

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

TEREZINHA APARECIDA DE ALMEIDA

**EFEITOS DOS LASERS VERMELHO E INFRAVERMELHO SOBRE A ATIVAÇÃO DAS
CÉLULAS RESPONSÁVEIS PELO DIRECIONAMENTO DO REPARO MUSCULAR**

São Paulo, SP

2015

TEREZINHA APARECIDA DE ALMEIDA

**EFEITO DOS LASERS VERMELHO E INFRAVERMELHO SOBRE A ATIVAÇÃO DAS
CÉLULAS RESPONSÁVEIS PELO DIRECIONAMENTO DO REPARO MUSCULAR**

**Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de
Pós- graduação em Ciências da Reabilitação da
Universidade para exame de defesa do curso de
mestrado**

Mestranda: Terezinha Aparecida de Almeida

Orientadora: Prof^a Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

São Paulo, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Terezinha Aparecida de.

Efeito dos lasers vermelho e infravermelho sobre a ativação das células responsáveis pelo direcionamento do reparo muscular./ Terezinha Aparecida de Almeida. 2015.

42 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Profa Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes.

1. Macrófagos. 2. Reparo muscular. 3. Laser.

I. Fernandes, Kristianne Porta Santos.

II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 16 de dezembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

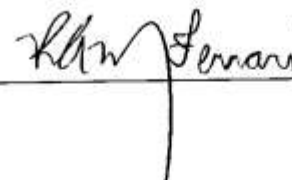
Aluno(a): Terezinha Aparecida de Almeida

Título da Dissertação: "Efeito dos lasers vermelho e infra vermelho sobre a ativação das células responsáveis pelo direcionamento do reparo muscular".

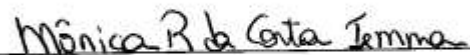
Presidente: PROFA. DRA. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES



Membro: PROFA. DRA. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROFA. DRA. MONICA ROSAS DA COSTA IEMMA



DEDICATÓRIA

*In memoria **Enoch Jonas de Almeida***

Pai, você sempre foi um exemplo de alegria de viver, de luta e de superação. Inspirou-me a ser um ser humano melhor e buscar por meus objetivos de vida.

Só tenho a dizer MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTO

1° A Deus...

*A minha família pelo o apoio e a força para seguir em frente. A minha mãe **Rizalva Almeida**, irmãos **Joselito Almeida** e **Juraci Almeida**, cunhadas **Lúcia** e **Risia** e meu querido sobrinho **Miguel Almeida**. Eu quero agradecer por tudo que já fizeram e dizer o quanto são especiais para mim. Amo todos vocês!*

*Ao meu companheiro e amigo **Boris Júniors López Calizaya**, por tudo que já fez por mim, por me ouvir, por me fazer sorrir e por outras coisas que aprendi com você. Eu Te Amo!*

*Agradeço em especial minha orientadora **Kristianne Porta Santos Fernandes**, pela sua dedicação, paciência e carinho. Você soube despertar a minha admiração e se tornou a minha inspiração. A sua missão vai muito além da missão de um professor.*
Muito Obrigada!

*Aos meus amigos, colegas e companheiros do laboratório da pós- graduação UNINOVE, **Rodrigo Barbosa Oliveira Brito**, **Nadhia Helena Souza**, **Kaline de Brito Sousa**, **Erika Batista** e as alunas de iniciação científica, **Juliana dos Santos Sousa Rocha** e **Tainá Antunes Serafim**.*

*Agradeço também a responsável técnica do Laboratório de Análises Clínicas **Mônica Vieira**.*

*Se consegui ver mais longe é
porque estava aos ombros de gigantes*

(Issac Newton)

Resumo

As interações entre o músculo e os macrófagos que o invadem após a ocorrência da lesão são determinantes para a evolução do reparo deste tecido. Por outro lado, o laser em baixa intensidade (LBI) tem sido muito utilizado no tratamento destas lesões no âmbito clínico e no experimental, mas pouco se conhece a respeito dos seus efeitos sobre os macrófagos. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito da irradiação com laser vermelho e infravermelho sobre o estado de ativação de macrófagos de fenótipo M1 e M2a. Para tanto, culturas de macrófagos J774 foram tratadas com agentes polarizadores (LPS e IFN- γ ou IL-4) por 24h e então irradiadas com LBI em 2 comprimentos de onda 780nm e 660nm nos mesmos parâmetros dosimétricos (70mW; 17,5J/cm²; 0,8J). Após 24h de incubação, o estado de ativação foi verificado por meio da técnica MTT. Em cada situação experimental, células não irradiadas serviram como controle, sendo realizados três experimentos independentes. A irradiação com laser de 780 nm mostrou-se capaz de diminuir a ativação de macrófagos polarizados para fenótipo M1 e aumentar a ativação de macrófagos de perfil M2a. Já a irradiação com laser de 660 nm intensificou ligeiramente o estado e ativação dos macrófagos M1 e aumentou de maneira significativa o estado de ativação de macrófagos de perfil M2a. Embora não se possa estabelecer uma relação entre resultados de estudos *in vitro* e desfechos clínicos futuros e ainda exista necessidade de avaliar os efeitos da irradiação laser nos outros fenótipos de macrófagos, os dados do presente estudo sugerem que os lasers vermelho e infravermelho pode trazer resultados diferentes quando utilizados nas diferentes fases do reparo muscular.

Palavras chave: macrófagos, laser de baixa potência, lesão muscular

Abstract

Interactions between the muscle and macrophages which invade it after an injury occurs are crucial to the evolution of repair in this tissue. On the other hand, low intensity laser (LLLT) has long been used in the treatment of such lesions, both in clinical and experimental settings; however, little is known about its effects on macrophages. The objective of this project was to evaluate the effect of irradiation with red and infrared laser on the activation state of M1 and M2a phenotypes of macrophages. For this purpose, J774 macrophage cultures were treated with polarizing agents (LPS and IFN- γ or IL-4) for 24 hours and were then irradiated with 2 wavelengths of LLLT – 780 nm and 660 nm – in the same dosimetric parameters (70mW; 17.5J/cm²; 0.8J). After 24 hours of incubation, the activation state was checked by MTT technique. In each experimental situation, non-irradiated cells served as controls, and three independent experiments were performed. Laser irradiation with 780 nm proved able to decrease the activation of macrophages polarized for M1 phenotype and increase activation of M2a profile macrophages. Laser irradiation with 660 nm slightly intensified the state and activation of M1 macrophages, while significantly increasing the activation state of M2a profile macrophages. Although it is not possible to establish a relationship between the results of *in vitro* studies and future clinical outcomes, and the effects of laser irradiation on other macrophage phenotypes still need to be assessed, data from this study suggest that red and infrared laser could have different results when used in the different stages of muscle repair.

Key Words: macrophage, low level laser, muscle injury

SUMARIO

LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURA	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	24
3. JUSTIFICATIVA	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Cultura de células	26
4.2 Polarização dos macrófagos para o perfil M1e M2a	26
4.3 Irradiação com laser de baixa intensidade	27
4.5 Grupos experimentais	28
4.6 Avaliação da ativação celular (MTT)	28
4.7 Analise estatística	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Efeito do LBI sobre a ativação de macrófagos de perfil M1	30
5.2 Efeito do LBI sobre a ativação de macrófagos de perfil M2a	31
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Artigos que avaliaram o efeito da luz sobre os macrófagos e monócitos	22
Tabela 2: Parâmetros de comprimento de onda, potência de saída, área de cabeçote, densidade de potência, densidade de energia e tempo de irradiação	27
Tabela 3: Descrição dos Grupos Experimentais	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da polarização dos macrófagos inflamatórios (M1) e anti- inflamatórios/ reparadores (M2). Bosurgi *et al.* 2011_____16
- Figura 2:** Percentual de ativação celular (Método MTT) das células dos diferentes grupos experimentais em relação às células do grupo controle_____30
- Figura 3:** Percentual de ativação celular (Método MTT) das células dos diferentes grupos experimentais. _____31

LISTA DE ABREVIATURA

CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase 2
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E. coli	Escherichia coli
GaAlAs	Arseneto de Gálio-Alumínio
He-Ne	Hélio-Neônio
IFN-γ	Interferon gamma
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina)
IL	Interleucina
INOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico- sintase induzida)
InGaAlP	Alumínio- Gálio- Índio- Fósforo
LBI	Laser em baixa intensidade
LPS	Lipopolissacarídeo
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PGE	Prostaglandina
SFB	Soro fetal bovino

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação de crescimento beta)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de necrose tumoral)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de crescimento endothelial vascular)

1. INTRODUÇÃO

As lesões musculares representam um problema desafiador para as ciências da reabilitação, pois reparam muito lentamente e com frequência apresentam uma recuperação funcional incompleta que pode ainda ser dificultada pela formação de um tecido de cicatrização que contribuirá para sua recorrência (HUARD *et al.*, 2002).

As primeiras fases do reparo das lesões musculares (degeneração e inflamação) duram poucos dias e englobam os processos de destruição da integridade tecidual, formação de edema, extravasamento sanguíneo e invasão tecidual por células imunes, principalmente neutrófilos e macrófagos (HUARD *et al.*, 2002; TIDBALL, 2005).

O desenvolvimento deste processo inflamatório inicial pode ter um efeito benéfico ou deletério no músculo, podendo promover tanto a amplificação da lesão inicial quanto seu reparo. Este direcionamento depende principalmente de três fatores: a magnitude da resposta inflamatória; a história prévia de atividade do músculo; e as complexas interações entre o músculo e as células inflamatórias que o invadem após a ocorrência da lesão (TIDBALL, 2005).

No que concerne às interações entre o tecido muscular e as células inflamatórias, vários autores têm demonstrado que os neutrófilos estão mais ligados à fase degenerativa do processo de reparo por causarem a lise direta da membrana das células musculares principalmente pela liberação de superóxidos (SMITH *et al.*, 1989; NGUYEN & TIDBALL, 2003; TIDBALL, 2005; BOSURGI *et al.*, 2011).

Já os macrófagos têm um papel bem mais complexo, pois além de realizarem a fagocitose dos restos teciduais preparando o tecido para o reparo, sintetizam radicais livres, diversos fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que terão papéis muito importantes na modulação e direcionamento do processo de reparo (GROUNDS, 1987; TEIXEIRA *et al.*, 2003; NGUYEN & TIDBALL, 2003; TIDBALL, 2005; BOSURGI *et al.*, 2011; SACLIER *et al.*, 2013).

Na fase inicial da resposta inflamatória (até 2 dias após a lesão muscular) predominam os macrófagos do fenótipo M1 (CD68+) ou inflamatório. Estes macrófagos produzem

citocinas e enzimas pró-inflamatórias que podem ampliar o dano tecidual. Se não ocorrer sobreposição de agentes lesivos, após aproximadamente 4 dias da ocorrência da lesão, os macrófagos da região lesionada passam a exibir também o perfil M2 (CD163+/CD206+). Nesta fase, estas células passarão a produzir citocinas de caráter antiinflamatório (que irão atenuar a população de macrófagos M1), bem como enzimas e fatores de crescimento que irão estimular a reconstrução do tecido destruído (ARNOLD *et al.*, 2007; TIDBALL & VILLALTA, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011; WEIDENBUSCH & ANDERS, 2012; SACLIER *et al.*, 2013). A figura 1 demonstra esquematicamente os fenótipos e produtos dos macrófagos M1 e M2.

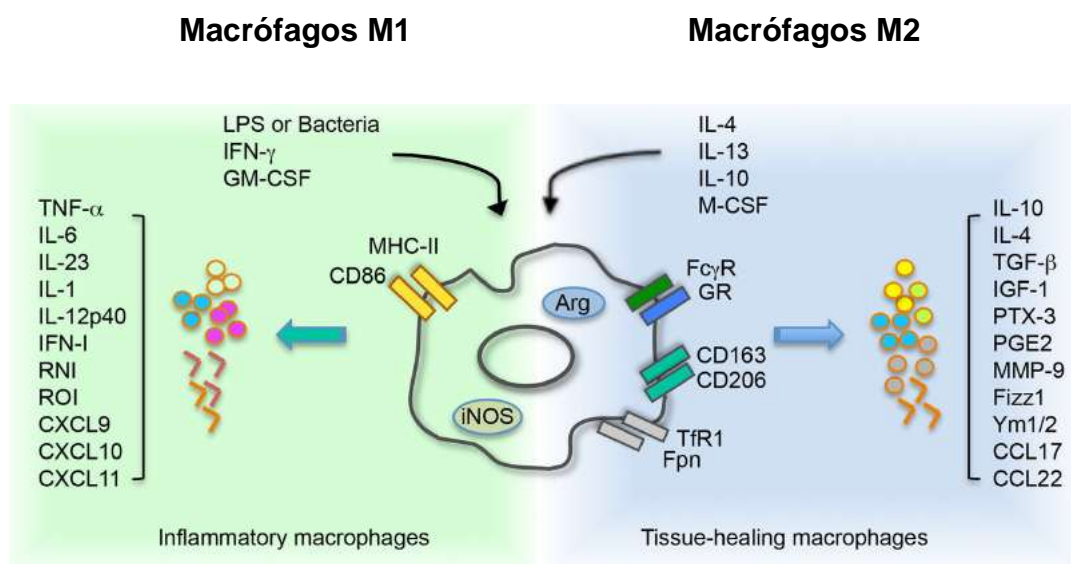


Figura 1: Representação esquemática da polarização dos macrófagos inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios/reparadores (M2). Bosurgi *et al.* Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. 2011

Os macrófagos que exibem o perfil M2 são ainda subdivididos nos fenótipos M2a, M2b e M2c. O fenótipo M2a caracteriza macrófagos ativados por citocinas do padrão TH2 (como a IL-4) e que secretam produtos ligados à síntese de matriz extracelular e angiogênese, sendo comum nos casos de inflamação crônica com fibrose. O perfil M2b (também chamado de regulatório) pode ser induzido pela combinação da ligação dos receptores *Toll* a imunocomplexos sendo comum nos quadros de infecção por parasitas. Já o perfil M2c ou anti-inflamatório pode ser induzido por compostos anti-inflamatórios (IL-10 e corticóides) e induz a produção de citocinas como a IL-10 e o TGF- β (SACLIER *et al.*, 2013).

Esta mudança no fenótipo dos macrófagos de M1 (inflamatório) para M2 (antiinflamatório, reparador) é um evento chave na regeneração muscular e coincide com a mudança do estágio proliferativo para a fase de diferenciação inicial das células precursoras miogênicas (TIDBALL & VILLALTA, 2010; BRIGITTE *et al.*, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011).

A complexidade e a importância dos efeitos dos macrófagos nos quadros inflamatórios gerados por lesões musculares têm evidenciado que eles devem ser considerados como células alvo para as intervenções terapêuticas (TIDBALL & VILLALTA, 2010; BRIGITTE *et al.*, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011; SACLIER *et al.*, 2013).

No âmbito da avaliação experimental das intervenções terapêuticas, o laser em baixa intensidade (LBI) vem demonstrando resultados promissores no tratamento de lesões musculares a mais de duas décadas evidenciando sua capacidade de modular o processo inflamatório (BIBIKOVA & ORON, 1993; BIBIKOVA & ORON, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1999; WEISS & ORON, 1992; LOPES-MARTINS *et al.*, 2006, ALVES *et al.*, 2014). Já os estudos *in vitro* que avaliaram o papel da fototerapia sobre os monócitos e macrófagos são mais escassos e estão sumarizados a seguir.

YOUNG *et al.* (1989) irradiaram culturas de monócitos U-937 com diodos de GaAlAs emissores de luz não coerente pulsada de comprimentos de onda de 660, 870 e 880 nm (15mW, 120mW/cm², 2,4 J/cm², 20 segundos, energia total de 0,3J) e de luz coerente (laser) de 820nm (15mW, 120mW/cm², 2,4 J/cm², 20 segundos, energia total de 0,3J). 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 fototerapia, nos diferentes parâmetros avaliados, não alterou a viabilidade dos mesmos, já o sobrenadante de cultura de monócitos que mais ativou a proliferação de fibroblastos após quatro dias de cultivo foi o irradiado com a luz não coerente de 660nm. Os sobrenadantes derivados de culturas de monócitos irradiadas com luz não coerente de 880 nm geraram 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, mas desta vez usando somente a luz pulsada não coerente de 660 nm (15mW, 120mW/cm²) nas fluências de 2,4; 4,8; 7,2 e 9,6 J/cm² (energias totais de 0,3J, 0,6J, 0,9J e 1,2J) e observou 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 no comprimento de 820nm nas densidades de potência de 400 ou 800 mW/cm² e nas fluências de 2,4 e de 7,2 J/cm² sobre monócitos U937. Os sobrenadantes destes monócitos irradiados foram incubados com fibroblastos e após 4 dias de cultivo, foi verificado que o sobrenadante das células irradiadas com 2,4 J/cm² e 800 mW/cm² (0,3J) gerou uma proliferação celular estatisticamente maior nos fibroblastos do que os sobrenadantes de monócitos tratados com a mesma fluência na densidade de potência de 400 mW/cm² (0,3J) que foi semelhante ao sobrenadante do grupo controle não irradiado. Já na fluência de 7,2 J/cm², a densidade de potência de 400 mW/cm² gerou o melhor estímulo proliferativo para os fibroblastos. Assim, os autores concluíram que para a luz coerente (laser) pulsada os efeitos da irradiação sobre os produtos produzidos pelos macrófagos e aplicados às culturas de fibroblastos, seriam mais efetivos quando da combinação de altas densidades de potência com baixas densidades de energia ou de altas densidades de energia com baixas densidades de potência.

DUBE *et al.* (2003) irradiaram macrófagos peritoneais murinos com laser de 632,8 nm (2,3 mW; 1mW/cm²; 0,01 a 0,06 J/cm²; 10 a 60 segundos; energias totais de 0,023J; 0,046J; 0,069J; 0,092J; 0,115J e 0,138J) e observaram que a atividade da enzima lisozima e o espriamento aumentaram com o aumento da fluência, já a fagocitose, a atividade da catepsina, e a concentração intracelular de NADPH mostraram um pico somente após a

irradiação na fluência de 0,02 J/cm². Neste modelo, foram usadas baixas densidades de potência e baixas densidades de energia e a variação da densidade de energia pareceu exercer efeitos diferentes conforme o desfecho avaliado.

LINDGÅRD *et al.* (2007) avaliaram o efeito da luz não coerente de 634 nm (2,5 W; 35,7 W/cm²; 5 minutos, energia total de 750J) 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 (EROS) intracelulares por monócitos humanos ativados com acetato de forbol miristato (PMA). Os autores observaram que a irradiação resultou em diminuição dos níveis intracelulares de EROS, porém causou 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. Neste estudo, a luz não coerente (não laser) foi utilizada em parâmetro de energia muito alto e que difere de todos os outros autores, além disso, os resultados são conflitantes dificultando o estabelecimento de uma conclusão.

Já GAVISH *et al.* (2008) avaliaram culturas da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 ativadas com lipopolissacarídeo (LPS) e irradiadas com laser de 780nm (2mW/cm², 2,2 J/cm², 18 minutos) evidenciaram que a fototerapia foi capaz de diminuir a expressão dos genes para citocinas pró e anti-inflamatórias (MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) somente quando as células tinham sido ativadas com LPS na concentração de 1 μ g/mL, porém não alterava a expressão do gene para TNF- α . Os autores dosaram somente as proteínas MCP-1 e IL-1 β e observaram que a irradiação laser foi capaz de diminuir a produção de ambas nas células tratadas com LPS nas concentrações de 0,1 μ g/mL e 1 μ g/mL. Neste estudo, os autores observaram diminuição na expressão gênica de algumas citocinas com a irradiação de baixa densidade de energia e baixa densidade de potência, porém a variação na ativação dos macrófagos influenciou a observação dos efeitos do laser, os dados de produção de citocinas foram parciais.

Já em macrófagos murinos provenientes de lavado peritoneal elicitados com tioglicolato, ativados com LPS (10 ng/mL), IFN- γ (20 μ g/mL) e substâncias usadas para a obturação de canais radiculares (material odontológico) e irradiados com laser diodo de

AsGaAl (780nm; 70 mW; 1750 mW/cm²; 3J/cm²; 1,5 segundos por aplicação) foi possível observar após 2 irradiações com intervalo de 6 horas que a produção de TNF- α diminuiu em todos os grupos irradiados, independentemente do tipo de ativação (SOUSA *et al.*, 2009). Neste estudo em particular, o laser foi usado com baixa densidade de energia e alta densidade de potência e o efeito foi positivo no que concerne à modulação da produção de uma citocina inflamatória, porém foi avaliada somente 1 citocina (TNF- α) e os macrófagos foram ativados com substâncias que não são de interesse para a compreensão da reparação do tecido muscular.

MEHRSAI *et al.* (2009) irradiaram monócitos humanos (estimulados ou não com fitohemaglutinina) com laser 632.8nm (5mW; 4J/cm²; 220 segundos/dia; por 7 ou 9 dias) 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 redução significativa na produção de todas as citocinas avaliadas nos grupos ativados e irradiados quando comparados com os grupos somente ativados. Neste estudo, a combinação de baixa densidade de energia e densidade de potência intermediária (~ 26,32mW/cm²) em relação às anteriormente relatadas, mostrou efeitos positivos na redução da produção de citocinas, porém foram realizadas várias aplicações com tempos de aplicação bastante longos, aumentando a quantidade total de energia recebida pelas células.

DE LIMA *et al.* (2010) verificaram o efeito do laser de 660 nm (30 mW; 4,5J/cm²; 252 segundos, energia total de 7,56J) sobre uma linhagem de macrófagos alveolares (AMJ2-C11) ativados com LPS ou H₂O₂ e observaram que a irradiação diminuiu o mRNA para a quimiocina MIP-2 (também chamada CXCL2), a geração de ROS intracelular e do fator NF- κ B nas células ativadas. Neste estudo foi usada baixa densidade de energia, mas não foi informada a densidade de potência, nem a área do cabeçote tornando difícil estabelecer uma comparação.

SOUZA *et al.* (2014) avaliaram o efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial de macrófagos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e interferon- γ (IFN- γ) simulando o fenótipo M1 e que depois foram irradiados com os parâmetros 780nm (70mW, 3J/cm², 1,5s e 0,41J/cm²) e 660nm (15mW, 7,5J/cm², 20s, 1,15J/cm²). Após 24 horas de irradiação, os macrófagos ativados e irradiados com laser de 660nm mostraram AM

semelhante ao grupo ativado e os irradiados com laser de 780 nm exibiram AM menor que o grupo somente ativado. Já após 3 dias de cultivo, os macrófagos ativados e irradiados com laser de 660nm e de 780 nm mostraram AM superior aos somente ativados. Após 5 dias de cultivo, os macrófagos ativados mostraram AM semelhante a dos macrófagos ativados e irradiados com laser de 660nm e de 780nm.

FERNANDES *et al.* (2015) também avaliaram o efeito do LBI sobre a ativação de macrófagos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* e interferon- γ (IFN- γ) simulando o fenótipo M1 e que depois foram irradiados com os parâmetros 780nm (70mW, 3J/cm², 1,5s e 0,41J/cm²) e 660nm (15mW, 7,5J/cm², 20s, 1,15J/cm²). Os autores constataram que os lasers de 660 nm e de 780 nm reduziram fortemente a expressão de RNAm de TNF- α e iNOS e a produção das proteínas TNF- α e COX-2 nas células J774 polarizadas para o perfil M1. Células irradiadas com laser de 660 nm expressaram mais mRNA de IL-6 e produziu mais proteína IL-6 do que as células M1 não irradiadas.

A compilação dos estudos que envolvem macrófagos e a fototerapia evidencia que os parâmetros dosimétricos e os efeitos avaliados até o momento são muito diversos (tabela 1).

Artigos	comprimento de onda (nm)	potência (mW)	densidade de potência (mW/cm ²)	energia total (J)	fluência (J/cm ²)	Célula	efeitos observados (↑=aumento, ↓=diminuição)
Young et al (1989)	LBI 820	15	120	0,3	2,4	monócitos U-937	↑ proliferação monócitos (somente no período de 36h) e o sobrenadante destes monócitos ↑ a proliferação de fibroblastos após 60h
Bolton et al (1990)	LED 660	15	120	0,3 a 1,2	2,4 4,8 7,2 9,6	monócitos U-937	sobrenadante dos monócitos irradiados com 0,9 e 1,2 J ↑ a proliferação de fibroblastos
Bolton et al (1991)	LBI 820	50 e 100	400 e 800	0,3 e 0,9	2,4 e 7,2	monócitos U-937	o sobrenadante dos monócitos ↑ a proliferação de fibroblastos quando da combinação de fluência menor com densidade de potência maior ou o inverso. Quando da combinação de fluência e densidade de potência altas, o resultado sobre a proliferação dos fibroblastos foi inibitório
Dube et al (2003)	LBI 632,8	2,3	1	0,023 a 0,138	0,01 a 0,06	macrófago peritoneal murino	↑espraiamento e ativ lisozima com ↑da fluência, ↑catepsina e NADPH intracelular somente com 0,046J
Lindgård et al (2007)	LED 634	2500	35700	750		monócito humano	↓ROS intracelular, ↑NO, não alterou Inos
Gavish et al (2008)	LBI 780		2		2,2	macrófago murino RAW 264.7 ativado com LPS	↓RNAm para MCP-1, IL-1α, IL-1β, IL-6 e IL-10 não altera RNAm para TNFα. ↓proteínas MCP-1 e IL-1β
Sousa et al (2009)	LBI 780	70	1750	0,21	3	macrófago peritoneal murino + tioglicolato+LPS+IFN _γ	↓ TNFα
Mehrsai et al (2009)	LBI 632.8	5	26,32	1,1	4	monócito humano ativado com fitohemaglutinina	↓proteínas IL-2, IL-12, TGF-β e IFN-γ
De Lima et al (2010)	LBI 660	30		7,56	4,5	AMJ2-C11 macrófago alveolar ativado com LPS ou H ₂ O ₂	↓RNAm para MIP-2 , ↓ ROS intracelular, ↓NF-kB
Souza et al (2014)	LBI 780 LBI 660	70 15	275 57,4	3 7,5	0,41 1,15	macrófagos J774	↓ atividade mitocondrial 1 dia (laser de 780 nm) ↑ativação 3 dias (laser de 660nm e 780 nm)
Fernandes et al (2015)	LBI 780 LBI 660	70 15	275 57,4	3 7,5	0,41 1,15	macrófagos J774	↓RNA m iNOS e TNF-α (lasers de 660 e 780 nm), ↓ TNFα e COX-2 (lasers de 660 e 780 nm), ↑IL-6 RNAm e IL-6 (660 nm)

Tabela 1 - Estudos que avaliaram o efeito da irradiação laser/LED sobre monócitos e macrófagos

A complexidade envolvida na escolha de parâmetros dosimétricos (comprimento de onda, fluência ou densidade de energia, densidade de potência, frequência de pulso, energia total) faz com que as publicações que avaliaram os efeitos do LBI tanto em macrófagos como em diferentes linhagens celulares apresentem resultados muito diversos e por vezes até antagônicos (HUANG *et al.*, 2011; PELOW *et al.*, 2010; PELOW *et al.*, 2011). Além disso, muitas publicações não informam todos os parâmetros utilizados para irradiação ou ainda apresentam erros nos cálculos das doses de energia aplicadas (PELOW *et al.*, 2010; PELOW *et al.*, 2011)

Portanto, ainda faltam muitos dados para entender a modulação exercida pelo LBI nos diferentes tipos celulares, em especial sobre os macrófagos.

2. OBJETIVO

Avaliar, *in vitro*, os efeitos do laser de baixa intensidade em dois parâmetros dosimétricos (780nm; 70mW; 17,5J/cm² e 660nm; 70mW; 17,5J/cm²) sobre ativação de macrófagos polarizados para os fenótipos M1 e M2a.

3. JUSTIFICATIVA

A modulação das diferentes fases do processo de reparo do músculo esquelético se dá principalmente pela mudança no fenótipo e consequentemente pela alteração do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados pelos macrófagos (TIDBALL & VILLALTA, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011; SACLIER *et al.*, 2013).

Por esta razão, os macrófagos são considerados células alvo para as intervenções terapêuticas (TIDBALL & VILLALTA, 2010; BOSURGI *et al.*, 2011; SACLIER *et al.*, 2013).

Por outro lado, na área da reabilitação das lesões musculares, muitos estudos têm evidenciado que o LBI é capaz de modular o processo de reparo muscular tanto em modelos experimentais como em avaliações clínicas (DOURADO *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2011; BAPTISTA *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2013; LEAL JUNIOR *et al.*, 2009; DE ALMEIDA *et al.*, 2012; BARONI *et al.*, 2010) mas ainda não se definiram os parâmetros dosimétricos ideais para esta modulação, principalmente frente aos macrófagos.

Esta avaliação se torna ainda mais importante pelas recentes evidências de que o uso de antiinflamatórios não esteróides poderia comprometer o processo de reparo muscular por inibir a proliferação e ativação de macrófagos e de células precursoras miogênicas (MACKEY *et al.* 2012, SCHOENFELD *et al.* 2012, MACKEY *et al.* 2013)

Já foi demonstrado que a polarização dos macrófagos (perfil M1/M2) obtida *in vitro*, por meio do cultivo destas células com citocinas pró ou antiinflamatórias corresponde a polarização observada *in vivo* durante o processo de reparo do músculo esquelético de humanos. Assim o modelo de ativação de macrófagos *in vitro* é um instrumento importante e fidedigno para avaliar o efeito de um recurso terapêutico sobre estas células e consequentemente sobre o processo de reparo do músculo esquelético (SACLIER *et al.*, 2013).

Assim sendo, este projeto trará informações importantes para esclarecer o mecanismo de ação do LBI vermelho e infravermelho e ainda para justificar a sua escolha no tratamento das lesões musculares que são tão freqüentes na prática clínica.

4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório do Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

4.1 Culturas celulares

Foi utilizada a linhagem de macrófagos J774 (derivada de camundongos) doada pelo Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda. A linhagem J774 deriva de retículo-sarcoma murino e tem sido bastante utilizada para avaliar o efeito de recursos terapêuticos em cultura celular (RALPH *et al.*, 1976; CROSBY *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2014).

As células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e suplementado com L-glutamina 2mM. As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA). O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular ficava subconfluente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante era removido, as células lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4mM; pH 7.4). Após incubação era realizada uma nova lavagem com meio, os macrófagos J774 desaderidos em PBS 1X utilizando um scraper cell, e em seguida as culturas foram centrifugadas a 1200 rpm a 10°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente ressuspensas em 1ml de meio DMEM. Antes de cada experimento, a viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) em câmara de Neubauer. Para os ensaios foram utilizadas somente as culturas com viabilidade maior que 95%.

4.2 Polarização dos macrófagos para o perfil M1 e M2a

As células foram tratadas com LPS de *Escherichia coli* (E. coli) 026: B6 (Sigma, St. Louis, MO) na concentração de 1µ/mL e com IFN-γ (Sigma, St. Louis, MO) na

concentração de 0,2µg/mL e mantidas em DMEM suplementado com 5% de SFB para induzir o perfil M1. Para induzir o fenótipo M2a, as culturas de J774 foram tratadas com IL-4 (Sigma, St Louis, MO) na concentração de 10 ng/mL e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB (BERLATO et al., 2002; KORHONEN et al., 2002; GAVISH et al., 2008; SACLIER et al., 2013). As células do grupo controle não foram tratadas. Todas culturas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂. Após este período, as culturas foram lavadas, desaderidas e centrifugadas a 1200 rpm durante 2 minutos em tubos Falcon de 50 mL para receberem irradiação laser ou serem plaqueadas (conforme descrito a seguir).

4.3 Irradiação com o Laser de Baixa Intensidade (LBI)

As culturas de macrófagos dos diferentes grupos experimentais (descritos a seguir) foram irradiadas 24 horas após a sua polarização utilizando o aparelho Twin-laser (MM Optics, São Carlos - SP - Brasil) que possui dois diodos (InGaAlP emitindo em 660 nm e GaAlAs emitindo em 780 nm) nos parâmetros descritos na Tabela 2. As células do grupo controle e as somente polarizadas sofreram a mesma manipulação, porém não foram irradiadas.

Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Área cabeçote (cm ²)	Densidade de potência (mW/cm ²)	Densidade de energia (J/cm ²)	Tempo (s)	Energia total (J)
780	70	0.04	1750	17,5	14,3	0,8
660	70	0.04	1750	17,5	14,3	0,8

Tabela 2: Parâmetros de comprimento de onda, potência de saída, área de cabeçote, densidade de potência, densidade de energia e tempo de irradiação.

As irradiações foram realizadas em tubos de centrifugação contendo os precipitados celulares, sendo de baixo para cima na extremidade inferior dos tubos, de modo que o feixe do laser atinja diretamente o pellet celular sem passar pelo meio de cultura (conforme descrito anteriormente por FUJIHARA et al., 2006 e avaliado por SILVA et al., 2012). Os experimentos foram realizados em um ambiente com obscuridade parcial para não sofrer interferência da luz externa. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação, mas não foram irradiadas.

4. 4 Grupos experimentais

PERFIL DOS MACRÓFAGOS	GRUPOS	TRATAMENTO
M1	G1	CONTROLE
	G2	M1
	G3	M1 + LASER 660NM
	G4	M1 + LASER 780NM
M2a	G5	CONTROLE
	G6	M2a
	G7	M2a + LASER 660NM
	G8	M2a + LASER 780NM

Tabela 3: Descrição dos grupos experimentais

4.5 Avaliação da ativação celular (MTT)

A metodologia utilizada para avaliação da ativação celular se baseia na habilidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT (3-[4,5- Dimethylthiazol- 2yl]- 2,5 diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue), formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis.

Para os ensaios, após a irradiação com o LBI, as células (1×10^4) foram incubadas em placas de 96 poços e mantidas em DMEM (5% SFB) por 24 horas. Após esse período as culturas foram lavadas com 100µL de PBS e tratadas com MTT (0,5 µg/mL) (Thiazolyl Blue – Sigma) e incubados a 37°C em estufa úmida a 5% de CO₂ por 4 horas. Decorrido este período de incubação foi adicionado 100µL de isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado e foi realizada a leitura da absorbância a 620nm com auxílio de um leitor de placas (i3 SpectraMax, Califórnia, EUA).

4.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes de forma independente. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software Instat 3, sendo considerado nível de significância de 5%. A normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov & Smirnov. Os dados com distribuição normal foram comparados pelo teste T test (com correção de Welch) e os não paramétricos foram comparados pelo teste Mann-Whitney.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do LBI sobre a ativação de macrófagos de perfil M1

Os macrófagos tratados com LPS e IFN- γ (indução de fenótipo M1) exibiram um estado de ativação maior ($p < 0,0001$; teste T com correção de Welch) que os que foram cultivados somente com meio de cultivo (controle). A irradiação com laser vermelho (660 nm) não foi capaz de alterar o estado de ativação dos macrófagos M1 ($p = 0,1315$; teste Mann-Whitney), já a irradiação com laser infravermelho (780 nm) promoveu redução no estado de ativação dos macrófagos M1 ($p < 0,0001$; teste T com correção de Welch). O estado de ativação dos macrófagos M1 irradiados com laser de 780 nm também foi menor do que a dos macrófagos M1 irradiados com laser de 660 nm ($p < 0,0001$; teste Mann-Whitney).

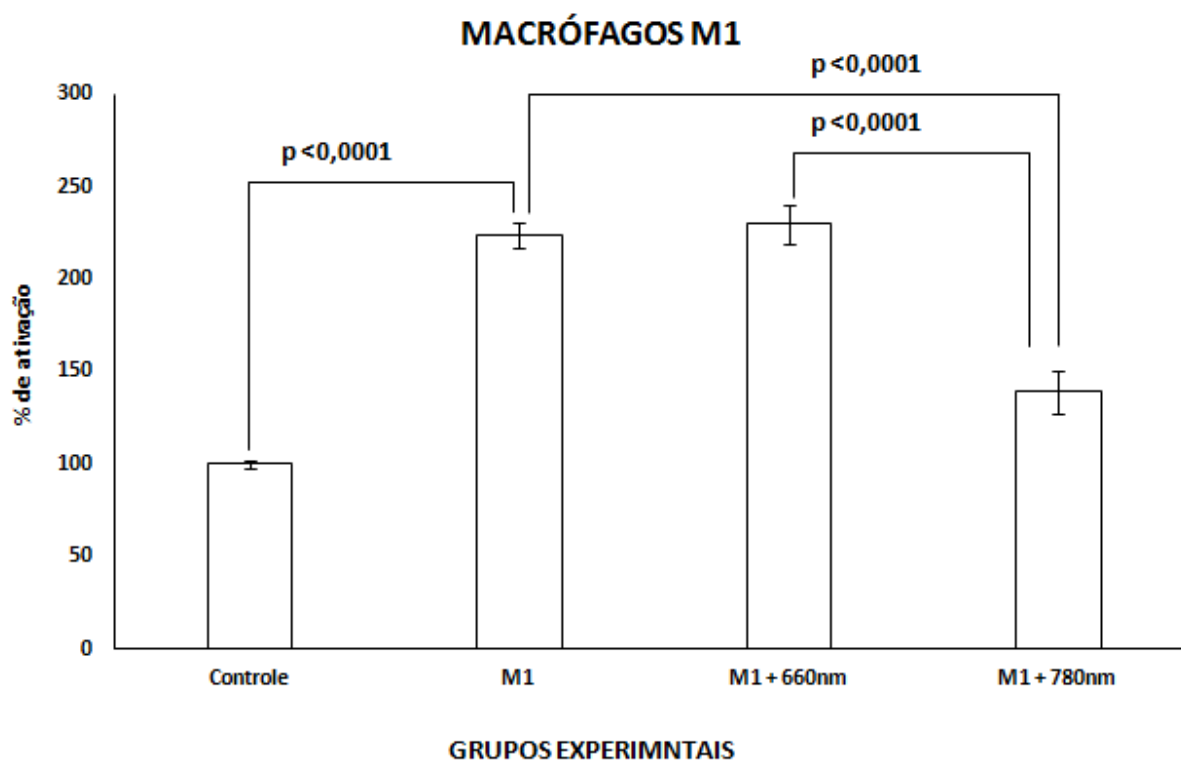


Figura 2: Percentual de ativação celular (método MTT) das células dos diferentes grupos experimentais em relação às células do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão.

5.2. Efeito do LBI sobre a ativação de macrófagos de perfil M2a

Os macrófagos tratados com IL-4 (indução de fenótipo M2a) exibiram um estado de ativação maior ($p < 0,0001$; teste T com correção de Welch) que os que foram cultivados somente com meio de cultivo (controle). Tanto a irradiação com laser vermelho (660 nm) como a com laser infravermelho (780 nm) aumentaram o estado de ativação dos macrófagos M2a ($p = 0,0224$ e $p < 0,0001$ respectivamente; teste T com correção de Welch). Não houve diferença entre o estado de ativação dos macrófagos M2a irradiados com laser de 780 nm e os macrófagos M2a irradiados com laser de 660 nm ($p = 0,1991$; teste T com correção de Welch).

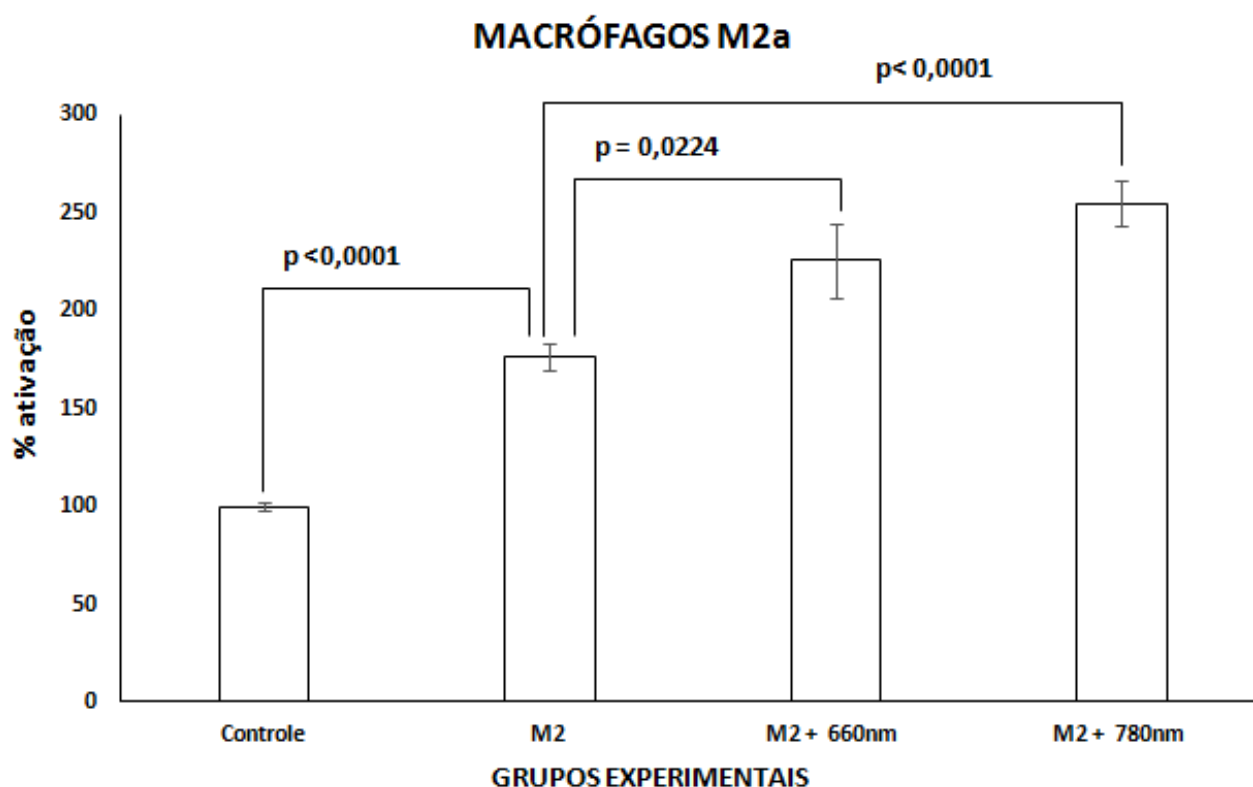


Figura 3: Percentual de ativação celular (método MTT) das células dos diferentes grupos experimentais em relação às células do grupo controle. Valores expressos em média \pm erro padrão.

6. DISCUSSÃO

Em revisão sistemática recente, concluiu-se que o LBI pode ser considerado um recurso terapêutico eficaz no tratamento de lesões musculares (Alves *et al.* 2014). Mesmo considerando que existem diferenças no processo de reparo dependendo do tipo de lesão (MACKEY *et al.*, 2012), já foi relatado que o LBI parece alterar o tecido muscular lesionado, sendo capaz de reduzir o influxo de neutrófilos, o edema, a mionecrose, a produção de óxido nítrico, a expressão de TNF- α , TGF- β , iNOS, IL-1 β , COX-1 e COX-2, a deposição de colágeno tipo I, os níveis teciduais de creatino-quinase (CK), de malondialdeído (MDA), hidroxiprolina e de superóxido dismutase (SOD) e os níveis plasmáticos de PGE2 nos primeiros dias após as lesões (BARBOSA *et al.*, 2008; CRESSONI *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2013; DE ALMEIDA *et al.*, 2013).

Já em períodos mais longos (7 ou mais dias após a lesão), a irradiação laser nos tecidos musculares lesionados demonstrou aumentar a proliferação de células satélites, o diâmetro das fibras musculares, o número de vasos sanguíneos, a deposição e organização de colágeno, e a expressão de fatores de crescimento, de VEGF (14 e 21 dias), de Miogenina (21 dias) e de MyoD (7, 14 e 21 dias). Também foi relatado que o LBI induziu a diminuição da área lesionada, da fibrose, da expressão de TNF- α , de COX-2, de IL-1 β , de miogenina (7 dias), de VEGF (7 dias) e de TGF- β e da imunomarcagem de COX-2 e de IGF-I (NAKANO *et al.*, 2009; BAPTISTA *et al.*, 2011; MESQUITA-FERRARI *et al.*, 2011; RENNO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; BRUNELLI *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Ações distintas temporalmente indicam que o LBI seria capaz de modular as células que orquestram o processo de reparo muscular, e que por esta razão, são consideradas

células alvo para as intervenções terapêuticas, ou seja, os macrófagos (TIDBALL & VILLALTA 2010, BOSURGI et al. 2011, SACLIER et al. 2013).

Os poucos estudos que avaliaram o efeito da laserterapia em macrófagos têm diferenças metodológicas significativas, especialmente no que se refere a parâmetros dosimétricos e ao estado de ativação das células usadas (tabela 1). O estado de ativação de macrófagos direciona a transição de fenótipo e a orquestração do reparo (MOKARRAM et al. 2014, MILLS et al. 2012, MARTINEZ et al. 2014, SACLIER et al. 2013, NOVAK et al. 2013, WEIDINBUSCH et al. 2012, TIDBALL & VILLALTA 2010, BOSURGI et al. 2011). Assim, entender como a fotobiomodulação pode influenciar a função e a ativação destas células é essencial para escolher os melhores regimes terapêuticos (Fernandes et al 2015).

De fato, a complexidade envolvida na escolha de parâmetros dosimétricos (comprimento de onda, fluência ou densidade de energia, densidade de potência, frequência de pulso, energia total) faz com que as publicações que avaliaram os efeitos do LBI tanto em macrófagos como em diferentes linhagens celulares apresentem resultados muito diversos e por vezes até antagônicos (HUANG et al. 2011, PELOW et al. 2010, PELOW et al. 2011). Além disso, muitas publicações não informam todos os parâmetros utilizados para irradiação ou ainda apresentam erros nos cálculos das doses de energia aplicadas (PELOW et al. 2010, PELOW et al. 2011).

Este estudo buscou colaborar no preenchimento desta lacuna, avaliando os efeitos do LBI em 2 parâmetros dosimétricos distintos, utilizando um modelo *in vitro* de polarização dos macrófagos (por meio do cultivo com estas células com produtos pró ou anti-inflamatórias) que corresponde a polarização observada *in vivo* durante o processo de reparo do músculo esquelético de humanos (SACLIER et al. 2013).

Como a mitocôndria exerce um efeito modulatório crucial nas vias de ativação dos macrófagos (EMRE & NÜBEL 2010) e quando o macrófago é ativado por meio de um estímulo inflamatório (ex: LPS+IFN γ), esta organela amplifica a via MAPK aumentando a produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios, a técnica MTT, utilizada neste estudo, é capaz de avaliar a atividade mitocondrial e refletir diretamente o estado de ativação celular (GERLIER & THOMASSET 1986; EMRE & NÜBEL 2010).

Diante dos resultados expostos foi possível observar que o laser de 780 nm foi capaz de diminuir o estado de ativação dos macrófagos de perfil M1, porém o laser de 660 nm causou um ligeiro aumento (não significativo) sobre estado de ativação destas células.

Estes dados são coerentes com os resultados apontados por SOUZA et al. (2014) que avaliaram o efeito das irradiações laser de 660 e de 780 nm (780nm; 70 mW; 3J/cm² e 660nm; 15mW; 7,5J/cm²) sobre o estado de ativação de macrófagos J774 polarizados para o perfil M1. GAVISH *et al.* (2008), SOUSA *et al.* (2009) e FERNANDES *et al.* (2015) também descreveram a diminuição da produção produtos de perfil M1, após irradiação de macrófagos ativados para o perfil M1 com lasers de 660 e de 780 nm.

Não foi possível encontrar na literatura nenhum estudo que descreve-se o papel da laserterapia sobre a ativação de macrófagos de perfil M2a, assim os dados deste estudo são inéditos e evidenciaram que ambas irradiações foram capazes de aumentar o estado de ativação dos macrófagos M2a.

Um recurso capaz de minimizar o estado de ativação de macrófagos de fenótipo M1 poderia minimizar o dano tecidual gerado pela ativação muito intensa destas células no período inicial do reparo (NGUYEN & TIDBALL 2003; TIDBALL 2005; BOSURGI et al., 2011). Do mesmo modo, a ativação de macrófagos de perfil M2a, poderia potencializar os efeitos coordenados por estas células na fase de reconstrução tecidual, ou seja, a síntese

da matriz extracelular, a angiogênese e a fibrogênese (SACLIER *et al.*, 2013; TIDBALL & VILLALTA 2010). Deste modo, como já sugerido por FERNANDES *et al* (2015), a irradiação laser ideal seria a mais eficiente em cada fase do processo de reparo muscular.

Embora, o modelo de ativação de macrófagos usado pode ser considerado um instrumento importante e fidedigno para avaliar o efeito de um recurso terapêutico sobre estas células e conseqüentemente sobre o processo de reparo do músculo esquelético (SACLIER *et al.* 2013), deve-se considerar, logicamente, que não é possível estabelecer uma correlação direta dos resultados obtidos *in vitro* com os desfechos clínicos futuros. Mas é muito importante conhecer previamente o efeito do LBI e dos demais recursos terapêuticos sobre cada tipo celular que compõe o tecido muscular, para podermos propor protocolos *in vivo* que modulem mais efetivamente o processo de reparo deste tecido.

7. CONCLUSÃO

A irradiação com laser de 780nm mostrou-se capaz de diminuir a ativação de macrófagos polarizados para fenótipo M1 e aumentar a ativação de macrófagos de perfil M2a. Já a irradiação com laser de 660 nm intensificou ligeiramente o estado e ativação dos macrófagos M1 e aumentou de maneira significativa o estado de ativação de macrófagos de perfil M2a. Embora não se possa estabelecer uma relação entre resultados de estudos in vitro e desfechos clínicos futuros e ainda exista necessidade de avaliar os efeitos da irradiação laser nos outros fenótipos de macrófagos, os dados do presente estudo sugerem que os lasers vermelho e infravermelho pode trazer resultados diferentes quando utilizados nas diferentes fases do reparo muscular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; MELO, C.A.V.; YAMAGUCHI, R.Y.; FRANÇA, C.M.; TEIXEIRA, D.F.; BUSSADORI, S.K.; NUNES, F.D.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. **Lasers Med Sci.** 2013 Aug 28 [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s10103-013-1428-9.

ALVES, A. N.; FERNANDES, K.P.S.; DEANA, AM; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA- FERRARI, R.A.. Effect of low level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review.**American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation.**v93,p.1073-1085,2014.

ASSIS, L; MORETTI, A.I.S; ABRAHÃO, T. B.; CURY, V.; SOUZA, H. P.; HAMBLIM, M. R.; PARIZOTTO, N.A.. Low- level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers surg med.**v. 44, p.726-35, 2012.

ASSIS, L.; MORETTI, A.I.; ABRAHÃO, T.B; DE SOUZA, H.P.; HAMBLIM, M.R.; PARIZOTTO, N.A. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Med Sci.**v.28, n.3, p.947-55, 2013.

ARNOLD, L.; HENRY, A.; PORON, F.; BABA-AMER, Y.; VAN ROOIJEN, N.; PLONQUET, A.; GHERARDI, R.K.; CHAZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med.**; v.204, n.5, p.1057-69, 2007.

BAPTISTA, J.; MARTINS, M.D.; PAVESI, V.C.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.; PINTO JUNIOR, D. DOS S., FERRARI, R.A. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. **Photomed Laser Surg.** v.29, n.1, p.11-7, 2011.

BARBOSA, A.M.; VILLAVARDE, A.B.; GUIMARAES-SOUZA, L.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by Bothrops jararacussu snake venom. **Toxicon.** v.51, n.7, p.1236-44, 2008.

BARBOSA, A.M.; VILLAVARDE, A.B.; SOUSA, L.G.; MUNIN, E.; FERNANDEZ, C.M.; COGO, J.C.; ZAMUNER, S.R. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. **Photomed Laser Surg.** v.27, n.4, p.591-7, 2009.

BARONI, B.M.; LEAL JUNIOR, E.C.; DE MARCHI, T.; LOPES, A.L.; SALVADOR, M.; VAZ, M.A. Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans. **Eur J Appl Physiol.** v.110, n.4, p.789-96, 2010.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. **Anat Rec.** v.235, n. 3, p.374-80, 1993.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec.**v.241, n. 1, p.123-8, 1995.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy: a dose response study. **Laser Ther.** v.2, n.3, p.101-6, 1990.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy with varying power and energy densities. **Laser Ther.**v.3, p.105-11, 1991.

BOSURGI, L.; MANFREDI, A.A.; ROVERE-QUERINI, P. Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. **Front Immunol.** v.2, p.62, 2011.

BRIGITTE, M.; SCHILTE, C.; PLONQUET, A.; BABA-AMER, Y.; HENRI, A.; CHARLIER, C.; TAJBAKHSH, S.; ALBERT, M.; GHERARDI, R.K.; CHRÉTIEN, F. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. **Arthritis Rheum.** v.62, n.1, p.268-79, 2010.

BRUNELLI, R. M.; RODRIGUES, N.C.; RIBEIRO, D.A.; FERNANDES, K.; MAGRI, A.; ASSIS, L.; PARIZZOTO, N.A.; CLIQUET, A. J.; RENNO, A.C.; ABREU, D.C. The effects of 780-nm low-level laser therapy on muscle healing process after cryolesion. **Lasers Med Sci.** v.29, n.1, p.91-6, 2014.

CABANE, C.; ENGLARO, W.; YEOW, K.; RAGNO, M.; DÉRIJARD, B. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 284, p.658-66, 2003.

CRESSONI, M.D. C.; GIUSTI, H. H. k. D.; CASAROTTO, R. A.; ANARUMA, C.A. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. **Photomed Laser Surg.** 26: 461-66.2008

CROSBY L; CASEY W; MORGAN K; NI H; YOON L; EASTON M; MISUKONIS M; BURLESON G; GHOSH D.K. Murine J774 macrophages recognize LPS/IFN-g, non-CpG DNA or two-CpG DNA-containing sequences as immunologically distinct. **Nitric Oxide.** v.22, n.3, p.242-57, 2010.

DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R.A., DE MARCHI, T.; TOMAZONI, S.S.; ALBERTINI, R.; CORRÊA, J.C.; ROSSI, R.P.; MACHADO, G.P.; DA SILVA, D.P.; BJORDAL, J.M.; LEAL JUNIOR, E.C. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? **Lasers Med Sci.** v.27, n.2, p.453-8, 2012.

DE ALMEIDA, P.; LOPES- MARTINS, R.Á.; TOMAZONI, S.S.; ALBUQUERQUE- PONTES, G.M.; SANTOS, L.A.; VANIN, A.A.; FRIGO, L; VIEIRA, R.P.;ALBERTINI, R.; DE CARVALHO, P. DE T.; LEAL- JUNIOR, E. C. Low-level laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. **Photochem Photobiol.** v.89, n.2, p.501-7, 2013.

DE LIMA, F.M.; VILLAVERDE, A.B.; ALBERTINI, R.; DE OLIVEIRA, A.P.; FARIA NETO, H.C.; AIMBIRE, F. Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) mRNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. **Photomed Laser Surg.** v.28, n.6, p.763-71, 2010.

DE SOUZA, T.O.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; DOS SANTOS PINTO JR., D. ; CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.; MARTINS, M.D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Med Sci.** v.26, n.6, p.803-14, 2011.

DOURADO, D.M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; DA CRUZ-HOFLING, M.A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops Moojeni snake venom. **Lasers Surg Med.** v.33, n.5, p.352-7, 2003.

DUBE, A.; BANSAL, H.; GUPTA, P.K. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. **Photochem Photobiol Sci.** v.2, n.8, p.851-5, 2003

EMRE Y, NÜBEL T. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. **FEBS Lett.** 2010; 584 (8):1437-42.

FERNANDES, K.P.S.; ALVES, A.N.; NUNES, F.D.; SOUZA, N.H.C.; JUNIOR, J.A.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. **Lasers Med Sci.** v.28, n.3, p.1043-6, 2013.

FERNANDES, K. P.S.; SOUZA N.H.; MESQUITA- FERRARI, R.A.; SILVA, D.F.; ROCHA, L.A.; ALVES A.N.; SOUSA, K.B.; BUSSADORI, S. K.; HAMBLIM, M. R.; NUNES, F. D. Photobiomodulation with 660-nm and 780-

nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B*. 2015 Oct 20;153:344-351.

FUJIHARA, N.A.; HIRAKI, K.R.; MARQUES, M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. v.38, n.4, p.332-6, 2006.

GAVISH, L.; PEREZ, L.S.; REISSMAN, P.; GERTZ, S.D. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. *Lasers Surg Med*. v.40, n.5, p.371-8, 2008.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods*. 1986; 94 (1–2): 57-63.

GROUND, M.D. Phagocytosis of necrotic muscle in muscle isografts is influenced by the strain, age, and sex of host mice. *J Pathol*. v.153, p.71–82, 1987.

GROUND, M.D.; WHITE, J.D.; ROSENTHAL, N.; BOGOYEVIATCH, M.A. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem*. v.50, n.5, p.589-610, 2002.

HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. v.9, n.4, p.602-18, 2011.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F.H. Muscle injuries and repair: current trends in research, *J. Bone Joint Surg. Am*. v.84-A, p.822–32, 2002.

LINDGARD, A.; HULTEN, L.M.; SVENSSON, L.; SOUSSI, B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from 1 human monocytes. *Lasers Med Sci*. v.22, n.1, p.30-6, 2007.

LIU, X.G.; ZHOU, Y.J.; LIU, T.C. Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise. *Photomed Laser Surg*. 27;6: 863-9, 2009.

LEAL JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; BARONI, B.M.; DE MARCHI, T.; ROSSI, R.P.; ROSSELLI, D.; GENEROSI, R.A.; DE GODOI, V.; BASSO, M.; MANCALOSS, J.L.; BJORDAL, J.M. Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. *Photomed Laser Surg*. v.27, n.4, p.617-23, 2009.

LOPES-MARTINS, R.A.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANTI, A.C. Jr.; MUSCARA, M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol*. v.101, n.1, p.283-8, 2006.

LUO, L.; SUN, Z.; ZHANG, L.; LI, X.; DONG, Y.; LIU, T.C. Effects of low-level laser therapy on ROS homeostasis and expression of IGF-1 and TGF- β 1 in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. v.28, n.3, p.725-34, 2013.

MACKEY, A.L.; MIKKELSEN, U.R.; MAGNUSSON, S.P.; KJAER, M. Rehabilitation of muscle after injury - the role of anti-inflammatory drugs. *Scand J Med Sci Sports*. v.22, n.4, p.e8-14, 2012.

MACKEY, A.L. Does an NSAID a day keep satellite cells at bay? *J Appl Physiol*. v.115, n.6, p. 900-8, 2013.

MCFARLANE, C.; HENNEBRY, A.; THOMAS, M.; PLUMMER, E.; LING, N.; SHARMA, R.; KAMBADUR, R. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res*. v.314, p.317-29, 2008.

MESQUITA-FERRARI, R.A.; MARTINS, M.D.; SILVA Jr., J.A.; DA SILVA T.D.; PIOVESAN, R.F.; PAVESI, V.C.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci*. v.26, n.3, p.335-40, 2011.

- MEHRSAI, A.; AFSHARPAD, M.; AFSHARPAD, M. MOHYDIN, M.; ANSARI, B.; POURMAND, G.; NIKBIN, B. The effect of low-level helium-neon (HeNe) laser radiation on the secretion of cytokines that promote chronic graft rejection- An in vitro study. **Medical Laser Application**. v.24, p.194–200, 2009.
- MOKARRAM, N.; BELLAMKONDA, R. A perspective on immunomodulation and tissue repair, **Ann. Biomed. Eng.** v 42, p338-351, 2014.
- MILLS, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease, **Crit. Rev. Immunol.** V. 32, p 463-488, 2012.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, **F1000Prime Rep.** v 3, p 6-13, 2014.
- NAKANO, J.; KATAOKA, H.; SAKAMOTO, J.; ORIGUCHI, T.; OKITA, M.; YOSHIMURA, T. Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol*. v.94, n.9, p.1005-15, 2009.
- NGUYEN, H.X.; TIDBALL, J.G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. **J Physiol**. v.547, n.1, p.125-32, 2003.
- NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Macrophage phenotypes during tissue repair, **J. Leukoc. Biol.** v 93, p 875-881, 2013.
- OLIVEIRA, N.M.; PARIZZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg Med**.v.25, n.1, p.13-21, 1999.
- PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**. v.28, Suppl 1:S3-40, 2010.
- PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; RYAN, B.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**. v.29, n.5, p.285-304, 2011.
- RALPH P; MOORE M.A; NILSSON K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. **J Exp Med**.v.143, n.6, p.1528-33, 1976.
- RENNÓ, A.C.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.P.S.; BOSSINI, P.S.; DE OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.; RIBEIRO, D.A. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. *Photomed Laser Surg*. v. 29, n.1, p.5-10, 2011.
- RODRIGUES, N.C.; BRUNELLI, R.; DE ARAÚJO, H.S.; PARIZOTTO, N.A.; RENNÓ, A.C. Low-level laser therapy (LLLT) (660nm) alters gene expression during muscle healing in rats. *J Photochem Photobiol B*. v.120, p.29-35, 2013
- SACLIER, M.; YACOUB-YOUSSEF, H.; MACKEY, A.L.; ARNOLD, L.; ARDJOUNE, H.; MAGNAN, M.; SAILHAN, F.; CHELLY, J.; PAVLATH, G.K.; MOUNIER, R.; KJAER, M.; CHAZAUD, B. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. **Stem Cells**. v.31, n.2, p.384-96, 2013.
- SCHOENFELD, B.J. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for exercise-induced muscle damage: implications for skeletal muscle development. **Sports Med**. v.42, n.12, p.1017-28. 2012.
- SILVA, D.F.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; FERNANDES, K.P.; RAELE, M.P.; WETTER, N.U.; DEANA, A.M. Effective transmission of light for media culture, plates and tubes. **Photochem Photobiol**. v.88, n.5, p.1211-6, 2012.

- SILVEIRA, P.C.L.; DA SILVA, L.A.; FRAGA, D.B.; FREITAS, T.P.; STRECK, E.L.; PINHO, R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B*. v.95, p.89-92, 2009.
- SILVEIRA, P.C.L.; SILVA, L.A.; PINHO, C.A.; DE SOUZA, P.S.; RONSANI, M.M.; SCHEFFER, D.D.L.; PINHO, R.A. Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med Sci*. v.28, n.2, p.431-6, 2013.
- SMITH, J.; GRISHAM, M.; GRANGER, N. AND KORTHUIS, R. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 256, p. H789–93, 1989.
- SOUZA L.R. CAVALCANTI, B.N.; MARQUES, M.M. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg* 2009 Feb;27(1):37-42.and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg*. v.27, n.1, p.37-42, 2009.
- SOUZA, T.O.; MESQUITA, D.A.; FERRARI, R.A.M.; DOS SANTOS, D. J.; CORREA, L.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S.; MARTINS, M.D. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci*. v, 26. n, 6. p, 803-14, 2011.
- SOUZA, N.H.C.; FERRARI, R.A.M.; SILVA, D.F.T.; NUNES, F.D.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S.; Effect of low- level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. p 308-314. 2014
- TANNU, N.S.; RAO, V.K.; CHAUDHARY, R.M.; GIORGIANNI, F.; SAEED, A.E.; GAO, Y.; RAGHOW, R. Comparative Proteomes of the Proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program. *Mol Cell Proteomics*. p.1065-82, 2004.
- TEIXEIRA, C.F.P.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; CRUZ- HOFLING, M.A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F. AND GUTIERREZ, J.M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve*. v. 28, p.449–59, 2003.
- TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v.288, n.2, p. R345-53, 2005.
- TIDBALL, J.G.; VILLALTA, S.A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v.298, n. 5, p. 1173-87, 2010.
- WEIDENBUSCH, M.; ANDERS, H.J. Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. *J Innate Immun*. v.4, n.5-6, p.463-77, 2012.
- WEISS, N.; ORON U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol*. (Berl) v.186, n.5, p.497-503, 1992.
- YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS , C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med*. v.9, n.5, p. 497-505, 1989.

Full length article

Authors: Ms. Terezinha Almeida; Raquel Mesquita-Ferrari; Kaline Sousa, Sandra Bussadori; Kristianne Fernandes.

Dear Dr. K Fernandes,

Thank you for submitting your manuscript entitled " EFFECT OF RED AND INFRARED LASERS ON THE ACTIVATION OF THE CELLS RESPONSIBLE FOR MUSCLE REPAIR " to BMC Complementary and Alternative Medicine.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial System as an author.

Your manuscript will be given a reference number shortly, at which time you will receive a further e-mail.

Kind regards,

Editorial Office
BMC Complementary and Alternative Medicine

For further assistance, please visit our customer support site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.