumidamente nos quadros 01 e 02 a seguir. Os grupos controles M0; L0 ou N0 foram comparados com os grupos controles irradiados com LED e também com os grupos polarizados para perfil pró ou anti-inflamatório (M1; L1; N1 ou M2; L2 ou M2). Os grupos controles irradiados ainda foram comparados com os grupos polarizados e os grupos polarizados foram comparados com os grupos polarizados e irradiados.

Quadro 01: Síntese de expressão gênica e proteica de monócitos, linfócitos e neutrófilos polarizados para perfil pró-inflamatório irradiados com LED ambar de 590 nm.

Grupo	Citocina	Perfil Pró-inflamatório			Polarizado X Polarizado+LED
		Controle X Controle+LED	Controle X polarizado	Controle+LED X Polarizado	
Monócitos (M)	IL-6	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ↑ Proteína: ↑	mRNA: ↑ Proteína: ↑	mRNA: ns Proteína: ↓
	IL-1 β	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ↑ Proteína: ↑	mRNA: ↑ Proteína: ↑	mRNA: ns Proteína: ns
	TNF α	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ↑	mRNA: ne Proteína: ↑	mRNA: ne Proteína: ↓
Linfócitos (L)	IL-17	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ns Proteína: ↑
	IFN γ	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ns Proteína: ↑	mRNA: ns Proteína: ↑	mRNA: ns Proteína: ns
Neutrófilos (N)	IL-1 β	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ns Proteína: ns	mRNA: ns Proteína: ↑	mRNA: ns Proteína: ns
	TNF α	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ↓

Controle (Sem polarização e sem Irradiação); Controle+LED (Sem polarização + Irradiação LED ambar); Polarizado (Com LPS para perfil pró-inflamatório); Polarizado+LED (Polarização com LPS e Irradiação com LED ambar); ns- não significante; ne- não expresso; ↑- aumento; ↓-redução.

Quadro 02: Síntese de expressão gênica e proteica de monócitos, linfócitos e neutrófilos polarizados para perfil anti-inflamatório irradiados com LED ambar de 590 nm.

Grupo	Citocina	Perfil Anti-inflamatório			
		Controle X Controle+LED	Controle X polarizado	Controle+LED X Polarizado	Polarizado X Polarizado+LED
Monócitos (M)	IL-10	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ↑	mRNA: ne Proteína: ↑	mRNA: ne Proteína: ↓
Linfócitos (L)	IL-10	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ↑	mRNA: ne Proteína: ↑	mRNA: ne Proteína: ↓
Neutrófilos (N)	IL-10	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ns	mRNA: ne Proteína: ns
	VEGF	mRNA: ne Proteína: nt	mRNA: ne Proteína: nt	mRNA: ne Proteína: nt	mRNA: ne Proteína: nt

Controle (Sem polarização e sem Irradiação); Controle+LED (Sem polarização + Irradiação LED ambar); Polarizado (Com IL4+LPS para perfil anti-inflamatório); Polarizado+LED (Polarização com IL4+LPS e Irradiação com LED ambar); ns- não significante; ne- não expresso; ↑- aumento; ↓-redução.

6. DISCUSSÃO

A fotobiomodulação utiliza luz monocromática na região óptica entre 400-1000 nm para tratar de maneira não invasiva e não térmica os tecidos lesionados. Esse tipo de tratamento se baseia na capacidade da luz (fótons) em alterar o metabolismo celular após sua absorção por componentes intracelulares (Farivar et al. 2014, Anders et al. 2015, Hamblin et al. 2017). Embora monócitos, linfócitos e neutrófilos sejam consideradas células chave na coordenação dos processos de inflamação e reparo (Mesquita Junior et al. 2010, Duque and Descoteaux 2014, Ma et al. 2016, Tidball 2017, Abbas et al. 2018, Okabe 2018, Souza 2018), muito pouco foi descrito sobre a absorção da luz por estas células.

Na avaliação de absorbância óptica desse estudo, foi verificado que os três tipos de leucócitos (monócitos, linfócitos e neutrófilos) absorvem luz nas regiões entre 450-900 nm.

Monócitos mostraram um pico de absorção entre 520-570 nm (que compreende as cores verde, amarelo e ambar), comprimentos que não são os mais usados na FBM, que atualmente são o vermelho e infravermelho próximo (Alves et al. 2014, Hamblin 2017). Porém é interessante notar que a polarização M1 gerou aumento de absorção nos comprimentos vermelho e infravermelho, ou seja, numa situação inflamatória os monócitos absorveriam mais luz nestes comprimentos do que em uma situação normal, do mesmo modo, os monócitos M2 mostraram maior absorção no comprimento de onda vermelho que os monócitos M0. Muitos artigos na literatura apontam os efeitos terapêuticos das fontes vermelhas e infravermelhas no tratamento das lesões inflamatórias (Baptista et al. 2011, Assis et al. 2013, Fernandes et al. 2013, Alves et al. 2014, Souza et al. 2014, Hamblin 2017, Souza et al. 2018) e também na modulação da resposta inflamatória de monócitos/macrófagos (Lindgard et al. 2007, Mehrsai et al. 2009, Alves et al. 2014, Chen et al. 2014, Souza et al. 2014, Fernandes et al. 2015, Carvalho et al. 2016, Hamblin 2017, Sousa et al. 2019), mas não existe nenhum estudo que tenha observado a interação da luz com a plasticidade dos leucócitos humanos.

Portanto, na comparação de absorção entre M1 e M2 foi visto que os monócitos M1 absorvem mais luz nos comprimentos de onda vermelho e

principalmente infravermelho em relação aos monócitos M2, o que sugere que em um quadro inflamatório o efeito da irradiação nestes comprimentos de onda será mais efetivo. Esses resultados podem contribuir para elucidação de quadros inflamatórios, sugerindo uma aplicação de luz infravermelha no início da lesão, momento em que predominam os monócitos M1 e uma segunda aplicação de vermelha na fase final, com maior absorção pelos monócitos M2.

Na avaliação do efeito da irradiação com LED ambar sobre a absorbância dos monócitos foi também muito interessante notar que as células polarizadas passam a absorver menos luz nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, ficando com espectro mais próximo dos monócitos não polarizados, o que poderia indicar que realmente tenha ocorrido um efeito modulador do LED ambar sobre estas células, o que sugere que, quando irradiadas elas voltariam ao padrão sem ativação, não polarizado. Monócitos não polarizados quando irradiados não exibiram alteração no padrão de absorção indicando que nestas células não houve modulação pelo LED.

Os linfócitos, por sua vez, mostraram pico de absorção no início (450-570 nm) e no final do espectro avaliado (770-900nm), o que indicaria que seriam responsivos principalmente às fontes azuis, verdes, amarelas e infravermelhas. Tanto a polarização como a irradiação com LED ambar não alteraram o padrão de absorção destas células, porém linfócitos não polarizados quando irradiados com LED passaram a absorver mais luz infravermelha. Na comparação de absorção entre L1 e L2, os dois grupos responderam semelhante, embora em algumas regiões os linfócitos L1 tenham apresentado pico de absorção maiores comparados aos L2 (na luz âmbar em 550 nm e na luz infravermelha a partir de 750 nm). Os linfócitos L1 se comportaram de forma semelhante aos monócitos M1, que apresentaram um aumento de absorbância na região do espectro que compreende a luz infravermelha.

Já os neutrófilos mostraram pico de absorção entre 520 e 570 nm indicando que seriam mais responsivos a fontes nas cores verde e amarela. As polarizações para perfil inflamatório ou anti-inflamatório e as irradiações com LED praticamente não alteraram o padrão de absorção de neutrófilos. Na comparação de absorção entre N1 e N2 não foi observada diferença, ambos apresentaram pico entre 520-570 nm, sendo que o pico de neutrófilos N1, foi um pouco mais evidente.

Apenas um estudo foi encontrado mostrando a análise da absorção de luz em leucócitos, estes descritos como macrófagos derivados de sarcoma de camundongos Balb/c (Fernandes et al. 2015). Essas células se comportaram de forma semelhante aos monócitos e neutrófilos avaliados aqui, mostrando pico de absorção entre 550-600 nm. Os achados desse estudo são de suma importância para auxiliar na escolha do comprimento de onda ideal para desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos que envolvam a fotobiomodulação sobre as principais células inflamatórias de sangue humano. A FBM tem sido usada para irradiações da corrente sanguínea, a chamada ILIB ou FBM sistêmica que pode ser aplicada de maneira na corrente sanguínea ou sobre a pele ou mucosa que recobrem os vasos (Alves et al. 2014, Hamblin 2017). Somado a isso, é importante lembrar que tanto na FBMS não invasiva como no tratamento de lesões teciduais, a luz terá que atravessar várias barreiras teciduais para atingir os leucócitos, assim sempre haverá necessidade de avaliar a transmissão efetiva de cada fonte. Já foi descrito na literatura que a região visível do espectro é indicada para terapia de tecidos mais superficiais como pele e mucosas, pois a melanina e hemoglobina absorvem a luz em comprimentos de onda inferior a 600 nm, dificultando a penetração dessas fontes de luz. Por outro lado, a região do infravermelho próximo pode interagir com estruturas mais profundas devido a sua maior profundidade de penetração (Castilho-filho 2003, Marques et al. 2004, Sordillo et al. 2014, Khalid 2016). Porém, comprimentos de onda acima de 900 nm podem se deparar com uma barreira, pois a água apresenta maior absorbância nessa região e pode atrapalhar esse processo (Castilho-filho 2003, Khalid 2016, Hamblin 2017).

A metodologia de polarização de monócitos e linfócitos para perfil pró ou anti-inflamatório com LPS ou IL-4+LPS foi efetiva. Os monócitos estimulados com LPS (M1) por 2h apresentaram um aumento na expressão gênica e síntese proteica das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL1 β e TNF α e os linfócitos um aumento na síntese de IFN γ . Essa descrição está de acordo com o perfil de secreção de citocinas mostrado por essas células nos estudos de Suzuki 2000, Adib-Conquy & Cavaillon 2002 e Plevin et al. 2016. Foram descritas duas possíveis vias de ativação com LPS para indução de secreção dessas citocinas: a via MyD88, que ativa a liberação de citocinas inflamatórias (TNF α , IL-6) por meio da ativação TLR4 / CD14 da superfície celular e a via dependente do TRIF, que estimula liberação de citocinas do tipo IFN γ via internalização do TLR4 nos

endossomos (Kawai & Akira 2011, Plevin et al. 2016). Na polarização de perfil anti-inflamatório (em monócitos e linfócitos) também foram encontrados resultados positivos, quando essas células mostraram um aumento na produção de IL-10 após estímulo com IL-4+LPS por 2h, assim como foi observado no estudo de Woodward et al. 2012. Sobre os neutrófilos, não foram observadas diferenças significantes entre células polarizadas e não polarizadas, tanto no perfil N1 como no N2 em relação aos neutrófilos N0. A polarização dessas células não respondeu como esperado ou talvez o tempo e/ou concentração de polarização das células não fossem os mais efetivos para este modelo experimental. Sendo necessário a realização de futuras avaliações para compreender melhor a modulação exercida pelo LPS ou IL-4+LPS. É importante destacar que um estudo publicado por Naegelen et al. (2015) comparou diferentes tempos (0-12h) de estimulação de neutrófilos humanos com LPS, concluindo que os períodos entre 6-12h foram os que apresentaram maior expressão das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF α por citometria de fluxo. Esses achados podem contribuir para definição de uma futura análise de curva dose-reposta para os neutrófilos, levando em consideração que o tempo de análise avaliado aqui pode ter sido muito curto (apenas 4h após estímulo inicial). Porém, como os experimentos deste projeto ainda previam a irradiação e estas células têm vida útil curta houve esse medo em manter períodos de polarização mais longos.

Na avaliação de curva dose-resposta para escolha da dosimetria (apêndice 9.4.) por meio de produção de IL-6 por monócitos tratados com LPS (M1) e irradiados com diferentes doses de LEDs (ambar e infravermelho), foi possível observar que quando da utilização de uma única irradiação, a energia de 1J com LED infravermelho e de 1J e 8J com LED ambar foram capazes de gerar a redução da produção de IL-6 pelos monócitos M1. Já quando foram realizadas 2 aplicações de LED, não foi possível observar efeito do LED infravermelho sobre a redução da produção de IL-6 nos monócitos M1 em nenhuma das energias testadas. Mas os monócitos M1 irradiados com LED ambar por duas vezes, usando as energias de 1J, 4J (sendo essa a mais efetiva) e 8J exibiram produção de IL-6 menor do que os M1 não irradiados. A energia de 2J não modulou significativamente a produção de IL-6. Destes resultados podemos concluir que realmente é fundamental avaliar a dosimetria ideal para observar

resultados mais efetivos da FBM, ou seja, a janela terapêutica assim como relatado anteriormente (Tsai et al. 2001, Sordillo et al. 2014, Khalid 2016).

Com o intuito de avaliar o efeito da FBM com LED em quadro inflamatório, monócitos de perfil M1 irradiados com luz ambar quando da utilização de 4J por 2 vezes reduziram além da produção de IL-6, a produção de TNF α (após 2 h de polarização e coletados após 24 h). Enquanto a citocina IL-1 β não mostrou diferença estática na expressão proteica ou gênica. Similarmente, Carvalho et al. 2016 observaram uma redução na produção das proteínas IL-6, TNF α e IL-1 β em monócitos humanos U-937 tratados com LPS e irradiados com laser de 660 nm (30 mW, 4,5 J/cm², 1,8 J) após 12 horas da polarização. Esse estudo ainda mostrou uma redução significativa na expressão desses genes inflamatórios (*IL-6* e *TNF α*) após o tratamento com FBM no mesmo período, o que não foi observado aqui, apesar do valor de expressão do mRNA de *IL-6* se apresentar menor nos grupos M1 irradiados com LED quando comparados aos não irradiados. O mRNA de *TNF α* não foi expresso nesse estudo no período de avaliação de 24 horas. Souza et al. 2014 também observaram uma redução na produção proteica de TNF α em monócitos humanos da linhagem U-937 ativados com LPS, após tratamento com laser de 660 nm (30 mW, 4,5 J/cm², 1,8 J). Já Chen et al. 2014 compararam diferentes dosimetrias de laser sobre a produção de TNF α por monócitos humanos THP-1 ativados com LPS e observaram que quando usavam o tratamento com laser infravermelho de 808 nm (170 mW, 1 J/cm², 3,8 J) ocorria uma redução na expressão gênica de TNF α , mas, com o uso do laser vermelho de 660 nm (6 mW, 1 J/cm², 7,5 J) ocorria um aumento na expressão gênica e produção proteica desse mediador.

Nos neutrófilos N1 só foi possível observar efeito modulador sobre a produção de TNF α que se mostrou menor após irradiação com LED ambar. Contudo, a polarização dessas células não respondeu como esperado (como descrito anteriormente), sendo necessário a realização de mais estudos para analisar uma curva-dose resposta por neutrófilos polarizados com LPS ou IL-4+LPS. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo que tenha avaliado o efeito da FBM sobre a secreção de citocinas por neutrófilos polarizados para perfis pró ou anti-inflamatório dificultando a comparação de resultados.

Já linfócitos ativados com LPS e irradiados duas vezes com LED Ambar 4J apresentaram maior produção de IL-17 do que os linfócitos apenas ativados.

Também, não foram encontrados estudos que avaliassem IL-17 em células humanas tratadas com FBM. Por outro lado, não houve diferença significativa na produção de IFN γ após aplicação do LED nos linfócitos L1. Na literatura, esse mediador foi avaliado apenas em monócitos humanos isolados com Ficoll e ativados com fitohemaglutinina (Mehrsai et al. 2009), não houve avaliação em linfócitos. O estudo publicado pelo grupo Mehrsai et al. 2009 avaliou laser vermelho 632,8 nm (5 mW, 5.6 J/cm², 1.1 J) e mostrou uma redução não somente na produção proteica de IFN γ , mas como também das proteínas IL-2, IL-12 e TGF- β .

As citocinas avaliadas nesse presente estudo IL1 β , IL-6, IFN γ e TNF α são essenciais para a resposta inflamatória que é benéfica quando existe o controle quantitativo e temporal de seus mediadores, mas prejudicial se exacerbada ou prolongada (Duque & Descoteaux 2014, Barrientos et al. 2018, Sousa et al. 2019). Estudos prévios demonstraram que o efeito atenuante da fotobiomodulação sobre a liberação desses mediadores pró-inflamatórios pode causar uma série de modulações em diferentes modelos experimentais. Dentre essas modulações, observou-se redução nos danos musculares esqueléticos após lesão aguda em humanos (Vanin et al. 2016, Tomazoni et al. 2019), redução no processo inflamatório de artrite reumatoide em humanos (Yamaura et al. 2009), aceleração de cicatrizações de feridas em modelos in vivo (Gupta et al. 2015), redução de inflamação pulmonar aguda em estudos in vivo (de Lima et al. 2013), dentre outros estudos que associam essa redução a uma resposta anti-inflamatória estimulada pela FBM (Alves et al. 2014, Fernandes et al. 2015, Souza et al. 2018, Sousa et al. 2019).

Neste sentido, seria esperado que a FBM também tivesse exibido modulação da produção de IL-17. No entanto, um aumento na secreção desta citocina pode favorecer tratamentos de imunoterapia em pacientes debilitados portadores de doenças crônicas e/ou autoimunes (Zhu & Qian 2012, Taku et al. 2017), o que poderia ser uma nova aplicação para a FBM.

Com relação aos perfis anti-inflamatórios ou moduladores, a irradiação com LED ambar reduziu a produção de IL-10 em monócitos e linfócitos polarizados com LPS+IL-4 no período de 24 h. Embora essa citocina seja caracterizada como anti-inflamatória, se secretada em grandes quantidades ou por períodos prolongados pode causar danos aos tecidos biológicos provocando fibrose (Sun

et al. 2011), o que torna o controle sobre essa produção de suma importância. Além do mais, já foi descrito na literatura que a própria ativação com LPS (associado a citocina IL-4) pode gerar um aumento na produção de IL-10 (Woodward et al 2012). Dessa forma, a redução dessa citocina após tratamento com FBM poderia ser explicada pela modulação obtida a partir da interação de fótons com as vias de ativações com LPS presentes nessas células, reduzindo assim os produtos dessa ativação (no caso o IL-10) como descrito anteriormente (Kawai & Akira 2011, Plevin et al. 2016).

Somado a isso, um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Sousa et al. 2019) observou em macrófagos polarizados com IL-4 e irradiados com laser infravermelho de 780 nm, redução na expressão do mediador anti-inflamatório *TGFβ1* após 24 horas, mas um aumento na expressão desta citocina no período de 4 h. Não podemos descartar a possibilidade do LED ambar ter gerado aumento da produção de IL-10 em períodos mais curtos de avaliação. Não foram encontrados trabalhos que tivessem avaliado IL-10 em monócitos humanos tratados com LED ambar. Mas, Carvalho et al. (2016) observaram um aumento na produção dessa citocina após irradiação com laser vermelho sobre monócitos U-937 estimulados com LPS por 12 horas.

A associação dos resultados apresentados nesse estudo sobre perfil anti-inflamatório ou imunoregulador evidencia que as células inflamatórias respondem a luz em diferentes comprimentos de onda, assim há necessidade de continuar pesquisando para avaliar novas modalidades terapêuticas e sistemas de entrega de luz. Também foi possível verificar que as fontes LED podem gerar efeitos terapêuticos assim como as fontes laser (Wong-Riley et al. 2001, Weiss et al. 2005a, Weiss et al. 2005b, Siqueira et al. 2009, Yeh et al. 2010, Chaves et al. 2014, Hamblin 2017, Heiskanen & Hamblin 2018).

Ainda foi possível verificar que a luz ambar é capaz de gerar efeitos moduladores sobre leucócitos que podem ser comparados ou até superar os exibidos pelas fontes vermelhas ou infravermelhas evidenciando mais uma vez a necessidade da continuação de estudos que envolvam fontes com diferentes comprimentos de onda.

Como dificuldades e limitações desse estudo, é possível citar a determinação dos períodos de avaliação que contemplassem os efeitos da

ativação/polarização e também da FBM. Foi observado que os monócitos não mostraram expressão de mRNA das citocinas *TNF α* e *IL-10* e os linfócitos mRNA de *IL-10*. O tempo de avaliação pode ter sido muito longo, uma vez que já foi visto que o período de expressão gênica pode preceder a liberação da proteína (Sousa et al. 2009). Estudos posteriores podem auxiliar a encontrar o tempo ideal para avaliação de expressão desses genes, talvez em períodos mais curtos. Do mesmo modo, os neutrófilos também não mostraram uma modulação significativa na produção ou expressão de citocinas inflamatórias após polarização com LPS ou IL-4+LPS e/ou tratamento com LED. Essas células poderiam ser avaliadas em períodos maiores entre 6 h e 12 h e testando outras concentrações de ativação (Naegelen et al. 2015).

Todos os achados de polarização de leucócitos podem contribuir na padronização de modelos experimentais (*in vitro* ou *in vivo*) para futuras análises de ativação de células sanguíneas. Eles apresentam também uma contribuição para o desenvolvimento de novos estudos clínicos que envolvam a fotobiomodulação e suas diferentes fontes de luz como a luz visível azul, verde, amarelo/ambar e laranja. Além disso, foi possível observar que deve existir a necessidade de adequação das fontes de luz durante as diferentes fases do processo inflamatório, visto que a luz infravermelha é mais absorvida por monócitos pró-inflamatórios M1 e a luz vermelha por monócitos anti-inflamatórios M2 (sugerindo que cada fase responde a uma fonte de luz diferente). Como também, foi sugerido opticamente que existe a possibilidade de aplicação de luz como tratamento preventivo, já que após a irradiação, os monócitos M1 voltaram a se comportar como os monócitos de padrão não ativado, absorvendo menos luz, e isso mostra que a fototerapia pode modular as respostas celulares de acordo com o seu perfil de ativação inflamatório ou imunoregulatório. No entanto, logicamente ainda existe necessidade de continuar pesquisando antes de transpor estes resultados para a prática clínica.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que os três tipos de leucócitos (monócitos, linfócitos e neutrófilos) foram capazes de absorver luz nas regiões de 450-800 nm, sendo que, monócitos e neutrófilos mostraram pico de absorção entre 520-570 nm e os linfócitos mostraram pico de absorção no início (450-570 nm) e no final do espectro avaliado (770-900 nm). Todos os leucócitos avaliados mostraram absorbância óptica no comprimento de onda utilizado neste estudo (ambar 590 nm) e os monócitos M1 irradiados mostraram menor absorbância em relação ao monócitos M1 não irradiados (principalmente na região do vermelho e infravermelho), o que sugere que a fotobiomodulação pode alterar o padrão de reposta celular dos leucócitos. Ainda foi observado que os monócitos M1 apresentam maior absorção de luz infravermelha e os monócitos M2 de luz vermelha, o que possibilita uma associação de mais de uma fonte de luz nos tratamentos de inflamação e reparo, com aplicação de diferentes fontes de acordo com a fase do tratamento.

O tratamento com LED ambar, nas células polarizadas para o perfil inflamatório gerou nos monócitos redução na síntese proteica das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF α , nos neutrófilos a redução da produção de TNF α e nos linfócitos aumento na produção de IL-17. Nos leucócitos polarizados para o perfil anti-inflamatório/regulador, a irradiação com LED ambar reduziu a produção de IL-10 em monócitos e linfócitos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 9 Edição; Editora GEN Guanabara Koogan (2018).
- 2- Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27927-34.
- 3- Alster TS, Wanitphakdeedecha R. Improvement of postfractional laser erythema with light-emitting diode photomodulation. *Dermatologic Surg*. 2009;35(5):813–5.
- 4- Alves AN, Fernandes KPS, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair. *Am J Phys Med Rehabil*. 2014;93(12):1073-1085. doi:10.1097/PHM.0000000000000158.
- 5- Amantea D. Polarizing the immune system towards neuroprotection in brain ischemia. *Neural Regen Res*. 2016;11(1):81-82. doi:10.4103/1673-5374.169633.
- 6- Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015;33(4):183-184. doi:10.1089/pho.2015.9848.
- 7- Arnardottir HH, Freysdottir J, Hardardottir I. Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice. *Inflamm Res*. 2012;61(9):931-939. doi:10.1007/s00011-012-0484-0.
- 8- Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, et al. Low-Level Laser Therapy (808 nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion. *Lasers Surg Med*. 2013;44(9):726-735. doi:10.1002/lsm.22077.
- 9- Baptista J, Martins MD, Ph D, et al. Influence of Laser Photobiomodulation on Collagen IV During Skeletal Muscle Tissue Remodeling After Injury in Rats. 2011;29(1):11-17. doi:10.1089/pho.2009.2737.

10- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008 Sep-Oct;16(5):585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410. x.

11- Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* 2000;321(7258):424. doi: 10.1136/bmj.321.7258.424.

12- Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol.* 2012;2(11):120134-120134. doi:10.1098/rsob.120134.

13- Biedermann T, Röcken M, Carballido JM. TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004;9(1):5-14.

14- Bolton PA, Young S, Dyson M. Macrophage Responsiveness to Light Therapy - A Dose Response Study. *LASER Ther.* 1990; 2:101-6. doi.org/10.5978/islsm.90-OR-07.

15- Bolton P, Young S, Dyson M. Macrophage Responsiveness to Light Therapy with Varying Power and Energy Densities. *LASER Ther.* 1991;3(3):105-111. doi:10.5978/islsm.91-OR-15.

16- Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train.* 2006;41(4):457-465. doi:10.1016/S0162-0908(08)79217-1.

17- Carvalho JL, Britto A, Souza NH, Ligeiro de Oliveira AP, Anatriello E AR and AF. The M1/M2 Pattern and the Oxidative Stress are Modulated by Low- Level Laser in Human Macrophage. *J Clin Cell Immunol.* 2016;07(01):1-12. doi:10.4172/2155-9899.1000387.

18- Castilho-Filho T. Avaliação da ação da radiação laser em baixa intensidade no processo de osseointegração de implantes de titânio inseridos em tíbia de coelhos. Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares da Universidade de São Paulo. 2003; Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

19- Cerdeira DC, Brigagão MRPL, Carli ML, Ferreira CS, Moraes GOS, Hadad H, Hanemann JAC HM and SF. Low-level laser therapy stimulates the oxidative

burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. 2016; 9:1180-1188. doi:10.1002/jbio.201600035.

20- Chaves ME de A, Araújo AR de, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol*. 2014;89(4):616-623. doi:10.1590/abd1806-4841.20142519.

21- Chen C, Wang C, Wang Y, et al. Effects of Low-Level Laser Therapy on M1-Related Cytokine Expression in Monocytes via Histone Modification. 2014;2014. doi:10.1155/2014/625048.

22- De Jonge HJM, Fehrmann RSN, De Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, De Vries EGE, Van Der Zee AGJ, Te Meerman GJ, Ter Elst A. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One*. 2007; 2(9): e898. doi: 10.1371/journal.pone.0000898.

23- DeLand MM, Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Lasers Surg Med*. 2007;39(2):164–8.

24- de Lima FM, Vitoretti L, Coelho F, et al. Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. *Lasers Med Sci*. 2013; 28:551–564.

25- Deniset JF, Kubes P. Recent advances in understanding neutrophils. *F1000Research*. 2016;5(0):2912. doi:10.12688/f1000research.9691.1.

26- Duque AG, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014 Oct 7; 5:491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491. eCollection 2014.

27- Fan X, Rudensky AY. Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell*. 2016 Mar 10;164(6):1198-1211. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.048.

28- Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low-level laser therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014;5(2):58-62.

29- Fernandes KPS, Alves AN, Nunes FD, et al. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):1043-1046. doi:10.1007/s10103-012-1233-x.

- 30- Fernandes KPS, Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, et al. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2015; 153:344-351. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.015.
- 31- Filardy AA, Pires DR, Nunes MP, et al. Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12^{low}IL-10^{high} Regulatory Phenotype in Macrophages. *J Immunol.* 2010;185(4):2044-2050. doi:10.4049/jimmunol.1000017.
- 32- Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. 2016:1-37. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.Proposed.
- 33- Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Low-Level Laser Irradiation Attenuates Production of Reactive Oxygen Species by Human Neutrophils. 2003;21(3):165-170.
- 34- García-García A, de Castillejo CL, Méndez-Ferrer S. BMSCs and hematopoiesis. *Immunol Lett.* 2015; 168(2):129-35. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.020.
- 35- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010 Feb 5;327(5966):656-61. doi: 10.1126/science.1178331.
- 36- Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2016 Mar; 8(3): 36. doi: 10.3390/cancers8030036.
- 37- Gupta A, Keshri GK, Yadav A, et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLTL) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics.* 2015; 8:489–501.
- 38- Hamblin MR. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. *BBA Clin.* 2016; 6: 113–124. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.09.002.
- 39- Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys.* 2017;4(3):337-361. doi:10.3934/biophy.2017.3.337.

- 40- Heiskanen V, MR Hamblin. Photobiomodulation: Lasers vs Light Emitting Diodes? *Photochem Photobiol Sci*. 2018 Aug 8;17(8):1003-1017.
- 41- Huang Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. 2011:602-618. doi: 10.2203/dose-response.11-009.Hamblin.
- 42- Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013; 140(12):2463-7. doi: 10.1242/dev.083147.
- 43- Karlmark KR, Tacke F, Dunay IR. Monocytes in Health and Disease – Minireview. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012;2(2):97–102. doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.1
- 44- Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011; 34(5):637–650.
- 45- Khalid MZ. Mechanism of Laser/light beam interaction at cellular and tissue level and study of the influential factors for the application of low-level laser therapy. *Physics. Med*. 2016, 0-20.
- 46- Kobayashi Y. Neutrophil biology: An update. *Excli J*. 2015; 14:220-227. doi:10.17179/excli2015-102.
- 47- Koyasu S, Moro K. Role of Innate Lymphocytes in Infection and Inflammation. *Front Immunol*. 2012; 3:101. doi: 10.3389/fimmu.2012.00101.
- 48- Lingard A, Hultén LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci*. 2007;22(1):30-36. doi:10.1007/s10103-006-0419-5.
- 49- Livak KJ, Schmittgen TD. Analyses of relative gene expression data using *real-time* quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method). *Methods*. 2001; 25: 402-408.
- 50- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:925135. doi: 10.1155/2012/925135.
- 51- Ma Y, Yabluchanskiy A, Iyer RP, et al. Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2016;110(1):51-61. doi:10.1093/cvr/cvw024.

- 52- Marques C, Martins A, Conrado LA. The Use of Hyperbaric Oxygen Therapy and Led Therapy in Diabetic Foot. *Laser in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and System*". Proceeding of SPIE. 2004; 5312:47-53. doi:10.1117/12.528233.
- 53- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014;9(1):181-218. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
- 54- Mehraei A, Afshar M, Afshar M, et al. The effect of low-level helium-neon (HeNe) laser radiation on the secretion of cytokines that promote chronic graft rejection - An in vitro study. *Med Laser Appl.* 2009;24(3):194-200. doi: 10.1016/j.mla.2009.03.001.
- 55- Merry GF, Munk MR, Dotson RS, Walker MG, Devenyi RG. Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2017;95(4):e270–7.
- 56- Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Cruvine WM, Andrade LEC, Silva NP. Sistema imunitário - parte II. fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev. Bras. Reumatol.* 2010; vol.50 n.5. doi.org/10.1590/S0482-50042010000500008.
- 57- Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(6):463-488. doi:03b91cfa635b86ee,7acd81f604dc8b0c [pii].
- 58- Murray JR, Rajeevan MS. Evaluation of DNA extraction from granulocytes discarded in the separation medium after isolation of peripheral blood mononuclear cells and plasma from whole blood. *BMC Research Notes.* 2013; 6:440.
- 59- Musawi MS Al, Jaafar MS, Ahmed NM. Effects of low-level laser irradiation on human blood lymphocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2016. doi:10.1007/s10103-016-2134-1.
- 60- Naegelen I, Beaume N, Plançon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Bréchar S. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model

Approach Based on Linear Fitting. *J Immunol Res.* 2015; 2015: 817038. doi: 10.1155/2015/817038.

61- Neely CJ, Kartchner LB, Mendoza AE, et al. Flagellin treatment prevents increased susceptibility to systemic bacterial infection after injury by inhibiting anti-inflammatory IL-10+ IL-12- neutrophil polarization. *PLoS One.* 2014;9(1):1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0085623.

62- Okabe Y. Molecular control of the identity of tissue-resident macrophages. *Int Immunol.* 2018 Oct 29;30(11):485-491. doi: 10.1093/intimm/dxy019.

63- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008;132(4):631-44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025.

64- Ozcelik O, Cenk Haytac M, Seydaoglu G. Enamel matrix derivative and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: A randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2008;35(2):147–56.

65- Peplow PV, Baxter GD. Testing infrared laser phototherapy (810 nm) to ameliorate diabetes: irradiation on body parts of diabetic mice. *Lasers Surg Med.* 2013; 45(4):240-5. doi: 10.1002/lsm.22130.

66- Plevin RE, Knoll M, McKay M, Arbabi S, Cuschieri J. The Role of Lipopolysaccharide Structure in Monocyte Activation and Cytokine Secretion. *Shock.* 2016 Jan; 45(1): 22–27.

67- Scheiermann C, Frenette PS, Hidalgo A. Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovasc Res.* 2015; 107(3):340-51. doi: 10.1093/cvr/cvv099.

68- Seely AJE, Pascual JL, Christou N V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care.* 2003;7(4):291-307. doi:10.1186/cc1853.

69- Silva DF, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Raele MP, Wetter NU, Deana AM. Effective Transmission of Light for Media Culture, Plates and Tubes. *Photochem Photobiol.* 2012 Sep-Oct;88(5):1211-6. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01166. x.

- 70- Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2009 May 4;95(2):89-92. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.01.004.
- 71- Siqueira CPCM, Toginho Filho DDO, Lima FM, et al. Efeitos biológicos da luz: aplicação de terapia de baixa potência empregando LEDs (Light Emitting Diode) na cicatrização da úlcera venosa: relato de caso. *Semin Ciências Biológicas e da Saúde*. 2009;30(1):37. doi:10.5433/1679-0367.2009v30n1p37.
- 72- Sordillo LA, Pu Y, Pratavieira S, Budansky Y, Alfano RR. Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows. *J Biomed Opt*. 2014 May;19(5):056004. doi: 10.1117/1.JBO.19.5.056004.
- 73- Sousa KDB, Fernanda M, Destro S, et al. Differential expression of inflammatory and anti-inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after photobiomodulation with red or infrared lasers. 2019.
- 74- Souza NHC, Marcondes PT, Albertini R, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS, Aimbire F. Low-level laser therapy suppresses the oxidative stress-induced glucocorticoids resistance in U937 cells: Relevance to cytokine secretion and histone deacetylase in alveolar macrophages. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2014; 130:327-336. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.12.010.
- 75- Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, da Silva DFT, Ribeiro BG, Alves AN, Garcia MP, Nunes FD, da Silva Junior EM, França CM, Bussadori SK, Fernandes KPS. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4922-4934. doi: 10.1111/jcmm.13757. Epub 2018 Jul 19.
- 76- Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO. In Vitro Effects of Low-Level Laser Irradiation at 660 nm on Peripheral Blood Lymphocytes. 2000;261(March):255-261.
- 77- Sun L, Louie MC, Vannella KM, Wilke CA, LeVine AM, Moore BB, Shanley TP. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 300(3): L341–L353. doi: 10.1152/ajplung.00122.2010.

- 78- Suzuki T, Hashimoto S, Toyoda N, Nagai S, Yamazaki N, Dong HY, Sakai J, Yamashita T, Nukiwa T, Matsushima K. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2584-91.
- 79- Taku K, Fumio I, Motonari K, Terutaka K. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017: 3908061. doi: 10.1155/2017/3908061.
- 80- Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(3):165-178. doi:10.1038/nri.2016.150.
- 81- Tomazoni SS, Machado CDSM, De Marchi T, Casalechi HL, Bjordal JM, de Carvalho PTC, Leal-Junior ECP. Infrared Low-Level Laser Therapy (Photobiomodulation Therapy) before Intense Progressive Running Test of High-Level Soccer Players: Effects on Functional, Muscle Damage, Inflammatory, and Oxidative Stress Markers-A Randomized Controlled Trial. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 16; 2019:6239058. doi: 10.1155/2019/6239058.
- 82- Tsai CL, Chen JC, Wang WJ. Near-infrared Absorption Property of Biological Soft Tissue Constituents. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2001; 21(1): 7-14.
- 83- Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*. 2004;21(2):215-226. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.006.
- 84- Vanin AA, De Marchi T, Tomazoni SS, Tairova O, Casalechi HL, de Carvalho PTC, Bjordal JM, Leal-Junior EC. Pre-Exercise Infrared Low-Level Laser Therapy (810 nm) in Skeletal Muscle Performance and Postexercise Recovery in Humans, What Is the Optimal Dose? A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Photomed Laser Surg*. 2016; 34 (10): 473-482.
- 85- Wang Y, He X, Hao D, et al. Low-Level Laser Therapy Attenuates LPS-Induced Rats Mastitis by Inhibiting Polymorphonuclear Neutrophil Adhesion. *J Vet Med Sci*. 2014;76(11):1443-1450. doi:10.1292/jvms.14-0061.

- 86- Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA. A novel non-thermal non-ablative full panel LED photomodulation device for reversal of photoaging: digital microscopic and clinical results in various skin types. *Lasers Surg Med.* 2004;36(2):85–91.
- 87- Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, Bellew SG. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg.* 2005a;31(9 Pt 2):1199-205.
- 88- Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA. Clinical trial of a novel non-thermal LED array for reversal of photoaging: Clinical, histologic, and surface profilometric results. *Lasers Surg Med.* 2005b;36(2):85-91. doi:10.1002/lsm.20107.
- 89- Woodward EA, Kolesnik TB, Nicholson SE, Prêle CM, Hart PH. The anti-inflammatory actions of IL-4 in human monocytes are not mediated by IL-10, RP105 or the kinase activity of RIPK2. 2012; *Cytokine* 58(3):415-23. doi: 10.1016/j.cyto.2012.03.009.
- 90- Wong-riley MTT, Bai CAX, Buchmann E, Whelan HT. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. 2001;12(14):3033-3037.
- 91- Wu D, Zhou B, Xu Y, Yin Z, Luo D. Impact of intense pulsed light irradiation on cultured primary fibroblasts and a vascular endothelial cell line. *Exp Ther Med.* 2012;4(4):669–74.
- 92- Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, Fang S, Tamura T, Matsumoto Shinei, Aiba Y, Teruya K, Osada K. NR and SS. IL-10 Augments Antibody Production in *In Vitro* Immunized Lymphocytes by Inducing a Th2-Type Response and B Cell Maturation. 2004;68(11):2279-2284.
- 93- Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, et al. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers Surg Med.* 2009; 41:282–290.
- 94- Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation.* 2017;40(1):311-323. doi:10.1007/s10753-016-0458-4.

- 95- Yeh NG, Wu C-H, Cheng TC. Light-emitting diodes—Their potential in biomedical applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(8):2161-2166. doi: 10.1016/j.rser.2010.02.015.
- 96- Young, Steve; Bolton, Peter; Dyson, Mary; Harvey W, and Diamantopoulos C. Macrophage Responsiveness to Light Therapy. *Lasers Surg Med.* 1989;9(5):497-505. doi:10.1002/lsm.1900090513.
- 97- Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol.* 2012; 9(1): 11–19. doi: 10.1038/cmi.2011.47.
- 98- Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol.* 2003; 120(5):849-57.
- 99- Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science.* 2012;122(11):487–511. doi: 10.1042/cs20110496.

9. APÊNDICES

9.1. Análise de Separação de Células Mononucleares

Foi realizada análise de citometria para confirmação de separação de células mononucleares do sangue em três pacientes diferentes. A população 01 ou P1 representa os linfócitos e a população 02 ou P2 representa os monócitos, ambos identificados percentualmente, conforme mostra a figura ilustrativa 25.

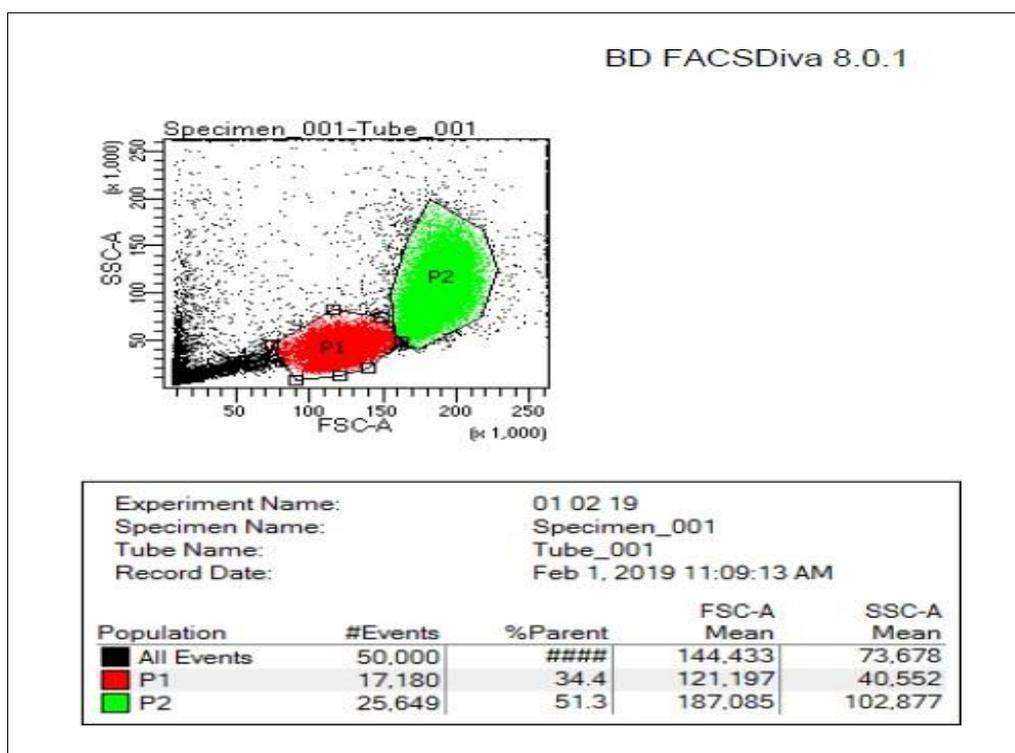


Figura 25 – Imagem Ilustrativa de análise de citometria para separação de células mononucleares do sangue em monócitos e linfócitos.

9.2. Curva dose-resposta de Polarização de Monócitos Humanos com LPS para Perfil Pró-inflamatório

Inicialmente foi realizada uma análise temporal da polarização de monócitos humanos para perfil pró-inflamatório utilizando LPS+IFN- γ (ambos na concentração de 100 ng/mL), por períodos de 2, 9 e 24 horas (Suzuki 2000, Adib-Conquy & Cavillon 2002, Plevin et al. 2016). Os resultados mostraram que a partir do período de 2h, já se observava um aumento significativo ($p < 0.001$) na produção da citocina IL-6 nos monócitos polarizados (M1) em comparação aos monócitos não polarizados (M0), como observa-se na Figura 26.

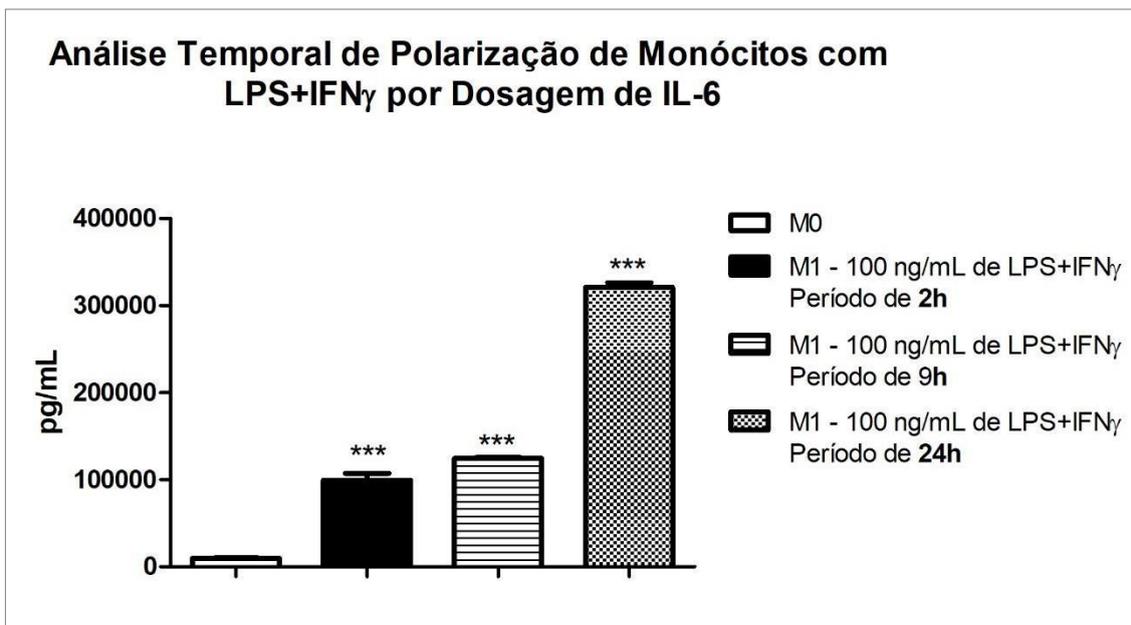


Figura 26 – Dosagem proteica de IL-6 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização) e M1 (ativados com LPS+IFN γ , ambos na concentração de 100 ng/mL) por 2, 9 e 24 horas. Todos os grupos ativados M1 foram comparados em relação ao grupo controle (M0). Barras representam médias e desvio padrão. $P < 0.001$ *** $n=1$.

Em seguida, foi feito um ensaio utilizando o sangue do mesmo paciente para observar o efeito de diferentes concentrações de IFN γ . Para isso, foram utilizadas duas diferentes concentrações de IFN γ (10 ng/mL e 100 ng/mL) associadas ao LPS (100 ng/mL), em um período de polarização de 24h. Esse ensaio mostrou que independentemente da concentração de IFN γ utilizada, os monócitos não apresentaram diferença na produção de IL-6, o que sugere que a maior parte da ativação para produção de IL-6 seja causada pela presença do LPS (Figura 27).

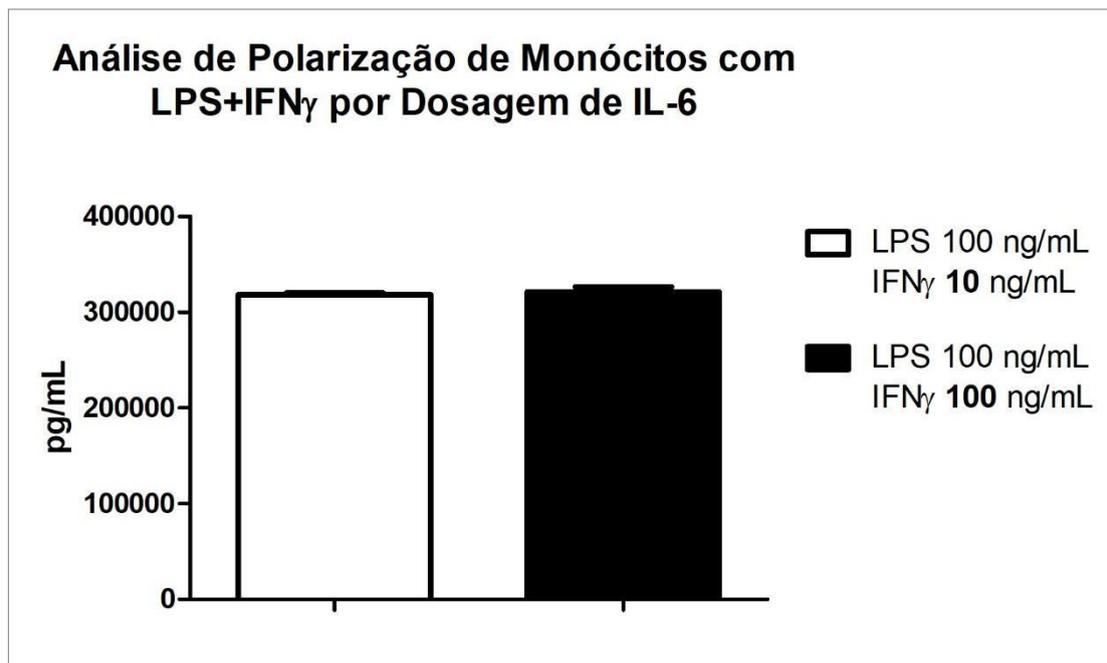


Figura 27 – Dosagem proteica de IL-6 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M1 ativados com IFN γ nas concentrações de 10 ou 100 ng/mL associados ao LPS 100 ng/mL, por um período de 24h. Barras representam médias e desvio padrão (n=1).

Para confirmar essa hipótese, foi realizado mais um ensaio com o objetivo de avaliar o efeito do IFN γ isoladamente na polarização de monócitos humanos, em diferentes concentrações (Figura 28). As concentrações de IFN γ avaliadas foram 25 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, e as células foram tratadas um período de 2h. A partir dos dados obtidos nessa análise, foi possível observar que o IFN γ pouco estimula a produção de IL-6 que atingiu no máximo 20 pg/mL (nas concentrações de IFN γ testadas), sendo que, a polarização testada anteriormente com IFN γ junto com LPS (100 ng/mL), mostrou uma produção maior que 300.000 pg/mL de síntese de IL-6 (no mesmo período de ativação de 2h). Dessa forma, foi decidido utilizar apenas LPS para a polarização dos leucócitos no presente estudo, numa concentração a ser determinada em ensaio de curva-dose resposta (Figura 29).

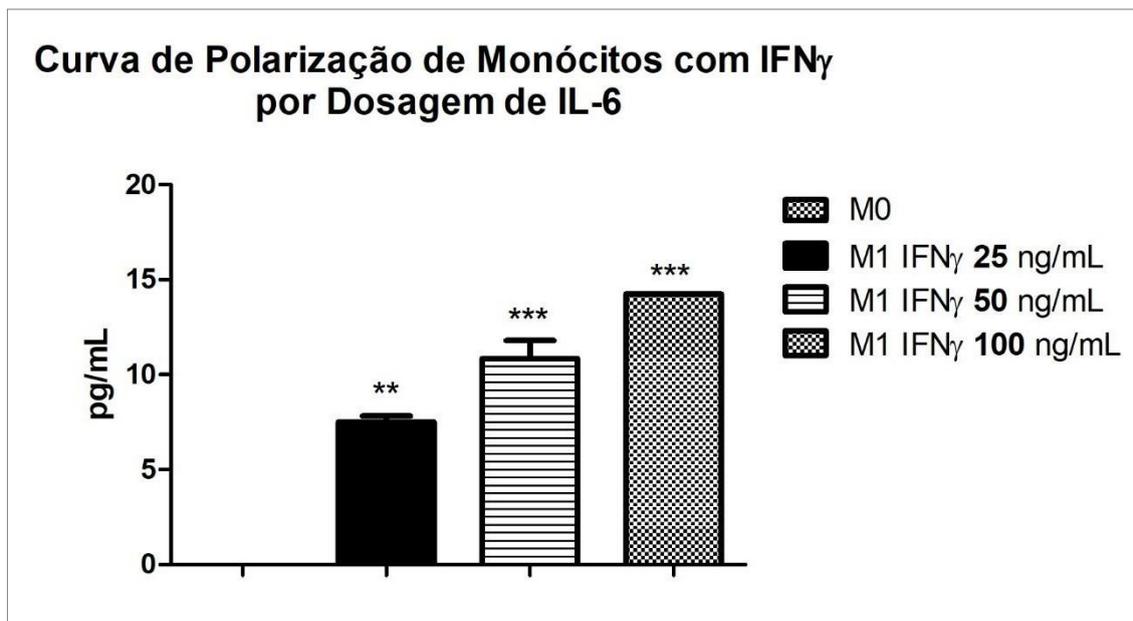


Figura 28 – Dosagem proteica de IL-6 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (1×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização) e M1 (ativados com IFN γ por 2h em diferentes concentrações: 25, 50 e 100 ng/mL). Todos os grupos ativados M1 foram comparados em relação ao grupo controle (M0). Barras representam médias e desvio padrão. $P < 0.01$ ** e $P < 0.001$ *** $n=1$.

Para finalizar a padronização de polarização de perfil pró-inflamatório, foi realizada uma curva dose-resposta para definição de concentração do LPS a partir de 100 ng/mL (Suzuki 2000, Adib-Conquy & Cavaillon 2002, Plevin et al. 2016). Os monócitos foram polarizados com LPS nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 ng/mL por um período de 2 horas. Após análise de produção de IL-6, foi observado que mesmo a menor concentração de LPS (10 ng/mL) foi capaz de polarizar as células para perfil pró-inflamatório. Todas as concentrações aumentaram a produção de IL-6 ($p < 0.001$) pelos monócitos polarizados (M1) comparados aos monócitos não polarizados (M0), como mostra a figura 29. O período de polarização definido para os ensaios de dosagem das demais citocinas pró-inflamatórias foi o período de 2 horas, utilizando apenas o LPS (10 ng/mL) como fator estimulante.

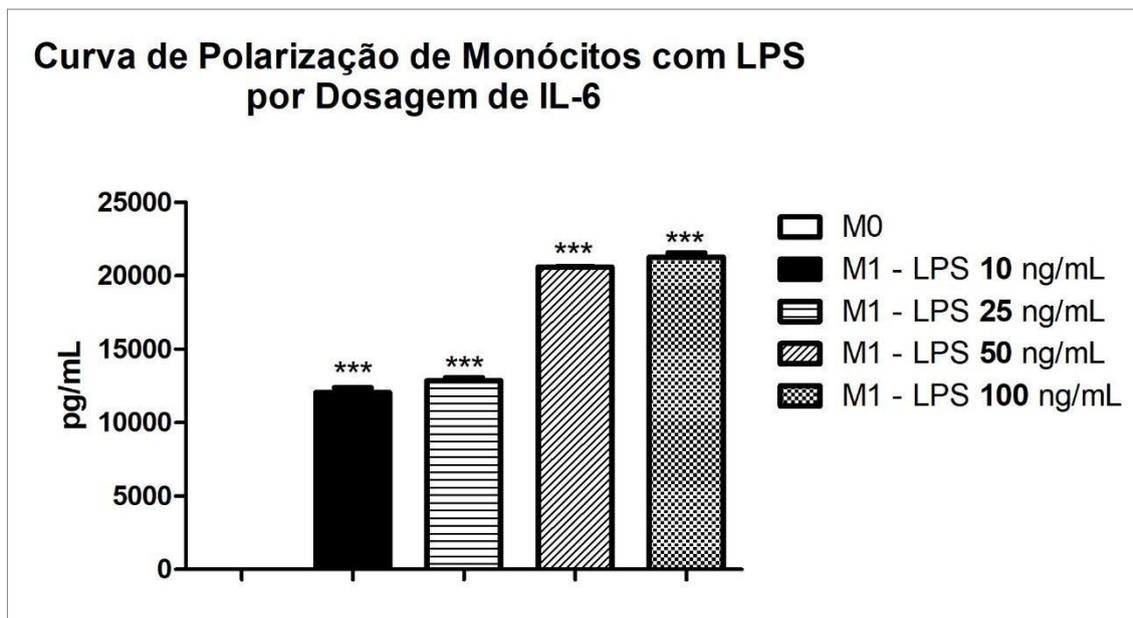


Figura 29 – Dosagem proteica de IL-6 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (1×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização) e M1 (ativados com LPS por 2h em diferentes concentrações: 10, 25, 50 e 100 ng/mL). Todos os grupos ativados M1 foram comparados em relação ao grupo controle (M0). Barras representam médias e desvio padrão. $P < 0.001$ *** $n=1$.

9.3. Curva dose-resposta de Ativação de Monócitos Humanos com IL-4 ou IL4+LPS para Perfil Anti-inflamatório

Foi realizada uma curva dose-resposta para definição da concentração de IL-4 ou LPS+IL-4 para ativação de perfil anti-inflamatório (Woodward et al 2012). Os monócitos foram ativados com apenas IL-4 na concentração de 10 ng/mL ou IL-4 (nessa mesma concentração) + LPS nas concentrações de 10 ou 500 ng/mL, todos por um período de 2 horas. Após análise de produção proteica de IL-10, foi observado que a mistura de IL-4 e LPS, potencializa a produção de IL-10 em monócitos polarizados comparados aos monócitos não polarizados (Figura 30). Foi definida a concentração de LPS 10 ng/mL (associada a 10 ng/mL de IL-4) para os experimentos de ativação de perfil anti-inflamatório de leucócitos.

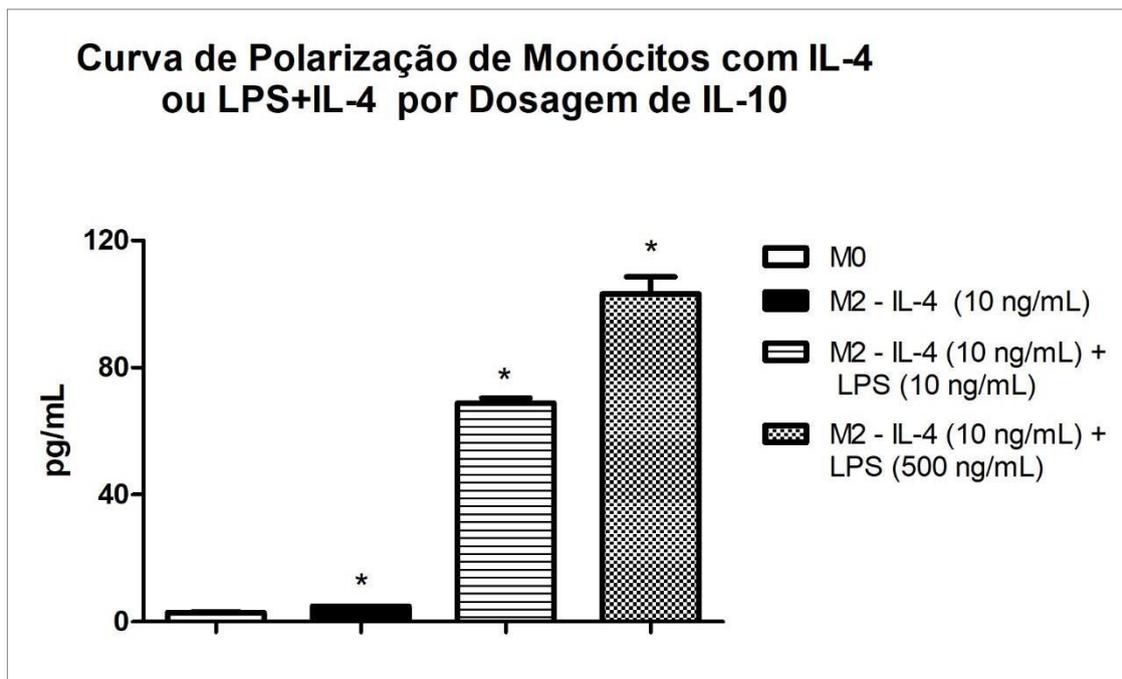


Figura 30 – Dosagem proteica de IL-10 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização); M2 IL-4 (10 ng/mL); M2 IL-4 (10 ng/mL) + LPS (10 ng/mL) e M2 IL-4 (10 ng/mL) + LPS (500 ng/mL), todos ativados por um período de 2 h. Todos os grupos ativados M2 foram comparados em relação ao grupo controle (M0). Barras representam médias e desvio padrão. $P < 0.05$ * $n=1$.

9.4. Curva dose-resposta para definição dos parâmetros dosimétricos

Para definição dos parâmetros dosimétricos da FBM, foi feita avaliação de produção proteica de IL-6 em 3 experimentos onde os monócitos foram ativados para perfil pró inflamatório com 10 ng/mL de LPS por 2h, e posteriormente irradiados com LED em diferentes parâmetros dosimétricos nos comprimentos de onda infravermelho de 850 nm e ambar 590 nm (Tabela 16). Os experimentos foram realizados em duplicata amostral de 03 pacientes diferentes e a dosagem proteica de IL-6 foi realizada utilizando Kit ELISA 430501 (Biolegend). A citocina de escolha para padronização do estudo foi a IL-6 por ser uma citocina muito bem descrita na literatura no contexto inflamatório (Fernandes et al. 2015, Carvalho et al. 2016, Sousa et al. 2019). Os dados foram apresentados em porcentagem devido a variação de produção proteica entre os pacientes.

O LED infravermelho foi usado na padronização pela sua capacidade de modular a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos de roedores (Fernandes et al. 2015, Sousa et al. 2019) e também por seus efeitos em monócitos e neutrófilos humanos ou de linhagem (Tabela 17, figura 31). O

Tabela 16 - Parâmetros Dosimétricos de LEDs Infravermelho e Ambar

Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Área cabeçote (cm ²)	Irradiância (mW/cm ²)	Exposição Radiante (J/cm ²)	Tempo (s)	Quantidade de Aplicações	Energia por Aplicação (J)	Energia total (J)
590 ± 20	70	3	23,3	0,33	15	1	1	1
590 ± 20	70	3	23,3	0,66	15	2	1	2
590 ± 20	70	3	23,3	0,66	30	1	2	2
590 ± 20	70	3	23,3	1,33	30	2	2	4
590 ± 20	70	3	23,3	1,33	60	1	4	4
590 ± 20	70	3	23,3	2,66	60	2	4	8
590 ± 20	70	3	23,3	2,66	120	1	8	8
590 ± 20	70	3	23,3	5,33	120	2	8	16
850 ± 20	70	3	23,3	0,33	15	1	1	1
850 ± 20	70	3	23,3	0,66	15	2	1	2
850 ± 20	70	3	23,3	0,66	30	1	2	2
850 ± 20	70	3	23,3	1,33	30	2	2	4
850 ± 20	70	3	23,3	1,33	60	1	4	4
850 ± 20	70	3	23,3	2,66	60	2	4	8
850 ± 20	70	3	23,3	2,66	120	1	8	8
850 ± 20	70	3	23,3	5,33	120	2	8	16

Diante dos resultados apresentados aqui, foi determinado o protocolo de irradiação de LED ambar 590 nm – 4J com duas aplicações descrito no item 4.5.

9.4.1. Produção de IL-6 por Monócitos Tratados com LED Infravermelho de 850 nm – Aplicação Única (1X)

Na figura 32, observa-se que os monócitos ativados com 10 ng/mL de LPS (M1) foram capazes de aumentar a sua produção de IL-6 ($p < 0.01$) em comparação aos monócitos não ativados (M0), após o período de 2 horas de ativação. Em contrapartida, o LED infravermelho de 850 nm com 1J de energia (aplicação única) foi capaz de reduzir a produção de IL-6 ($p < 0.05$) em monócitos ativados e irradiados em comparação com monócitos apenas ativados, mas não irradiados. Os demais parâmetros de LED infravermelho com 2, 4 e 8 J de

energia (aplicação única) não demonstraram diferença estatisticamente significativa para esta mesma análise.

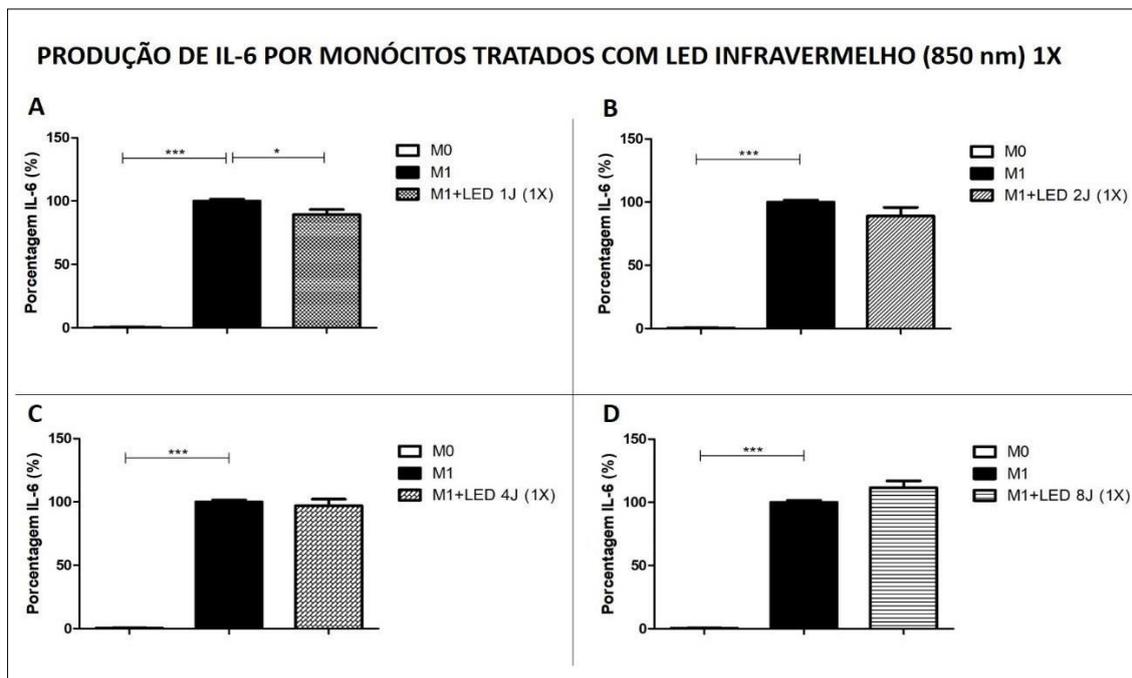


Figura 32. Percentual de produção de IL-6 em relação ao controle pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização), M1 (polarização com LPS 10ng/mL) e M1 + LED (polarização com LPS e irradiação com LED infravermelho de 850 nm) com doses de energia 1J (A), 2J (B), 4J (C) e 8J (D) com aplicação única após 2h de polarização. $P < 0.001$ *** e $p < 0.05$ *. $n = 3$.

9.4.2. Produção de IL-6 por Monócitos Tratados com LED Infravermelho de 850 nm – Duas Aplicações (2X)

Os monócitos ativados com LPS (M1) aumentaram a produção de IL-6 ($p < 0.01$) em comparação com os monócitos não ativados (M0), após um período de 2 horas de ativação. Por outro lado, os tratamentos com LED infravermelho de 850 nm (1J, 2J, 4J e 8J com duas aplicações) não apresentaram diferença estatisticamente significativa sobre os monócitos ativados M1 (Figura 33).

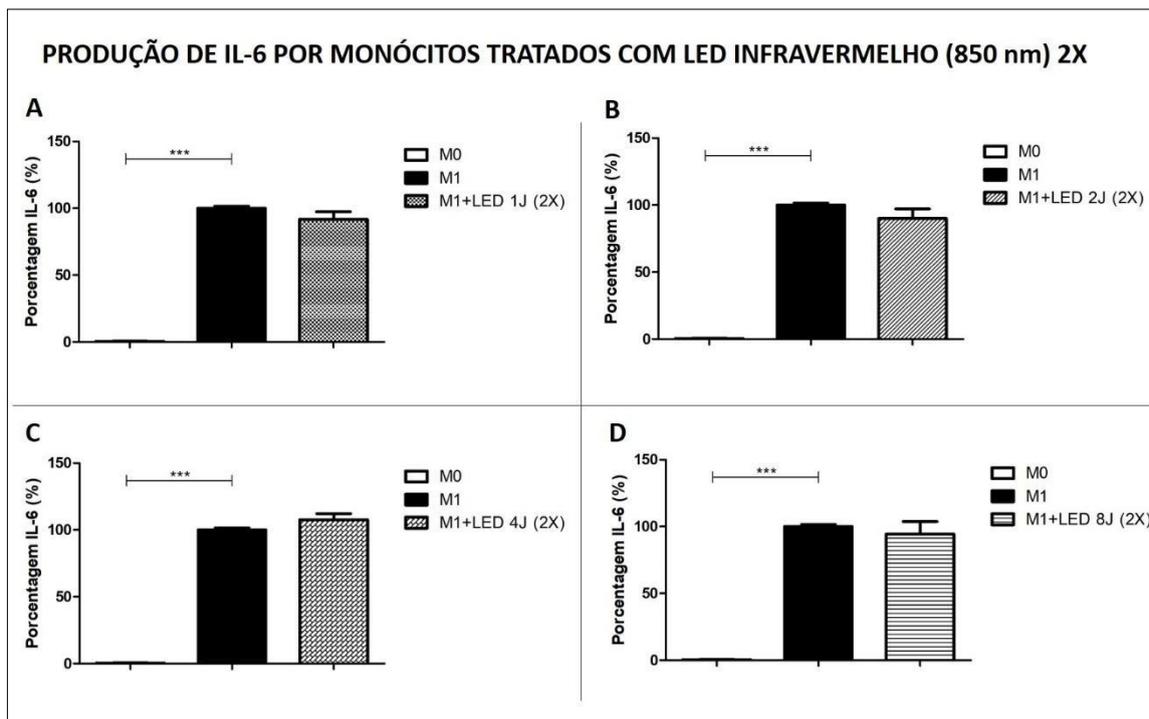


Figura 33. Percentual de produção de IL-6 em relação ao controle pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização), M1 (polarização com LPS 10ng/mL) e M1 + LED (polarização com LPS e irradiação com LED infravermelho de 850 nm) com doses de energia 1J (A), 2J (B), 4J (C) e 8J (D) com duas aplicações após 2h e 6h de polarização. $P < 0.001$ *** e $p < 0.05$ *. $n = 3$.

9.4.3. Produção de IL-6 por Monócitos Tratados com LED Ambar de 590 nm – Aplicação Única (1X)

A ativação de monócitos com 10 ng/mL de LPS (M1) por 2h, demonstrou um aumento significativo na produção de IL-6 ($p < 0.01$) em relação a monócitos não ativados (M0). Somado a isso, o LED ambar de 590 nm mostrou-se eficaz na redução da síntese proteica de IL-6 por monócitos M1, quando utilizadas as doses de energia de 1J ($p < 0.05$) e 8J ($p < 0.01$) com uma única aplicação. Porém, as doses de energia de 2 e 4 J (aplicação única) não demonstraram diferença estatisticamente significativa para esta mesma análise (Figura 34).

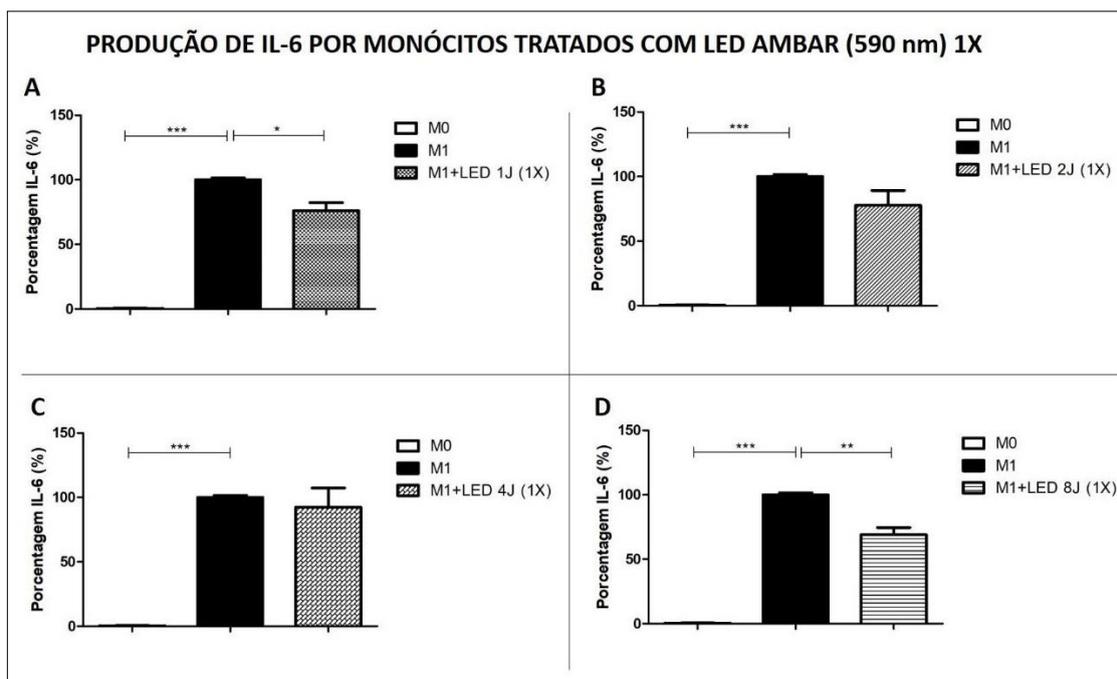


Figura 34. Percentual de produção de IL-6 em relação ao grupo M1 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização), M1 (polarização com LPS 10ng/mL) e M1 + LED (polarização com LPS e irradiação com LED ambar de 590 nm) com doses de energia 1J (A), 2J (B), 4J (C) e 8J (D) com aplicação única após 2h de polarização. $P < 0.001$ ***; $p < 0.01$ ** e $p < 0.05$ *. $n = 3$.

9.4.4. Produção de IL-6 por Monócitos Tratados com LED Ambar de 590 nm – Duas Aplicações (2X)

A figura 35 mostra um aumento na produção da proteína IL-6 em monócitos ativados com LPS (M1) por um período de 2 horas (comparados a monócitos não ativados). Assim como, mostra uma redução na produção dessa proteína nos monócitos polarizados para fenótipo pró-inflamatório (M1), após tratamento com LED ambar de 590 nm utilizando as doses de energia 1J ($p < 0.05$), 4J ($p < 0.001$) e 8J ($p < 0.001$) com duas aplicações após 2h e 6h de ativação. O tratamento com LED ambar de 2 Joules de energia (duas aplicações) não mostrou diferença estatisticamente significativa para esta análise.

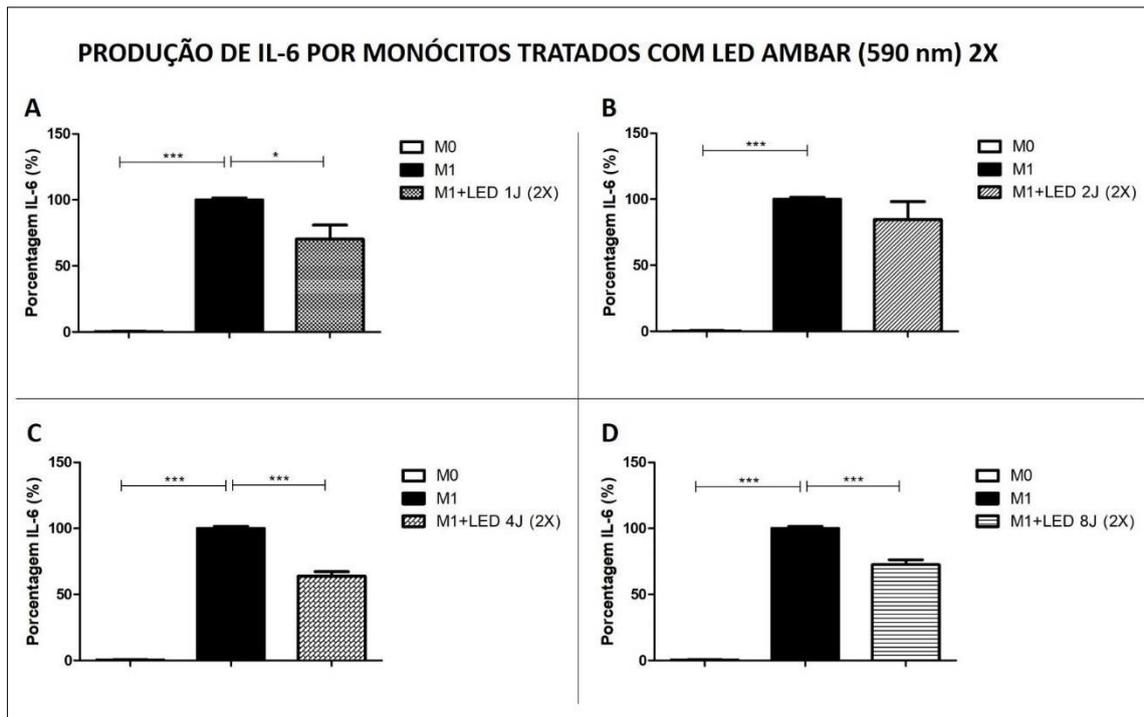


Figura 35. Percentual de produção de IL-6 em relação ao grupo M1 pelo método ELISA, no sobrenadante de culturas de monócitos (5×10^6 células/poço) dos grupos M0 (sem polarização), M1 (polarização com LPS 10ng/mL) e M1 + LED (polarização com LPS e irradiação com LED ambar de 590 nm) com doses de energia 1J (A), 2J (B), 4J (C) e 8J (D) com duas aplicações após 2h e 6h de polarização. $P < 0.001$ *** e $p < 0.05$ *. $n=3$.

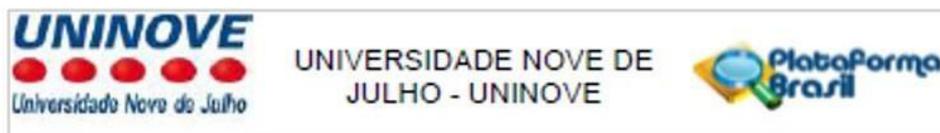
10. ANEXOS:

ANEXO 10.1. CARTA DE APROVAÇÃO PARA FORNECIMENTO DE CÂMARAS DE LEUCORREDUÇÃO



Figura 36. Carta de Aprovação para Fornecimento de Câmaras de Leucorredução

ANEXO 10.2. TERMO APROVAÇÃO COMITE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE MONÓCITOS, LINFÓCITOS E NEUTRÓFILOS HUMANOS POLARIZADOS PARA FENÓTIPOS PRÓ OU ANTI-INFLAMATÓRIO

Pesquisador: KALINE DE BRITO SOUSA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18432719.4.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.506.480

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios deste parecer foram extraídas do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1373156.pdf de 05/08/2019.

O efeito da fotobiomodulação no tratamento de diferentes lesões teciduais nos âmbitos clínico e experimental, tem sido bastante descrito, mas pouco se conhece a respeito dos seus efeitos sobre a polarização de leucócitos. Os objetivos deste projeto são avaliar o espectro de absorção de monócitos, neutrófilos e linfócitos humanos para definir o comprimento de onda mais absorvido por estas células. Posteriormente uma fonte LED de comprimento de onda correspondente ao mais absorvido será usada para avaliar a expressão gênica e a síntese proteica de mediadores produzidos por monócitos, neutrófilos e linfócitos polarizados para os fenótipos pró ou anti-inflamatório (Th1/Th2) e irradiados. Para realização desse estudo, culturas primárias destas células, advindas de coletas de sangue periférico, serão ativadas/polarizadas com LPS ou IL-4 por 2h, lavadas e coletadas para avaliação do espectro de absorção de luz. Posteriormente células (polarizadas ou não) serão irradiadas com o LED escolhido, usando dosimetria determinada por curva dose resposta prévia e então incubadas em estufa a 37°C por 24h, para análise de expressão dos genes IL-1, IL- 6, IL-10, TNF-, IFN-, IL-17 e VEGF por meio de PCR quantitativo e nova análise

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

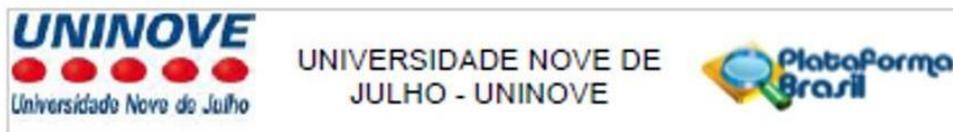
CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comiteetica@uninove.br



Continuação do Parecer: 3.506.430

arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas Individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 Item X1. 2. f).

De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à Instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1373156.pdf	05/08/2019 11:19:39		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	05/08/2019 11:18:30	KALINE DE BRITO SOUSA	Aceito
Outros	Carta.pdf	05/08/2019 10:20:04	KALINE DE BRITO SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	05/08/2019 10:06:40	KALINE DE BRITO SOUSA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 14 de Agosto de 2019

Assinado por:
CHRISTIANE PAVANI
(Coordenador(a))

Figura 37. Parecer e Termo de Aprovação de Comitê de Ética em Humanos

ANEXO 10.3. TABELA 17 - REVISÃO DE ARTIGOS COM FOTBIOMODULAÇÃO EM LEUCÓCITOS HUMANOS

Artigo	Laser/LED e Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Irradiância (mW/cm ²)	Energia Total (J)	Exposição Irradiante (J/cm ²)	Tempo de Irradiação (seg/min)	Tipo de Célula	Objetivo	Resultados
Young et al. 1989	LED (660, 870 e 880) Laser 820	15	120	0,3	2,4	20 s	Monócitos Humanos U-937	Avaliação dos efeitos das diferentes fontes de luz sobre a proliferação dos monócitos e os efeitos dos sobrenadantes colhidos destas culturas sobre fibroblastos	Os sobrenadantes de monócitos tratados com os LEDs 660 nm e 870 nm estimularam a proliferação de fibroblastos, porém o LED de 880 nm mostrou efeito inibitório. Nenhum destes parâmetros de LED modulou a proliferação de monócitos. O laser de 820 nm aumentou a proliferação monócitos e o sobrenadante destes monócitos aumentou a proliferação de fibroblastos
Bolton et al. 1990	LED 660	15	120	0,3 0,6 0,9 1,2	2,4 4,8 7,2 9,6	20 s 40 s 60 s 80 s	Monócitos Humanos U-937	Avaliação dos efeitos dos sobrenadantes de monócitos irradiados com LED 660 nm sobre fibroblastos	O sobrenadante dos monócitos irradiados com 0,9 e 1,2 J aumentaram a proliferação de fibroblastos
Bolton et al. 1991	Laser 820	50 100	400 800	0,3 0,9	2,4 7,2	6 e 18 s 3 e 9 s	Monócitos Humanos U-937	Avaliação dos efeitos dos diferentes parâmetros dosimétricos sobre a proliferação dos monócitos e fibroblastos	O sobrenadante das células irradiadas com 0,3 J (2,4 J/cm ² ; 800 mW/cm ² ; 3 s) e 0,9 J (7,2 J/cm ² , 400 mW/cm ² ; 18 s) estimularam uma proliferação celular estatisticamente nos fibroblastos
Lindgård et al. 2007	LED 634	2500	35700	300 750	4.285,71 10.714,28	2 min 5 min	Monócito humano isolado com Ficoll	Avaliação dos efeitos do LED sobre a produção de NO, ativação de enzimas desta via e liberação de ROS	↓ROS intracelular, ↑NO, não alterou iNOS
Mehrsai et al. 2009	Laser 632.8	5	25,5	1,1	5,6	3 min e 40 seg por dia (dia 3, 5 e 8)	Monócito humano isolado com Ficoll ativado com fitohemaglutinina	Avaliação dos efeitos do Laser sobre a produção das citocinas IL-2, IL-12, TGF-β e IFN-γ	↓Proteínas IL-2, IL-12, TGF-β e IFN-γ
Chen et al. 2014	Laser 660	6	0,8	7,5 15 22,5	1 2 3	1250; 2500; 3750	Monócitos humanos THP-1 ativados com LPS	Avaliação da FBM com 660 nm sobre a expressão gênica e produção proteica de CCL2, CXCL10 e TNFα	Irradiações com 1 e 2 J/cm ² aumentaram a expressão de CCL2, enquanto 3J/cm ² reduziu este gene. Já a expressão de CXCL10 e TNFα foram aumentadas com 1 J/cm ² . Assim como, 1 J/cm ² aumentou a produção proteica de CCL2, CXCL10 e TNFα

Chen et al. 2014	Laser 808	170	44,7	3,8 7,6 11,4	1 2 3	22,4; 44,8; 67,2	Monócitos humanos THP-1 ativados com LPS	Avaliação da FBM com 808 nm sobre a expressão gênica de CCL2, CXCL10 e TNF α	Irradiações com 1 e 2 J/cm ² aumentaram a expressão de CCL2, enquanto 3J/cm ² reduziu este gene. Já expressão de CXCL10 e TNF α foram diminuídas com 808 nm (1 J/cm ²).
Souza et al. 2014	Laser 660	30	76,4	1,8	4.5	60 seg	Monócitos Humanos U-937 ativados com LPS	Efeitos da FBM com 660 nm sobre a produção proteica de TNF α e IL-8	↓Proteínas TNF α e IL-8
Carvalho et al. 2016	Laser 660 nm	30	76,4	1,8	4,5	60 s	Monócitos Humanos U-937 ativados com LPS	Efeitos da FBM com 660 nm sobre a modulação no perfil de monócitos de M1 para M2	↓ TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (gene e proteína), CCL2, CXCL10, ROS e NF- κ B (proteína), HIF-1 α (gene) ↑ IL-10 (gene e proteína), arginase-1 e PGC-1 β (gene) e glutationa/GSH (proteína)
Stadler et al. 2000	Laser 660 nm	120	40	-	0 0,5 1 3 5	-	Linfócitos isolados de sangue Humano	Efeitos da FBM sobre proliferação de linfócitos, formação de radicais livres e peróxidos lipídicos por estas células irradiadas antes ou depois de isolamento do sangue total.	A proliferação de linfócitos, formação de radicais livres e peróxidos lipídicos foram significativamente maiores em amostras irradiadas na presença de sangue total em comparação com os linfócitos irradiados após isolamento
Musawi et al. 2017	Laser 405 nm 589 nm 780 nm	10	30	12, 18, 24, 30	36, 54, 72, 90	20, 30, 40 e 50 min	Linfócitos isolados de sangue Humano	Efeitos da FBM sobre linfócitos humanos e seus precursores	↑ nas contagens de linfócitos com FBM de 589 nm (fluência de 72 J/cm ²). Esta dosimetria confirmou seu efeito na análise de citometria de fluxo, mostrando um ↑ de linfócitos CD45 e células NK (CD16, CD56), mas não houve alterações nos linfócitos TCD3, células supressoras T (CD3, CD8), T-helper (CD3, CD4) e linfócitos B CD19
Fujimake et al. 2003	Laser 830	1000	150	62.7 125,4	9.5 19	30 s 60 s	Neutrófilos isolados de sangue Humano	Efeitos da FBM sobre a produção de ROS e expressão de CD11b e CD16 por citometria de fluxo em neutrófilos isolados de pacientes fumantes	A irradiação reduziu a produção de ROS, sendo que o efeito atenuador da FBM foi maior por neutrófilos de fumantes do que em não fumantes. A expressão de CD11b e CD16 não foi alterada
Cerdeira et al. 2016	Laser 660 780	40	1000 por irradiação	0,24 até 19,2	6 por irradiação	6 a 480 s	Neutrófilos isolados de sangue Humano	Efeitos da FBM sobre a produção de ROS e capacidade fungicida de neutrófilos incubados ou não com <i>C. albicans</i> .	As irradiações foram capazes de excitar os neutrófilos para um perfil funcional mais elevado, ↑ ROS e capacidade fungicida.