



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

**KALINE DE BRITO SOUSA**

**“EFEITO DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE A EXPRESSÃO**  
**GÊNICA E PROTEICA DE MEDIADORES DE MACRÓFAGOS J774 INDUZIDOS**  
**A DIFERENCIAÇÃO”**

**São Paulo, SP**

**2016**



**KALINE DE BRITO SOUSA**

**“EFEITO DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE A EXPRESSÃO  
GÊNICA E PROTEICA DE PRODUTOS DE MACRÓFAGOS J774 INDUZIDOS A  
DIFERENCIAÇÃO”**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade  
Nove de Julho para obtenção do título de Mestre em  
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

**São Paulo, SP**

**2016**

Sousa, Kaline de Brito.

Efeito do laser em baixa intensidade sobre a expressão gênica e proteica de mediadores de macrófagos J774 induzidos a diferenciação. Kaline de Brito Sousa. 2016.

105 f.

Dissertação (Mestrado)—Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

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

1. Macrófagos. 2. Processo inflamatório. 3. Laser em baixa intensidade. 4. Reparo tecidual.

I. Fernandes, Alessandro M. de.

II. Título.

CDU 615.831

Sao Paulo, 13 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVA/AO

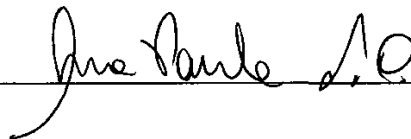
Aluna: KALINE DE BRITO SOUSA

Titulo da Dissertação: "Efeito do laser em baixa intensidade sobre a expressão gênica e proteica de produtos de macrófagos J774 induzidos a diferenciação"

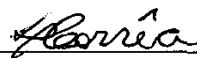
Presidente: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>^</sup>. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES




Membro: PROF<sup>o</sup> DR<sup>o</sup>. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Membro: PROF<sup>o</sup> DR<sup>o</sup>. LUCIANA CORRÊA



## DEDICATÓRIA



*Dedico ao meu sobrinho, **Heitor Rodrigues de Brito**, por ser essa  
pessoinha tão especial que eu tanto amo. Por você eu tenho essa imensa  
vontade de continuar, de me dedicar, de superar obstáculos, de vencer. E  
ainda que tenhamos longos meses de ausência um do outro, assim mesmo,  
sempre haverá uma constante presença na minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pelo dom da vida, por todas as oportunidades que tem colocado em minha vida, pela conclusão de mais uma etapa como este mestrado e por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

Aos meus pais, **Carlinho de Sousa Balbino** e **Maria Anunciada de Brito Sousa**, por serem modelos de coragem, por todo amor incondicional, dedicação, carinho, paciência, pelo imenso apoio contribuído nos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. Por sempre fazerem o possível e o impossível para me ver feliz. Nunca farei o suficiente para retribuir tudo que fizeram por mim. Muito obrigada, eu amo muito vocês!

Ao meu irmão, **Cailan Sousa** e minha cunhada **Layla Rodrigues**, por todo amor, carinho, compreensão e dedicação que foram essenciais para concretização desta fase importante em minha vida. Pois, a seus modos, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho.

Ao meu sobrinho, **Heitor Rodrigues de Brito**, pela emoção inexplicável que me permite ter, em ser tia de uma criança tão linda, amável e encantadora quanto você meu Heitorzinho. Desde que nasceu, você ilumina meu coração com a luz mais bela e perfeita, a luz do amor. TE AMO HEITOR!

À minha querida professora e orientadora **Dr<sup>a</sup> Kristianne Porta Santos Fernandes**, por ter aceitado o desafio de me orientar, pela forma segura e brilhante como o fez, por suas colocações de alto nível, pelas lições de vida, pela compreensão, dedicação, carinho, paciência. Agradeço a confiança depositada em mim mesmo quando eu não acreditava, todos os conselhos, todo o apoio, por todos os ensinamentos. Por sempre cuidar de mim com tanto carinho, nos momentos mais difíceis sempre estava ao meu lado me dando forças para continuar, me incentivando e lutando junto comigo para que eu não desistisse. Tenho muito orgulho em dizer que tive a oportunidade de ser orientada por uma pessoa tão especial pela qual tenho imenso amor e carinho. Muito obrigada!

À minha madrinha, amiga e tutora **Tatiana Dias Schalch**, por todos os ensinamentos, os conselhos, os pontos de vista, pelos cuidados, pelas broncas que sempre me acrescentaram e que eu agradeço muito. Tati, sempre foi tão presente no desenvolvimento deste trabalho, **me inspira a querer ser muito mais que fui até hoje**. Eu diria que, o seu apoio foi fundamental para que me mantivesse firme até o final, pois, todo início temos um pouco de dificuldade, e você tão experiente e tão decidida sempre estava ao meu lado me ajudando, me aconselhando e retribuindo amor e carinho. Muitíssimo obrigada Tati!

À minha querida amiga e conselheira **Katia do Vale**, por estar sempre ao meu lado quando eu mais precisei, por ser essa pessoa tão meiga e querida por todos. Katia, em poucas palavras não tenho como agradecer tudo que fizestes por mim, todos os ensinamentos, todas as conversas, paciência, atenção, por esse carinho de mãe que eu sempre pude contar. Muito obrigada!

Aos professores, **Dr<sup>a</sup> Raquel Agnelli Mesquita Ferrari e Dr<sup>a</sup> Sandra Kalil Bussadori**, por todos os ensinamentos, conselhos e por todo apoio. Deixo registrada toda minha admiração e carinho.

Aos professores, **Dr<sup>a</sup> Ana Paula Ligeiro e Dr. Rodolfo Vieira**, por estarem sempre dispostos a ajudar, agradeço por nos receber em seu laboratório e permitirem a realização de parte experimental do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, do departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) por sempre estar disposto a ajudar, agradeço por nos receber em seu laboratório e permitir a realização de parte deste trabalho.

Aos **amigos do laboratório** de pesquisa da UNINOVE, **Evaldo, Vinícius, Lucas, Carla, Léia, Nicole, Manoel, Yves, Camila, Diego, Luiz, Jaqueline** 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 ter me incentivado no ingresso da pesquisa científica, serei eternamente grata meu amigo. Como também não poderia

deixar de agradecer aos meus amigos de laboratório e companheiros de viagem (Boston) **Beatriz, Agnelo e Larissa** (obrigada por me fazerem a pessoa mais feliz do mundo em uma semana maravilhosa de congresso, a nossa amizade será eterna). Obrigada **Nadhia Helena, Maria Fernanda e Simone Moraes** por todo o ensinamento me repassado, por tudo que fizeram por mim, pela ajuda nos experimentos, paciência, pelas análises estatísticas, pelo emocional mediante as dificuldades do dia a dia. Serei eternamente grata!

Aos alunos de iniciação científica, **Debora, Loriana, Nayá, Giovanna, Izabela, Danilo, Guilherme, Leandro, Angela, Arnor, Raquel, Breno, Sandy, Hassan, Patrick, Ingrid, Wallace, Erick** por toda a ajuda na realização dos experimentos e pela amizade construída. Me sinto muito honrada em fazer parte do crescimento científico de vocês, assim como, me sinto muito orgulhosa de cada um. Cada um com seu jeito meigo, alegre, dedicado, esforçado. Vocês são muito mais que alunos pra mim, são meus sinceros amigos!

Aos **funcionários do laboratório de Pesquisa** da UNINOVE, em especial **Ângela** (minha Angelinha sinto tanta falta), **Giovanni** (por sempre ser muito mais que um amigo, um verdadeiro irmão. Sempre cuidando de mim e me proporcionando carinho, obrigada por me ajudar em todas as formatações de sumário da minha tese), **Márcio e Alana** por todo carinho, apoio emocional do qual sempre precisamos, colaboração, convívio, paciência e amizade construída.

As funcionárias da secretaria dos cursos de Pós-Graduação em Biofotônica, Ciências da Reabilitação e Medicina da UNINOVE, **Camila, Lígia, Priscila e Andréia** por todo suporte necessário.

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

À **UNINOVE** pela bolsa de estudos concedida e por todo suporte necessário. À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo: 2015/21219-6), por acreditar no nosso trabalho. Bem como, a **CAPES** pela concessão de bolsa no início do mestrado, antes da concessão da FAPESP.



***“O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha.  
Quem faz escolha, escreve sua própria história, constrói seus próprios  
caminhos”.***

***(Augusto Cury)***

## RESUMO

As interações entre o tecido e os macrófagos que o invadem após a ocorrência de uma lesão são determinantes para a evolução do seu reparo. Neste sentido, o laser em baixa intensidade (LBI) tem sido muito utilizado no tratamento de diferentes lesões teciduais no âmbito clínico e no experimental, mas pouco se conhece a respeito dos seus efeitos sobre os macrófagos. Os objetivos deste projeto foram avaliar o efeito do LBI (660 nm e 780 nm) sobre a expressão gênica e proteica de 12 produtos de macrófagos induzidos a diferenciação para os fenótipos M1, M2a e M2c. Macrófagos da linhagem J774 foram ativados/polarizados para os três fenótipos por 24h, irradiados com laser vermelho (660 nm) e infravermelho (780 nm) nas mesmas combinações de parâmetros dosimétricos (70 mW, 17,5 J/cm<sup>2</sup>, 1J). Passados os períodos de incubação de 4 e 24 h, foi realizada a análise da expressão gênica das quimiocinas (*CXCL2*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*), citocinas (*IL-1β*, *IFNγ*, *IL-6*, *TNFα*, *IL-13*) e fatores de crescimento (*TGFβ1*, *IGF1* e *VEGFA*) por meio de PCR *array*. O sobrenadante das culturas dos diferentes grupos experimentais (após 24h das irradiações) foi utilizado para avaliar a produção das diferentes proteínas de acordo com o perfil característico de cada fenótipo. Macrófagos não irradiados e não ativados serviram como controle. Foram realizados três experimentos independentes para dosagem proteica e dois experimentos independentes para avaliação da expressão gênica. Os macrófagos induzidos para fenótipo M1 (tratamento com LPS+IFN- $\gamma$ ) apresentaram um aumento na expressão gênica de *IL-6* e uma diminuição na expressão dos genes *CCL2*, *CCL4*, *CXCL2* e *TNFα* em relação aos macrófagos não ativados no período de 24 h. Na dosagem proteica, os macrófagos ativados apresentaram um aumento na produção de *CCL4* e *IL-6* em relação aos macrófagos não ativados. Adicionalmente, macrófagos induzidos ao fenótipo M2a (tratamento com *IL-4*), mostraram um aumento na expressão gênica de *TGFβ1* (24 h) e *CCL3*, *CCL4*, *CXCL2* e *TNFα* (4 h) quando comparados com as células do grupo controle. Já a polarização para o fenótipo M2c (tratamento com *IL-10* + *Dexametasona*), induziu um aumento na expressão gênica de *CXCL2* (4 h), *CCL3* e *IL-1β* (24 h). Na avaliação do tratamento com Laser foi observado que a irradiação com 660 nm

provocou uma diminuição na expressão dos genes *CCL3*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (4 h) e um aumento na expressão de *IL-1 $\beta$*  (4 h) e *CCL2*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (24 h) nos macrófagos M1. Nos macrófagos M2a, esta mesma irradiação ocasionou uma diminuição na expressão gênica de *CCL3*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (4 h). Neste mesmo contexto, os macrófagos induzidos para fenótipo M2c, que foram irradiados com o LBI de 660 nm apresentaram uma diminuição na expressão dos genes *CXCL2*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  (4 h) e *TNF $\alpha$*  (24 h). Além disso, o tratamento com laser infravermelho de 780 nm foi capaz de provocar um aumento na expressão dos genes *CCL2*, *IL-1 $\beta$*  e *TGF $\beta$ 1* (4 h) seguida de uma diminuição na expressão dos genes *CCL3*, *IL-6* e *TGF $\beta$ 1* (24 h). Em relação a dosagem proteica, foi observada uma diminuição na produção de IL-6 e *TNF $\alpha$*  por macrófagos ativados e irradiados em relação aos somente ativados. Ainda foi visto que o LBI infravermelho provocou um aumento na expressão de *TGF $\beta$ 1* (4 h) e uma diminuição na expressão gênica de *CCL4* (4 h), *CCL3* e *TGF $\beta$ 1* (24 h) nos macrófagos ativados para perfil M2a. Além do mais, na ativação para fenótipo M2c, esta mesma irradiação gerou aumento na expressão gênica de *TNF $\alpha$*  (4 h) seguido de diminuição na expressão de *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  e *TGF $\beta$ 1* (em 24 h). Os resultados destas avaliações permitem concluir que embora a linhagem celular J774 seja amplamente utilizada para avaliação dos efeitos de diferentes terapias, sua resposta não se apresentou fidedignamente como esperado nas diferentes polarizações deste estudo. Em relação ao tratamento com laserterapia, as irradiações com LBI de 660 nm e 780 nm, demonstraram capacidade de modular a expressão gênica nos diferentes perfis fenotípicos. Mas, somente o laser infravermelho (780 nm) foi capaz de diminuir a expressão gênica e proteica de mediadores pró-inflamatórios quando aplicado em macrófagos de fenótipo M1 e de modular a expressão gênica de *TGF $\beta$ 1* em macrófagos M2a, o que poderia explicar a diminuição inflamatória da fase inicial e a ausência de fibrose observada nos tecidos lesionados irradiados com LBI.

**Palavras-chave:** Macrófagos. Processo Inflamatório. Laser em Baixa Intensidade. Reparo Tecidual.

## ABSTRACT

The interactions between tissue and macrophages that migrate to the injury area are crucial to the repair process. In this context, Low-level laser therapy (LLLT) has been extensively used in the treatment of tissue damage in different clinical and experimental conditions; however, its effects on macrophages are still unclear. The objective of this study was to evaluate the effects of LLLT (660 nm and 780 nm) on gene expression and protein synthesis of 12 products of macrophages induced to M1, M2a and M2c phenotypes. J774 macrophages were activated/polarized for the three phenotypes for 24 h, irradiated with red laser (660 nm) and infrared (780 nm) using the same dosimetric parameters (70 mW, 17,5 J/ cm<sup>2</sup>, 1J). Following incubation periods of 4 and 24 hours, PCR array was performed to investigate gene expression profile of chemokines (*CXCL2*, *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*); cytokines (*IL-1 $\beta$* , *IFN $\gamma$* , *IL-6*, *TNF $\alpha$* , *IL-13*) and growth factors (*TGF $\beta$ 1*, *IGF1* e *VEGFA*). Culture supernatant, for the different experimental groups (after 24 hours of irradiation), was used to assess the production of the different proteins according to the characteristic profile of each phenotype. In each experimental situation, non-irradiated and non-activated cells were used as controls. Three independent experiments were performed for protein access and two independent experiments were performed to evaluate gene expression. All results were analyzed statistically. The macrophages induced for M1 phenotype (treatment with LPS+ IFN- $\gamma$ ), showed an increase in *IL-6* gene expression and a decrease in expression of *CCL2*, *CCL4*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  genes in relation to non-activated macrophages in the 24h period. At the protein level, activated macrophages showed an increase in the production of CCL4 and IL-6 when compared to non-activated macrophages. In addition, macrophages induced for M2a phenotype (treatment with IL-4), showed an increase in *TGF $\beta$ 1* (24 h) and *CCL3*, *CCL4*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (4h) gene expression when compared to the control group. Additionally, the polarization of the M2c phenotype (treatment with IL-10 + Dexamethasone), induced an increase in *CXCL2* (4 h), *CCL3* and *IL-1 $\beta$*  (24 h) gene expression. After treatment with red laser (660 nm), a decrease in *CCL3*, *CXCL2* and *TNF $\alpha$*  (4 h) as well as an increase in *IL-1 $\beta$*  (4 h), *CCL2*, *CXCL2* and *TNF $\alpha$*  (24 h) gene expression was observed in J774 cells. In M2a macrophages, red

laser irradiation caused a decrease in *CCL3*, *CXCL2* and *TNF $\alpha$*  (4 h) gene expression. In this same context, macrophages induced for M2c phenotype and irradiated with 660 nm showed a decrease in *CXCL2*, *TNF $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  (4 h) and *TNF $\alpha$*  (24 h) gene expression. Moreover, the treatment with infrared (780 nm) was able to cause an increase in *CCL2*, *IL-1 $\beta$*  and *TGF $\beta$ 1* (4 h) followed by a decrease in *CCL3*, *IL-6* and *TGF $\beta$ 1* (24 h) gene expression. Regarding protein synthesis, a decrease in IL-6 and TNF $\alpha$  production by activated and irradiated macrophages in comparison with the non-irradiated cells was observed. Irradiation with infrared laser resulted in increased expression levels of *TGF $\beta$ 1* (4 h) as well as decreased mRNA expression levels of *CCL4* (4 h), *CCL3* and *TGF $\beta$ 1* (24 h). In addition, M2c phenotype treated with infrared laser showed an increase in *TNF $\alpha$*  (4h) gene expression and a decrease in *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  and *TGF $\beta$ 1* (24h) gene expression. Although the J774 cell line has been extensively used to evaluate the effects of different therapies in macrophages phenotypes, in the experimental conditions performed in this study, J774 showed distinct pattern of chemokines, cytokines and growth factors expression after activation to M1, M2a or M2c phenotype. Regarding LLLT treatment, both parameters (660 nm and 780 nm) demonstrated ability to modulate the gene expression in all phenotypic profiles. However, only the infrared laser (780 nm) was able to decrease the gene and protein expression of pro-inflammatory mediators when applied to M1 phenotype macrophages. Additionally, this irradiation was able to modulate *TGF $\beta$ 1* gene expression in M2a macrophages, helping to better understand the mechanisms involved in the decrease of inflammatory response and fibrosis observed in the injured tissues irradiated with LLLT.

**Keywords:** Macrophages. Inflammatory process. Low Level Laser Therapy. Tissue repair.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1. Modulação do processo de reparo tecidual pelos macrófagos .....	21
1.2. Efeitos do laser em baixa intensidade sobre macrófagos e seus precursores.....	26
<b>2. OBJETIVO</b> .....	29
<b>2.1. Objetivos específicos</b> .....	29
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	29
3.1. Culturas Celulares .....	30
3.2. Ativação ou Polarização dos macrófagos (fenótipos M1, M2a e M2c).....	30
3.3. Parâmetros dosimétricos para irradiação laser.....	31
3.4. Grupos Experimentais .....	32
3.5. Fluxograma Experimental.....	32
3.6. Extração de RNA total, síntese de cDNA e análise de expressão gênica por PCR (reação em cadeia da polimerase) <i>array</i> .....	33
3.6.1. Isolamento do RNA.....	34
3.6.2. Síntese do DNA complementar e qPCR <i>array</i> .....	34
3.6.3. Desenho da placa de PCR <i>array</i> .....	35
3.6.4. Descrição dos genes analisados por PCR array de acordo com número de acesso no GenBank, símbolo e descrição .....	36
3.7. Dosagem de proteínas por imunoenensaio (ELISA).....	36
3.8. Análise estatística.....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	38
4.1. Análise de expressão gênica por PCR <i>array</i> – Perfil M1 .....	38
4.1.1. Avaliação do efeito do tratamento com LPS+IFN- $\gamma$ .....	38
4.1.2. Efeito do LBI sobre a expressão gênica de macrófagos - perfil M1 .....	43
4.2. Avaliação de produção proteica por macrófagos de perfil M1 irradiados com laser -período 24 h .....	51
4.3. Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M1- 4 e 24 h.....	56
4.4. Análise de expressão gênica por PCR <i>array</i> – Perfil M2a .....	58

4.4.1. Avaliação do efeito do tratamento com IL-4 .....	58
4.4.2. Efeito do LBI sobre a expressão gênica de macrófagos - perfil M2a.....	63
4.5. Avaliação de produção proteica por macrófagos de perfil M2a irradiados com laser -período 24 h .....	70
4.6. Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M2a- 4 e 24 h.....	72
4.7. Análise de expressão gênica por PCR <i>array</i> – Perfil M2c .....	73
4.7.1. Avaliação do efeito do tratamento com IL-10+Dexametasona .....	73
4.7.2. Efeito do LBI sobre a expressão gênica de macrófagos - perfil M2c.....	78
4.8. Avaliação de produção proteica por macrófagos de perfil M2c irradiados com laser - período 24 h.....	85
4.9. Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M2c- 4 e 24 h.....	87
4.10. Painel de expressão gênica e produção proteica de M1, M2a e M2c.....	89
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação dos fenótipos de macrófagos M1, M2a, M2b e M2c: ativação, marcadores de superfície, mediadores produzidos e função .....	24
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros dosimétricos para irradiação Laser .....	31
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos grupos experimentais.....	32
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos genes.....	36
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos kits comerciais utilizados no ELISA .....	37
<b>Tabela 6.</b> Expressão gênica nos grupos controle e M1.....	38
<b>Tabela 7.</b> Expressão gênica nos grupos controle e M1 – comparação entre 4 e 24 horas .....	39
<b>Tabela 8.</b> Expressão gênica nos grupos M1 e M1 irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - período de 4 h .....	44
<b>Tabela 9.</b> Expressão gênica nos grupos M1 e M1 irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - período de 24 h .....	44
<b>Tabela 10.</b> Expressão gênica nos grupos M1 e M1 irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - comparação entre 4 e 24 h.....	45
<b>Tabela 11.</b> Painel síntese - expressão gênica e produção proteica do perfil M1...57	
<b>Tabela 12.</b> Expressão gênica nos grupos controle e M2a.....	59
<b>Tabela 13.</b> Expressão gênica nos grupos controle e M2a – comparação entre 4 e 24 horas.....	59
<b>Tabela 14.</b> Expressão gênica nos grupos M2a e M2a irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm – período de 4 h.....	64
<b>Tabela 15.</b> Expressão gênica nos grupos M2a e M2a irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - período de 24 h .....	64



<b>Tabela 16.</b> Expressão gênica nos grupos M2a e M2a irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - comparação entre 4 e 24 h.....	64
<b>Tabela 17.</b> Painel síntese - expressão gênica e produção proteica do perfil M2a .....	72
<b>Tabela 18.</b> Expressão gênica nos grupos controle e M2c.....	73
<b>Tabela 19.</b> Expressão gênica nos grupos controle e M2c – comparação entre 4 e 24 horas.....	74
<b>Tabela 20.</b> Expressão gênica nos grupos M2c e M2c irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm – período de 4 h.....	79
<b>Tabela 21.</b> Expressão gênica nos grupos M2c e M2c irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - período de 24 h .....	79
<b>Tabela 22.</b> Expressão gênica nos grupos M2c e M2c irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm - comparação entre 4 e 24 h.....	79
<b>Tabela 23.</b> Painel síntese - expressão gênica e produção proteica do perfil M2c.....	88
<b>Tabela 24.</b> Painel de Expressão gênica e produção proteica M1, M2a e M2c.....	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da polarização dos macrófagos.....	22
<b>Figura 2.</b> Fluxograma Experimental .....	33
<b>Figura 3.</b> Desenho de placa de Pcr <i>array</i> .....	35
<b>Figura 4.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M1 - expressão gênica das quimiocinas: <i>CCL2</i> , <i>CCL3</i> , <i>CCL4</i> , <i>CXCL2</i> .....	40
<b>Figura 5.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M1 - expressão gênica das citocinas: <i>IL-6</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL-1<math>\beta</math></i> .....	41
<b>Figura 6.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M1 - expressão gênica do fator de crescimento <i>TGF<math>\beta</math>1</i> .....	43
<b>Figura 7.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica das quimiocinas <i>CCL2</i> , <i>CCL3</i> , <i>CCL4</i> , <i>CXCL2</i> em macrófagos M1 .....	47
<b>Figura 8.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica das citocinas: <i>IL-6</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> , <i>IL-1<math>\beta</math></i> em macrófagos M1 .....	49
<b>Figura 9.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica do fator de crescimento <i>TGF<math>\beta</math>1</i> em macrófagos M1 .....	50
<b>Figura 10.</b> Dosagem proteica de <i>CCL2</i> pelo método ELISA - perfil M1 .....	51
<b>Figura 11.</b> Dosagem proteica de <i>CCL3</i> pelo método ELISA - perfil M1 .....	52
<b>Figura 12.</b> Dosagem proteica de <i>CCL4</i> pelo método ELISA - perfil M1 .....	53

<b>Figura 13.</b> Dosagem proteica de CXCL2 pelo método ELISA - perfil M1 .....	54
<b>Figura 14.</b> Dosagem proteica de TNF $\alpha$ pelo método ELISA - perfil M1 .....	55
<b>Figura 15.</b> Dosagem proteica de IL-6 pelo método ELISA - perfil M1 .....	56
<b>Figura 16.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M2a - expressão gênica das quimiocinas: <i>CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2</i> .....	60
<b>Figura 17.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M2a - expressão gênica das citocinas: <i>IL-6, TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math></i> .....	62
<b>Figura 18.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M2a - expressão gênica dos fatores de crescimento <i>TGF<math>\beta</math>1 e VEGFA</i> .....	63
<b>Figura 19.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica das quimiocinas <i>CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2</i> em macrófagos M2a .....	66
<b>Figura 20.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica das citocinas: <i>IL-6, TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math></i> em macrófagos M2a .....	68
<b>Figura 21.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica do fator de crescimento <i>TGF<math>\beta</math>1</i> em macrófagos M2a .....	70
<b>Figura 22.</b> Dosagem proteica de VEGFA pelo método ELISA – perfil M2a .....	71
<b>Figura 23.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M2c - expressão gênica das quimiocinas: <i>CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2</i> .....	75
<b>Figura 24.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M2c - expressão gênica das citocinas: <i>IL-6, TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math></i> .....	76

<b>Figura 25.</b> Avaliação da ativação de macrófagos J774 para o perfil M2c - expressão gênica do fator de crescimento <i>TGFβ1</i> .....	78
<b>Figura 26.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica das quimiocinas <i>CCL2</i> , <i>CCL3</i> , <i>CCL4</i> , <i>CXCL2</i> em macrófagos M2c.....	81
<b>Figura 27.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica das citocinas: <i>IL-6</i> , <i>TNFα</i> , <i>IL-1β</i> em macrófagos M2c .....	84
<b>Figura 28.</b> Efeito do LBI sobre a expressão gênica do fator de crescimento <i>TGFβ1</i> em macrófagos M2c .....	85
<b>Figura 29.</b> Dosagem proteica de VEGFA pelo método ELISA – perfil M2c .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	do inglês, <i>Analysis of variance</i>
CD	do inglês, <i>Clusters of Differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GaAIs	Arseneto de Gálio –Alumínio
GAPDH	Gliceraldeído- 3- fosfato desidrogenase
ELISA	Imunoensaio do inglês, <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
GM-CSF	do inglês, <i>Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água oxigenada
IFN-γ	Interferon gamma
IGF1	Fator de Crescimento ligado a Insulina Tipo 1 (do inglês, <i>Insulin Growth Factor 1</i> )
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KCl	Cloreto de potássio
IL	Interleucina
LBI	Laser em Baixa Intensidade
LBP	Laser de Baixa Potência
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MGF	do inglês, <i>Mechano-growth Factor</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MIP-1α	do inglês, <u><i>Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha</i></u>
MIP -1β	do inglês, <u><i>Macrophage Inflammatory Protein 1 beta</i></u>
MIP-2α	do inglês, <i>Macrophage Inflammatory Protein 2 alpha</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	do inglês, <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase</i>

NF-kB	Fator de transcrição (do inglês, <i>Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of Activated B Cells</i> )
NO	do inglês, <i>Nitric Oxide</i>
PBS	do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogênio
PMA	do inglês, <i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate</i>
qPCR	do inglês, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	do inglês, <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
RNA <sub>se</sub>	Ribonuclease
ROS	do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	Rotações por minuto
RT	do inglês, <i>Reverse transcriptase</i>
R <sup>2</sup>	Coeficiente de correlação
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>
TNF-α	do inglês, Tumor Necrosis Factor α
VEGF	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

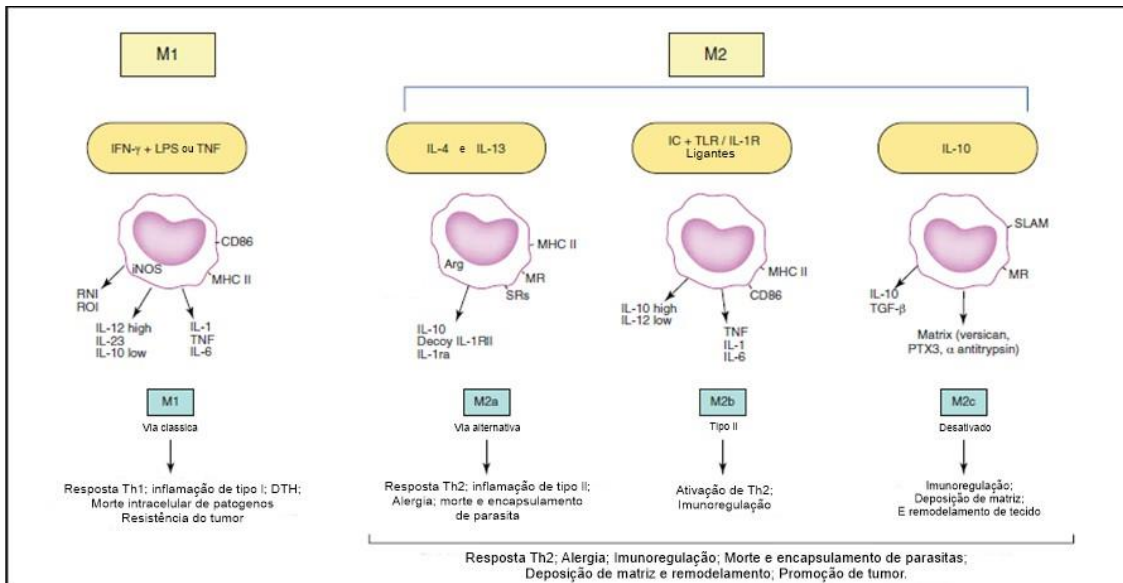
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A modulação do processo de reparo tecidual pelos macrófagos

O processo de reparo tecidual tem fases integradas e interdependentes que passam pela inflamação e proliferação e culminam na regeneração ou na cicatrização. A sequência, duração e intensidade de cada fase irão afetar diretamente a qualidade deste processo que tem os macrófagos como células importantes nas diversas etapas<sup>1-3</sup>.

Os macrófagos são apontados como componentes essenciais no reparo tecidual porque pela sua plasticidade e diversidade, além de realizarem a fagocitose dos remanescentes celulares degradados e células mortas, sintetizam radicais livres, diversos fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que terão papéis muito importantes na modulação e direcionamento deste. A plasticidade destas células (Figura 1) é uma resposta direta aos sinais advindos do tecido lesionado, assim, são definidos 2 estados de polarização ou 2 fenótipos básicos: macrófagos de fenótipo M1 (de perfil inflamatório) e de fenótipo M2 de perfil anti-inflamatório/reparador<sup>4-8</sup>.

Na fase inicial da resposta inflamatória (até 2 dias após a lesão tecidual) predominam nos tecidos lesionados os macrófagos do fenótipo M1 (CD68+, CD80+). 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 predominantemente o perfil M2 (CD163+/CD206+). Nesta fase, estas células passarão a produzir citocinas de caráter anti-inflamatório (que irão atenuar a população de macrófagos M1), bem como enzimas e fatores de crescimento que irão estimular a reconstrução do tecido destruído<sup>9,6,10,7,11,12,8</sup>.



**Figura 1:** Representação esquemática da polarização dos macrófagos inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios/reparadores (M2a, M2b e M2c). Imagem adaptada de Martinez & Gordon. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. 2014.

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 corticoides) e induz a produção de citocinas como a IL-10 e o TGF- $\beta$ <sup>3,7</sup>.

A mudança no fenótipo dos macrófagos de M1 (inflamatório) para M2 (anti-inflamatório, reparador) é um evento chave no reparo tecidual. A polarização prolongada ou ineficiente irá determinar atraso no reparo e em muitos casos impedir a ocorrência da regeneração tecidual<sup>11,12,8</sup>.

Este direcionamento do processo de reparo tecidual pela mudança fenotípica dos macrófagos recentemente foi demonstrado por meio de avaliação *in vitro* e de biópsia de tecido muscular lesionado de humanos onde se verificou que os macrófagos de perfil M1 e M2 coexistem nas áreas lesionadas mas que



os de perfil M1 estão associados a áreas teciduais onde há proliferação de células precursoras miogênicas e que *in vitro* os macrófagos deste perfil são capazes de migrar em direção a estas células, estimulando a sua proliferação e prevenindo sua diferenciação por meio da produção de IL-6, IL-1 $\beta$ , VEGF, IL-13 e de altas doses de TNF- $\alpha$  <sup>7</sup>. O mesmo estudo demonstrou que na fase de diferenciação miogênica, as áreas em regeneração estão associadas a macrófagos dos fenótipos M2a e/ou M2c e que *in vitro* estes dois fenótipos de macrófagos são capazes de atrair e de promover a diferenciação de células precursoras miogênicas por meio da produção de TGF- $\beta$  e de baixas doses de TNF- $\alpha$  <sup>7</sup>.

Macrófagos de perfil M1 (ativados/polarizados classicamente com IFN- $\gamma$  e LPS) apresentam como marcadores as moléculas CD80, CD86, IL-12, IL-23 e normalmente produzem as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, IL-27, IFN- $\gamma$  e as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CXCL9, CXCL2, CXCL10 (Tabela 1). Sendo que, estes produtos são muito importantes para o estabelecimento e manutenção de um ambiente pró-inflamatório, pela sua habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de células inflamatórias bem como, regular a duração e intensidade das respostas específicas dos mediadores envolvidos <sup>13,9,3,14,12,15-18</sup>.

Já os macrófagos de perfil M2/anti-inflamatório, podem ser ativados/polarizados classicamente com IL-4 e IL-13 (M2a), imunocomplexos ou ligantes TLR (M2b) ou ainda IL-10 ou TGF $\beta$ 1 (M2c). Nestas condições, a produção de citocinas inflamatórias é reduzida e há um aumento na produção de citocinas e quimiocinas de caráter anti-inflamatório e de fatores de crescimento (IL-10, CCR2, TGF- $\beta$ , IGF1, VEGFA, IL-13), bem como ocorre a expressão de marcadores de superfície como a CD163, CD150 e CD206 (Tabela 1). Estes perfis celulares estão relacionados ao remodelamento e reparo tecidual, à imunoregulação, à resistência a parasitas e ainda ao desenvolvimento de quadros de fibrose <sup>13,9,3,14,12,15-18</sup>.

Tabela 1: Comparação dos fenótipos M1, M2a, M2b e M2c: ativação, marcadores de superfície, mediadores produzidos e função (Duluc et al. 2007, Tidbal & Vilalta, 2010, Mantovani *et al.*, 2013, Duque & Descoteaux 2014, Martinez & Gordon 2014, Fernandes *et al.* 2015, Röszer 2015 e Sun et al., 2016).

<b>Fenótipos de Macrófagos</b>	<b>Ativação</b>	<b>Marcadores de Superfície</b>	<b>Mediadores</b>	<b>Função</b>
<b>M1</b>	Ligantes TLR, LPS, IFN- $\gamma$	CD16, CD32, CD80, CD86, IL-1R, IL-12, IL-23	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IL-27, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CXCL9, CXCL2, CXCL10, iNOS, NO,	Pró-inflamatório, Resposta tipo Th1
<b>M2a</b>	IL-4, IL-13	CD163, CCR2, IL-1R II, Arginase-1	CCL13, CCL14, CCL17, CCL22, CCL23, CCL24, TGF- $\beta$ , PDGF, MMP-9, MMP-12, Arginase-1	Anti-inflamatório, Resposta tipo Th2, pró-fibrótico
<b>M2b</b>	Imunocomplexos ligantes TLR	CD80, CD86	IL-1, IL-6, IL-10, IL-12	Imunoregulador
<b>M2c</b>	IL-10, TGF- $\beta$	CD150, CD163, IL-1R	IL-10, CCR2, TGF- $\beta$ , Arginase-1	Imunossupressor Reparo Tecidual

Macrófagos quando são expostos a estímulos inflamatórios, produzem citocinas de caráter pró-inflamatório predominantes na via de ativação clássica/fenótipo M1 como TNF $\alpha$  (Fator de Necrose tumoral alfa), um dos primeiros produtos a ser liberado em resposta a um agente patogênico e é caracterizado por estimular a fase aguda da resposta imunológica<sup>19,14</sup>. O TNF $\alpha$  além de induzir vasodilatação e diminuir permeabilidade vascular, ajuda a recrutar células para o sítio de inflamação através da regulação da liberação de quimiocinas do tipo CXCL1, CXCL2 e CXCL5, que é propício para a infiltração de linfócitos, neutrófilos e monócitos no local da lesão induzido a uma resposta<sup>20,14</sup>. De forma semelhante ao TNF, O IL-1 $\beta$  é também um pirogênio endógeno que é produzido e liberado nos estágios iniciais da resposta imune por infecções ou lesões. Durante a inflamação, a IL-1 $\beta$  estimula a produção de proteínas de fase aguda e atua no sistema nervoso central para induzir febre e secreção de prostaglandina. Nos mastócitos, a IL-1 $\beta$  induz a liberação de histamina, que por sua vez, provoca vasodilatação e inflamação localizada. É também, uma

substância quimioatraente para granulócitos, que aumenta a expansão e diferenciação de células TCD4, bem como, aumenta a expressão de moléculas de adesão celular em leucócitos e células endoteliais <sup>21,14</sup>.

Neste mesmo sentido, a interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica que apresenta funções pro e anti-inflamatórias. Estas funções influenciam diretamente na resposta imunológica do organismo no processo de reparo tecidual. Esta citocina estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda, estimula o recrutamento de monócitos para o local da inflamação, promove a diferenciação das células B em células plasmáticas, ativa as células T citotóxicas e regula a homeostase óssea <sup>22,23,14</sup>. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ativa macrófagos, que passam a produzir intermediários importantes como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, potencializando a resposta inflamatória e inibindo o crescimento ou promovendo a apoptose do agente lesivo <sup>24</sup>. Por outro lado, a IL-13 é denominada uma citocina de perfil anti-inflamatório pela sua capacidade de inibir a atividade quimiotática de monócitos e macrófagos e reduzir a expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MIP-1 e MCP). Desta forma, IL-13 atua diminuindo a resposta inflamatória <sup>3,12,16,18, 25, 26</sup>.

CCL2, CCL3 e CCL4 também são associados ao fenótipo M1 e desempenham um papel crucial na orientação das células do sistema imunológico, recrutando e sinalizando o local adequado onde esses produtos (Células T, basófilos, eosinófilos e células dendríticas) são necessários no momento da resposta inflamatória <sup>27,14</sup>. Neste mesmo âmbito, CXCL2 é uma quimiocina segregada por monócitos e macrófagos que tem como função recrutar neutrófilos e células estaminais hematopoiéticas, apresenta caráter de angiogênese e pode promover o desenvolvimento de tumores tais como melanomas <sup>28,29,14</sup>.

TGF- $\beta$ 1 (Fator de transformação do crescimento beta 1) é produzido principalmente por fibroblastos, macrófagos, linfócitos T e apresenta um papel importante na proliferação, diferenciação e migração celular durante a resposta inflamatória, pois atenua os efeitos pró-inflamatórios de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-12. Somado a isso, o TGF- $\beta$ 1 é considerado um potente quimioatraente para

fibroblastos que estimulam a síntese de colágeno e fibronectina promovendo angiogênese, imunomodulação e renovação de matriz extracelular, o que lhe atribui um caráter anti-inflamatório <sup>24, 30,31,14</sup>.

IGF1 (Fator de crescimento semelhante à insulina 1) é um importante mediador anti-inflamatório envolvido em vários processos de desenvolvimento, tais como proliferação, sinalização, diferenciação, sobrevivência, crescimento, apoptose e regeneração <sup>32</sup>. Da mesma forma, O VEGFA (Fator de crescimento vascular endotelial) é um potente fator no aumento da permeabilidade de células endoteliais que conduz à passagem de componentes de plasma e leucócitos do vaso sanguíneo para os tecidos, e pode, portanto, contribuir para a resposta inflamatória. Este produto pode exercer funções protetoras e anti-inflamatórias, estimulando a produção de NO endotelial, o que pode inibir o recrutamento de leucócitos <sup>33</sup>.

Pela complexidade, diversidade e importância dos efeitos dos macrófagos nos quadros de lesão tecidual, vários autores têm apontado que estas células devem ser consideradas como alvo para as intervenções terapêuticas <sup>9,34,6,3,7</sup>.

Neste sentido, no âmbito da avaliação experimental das intervenções terapêuticas, o laser em baixa intensidade (LBI) ou de baixa potência (LBP) vem demonstrando resultados promissores no tratamento de lesões teciduais evidenciando sua capacidade de modular o processo inflamatório <sup>35-44</sup>. Porém, poucos estudos avaliaram o efeito da fototerapia isoladamente sobre os macrófagos.

## **1.2. Efeitos do laser em baixa intensidade sobre macrófagos e seus precursores**

A compilação dos estudos que envolvem macrófagos e o LBI evidencia que os parâmetros dosimétricos e os efeitos avaliados até o momento são diversos. Porém, de modo geral, já foi demonstrado que o LBI no comprimento de onda vermelho foi capaz de aumentar a atividade da enzima lisozima e o espriamento, a fagocitose, a atividade da catepsina, a concentração intracelular de NADPH em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos <sup>45</sup>; reduzir

a produção de IL-2, IL-12, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$  em monócitos humanos tratados com fitohemaglutinina <sup>46</sup>; reduzir a expressão de MIP-2 (CXCL2), a geração de ROS intracelular e o fator NF- $\kappa\beta$  em macrófagos da linhagem alveolar AMJ2-C11 tratados com LPS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>47</sup>; reduzir a produção proteica de TNF $\alpha$  e IL-8 em monócitos U937 ativados com LPS <sup>48</sup>. Neste sentido, também existem relatos que indicam que esta irradiação foi capaz de aumentar a expressão e produção de citocinas e quimiocinas de perfil M1/pró-inflamatório como CCL2, CXCL10 e TNF $\alpha$  em monócitos humanos THP-1 ativados com LPS <sup>49</sup>; e não foi capaz de alterar a produção de ROS em macrófagos diferenciados de linfócitos (THP-1) tratados com forbol ester <sup>50</sup>.

Já o LBI infravermelho foi capaz de reduzir a expressão gênica de MCP-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 e a síntese proteica de MCP-1 e IL-1  $\beta$  em macrófagos de linhagem RAW 264.7 ativados com LPS <sup>51</sup>. Também foi relatado que esta irradiação com infravermelho foi capaz de reduzir a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos peritoneais ativados com tioglicolato + LPS + IFN $\gamma$  <sup>52</sup> e reduzir a expressão de CXCL10 e TNF $\alpha$  por monócitos humanos THP-1 ativados com LPS e irradiados com laser infravermelho de 808 nm <sup>49</sup>. Neste mesmo modelo experimental, foi observado um aumento na expressão da quimiocina CCL2 nesta mesma avaliação <sup>49</sup>. Além disso, esta irradiação não causou alteração na produção de ROS em macrófagos diferenciados de THP-1 tratados com forbol ester <sup>50</sup>.

Especificamente na linhagem de macrófagos J774 (que é objeto deste estudo) polarizados para perfil M1, o LBI de 660 nm (vermelho) possibilitou uma redução na atividade mitocondrial de macrófagos J774 ativados com LPS 1 $\mu$ g/mL e IFN- $\gamma$  0,2  $\mu$ g/mL no período de 24 h. Já o LBI infravermelho de 780 nm foi capaz de diminuir a atividade mitocondrial destes macrófagos ativados nas mesmas condições nos períodos de 24 e 72 h <sup>53</sup>. No estudo de Fernandes *et al.* 2015, nas mesmas condições experimentais, o LBI de 660 nm foi capaz de aumentar a expressão gênica e proteica de IL-6 no período de 24 horas, bem como, diminuir a expressão gênica e proteica de TNF $\alpha$  (24 e 72 h) e diminuir a síntese da proteína de COX-2 nos dois períodos avaliados <sup>15</sup>. Com relação ao LBI de 780 nm, estes mesmos autores observaram que houve uma diminuição na expressão gênica dos produtos TNF $\alpha$  e iNOS, como também foi observada

uma diminuição na produção das proteínas IL-6 (24h) e TNF $\alpha$  e COX-2 (24 e 72 h) <sup>15</sup>. Os demais estudos *in vitro* que avaliaram o papel da fototerapia (incluindo LED terapia) sobre os monócitos e macrófagos e o detalhamento das condições experimentais dos estudos citados estão sumarizados no Anexo 1 <sup>54-56,45,40,51,52,46,47,50,48,53,49,15</sup>.

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) e modelos experimentais 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 <sup>57-59</sup>. Além disso, foram encontrados estudos que realizaram uma revisão sistemática de artigos que investigaram os efeitos da terapia com laser em células humanas e animais em cultura e o efeito desta terapia na expressão gênica de mediadores inflamatórios (Janeiro de 2002 a setembro de 2009). Foi observado que muitas publicações não informam todos os parâmetros utilizados para irradiação ou ainda apresentam erros nos cálculos das doses de energia aplicadas <sup>58,59</sup>.

Portanto, ainda faltam muitos dados para entender a modulação exercida pelo LBI nos diferentes tipos celulares, em especial sobre os macrófagos, e principalmente para entender o efeito dos diferentes parâmetros dosimétricos da irradiação laser sobre esta modulação. Somado a isso, como citado anteriormente, não foi possível encontrar na literatura nenhum estudo (*in vitro* ou *in vivo*) que avaliasse se o LBI é capaz de alterar a produção de mediadores específicos dos diferentes fenótipos de macrófagos.

Este projeto procurou elucidar este tema por meio de avaliações *in vitro*, onde foi avaliado o efeito do LBI sobre a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento por macrófagos ativados (para os fenótipos M1, M2a e M2c) por PCR *array* e dosagem de proteínas no sobrenadante destas culturas. Deste modo, este projeto trouxe informações importantes para esclarecer o mecanismo pelo qual o LBI exerce seus efeitos no processo de reparo das lesões

teciduais com especial ênfase à modulação exercida sobre os diferentes fenótipos de macrófagos.

## **2. OBJETIVO**

Este projeto teve como objetivo, avaliar *in vitro* o efeito do LBI (em duas combinações de parâmetros dosimétricos) sobre a expressão gênica (qPCR *array*) e proteica (imunoensaio - ELISA) de 12 mediadores de macrófagos (polarizados para os fenótipos M1, M2a e M2c) que tem um papel importante no processo de reparo tecidual.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Avaliar a resposta da linhagem de macrófagos J774 (derivada de sarcoma de camundongos Balb/c) à ativação para os fenótipos M1 (LPS+ IFN- $\gamma$ ), M2a (IL-4) e M2c (IL-10 + Dexametasona) por meio da avaliação da expressão gênica e proteica das quimiocinas CXCL2 (MIP-2 $\alpha$ ), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) e CCL4 (MIP-1 $\beta$ ); das citocinas IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IL-13; e dos fatores de crescimento TGF $\beta$ 1, IGF1e VEGFA nos períodos de 4 e 24 horas.
- Avaliar o efeito do LBI vermelho de 660 nm e infravermelho de 780 nm sobre a expressão gênica e produção proteica destes mesmos 12 produtos por macrófagos J774 induzidos para os fenótipos M1, M2a e M2c nos períodos de 4 e 24 horas.
- Avaliar a comparação entre os efeitos do LBI vermelho de 660 nm e infravermelho de 780 nm na polarização dos diferentes fenótipos (M1, M2a e M2c) de macrófagos J774.

## **3. METODOLOGIA**

Os experimentos foram realizados no laboratório do curso de Mestrado e Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

### 3.1 Culturas celulares

Foi utilizada a linhagem de macrófagos J774 (linhagem comercial de macrófagos derivados de sarcoma de camundongos Balb/c) que foi doada gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda. Essa linhagem celular J774 é amplamente utilizada pela facilidade em obtenção e manipulação<sup>60-62</sup>.

As células foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). O meio de cultivo foi ainda 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 CO<sub>2</sub>. 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 se tornou subconfluyente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM; pH 7.4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após incubação foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente ressuspensão em 1ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) em câmara de Neubauer e foram utilizadas nos ensaios somente as culturas com viabilidade maior que 95%.

### 3.2 Ativação/Polarização dos macrófagos (fenótipos M1, M2a e M2c)

Para simular o padrão de ativação M1, as culturas de macrófagos J774 foram tratadas com LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*) O26: B6 (Sigma, St. Louis, MO) e IFN- $\gamma$  (Sigma) nas concentrações de 1 $\mu$ g/mL e 0,2  $\mu$ g/mL respectivamente



<sup>63,64,7</sup> e cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) por 24 horas. Para simular os padrões de ativação M2a e M2c, as culturas de macrófagos foram tratadas com IL-4 (0,1 µg/mL) e com IL-10 (0,1 µg /mL) + dexametasona (0,8 µg /mL) respectivamente <sup>7</sup>, e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) por 24 horas.

Passado o período de ativação (24h), as culturas foram lavadas duas vezes com PBS para remover os agentes de ativação e posteriormente irradiadas com LBI.

### 3.3 Parâmetros dosimétricos para irradiação laser

As culturas de macrófagos foram irradiadas após 24 horas de sua ativação/polarização utilizando o aparelho Twin-laser (MM Optics, São Carlos – SP - Brasil) nas 2 combinações de parâmetros descritas na Tabela 2.

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

Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Área cabeçote (cm <sup>2</sup> )	Densidade de potência (mW/cm <sup>2</sup> )	Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	Tempo (s)	Energia total (J)
780	70	0.04	1750	17,5	15	1
660	70	0.04	1750	17,5	15	1

As irradiações foram feitas em tubos de centrifugação contendo os precipitados celulares, sendo de baixo para cima na extremidade inferior dos tubos, de modo que o feixe de laser atingiu diretamente o pellet celular sem passar pelo meio de cultura <sup>65,53,15</sup>. Os experimentos foram realizados em ambiente com obscuridade parcial para não sofrerem interferência da luz externa. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação, mas não foram irradiadas. Os parâmetros para uso do laser foram definidos em ensaio dose-resposta prévio, realizado pelo nosso grupo de pesquisa onde macrófagos foram ativados para o padrão M1, irradiados com 6 combinações diferentes de parâmetros e dosou-se a produção proteica de IL-6 e TNF-α <sup>66</sup>.

### 3.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos grupos experimentais para experimentos *in vitro*.

<b>M1 (LPS + IFN-<math>\gamma</math>)</b>	<b>M2a (IL-4)</b>	<b>M2c (IL-10+dexametasona)</b>
Controle (Sem ativação)	Controle (Sem ativação)	Controle (Sem ativação)
Ativado M1 (Sem Irradiação)	Ativado M2a (Sem Irradiação)	Ativado M2c (Sem Irradiação)
Ativado M1 e irradiado com LBI 660 nm	Ativado M2a e irradiado com LBI 660 nm	Ativado M2c e irradiado com LBI 660 nm
Ativado M1 e irradiado com LBI 660 nm	Ativado M2a e irradiado com LBI 660 nm	Ativado M2c e irradiado com LBI 780 nm

### 3.5 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

Macrófagos J774 foram ativados por 24 horas para os perfis: M1 (1 $\mu$ g/mL de LPS e 0,2 $\mu$ g/mL de IFN- $\gamma$ ), M2a (0,01 $\mu$ g/mL de IL- 4) e M2c (0,01 $\mu$ g/mL de IL-10 e 0,08  $\mu$ g/mL de dexametasona), irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm (parâmetros: 70mW; 17,5 J/cm<sup>2</sup>; 14,3seg. 0,8J) e incubados novamente por 4 e 24 horas em estufa 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram utilizadas para avaliar a expressão gênica das quimiocinas: *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2*; citocinas *IL-1 $\beta$* , *IFN $\gamma$* , *IL-6*, *TNF $\alpha$* , *IL-13*; fatores de crescimento *TGF $\beta$ 1*, *IGF1* e *VEGFA* pelo método de PCR *array* (após 4 e 24 horas). O sobrenadante das culturas dos diferentes grupos experimentais (período de 24 horas) foi usado para dosagem de proteínas por imunoenensaio ELISA. A figura 2 ilustra os procedimentos experimentais realizados.

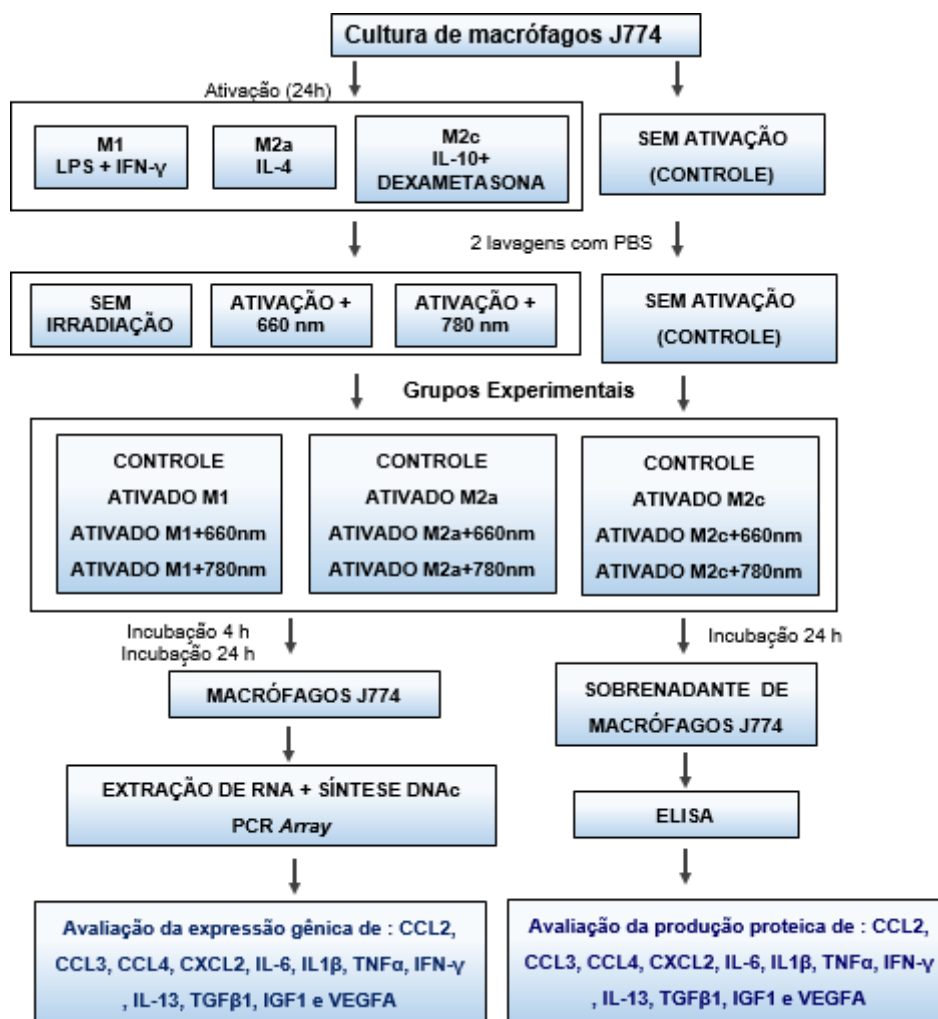


Figura 2: Representação esquemática em fluxograma experimental.

### 3.6 Extração de RNA total, síntese de cDNA e análise de expressão gênica por PCR (reação em cadeia da polimerase) array

Após as irradiações, as culturas de macrófagos dos grupos descritos no item 3.4 foram cultivadas em placas de Petri de 5 cm ( $1 \times 10^6$  células/placa), com meio de cultura DMEM (contendo 5% de SFB para perfil M1 e 10% para os perfis M2a e M2c), a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 4 e 24h. Após estes períodos, o meio de cultura foi removido das placas e as células foram coletadas utilizando 1mL de tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4mM; pH 7.4) e depois foram centrifugadas (3 minutos,  $4^\circ\text{C}$ , 2.300 G) e o sobrenadante foi descartado em fluxo laminar. O pellet formado na parte inferior do microtubo foi armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.6.1 Isolamento do RNA

O RNA das amostras foi extraído utilizando-se o kit RNEasy Micro kit (Qiagen, Hilden-Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi ressuspensão em água livre de DNase/RNA e a concentração e pureza determinada com auxílio do equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) em comprimento de onda de 260 e 280nm. Para verificar a integridade do RNA extraído, 1µg de RNA total de todas as amostras foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1% e foi verificado que todas as amostras estavam íntegras, apresentando bandas representativas das subunidades ribossômicas 28s e 18s.

### 3.6.2 Síntese do DNA complementar e qPCR *array*

O DNA complementar utilizado para a reação de PCR *array* foi obtido a partir da transcrição reversa de 500ng de RNA total das amostras utilizando-se o RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, Maryland – EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR *array* foram realizadas utilizando-se placas customizadas (CAPM 13086A – Qiagen, Maryland – EUA) para avaliação da expressão gênica dos 12 genes descritos no item objetivos. Além dos transcritos pertencentes à citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, estavam presentes na placa de PCR *array*, 4 controles, a saber: controle endógeno (*GAPDH*), controle de contaminação por DNA genômico (MGDC), controle da transcriptase reversa (RTC) e controle positivo da reação de PCR (PPC). A disposição dos genes nas placas de 96 poços bem como a descrição de cada gene analisado está representada na Figura 2 e na Tabela 4, respectivamente. As reações de PCR *array* foram realizadas com uso do reagente RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen, Maryland – EUA) em termociclador (Applied Biosystems 7500, Foster City, California, EUA) de acordo com as instruções do fabricante em.

As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação. Os resultados de expressão foram analisados por meio do software RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data

Analysis version 3.5, o qual utiliza o método do Ct comparativo  $-2^{\Delta\Delta Ct}$  para análise da expressão gênica. Os valores de *fold-change* (valor numérico que representa quanto o gene alvo está mais ou menos expresso em relação ao controle) para análise do efeito da ativação dos perfis M1, M2a e M2c foram obtidos por meio da razão do valor de expressão no grupo ativado (sem irradiação) em relação ao grupo controle (sem ativação). Os valores de *fold-change* para análise do efeito da ativação dos perfis M1, M2a e M2c associado ao LBI 660nm ou LBI 780nm foram obtidos dividindo-se o valor de expressão do grupo ativado com LBI (660 ou 780nm) em relação ao grupo somente ativado. Foram feitas as seguintes análises:

- $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{gene controle endógeno GAPDH})$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{ativado M1 ou M2a ou M2c}) / \Delta Ct(\text{controle}) = \textit{fold change}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{ativado M1 ou M2a ou M2c e irradiado com LBI de 660 nm e LBI de 780 nm}) / \Delta Ct(\text{ativado M1 ou M2a ou M2c}) = \textit{fold change}$

Os valores de *fold-change* menores que 1,00 indicam baixa expressão gênica e foram transformados em números inteiros negativos pela razão  $1/\textit{fold-change}$  para obtenção do *fold-regulation*. Os genes que apresentaram valores de *fold-regulation* maiores que 1,5 ou menores que -1,5 foram considerados como diferencialmente expressos.

### 3.6.3 Desenho da placa – PCR array

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CXCL2	TGFβ1	CXCL2	TGFβ1	CXCL2	TGFβ1	CXCL2	TGFβ1	CXCL2	TGFβ1	CXCL2	TGFβ1
B	CCL2	IGF1	CCL2	IGF1	CCL2	IGF1	CCL2	IGF1	CCL2	IGF1	CCL2	IGF1
C	CCL3	VEGFA	CCL3	VEGFA	CCL3	VEGFA	CCL3	VEGFA	CCL3	VEGFA	CCL3	VEGFA
D	CCL4	IFNγ	CCL4	IFNγ	CCL4	IFNγ	CCL4	IFNγ	CCL4	IFNγ	CCL4	IFNγ
E	IL1β	GAPDH	IL1β	GAPDH	IL1β	GAPDH	IL1β	GAPDH	IL1β	GAPDH	IL1β	GAPDH
F	IL6	MGDC	IL6	MGDC	IL6	MGDC	IL6	MGDC	IL6	MGDC	IL6	MGDC
G	IL13	RTC	IL13	RTC	IL13	RTC	IL13	RTC	IL13	RTC	IL13	RTC
H	TNFα	PPC	TNFα	PPC	TNFα	PPC	TNFα	PPC	TNFα	PPC	TNFα	PPC

Figura 3: Desenho da placa – PCR array

### 3.6.4 Descrição dos genes analisados por PCR *array* de acordo com número de acesso no GenBank, símbolo e descrição

Tabela 4: Tabela com a descrição dos genes

Acesso GenBank	Símbolo	Descrição
NM_009140	CXCL2	Quimiocina - Ligante 2 (Motivo C-X-C)
NM_011333	CCL2	Quimiocina - Ligante 2 (Motivo C-C)
NM_011337	CCL3	Quimiocina - Ligante 3 (Motivo C-C)
NM_013652	CCL4	Quimiocina - Ligante 4 (Motivo C-C)
NM_013693	TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
NM_011577	TGF $\beta$ 1	Fator transformador de crescimento beta 1
NM_010512	IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 fator A
NM_009505	VEGFA	Fator de crescimento vascular endotelial fator A
SA_00106	MGDC	Controle de contaminação por DNA genômico
NM_008084	GAPDH	Controle endógeno
SA_00104	RTC	Controle da transcriptase reversa
SA_00103	PPC	Controle positivo da reação de PCR
NM_008361	IL1 $\beta$	Interleucina 1 beta
NM_031168	IL6	Interleucina 6
NM_008355	IL13	Interleucina 13
NM_008337	IFN $\gamma$	Interferon gamma

### 3.7 Dosagem de proteínas por imunoenensaio (ELISA)

Conforme descrito no item 3.6, após as irradiações, as culturas de macrófagos dos grupos experimentais foram cultivadas em placas de Petri de 5 cm ( $1 \times 10^6$  células/ placa), com meio de cultura DMEM (contendo 5% de SFB para perfil M1 e 10% para os perfis M2a e M2c), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a avaliação da produção proteica, foi utilizado somente o sobrenadante das culturas de macrófagos incubados por 24 horas e que foi recolhido imediatamente antes da realização do *PCR array*.

Foi realizada a técnica de ELISA, utilizando-se kits comerciais descritos a seguir, de acordo com os protocolos dos fabricantes (tabela 5):

Tabela 5: Descrição dos kits comerciais utilizados para a técnica ELISA

Proteína	Kit Comercial
<b>CXCL2 (MIP-2a)</b>	Kit R&D Mouse CXCL2/MIP-2a – DUOSET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY452)
<b>CCL2 (Mcp-1)</b>	Biologend Mouse MCP-1 – ELISA MAX™ Standard Sets (432701)
<b>CCL3 (Mip-1 α):</b>	Kit R&D Mouse CCL3/MIP-1α – DUO SET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY450)
<b>CCL4 (Mip-1β)</b>	Kit R&D Mouse CCL4/MIP-1β – DUO SET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY451)
<b>IL-1β</b>	Biologend Mouse IL-1β – ELISA MAX™ Standard Sets (432601)
<b>IFNγ</b>	Biologend Mouse IFNγ – ELISA MAX™ Standard Sets (430801)
<b>IL-6</b>	Biologend Mouse IL-6 – ELISA MAX™ Standard Sets (431301)
<b>TNFα</b>	Biologend Mouse TNF-α – ELISA MAX™ Standard Sets (430901)
<b>IL-13</b>	Kit R&D Mouse IL-13 – DUO SET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY413)
<b>TGFβ<sub>1</sub></b>	Kit R&D Mouse TGFβ <sub>1</sub> – DUO SET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY71679)
<b>IGF1</b>	Kit R&D Mouse IGF-1 – DUO SET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY791)
<b>VEGF A</b>	Kit R&D Mouse VEGFA – DUO SET® DEVELOPMENT SYSTEM (DY493)

### 3.8 Análise Estatística

Os dados de produção proteica foram analisados por meio do software “GraphPad InStat-3”. A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados apresentaram distribuição paramétrica e foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.01. Os valores de expressão para cada gene no grupo controle (sem ativação) foi comparado com os grupos ativado (sem irradiação), ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780nm utilizando o teste T não pareado com correção de Welch. Os níveis de confiança foram ajustados para 95% ( $p < 0.05$ )

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise de expressão gênica por PCR array – Perfil M1

#### 4.1.1. Avaliação do efeito do tratamento com LPS+IFN- $\gamma$

Os valores de expressão dos genes avaliados no grupo controle e ativado perfil M1 (tratamento com LPS+IFN- $\gamma$ ) nos períodos de 4 e 24 horas estão descritos nas Tabelas 6 e 7 e estão representados graficamente nas figuras 3, 4 e 5. O efeito da ativação do perfil M1 em relação ao controle (Tabela 6) bem como o efeito desta ativação entre os períodos de 4 e 24 horas foram analisados estatisticamente (Tabela 7). Somente os genes que apresentaram diferença estatística significativa bem como valores de *fold-regulation* maiores que 1,50 ou menores que -1,50 foram considerados como diferencialmente expressos (e estão em negrito).

Tabela 6: Tabela com a descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos controle e ativado Perfil M1. Períodos de 4 e 24 horas.

Gene	Período 4 horas				Período 24 horas			
	Controle	Ativado M1	p-valor	<i>Fold-regulation</i>	Controle	Ativado M1	p-valor	<i>Fold-regulation</i>
<b>CCL2</b>	0.09 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.0002	0.33	-1.81	1.31 $\pm$ 0.28	0.32 $\pm$ 0.08	<b>0.02</b>	<b>-4.16</b>
CCL3	0.09 $\pm$ 0.009	0.13 $\pm$ 0.007	0.06	1.44	0.86 $\pm$ 0.37	0.30 $\pm$ 0.02	0.12	-2.94
<b>CCL4</b>	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.0005	0.30	-1.33	0.08 $\pm$ 0.005	0.04 $\pm$ 0.002	<b>0.0008</b>	<b>-2.00</b>
<b>CXCL2</b>	0.14 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.006	0.68	1.21	0.27 $\pm$ 0.06	0.09 $\pm$ 0.01	<b>0.03</b>	<b>-3.00</b>
<b>IL-6</b>	0.009 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.006	0.25	2.22	0.002 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.0003	<b>0.01</b>	<b>4.50</b>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0.037 $\pm$ 0.007	0.03 $\pm$ 0.002	0.47	-1.23	0.04 $\pm$ 0.0003	0.01 $\pm$ 0.003	<b>0.002</b>	<b>-4.00</b>
<b>IL1-<math>\beta</math></b>	0.0006 $\pm$ 0.0001	0.0006 $\pm$ 0.00006	0.67	1.00	0.002 $\pm$ 0.0001	0.0004 $\pm$ 0.0001	0.06	-5.00
<b>TGF<math>\beta</math>1</b>	0.08 $\pm$ 0.00003	0.07 $\pm$ 0.001	0.02	-1.14	0.10 $\pm$ 0.004	0.11 $\pm$ 0.004	0.05	1.10



Tabela 7: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos controle e ativado Perfil M1. Comparação entre 4 e 24 horas.

Gene	Comparação entre 4 e 24 horas – M1				Ativado 4h	Ativado 24h	p-valor	Fold Regulation
	Controle 4h	Controle 24h	p-valor	Fold Regulation				
<b>CCL2</b>	0.09 $\pm$ 0.05	1.31 $\pm$ 0.28	<b>0.01</b>	<b>14.5</b>	0.055 $\pm$ 0.0003	0.323 $\pm$ 0.087	<b>0.03</b>	<b>5.87</b>
<b>CCL3</b>	0.09 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.37	0.07	9.55	0.134 $\pm$ 0.013	0.301 $\pm$ 0.026	<b>0.01</b>	<b>2.24</b>
<b>CCL4</b>	0.04 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.005	0.07	2.00	0.033 $\pm$ 0.0009	0.041 $\pm$ 0.002	0.05	1.24
<b>CXCL2</b>	0.14 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.06	0.12	1.92	0.172 $\pm$ 0.011	0.091 $\pm$ 0.017	<b>0.0068</b>	<b>-1.92</b>
<b>IL6</b>	0.009 $\pm$ 0.006	0.002 $\pm$ 0.001	0.21	-4.54	0.020 $\pm$ 0.011	0.009 $\pm$ 0.0003	0.24	-2.22
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.0003	0.23	1.33	0.030 $\pm$ 0.004	0.013 $\pm$ 0.003	<b>0.009</b>	<b>-2.32</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0.0006 $\pm$ 0.0002	0.002 $\pm$ 0.001	0.07	3.33	0.0006 $\pm$ 0.0001	0.0004 $\pm$ 0.0001	0.20	-1.51
<b>TGF<math>\beta</math></b>	0.08 $\pm$ 0.00005	0.10 $\pm$ 0.004	0.03	1.25	0.074 $\pm$ 0.003	0.113 $\pm$ 0.004	<b>0.0016</b>	<b>1.52</b>

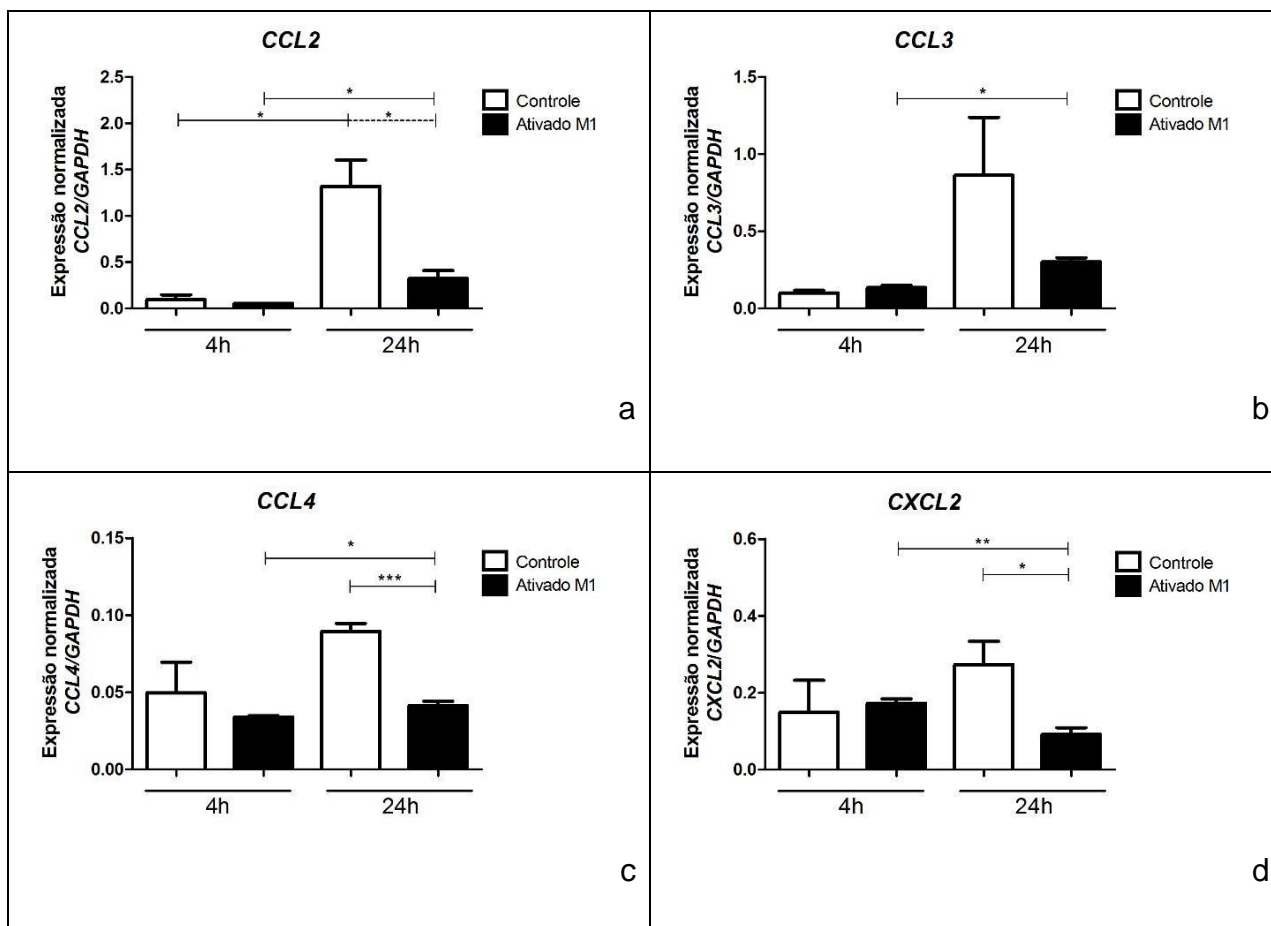
#### a) Quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2

Em relação a expressão gênica das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2*, os resultados permitiram observar que após o período de 4 horas, não houve diferença estatística significativa nas células do grupo ativado perfil M1 em relação às células do grupo controle (Tabela 6, Figura 4).

Após o período de 24 horas, houve uma diminuição significativa na expressão gênica das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -4,16), *CCL4* ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* -2,00) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -3,00) nas células do grupo ativado em relação as células do grupo controle. Na avaliação da expressão do gene *CCL3* foi observado que não houve diferença estatística significativa nas células do grupo ativado perfil M1 em relação as células do grupo controle (Tabela 6, Figura 4).

Em relação ao fator tempo, foi possível observar (Tabela 7, Figura 4) que houve um aumento significativo na expressão gênica de *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 14,5) nas células do grupo controle que permaneceram incubadas por 24 horas em relação as células do grupo controle que permaneceram incubadas por 4 horas. Já com relação a expressão gênica das quimiocinas *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2*, não houve diferença estatística significativa nas células do grupo controle nos períodos avaliados. Além disso, as células do grupo ativado (24h) apresentaram um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas

*CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 5,87) e *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,24) e uma diminuição significativa na expressão da quimiocina *CXCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -1,92) em relação as células do grupo ativado (4h). Enquanto que na avaliação da expressão do gene *CCL4*, não houve diferença estatística significativa nas células do grupo ativado nos diferentes tempos avaliados.



**Figura 4.** Expressão gênica das quimiocinas *CCL2/MCP-1* (a), *CCL3/MIP-1 $\alpha$*  (b), *CCL4/MIP-1 $\beta$*  (c), *CXCL2/MIP-2 $\alpha$*  (d) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação para perfil M1 e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$ . Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### b) Citocinas: IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-13

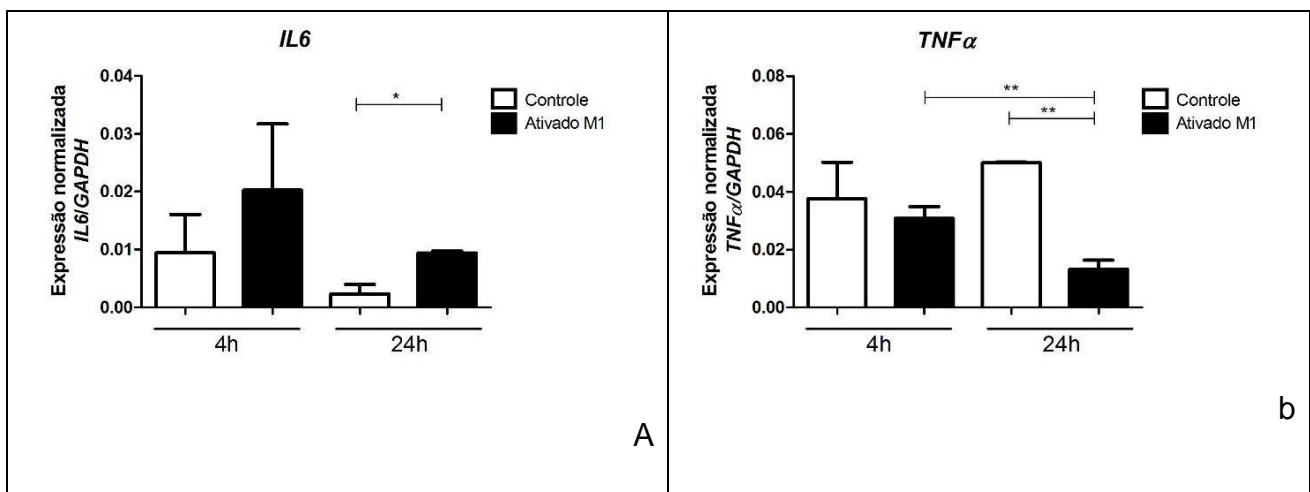
Já com relação à expressão de citocinas, os resultados permitiram observar que após o período de 4 horas, não houve diferença estatística

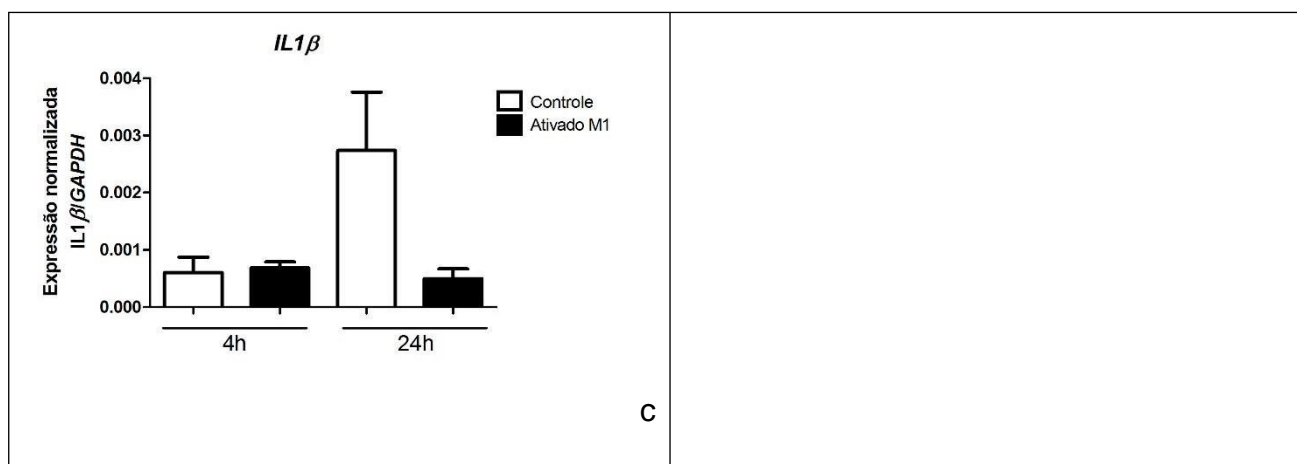
significante na expressão das citocinas *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  e *TNF $\alpha$*  nas células do grupo ativado perfil M1 em relação às células do grupo controle (Tabela 6, Figura 5).

No período de 24 horas, houve um aumento na expressão de *IL-6* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 4,50), bem como, uma diminuição nos níveis de expressão do gene *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -4,00) nas células do grupo ativado em relação às células do grupo controle. Em relação à expressão de *IL-1 $\beta$* , não houve diferença estatística significativa entre as células do grupo controle e ativado (Tabela 6, Figura 5).

Na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, não houve diferença na expressão das citocinas *IL-1 $\beta$* , *TNF $\alpha$*  e *IL-6* nas células do grupo controle. Por outro lado, foi observado que nas células do grupo ativado houve uma diminuição significativa na expressão da citocina *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -2,32) no período de 24h em relação ao período de 4h. Não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-1 $\beta$*  e *IL-6* entre os diferentes períodos nas células do grupo ativado (Tabela 7, Figura 5).

Os genes *IFN $\gamma$*  e *IL-13* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.





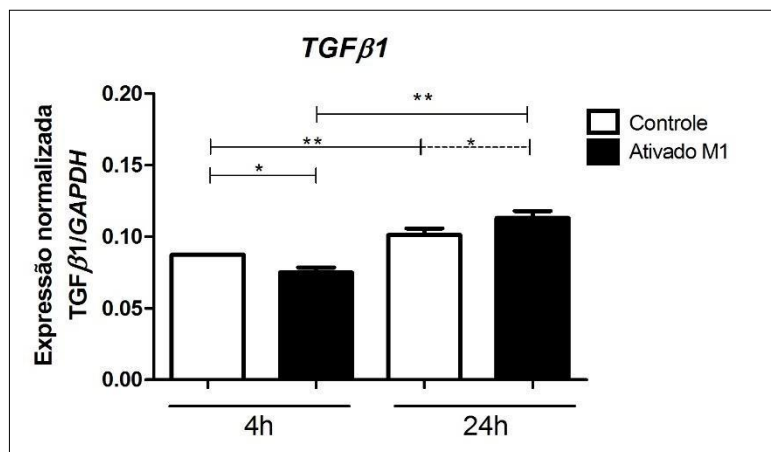
**Figura 5.** Expressão gênica das citocinas *IL-6* (a), *TNFα* (b) e *IL-1β* (c) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação para perfil M1 e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$ . Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### c) Fatores de crescimento: *TGFβ1*, *IGF1* e *VEGFA*

Na avaliação da expressão dos fatores de crescimento, foi possível observar que, não houve diferença estatística significativa na expressão de *TGFβ1* nas células do grupo ativado para perfil M1 em relação as células do grupo controle após os períodos de 4 e 24 horas (Tabela 6, Figura 6).

Além disso, na comparação entre os tempos de 4 e 24 horas, foi observado (Tabela 7, Figura 6) que as células do grupo ativado (24h) apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *TGFβ1* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 1,52) em relação as células do grupo ativado (4h). Já com relação as células do grupo controle, não houve diferença estatística significativa na expressão deste gene na comparação entre os períodos observados.

Os genes *IGF1* e *VEGFA* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.



**Figura 6.** Expressão gênica do fator de crescimento *TGF-β1* pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação para perfil M1 e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e do grupo ativado (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$ . Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.1.2. Efeito do LBI sobre a expressão gênica de macrófagos - perfil M1

Os dados de expressão dos genes avaliados nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação) e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm nos períodos de 4 e 24 horas estão descritos nas Tabelas 8 e 9 e estão representados graficamente nas figuras 6, 7 e 8. Em relação ao efeito da irradiação, também foi realizada a comparação entre os períodos de 4 e 24 horas (Tabela 10) e os valores foram avaliados estatisticamente. Somente os genes que apresentaram diferença estatística significativa bem como valores de *fold-regulation* maiores que 1,50 ou menores que -1,50 foram considerados como diferencialmente expressos (e estão em negrito). Os genes *IFN $\gamma$* , *IL- 13*, *IGF1* e *VEGFA* não foram expressos pelos macrófagos nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 8: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm Perfil M1. Período de 4 h.

Gene	LBI 660	p-valor	Fold-regulation	Ativado M1	LBI 780	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	0.11±0.033	0.09	2.20	0.05±0.0003	0.09±0.012	<b>0.03</b>	<b>1.80</b>
<i>CCL3</i>	0.06±0.013	<b>0.008</b>	<b>-2.17</b>	0.13±0.013	0.10±0.001	0.07	-1.31
<i>CCL4</i>	0.04±0.006	0.08	1.21	0.033±0.0009	0.035±0.006	0.76	1.06
<i>CXCL2</i>	0.093±0.01	<b>0.006</b>	<b>-1.85</b>	0.172±0.01	0.20±0.028	0.21	1.16
<i>IL-6</i>	0.01±0.004	0.48	1.00	0.01±0.005	0.016±0.008	0.78	1.60
<i>TNF-α</i>	0.01±0.002	<b>0.01</b>	<b>-3.03</b>	0.03±0.004	0.036±0.002	0.49	1.20
<i>IL1-β</i>	0.06±0.05	<b>0.002</b>	<b>100.0</b>	0.0006±0.0001	0.11±0.002	<b>0.0002</b>	<b>183.3</b>
<i>TGFβ1</i>	0.06±0.005	0.06	-1.17	0.07±0.003	0.11±0.002	<b>0.0007</b>	<b>1.57</b>

Tabela 9: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativado e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm Perfil M1. Período de 24 h.

Gene	LBI 660	p-valor	Fold-regulation	Ativado M1	LBI 780	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	0.59±0.09	<b>0.03</b>	<b>1.84</b>	0.32±0.08	0.41±0.10	0.30	1.28
<i>CCL3</i>	0.28±0.007	0.35	-0.93	0.30±0.02	0.17±0.02	<b>0.01</b>	<b>-1.78</b>
<i>CCL4</i>	0.04±0.0004	0.11	1.00	0.04±0.002	0.03±0.006	0.20	-1.33
<i>CXCL2</i>	0.14±0.009	<b>0.02</b>	<b>1.55</b>	0.09±0.01	0.11±0.01	0.31	1.22
<i>IL-6</i>	0.01±0.001	0.22	1.11	0.009±0.0003	0.006±0.001	<b>0.04</b>	<b>-1.51</b>
<i>TNFα</i>	0.02±0.002	<b>0.03</b>	<b>2.00</b>	0.01±0.003	0.01±0.001	0.49	-1.00
<i>IL1-β</i>	0.0008±0.00008	0.07	2.00	0.0004±0.0001	0.0003±0.0001	0.43	-1.33
<i>TGFβ1</i>	0.11±0.02	0.83	1.00	0.11±0.004	0.06±0.0007	<b>0.003</b>	<b>-1.85</b>

Tabela 10: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm Perfil M1. Comparação entre 4 e 24 horas.

Comparação entre 4 e 24 horas - M1												
Gene	Ativado 4h	Ativado 24h	p-valor	Fold Regulation	LBI 660 4h	LBI 660 24h	p-valor	Fold Regulation	LBI 780 4h	LBI 780 24h	p-valor	Fold Regulation
<b>CCL2</b>	0.055 $\pm$ 0.0003	0.323 $\pm$ 0.087	<b>0.03</b>	<b>5.87</b>	0.114 $\pm$ 0.033	0.595 $\pm$ 0.093	<b>0.01</b>	<b>5.21</b>	0.09152 $\pm$ 0.01246	0.419 $\pm$ 0.105	<b>0.03</b>	<b>4.57</b>
<b>CCL3</b>	0.134 $\pm$ 0.013	0.301 $\pm$ 0.026	<b>0.01</b>	<b>2.24</b>	0.066 $\pm$ 0.013	0.283 $\pm$ 0.007	<b>0.0002</b>	<b>4.28</b>	0.1081 $\pm$ 0.001229	0.178 $\pm$ 0.029	<b>0.05</b>	<b>1.64</b>
<b>CCL4</b>	0.033 $\pm$ 0.0009	0.041 $\pm$ 0.002	0.05	1.24	0.046 $\pm$ 0.006	0.045 $\pm$ 0.0004	0.887	-1.03	0.03506 $\pm$ 0.006035	0.033 $\pm$ 0.006	0.77	-1.06
<b>CXCL2</b>	0.172 $\pm$ 0.011	0.091 $\pm$ 0.017	<b>0.0068</b>	<b>-1.92</b>	0.093 $\pm$ 0.016	0.143 $\pm$ 0.009	<b>0.0215</b>	<b>1.53</b>	0.203 $\pm$ 0.028	0.110 $\pm$ 0.019	<b>0.0183</b>	<b>-1.85</b>
<b>IL6</b>	0.020 $\pm$ 0.011	0.009 $\pm$ 0.0003	0.24	-2.22	0.023 $\pm$ 0.007	0.010 $\pm$ 0.001	0.10	-2.32	0.016 $\pm$ 0.008	0.006 $\pm$ 0.001	0.35	-2.70
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0.030 $\pm$ 0.004	0.013 $\pm$ 0.003	<b>0.009</b>	<b>-2.32</b>	0.014 $\pm$ 0.002	0.021 $\pm$ 0.002	<b>0.04</b>	<b>1.50</b>	0.036 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.001	<b>0.004</b>	<b>-3.33</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0.0006 $\pm$ 0.0001	0.0004 $\pm$ 0.0001	0.20	-1.51	0.064 $\pm$ 0.005	0.0008 $\pm$ 0.00008	<b>0.002</b>	<b>-100,0</b>	0.110 $\pm$ 0.002	0.0003 $\pm$ 0.0001	<b>0.002</b>	<b>-500,0</b>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	0.074 $\pm$ 0.003	0.113 $\pm$ 0.004	<b>0.0016</b>	<b>1.52</b>	0.064 $\pm$ 0.005	0.113 $\pm$ 0.002	<b>0.0053</b>	<b>1.76</b>	0.110 $\pm$ 0.002	0.061 $\pm$ 0.0007	<b>0.0009</b>	<b>-1.81</b>

#### a) Quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2

Com relação a expressão de quimiocinas no período de 4 horas, os resultados permitiram observar que, houve uma diminuição significativa na expressão gênica das quimiocinas CCL3 ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -2,17) e CXCL2 ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -1,85) nas células que receberam o tratamento com LPS e IFN- $\gamma$  (Perfil m1) mais irradiação com LBI vermelho de 660 nm em relação as células do grupo que recebeu somente ativação. Já as quimiocinas CCL2 e CCL4 não apresentaram diferença estatística significativa nos seus valores de

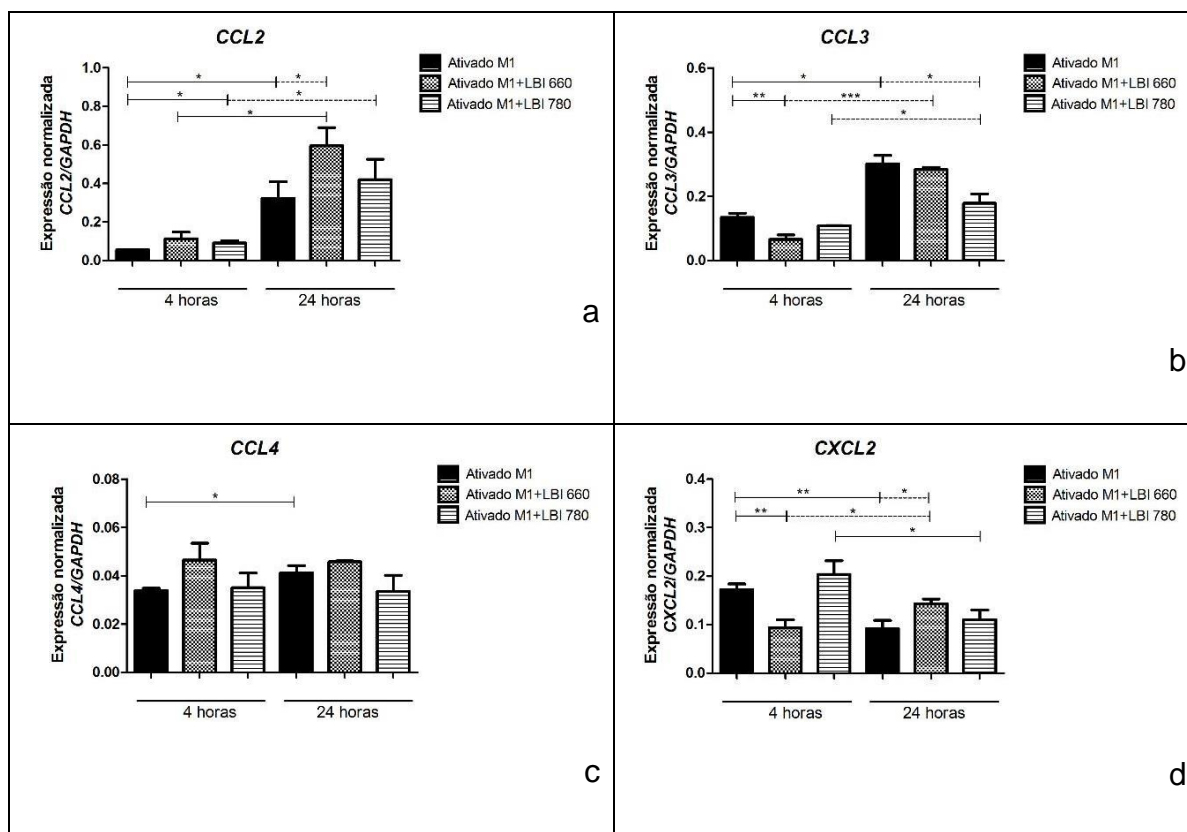
expressão na comparação dos macrófagos presentes nestes grupos avaliados. Bem como, foi observado um aumento significativo na expressão da quimiocina *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,80) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm em relação as células do grupo ativado M1. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão dos genes *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* nas células presentes nestes grupos observados no período de 4 horas (Tabela 8, Figura 7).

Na avaliação do período de 24 horas, foi possível observar que, houve um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,84) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,55) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI vermelho de 660nm em relação as células do grupo que recebeu somente ativação. Enquanto isso, não houve diferença estatística significativa na expressão de *CCL3* e *CCL4* nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado. Por outro lado, houve uma diminuição significativa na expressão da quimiocina *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,78) nas células do grupo ativado e tratado com LBI infravermelho de 780nm em relação as células do grupo ativado. Porém, as quimiocinas *CCL2*, *CCL4* e *CXCL2* não apresentaram diferença estatística significativa nos seus valores de expressão nos macrófagos presentes nos diferentes grupos experimentais avaliados (Tabela 9, Figura 7).

Além disso, foi realizada a comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, onde os resultados demonstraram que os macrófagos que receberam o tratamento com LPS e IFN- $\gamma$  apresentaram um aumento significativo na expressão das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 5,87) e *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,24) bem como, uma diminuição significativa na expressão de *CXCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -1,92) no período de 24 horas em relação 4 horas. Não houve diferença estatística significativa na expressão de *CCL4* na comparação dos diferentes tempos de incubação pelos macrófagos ativados. As células que receberam o tratamento (Perfil M1) e a irradiação com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 5,21), *CCL3* ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* 4,28) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,53) no período de 24 horas em relação 4 horas. Já em relação ao gene *CCL4*, não houve diferença estatística significativa na comparação entre os períodos pelos macrófagos ativados e irradiados neste



parâmetro dosimétrico. Foi também visto que, os macrófagos ativados e irradiados com LBI de 780 nm apresentaram um aumento significativo na expressão das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 4,57), *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,64) e uma diminuição significativa na expressão de *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,85) no período de 24 horas em relação 4 horas. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão de *CCL4* nas células presentes neste grupo observado na comparação entre os períodos (Tabela 10, Figura 7).



**Figura 7.** Expressão gênica das quimiocinas *CCL2/MCP-1* (a), *CCL3/MIP-1 $\alpha$*  (b), *CCL4/MIP-1 $\beta$*  (c), *CXCL2/MIP-2 $\alpha$*  (d) pelo método qPCR array após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos ativados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de  $\text{IFN-}\gamma$  e dos grupos ativados e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

## b) Citocinas: IL-6, $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , $\text{IFN}\gamma$ , IL-13

Em relação à expressão de citocinas, foi observado que após o período de 4 horas, houve um aumento significativo na expressão da citocina *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 100,0) bem como, uma diminuição significativa na

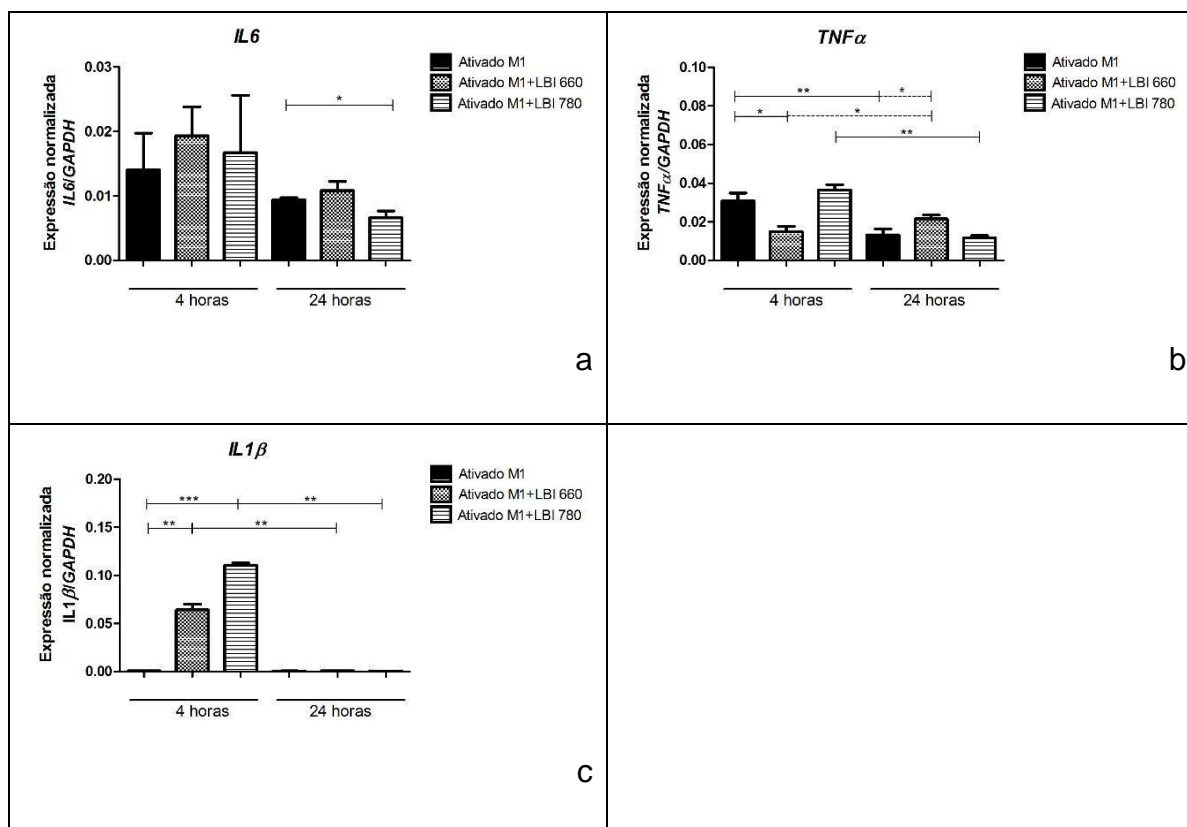
expressão de *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -3,03) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado (tratamento com LPS e IFN- $\gamma$  – Perfil M1). Por outro lado, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* nas células destes grupos observados neste período. Já em relação aos macrófagos ativados e irradiados com LBI de 780 nm, foi visto que, houve um aumento significativo na expressão do gene *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* 183,3) em relação aos macrófagos que foram apenas ativados para perfil M1. Porém, não houve diferença estatística significativa na expressão das citocinas *IL-6* e *TNF $\alpha$*  nas células do grupo ativado e irradiado nestes parâmetros dosimétricos em relação as células do grupo ativado (Tabela 8, Figura 8).

As análises realizadas nos períodos de 24 horas mostraram que as células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão gênica da citocina *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,00) em relação as células do grupo somente ativado. Enquanto isso, não houve diferença estatística significativa na expressão das citocinas *IL-1 $\beta$*  e *IL-6* nas células destes grupos avaliados neste período. Além disso, as células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm, apresentaram uma diminuição significativa na expressão gênica da citocina *IL-6* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,51) em relação as células do grupo que recebeu somente a ativação. Em relação as citocinas *IL-1 $\beta$*  e *TNF $\alpha$* , não houve diferença estatística significativa na comparação destes dois grupos (Tabela 9, Figura 8).

Já com relação ao fator tempo, foi feita a comparação entre os períodos de 4 e 24 horas e os resultados mostraram que, as células que foram ativadas Perfil M1 apresentaram uma diminuição significativa na expressão gênica da citocina *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -2,32) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Porém, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* e *IL-1 $\beta$*  nas células deste grupo entre os períodos avaliados. Os macrófagos que receberam ativação e irradiação com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão de *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,50), bem como uma diminuição significativa na expressão de *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -100,0) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* nas células presentes neste grupo entre os períodos avaliados. Foi possível

observar também que, os macrófagos que foram ativados e irradiados com LBI de 780 nm apresentaram uma diminuição significativa na expressão dos genes *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -3,33) e *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -500,0) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Enquanto isso, não houve diferença estatística significativa na expressão gênica de *IL-6* nas células deste grupo entre os períodos avaliados (Tabela 10, Figura 8).

Os genes *IFN $\gamma$*  e *IL-13* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.



**Figura 8.** Expressão gênica das citocinas *IL-6* (a), *TNF $\alpha$*  (b) e *IL-1 $\beta$*  (c) pelo método qPCR array após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos ativados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  e dos grupos ativados e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### c) Fatores de crescimento: TGF $\beta$ 1, IGF1 e VEGFA

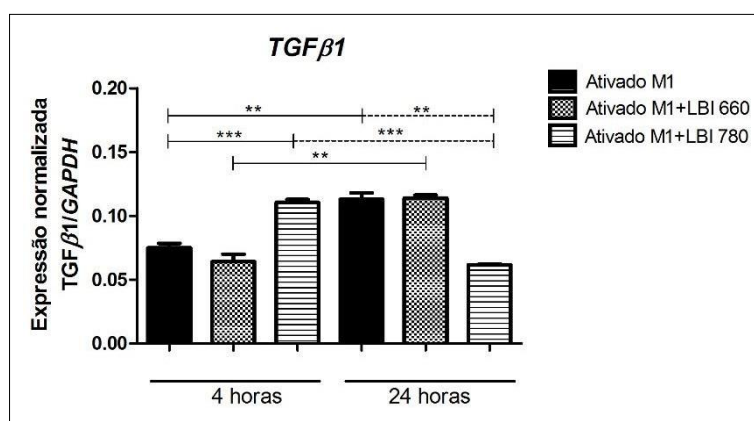
Sobre a expressão dos fatores de crescimento, os resultados permitiram observar que as células do grupo ativado e irradiado com LBI infravermelho de 780nm apresentaram um aumento significativo na expressão gênica de *TGF $\beta$ 1*

( $p < 0.001$ , *fold-regulation*, 1,57) em relação as células do grupo somente ativado com IL-10 e Dexametasona no período de 4 horas. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão deste gene nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado neste período (Tabela 8, Figura 9).

No período de 24 horas, foi visto que, as células do grupo ativado e irradiado com LBI infravermelho de 780nm apresentaram uma diminuição significativa na expressão gênica de *TGF $\beta$ 1* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation*, -1,85) em relação as células do grupo somente ativado. Por outro lado, as células do grupo ativado e tratado com LBI vermelho de 660nm não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão deste gene em relação as células do grupo que recebeu somente ativação (Tabela 9, Figura 9).

Além disso, foi observado que na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, que as células do grupo ativado e as células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *TGF $\beta$ 1* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 1,52 e  $p < 0.01$ , *fold-regulation* 1,76 respectivamente) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Já com relação as células do ativado e irradiado com LBI de 780 nm, houve uma diminuição significativa na expressão deste fator de crescimento (*TGF $\beta$ 1* -  $p < 0.01$ , *fold-regulation* -1,81) na comparação destes dois períodos avaliados (Tabela 10, Figura 9).

Não houve expressão gênica dos fatores de crescimento *IGF1* e *VEGFA*, pelas células dos respectivos grupos.



**Figura 9.** Expressão gênica do fator de crescimento *TGF- $\beta$ 1* pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de

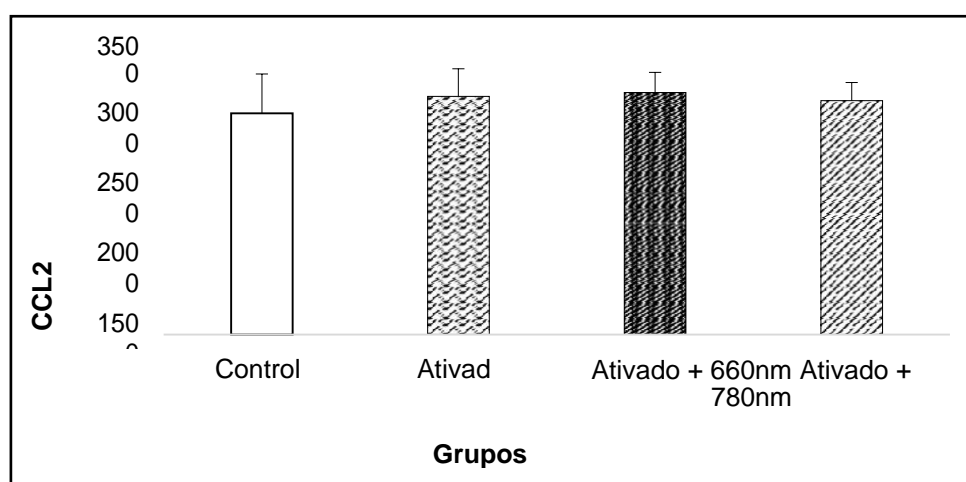
células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo ativado (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  e dos grupos ativado e irradiado com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.2. Avaliação de produção proteica por macrófagos de perfil M1 irradiados com laser - período 24 horas

Para o perfil M1, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Imunoensaio ELISA, de acordo com a produção padrão de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento descrita na literatura para este fenótipo (Bosurgi et al. 2011, Duque & Descoteaux 2014, Martinez & Gordon 2014, Röszer 2015, Xuan et al. 2015), ou seja, as quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CXCL2 (MIP-2 $\alpha$ ) e as citocinas IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6.

##### a) CCL2 (MCP-1)

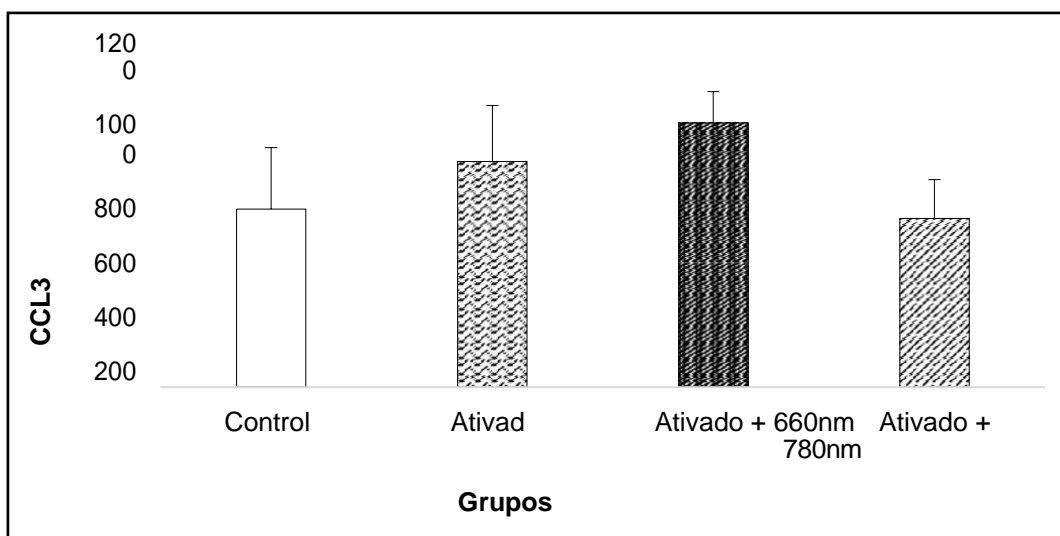
Embora houvesse um aumento na produção de CCL2 nas células do grupo ativado quando comparadas com as células do grupo controle ( $p > 0.05$ ), bem como, um aumento na produção deste produto nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação às células do grupo somente ativado ( $p > 0.05$ ) e por outro lado, as células do grupo ativado e tratado com LBI de 780nm, apresentaram uma diminuição na produção de CCL2 em relação às células do grupo ativado ( $p > 0.05$ ), nenhum destes resultados foi estatisticamente significativo (Figura 10).



**Figura 10.** Dosagem proteica de CCL2 pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 perfil M1 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e do grupo ativado (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão.

### b) CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )

Na avaliação da produção de CCL3, os resultados permitiram observar que houve um aumento na produção deste produto nas células do grupo ativado quando comparadas com as células do grupo controle, ( $p > 0.05$ ). Bem como, um aumento na produção deste produto nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo somente ativado ( $p > 0.05$ ). Por outro lado, as células do grupo ativado e tratado com LBI de 780nm, apresentaram uma diminuição na produção de CCL3 em relação as células do grupo ativado ( $p > 0.05$ ). No entanto, estes resultados referentes a produção deste produto não foram estatisticamente significantes (Figura 11).

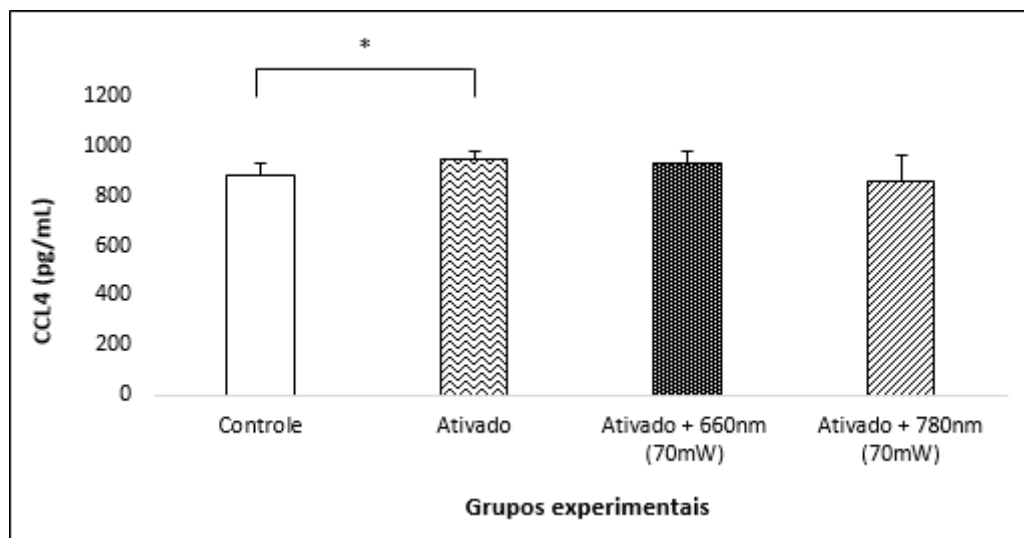


**Figura 11.** Dosagem proteica de CCL3 pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 perfil M1 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e dos grupos tratados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão.

### c) CCL4 (MIP-1 $\beta$ )

Já em relação a CCL4, as células do grupo ativado apresentaram um aumento significativo na produção deste produto em relação as células do grupo

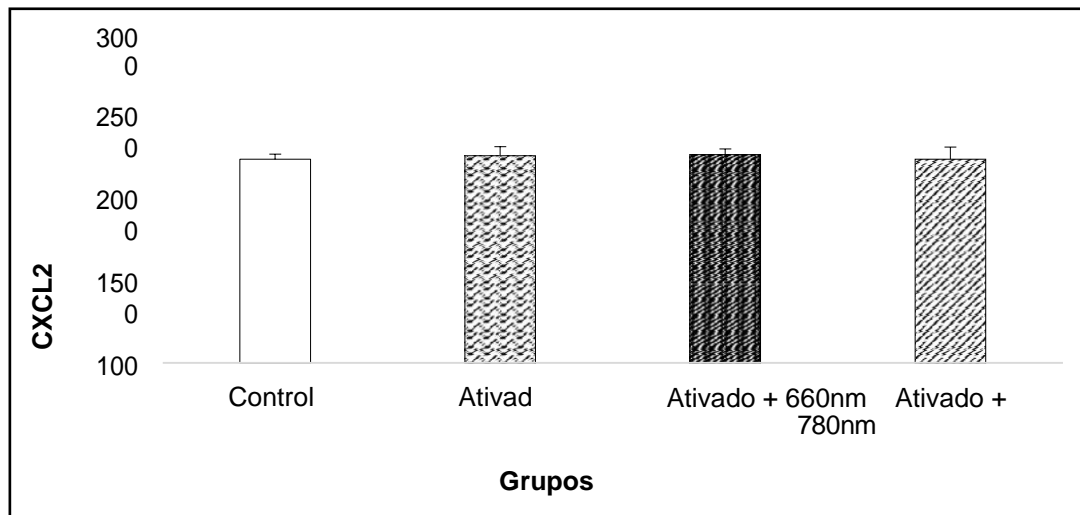
controle ( $p < 0.05$ ). Por outro lado, houve uma diminuição na produção desta nas células dos grupos ativado e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm em relação as células do grupo somente ativado ( $p > 0.05$ ). No entanto, estes resultados referentes à produção deste produto não foram estatisticamente significantes na comparação entre as células do grupo ativado e as células dos grupos ativado tratados com LBI de 660 nm e 780 nm (Figura 12).



**Figura 12.** Dosagem proteica de CCL4 pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e dos grupos tratados (sem irradiação com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ .

#### d) CXCL2 (MIP-2 $\alpha$ )

Os resultados permitiram observar em relação a produção de CXCL2 que as células do grupo ativado apresentaram um aumento na produção desta quimiocina em relação as células do grupo controle ( $p > 0.05$ ). Por outro lado, houve uma diminuição na produção deste produto nas células dos grupos ativado e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm em relação às células do grupo somente ativado ( $p > 0.05$ ). No entanto, estes resultados referentes à produção deste produto não foram estatisticamente significantes na comparação entre as células dos grupos ativado e dos ativado tratados com LBI de 660 nm e 780 nm (Figura 13).

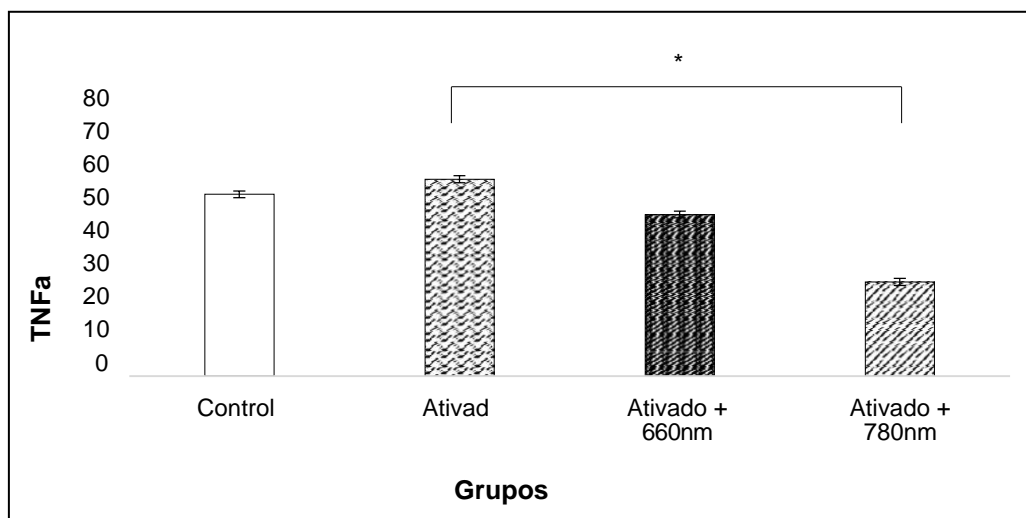


**Figura 13.** Dosagem proteica de CXCL2 pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e dos grupos tratados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão.

#### e) TNF $\alpha$

Em relação a produção de TNF $\alpha$ , foi observado que as células do grupo ativado apresentaram um aumento na produção desta quimiocina em relação as células do grupo controle ( $p > 0.05$ ), porém não houve diferença estatística significativa. Por outro lado, houve uma diminuição significativa na produção desta citocina nas células dos grupos ativado e irradiado com LBI de 780 nm em relação às células do grupo somente ativado ( $p < 0.05$ ). Apesar das células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660nm apresentarem uma diminuição na produção de TNF $\alpha$  em relação as células do grupo somente ativado, não houve diferença estatística significativa na produção desta citocina (Figura 14).





**Figura 14.** Dosagem proteica de TNF $\alpha$  pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e dos grupos tratados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ .

#### f) IFN $\gamma$

Não houve produção de IFN $\gamma$  pelas células presentes nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação) e os grupos tratados com LBI de 660nm e 780nm.

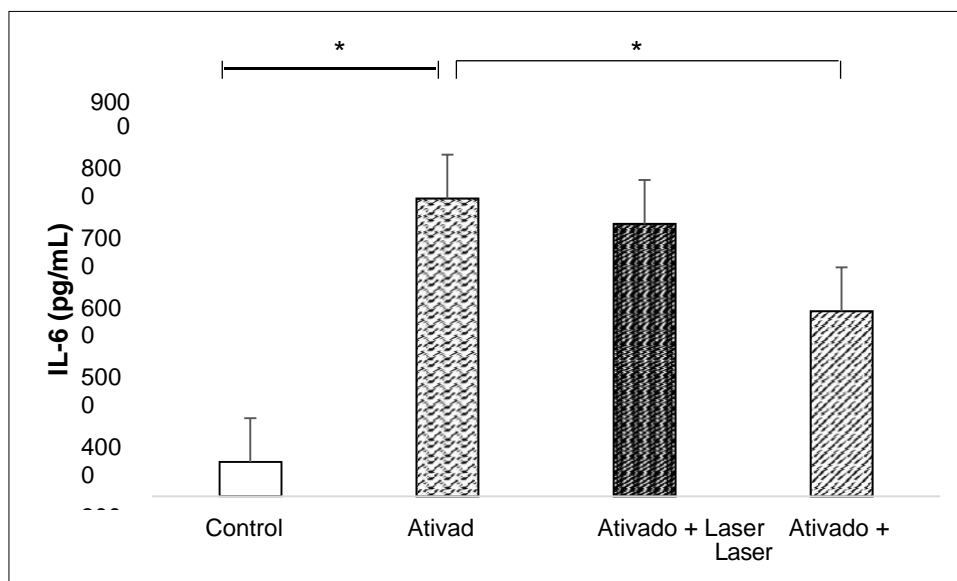
#### g) IL1- $\beta$

Os resultados permitiram observar que não houve produção de IL1- $\beta$  pelas células presentes nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação), e os grupos tratados com LBI de 660nm e 780nm.

#### h) IL-6

Já em relação a produção de IL-6 (Figura 15), foi observado que os macrófagos do grupo somente ativado apresentaram um aumento significativo de IL-6 em relação ao grupo controle ( $p < 0.001$ ). Além disso, as células ativadas e irradiadas com LBI de 780nm produziram menos IL-6 que as células somente ativadas ( $p < 0.001$ ). Apesar das células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660nm apresentarem uma diminuição na produção de IL-6 em relação as células

do grupo somente ativado, não houve diferença estatística significativa na produção desta citocina ( $p > 0.05$ ).



**Figura 15.** Dosagem proteica de IL-6 pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e dos grupos tratados (sem irradiação) com  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS de *E. coli* e  $0,2 \mu\text{g/mL}$  de IFN- $\gamma$  (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ .

#### 4.3 Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M1- 4 e 24 h

Os resultados dos experimentos realizados para o fenótipo M1 estão aglutinados na Tabela 11.

Tabela 11: Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M1.

PERFIL M1				
Pcr array - 4 e 24 horas				Elisa – 24h
Citocinas	M1 (Sem Irradiação)	M1 + 660 nm x M1 (Sem Irradiação)	M1 + 780 nm x M1 (Sem Irradiação)	Ativação e Tratamentos com Laser
	x M Controle			
CCL2	S# 4h ↓ 24h	S# 4h ↑ 24h	↑ 4h S# 24h	M1 x M Cont = Aumento S# M1 660 nm x M1 = Aumento S# M1 780 nm x M1 = Redução S#
CCL3	S# 4h S# 24h	↓ 4h S# 24h	S# 4h ↓ 24h	M1 x M Cont = Aumento S# M1 660 nm x M1 = Aumento S# M1 780 nm x M1 = Redução S#
CCL4	S# 4h ↓ 24h	S# 4h S# 24h	S# 4h S# 24h	<b>M1 x M Cont = Aumento (p&lt;0.05)</b> M1 660 nm x M1 = Redução S# M1 780 nm x M1 = Redução S#
CXCL2	S# 4h ↓ 24h	↓ 4h 24h	S# 4h S# 24h	M1 x M Cont = Aumento S# M1 660 nm x M1 = Redução S# M1 780 nm x M1 = Redução S#
IL-6	S# 4h ↑ 24h	S# 4h S# 24h	S# 4h ↓ 24h	<b>M1 x M Cont = Aumento (p&lt;0.001)</b> M1 660 nm x M1 = Redução) S# <b>M1 780 nm x M1 = Redução (p&lt;0.001)</b>
TNFα	S# 4h ↓ 24h	↓ 4h 24h	S# 4h S# 24h	M1 x M Cont = Aumento S# M1 660 nm x M1 = Redução S# <b>M1 780 nm x M1 = Redução (p&lt;0.05)</b>
IL-1β	S# 4h S# 24h	↑ 4h S# 24h	↑ 4h S# 24h	Não houve produção de IL-1β pelas células dos grupos: controle, ativado e ativado e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm
TGF-β1	S# 4h S# 24h	S# 4h S# 24h	4h ↓ 24h	-----

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve produção de IFN- $\gamma$ pelas células dos grupos: controle, ativado e ativados e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm
<b>IL-13</b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	----- -
<b>VEGFA</b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	----- -
<b>IGF-1</b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	----- -

S $\neq$  (Sem diferença estatística). M Controle (Macrófago sem ativação). M1 (Macrófago ativado para perfil M1).  $\uparrow$  (Aumento).  $\downarrow$  (Diminuição)

#### 4.4. Análise de expressão gênica por PCR array – Perfil M2a

##### 4.4.1 Avaliação do efeito do tratamento com IL-4

Os dados de expressão dos genes avaliados no grupo controle e ativado perfil M2a (tratamento com IL-4) nos períodos de 4 e 24 horas estão descritos nas Tabelas 12 e 13 e estão representados graficamente nas figuras 15, 16 e 17. O efeito da ativação do perfil M2a em relação ao controle (Tabela 12) bem como o efeito desta ativação entre os períodos de 4 e 24 horas foram analisados estatisticamente (Tabela 13). Somente os genes que apresentaram diferença estatística significativa bem como valores de *fold-regulation* maiores que 1,50 ou menores que -1,50 foram considerados como diferencialmente expressos (e estão em negrito).

Tabela 12: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos controle e ativado Perfil M2a. Períodos de 4 e 24 horas. SE (Sem Expressão).

Gene	Período 4 horas				Período 24 horas			
	Controle	Ativado M2a	p-valor	Fold-regulation	Controle	Ativado M2a	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	0.18±0.06	0.54±0.148	0.23	3.00	0.93±0.30	0.52±0.14	0.17	-1.81
<i>CCL3</i>	0.13±0.01	0.35±0.09	<b>0.05</b>	<b>2.69</b>	0.45±0.08	0.44±0.01	0.86	-1.03
<i>CCL4</i>	0.06±0.006	0.09±0.002	<b>0.01</b>	<b>1.50</b>	0.08±0.002	0.06±0.006	0.06	-1.33
<i>CXCL2</i>	0.14±0.04	0.37±0.08	<b>0.02</b>	<b>2.64</b>	0.94±0.24	1.09±0.030	0.53	1.15
<i>IL-6</i>	0.01±0.004	0.03±0.01	0.42	3.00	0.14±0.001	0.12±0.03	0.49	-1.17
<i>TNFα</i>	0.02±0.0006	0.05±0.001	<b>0.0015</b>	<b>2.50</b>	0.04±0.01	0.03±0.009	0.81	-1.33
<i>IL1-β</i>	0.001±0.0004	0.001±0.001	0.44	1.00	0.005±0.002	0.01±0.004	0.19	2.00
<i>TGFβ1</i>	0.09±0.003	0.07±0.009	0.08	-1.29	0.08±0.008	0.13±0.014	<b>0.01</b>	<b>1.62</b>
<i>VEGF A</i>	SE	SE	SE	SE	0.00009±0.00005	0.0002±0.0001	0.40	2.20

Tabela 13: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos controle e ativado Perfil M2a. Comparação entre 4 e 24 horas.

Comparação entre 4 e 24 horas – M2a								
Gene	Controle 4h	Controle 24h	p-valor	Fold Regulation	Ativado 4h	Ativado 24h	p-valor	Fold Regulation
<i>CCL2</i>	0.15±0.07	0.93±0.30	0.04	6.20	0.37±0.27	0.52±0.14	0.45	1.40
<i>CCL3</i>	0.13±0.01	0.45±0.08	0.02	3.46	0.35±0.09	0.44±0.018	0.24	1.25
<i>CCL4</i>	0.06±0.006	0.08±0.002	0.03	1.33	0.09±0.002	0.06±0.006	0.02	-1.51
<i>CXCL2</i>	0.14±0.04	0.94±0.24	0.03	6.71	0.30±0.14	1.09±0.30	0.05	3.63
<i>IL6</i>	0.014±0.005	0.14±0.001	0.0007	10.0	0.05±0.03	0.12±0.03	0.09	2.40
<i>TNFα</i>	0.02±0.0006	0.04±0.01	0.23	2.00	0.05±0.001	0.03±0.009	0.08	-1.66
<i>IL-1β</i>	0.001±0.0004	0.005±0.002	0.10	5.00	0.001±0.001	0.01±0.004	0.08	10.0
<i>TGFβ</i>	0.093±0.003	0.08±0.008	0.20	-1.16	0.07±0.009	0.13±0.01	0.01	1.85

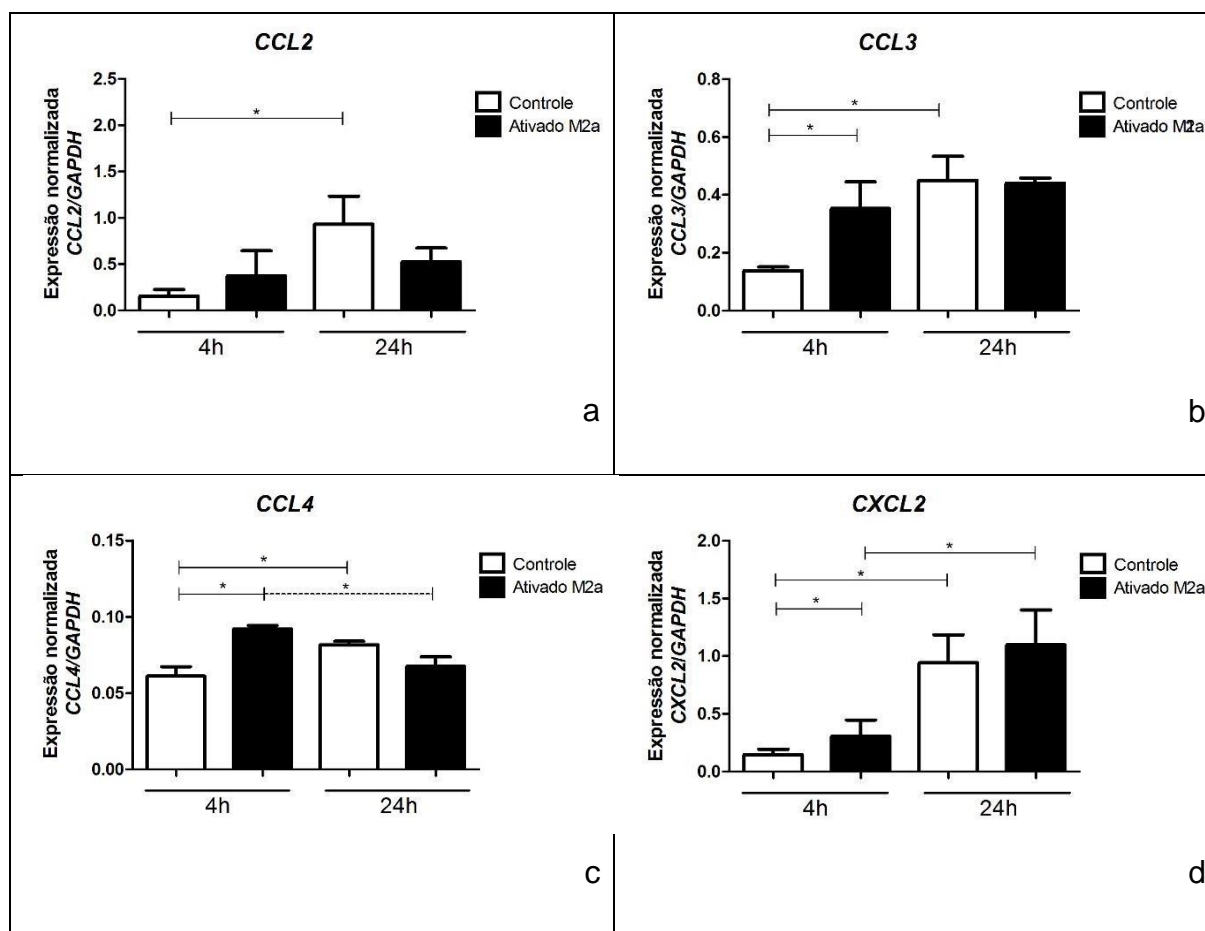
#### a) Quimiocinas: *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CXCL2*

Na figura 16, pode ser observado que após o período de 4 horas houve um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,69), *CCL4* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,50) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,64) nas células do grupo ativado (tratamento com IL-4) em relação as células do grupo controle. Por outro lado, com relação a expressão do gene *CCL2*, não houve diferença estatística significativa na comparação entre os macrófagos presentes nestes grupos que foram avaliados (Tabela 12).

No período de 24h, os resultados permitiram observar que, não houve diferença estatística significativa nas células do grupo ativado perfil M2a em relação às células do grupo controle na expressão gênica das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* (Tabela 12, Figura 16).

Na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, foi visto que houve um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 6,20), *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,46) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-*

*regulation* 6,71) nas células do grupo controle no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Por outro lado, não houve diferença estatística significativa na expressão de *CCL4* nas células do grupo controle nos diferentes períodos avaliados. Além disso, as células do grupo ativado apresentaram um aumento significativo na expressão gênica de *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,63) bem como uma diminuição significativa na expressão de *CCL4* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,51) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Já com relação a expressão das quimiocinas *CCL2* e *CCL3*, não houve diferença estatística significativa entre os diferentes períodos nas células do grupo ativado (Tabela 13, Figura 16).



**Figura 16.** Expressão gênica das quimiocinas *CCL2/MCP-1* (a), *CCL3/MIP-1 $\alpha$*  (b), *CCL4/MIP-1 $\beta$*  (c), *CXCL2/MIP-2 $\alpha$*  (d) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação para o perfil M2a e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL- 4. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

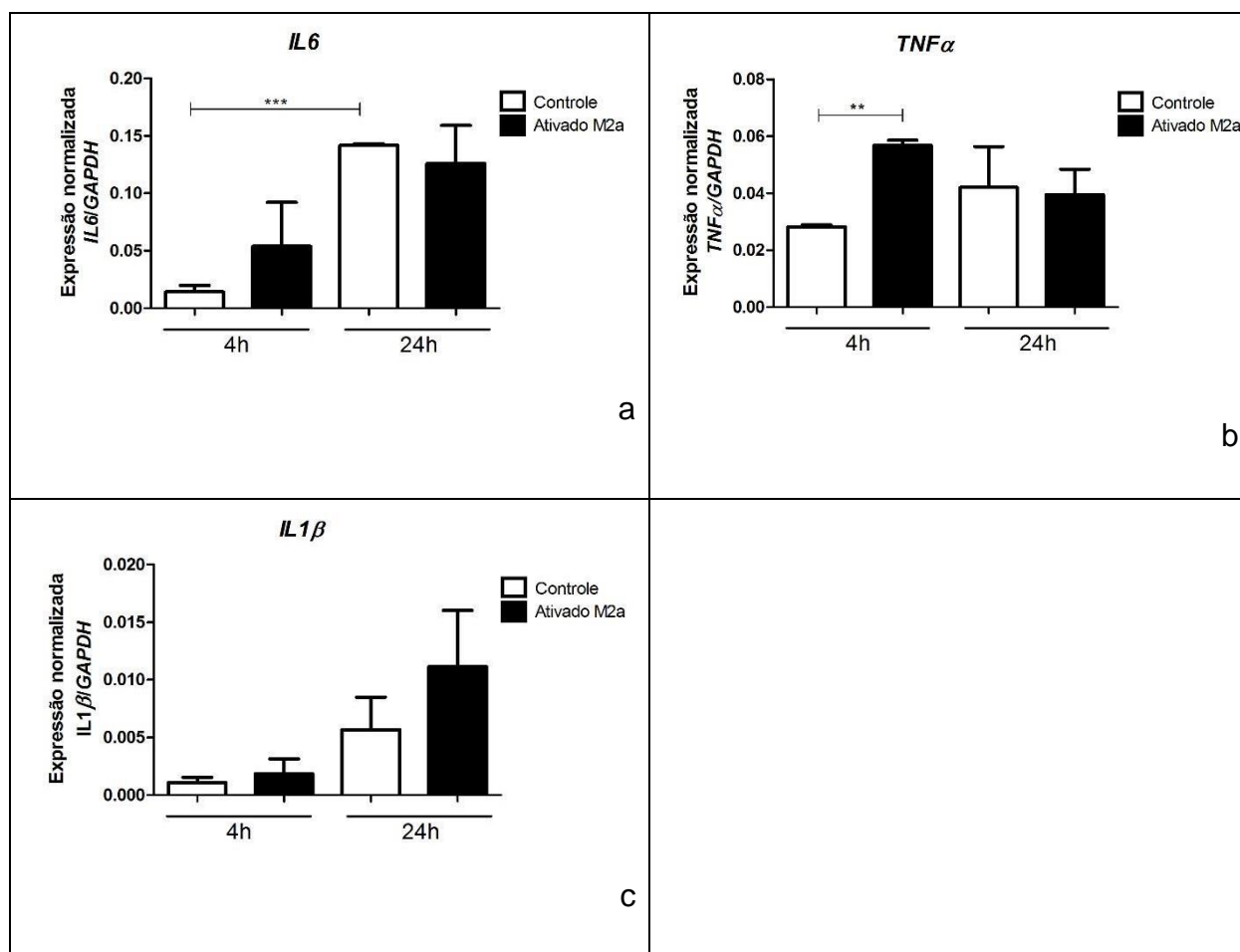
**b) Citocinas: IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-13**

Já com relação à expressão de citocinas, os resultados permitiram observar que após o período de 4 horas, houve um aumento significativo na expressão gênica da citocina *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 2,50) nas células do grupo ativado (tratamento com IL-4) em relação as células do grupo controle. Não houve diferença estatística significativa na expressão gênica das citocinas *IL-6* e *IL-1 $\beta$*  na comparação dos macrófagos destes grupos experimentais (Tabela 12, Figura 17).

Na avaliação do período de 24 horas, foi possível observar que não houve diferença estatística significativa nos valores de expressão gênica das citocinas *IL-6*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  nas células do grupo ativado em relação as células do grupo controle (Tabela 12, Figura 17).

Na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, foi observado que as células do grupo controle apresentaram um aumento significativo na expressão da citocina *IL-6* ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* -10,0) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Já em relação a expressão das citocinas *IL-1 $\beta$*  e *TNF- $\alpha$* , não houve diferença estatística significativa na comparação entre os períodos (4 e 24h) no grupo controle. Por outro lado, foi observado que, as células do grupo ativado não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão das citocinas *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  e *TNF- $\alpha$*  nos períodos avaliados (Tabela 13, Figura 17).

Os genes *IFN $\gamma$*  e *IL-13* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.



**Figura 17.** Expressão gênica das citocinas *IL-6* (a), *TNF $\alpha$*  (b) e *IL-1 $\beta$*  (c) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação para o perfil M2a e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL-4. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### c) Fatores de crescimento: *TGF $\beta$ 1*, *IGF1* e *VEGFA*

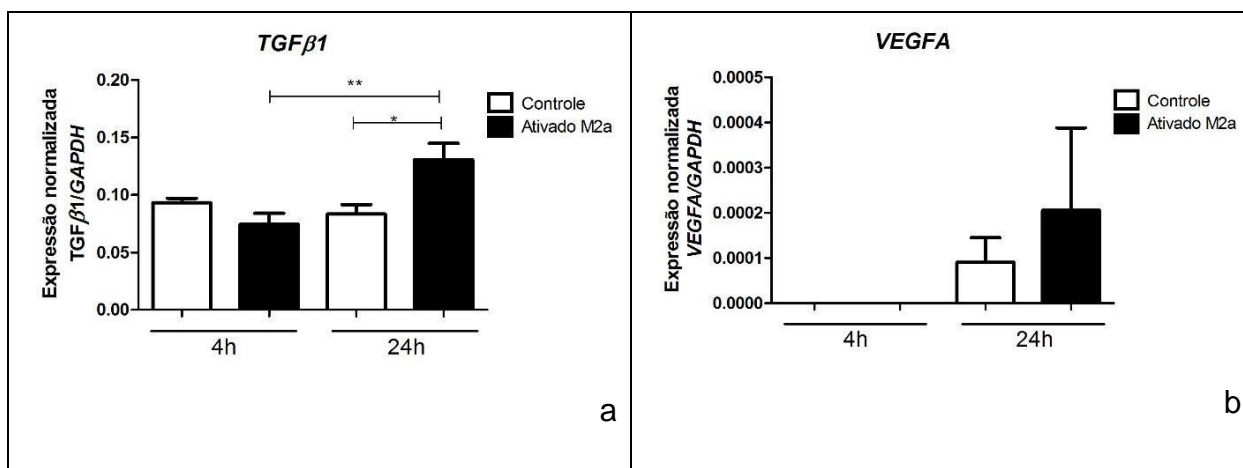
De acordo com os resultados avaliados, foi possível observar que, não houve diferença estatística significativa na expressão gênica do fator de crescimento *TGF $\beta$ 1* nas células do grupo ativado perfil M2a em relação as células do grupo controle. O gene *VEGFA* não foi expresso neste período avaliado. (Tabela 12, Figura 18).

Com relação ao período de 24 horas, foi visto que, houve um aumento significativo na expressão gênica de *TGF $\beta$ 1* ( $p < 0,05$ , *fold-regulation* 1,62) nas células do grupo ativado em relação as células do grupo controle e não houve diferença estatística significativa na expressão do fator de crescimento *VEGFA* na comparação destes grupos (Tabela 12, Figura 18).



Além disso, na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, foi observado que as células do grupo ativado apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *TGFβ1* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,85) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Não houve diferença estatística significativa na expressão deste gene entre os diferentes períodos nas células do grupo controle (Tabela 13, Figura 18).

O gene *IGF1* não foi expresso pelas células presentes nestes grupos experimentais nos períodos de 4 horas e 24 horas.



**Figura 18.** Expressão gênica dos fatores de crescimento *TGF-β1* (a) e *VEGFA* (b) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL-4. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.4.2. Efeito do LBI sobre a expressão gênica de macrófagos - perfil M2a

Os dados de expressão dos genes avaliados nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação) e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm nos períodos de 4 e 24 horas estão descritos nas Tabelas 14 e 15 e estão representados graficamente nas figuras 18, 19 e 20. Em relação ao efeito da irradiação, também foi realizada a comparação entre os períodos de 4 e 24 horas (Tabela 16) e os valores foram avaliados estatisticamente. Somente os genes que apresentaram diferença estatística significativa bem como valores de *fold-regulation* maiores que 1,50 ou menores que -1,50 foram considerados como diferencialmente expressos (e estão em negrito).

Tabela 14: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm. M2a Período de 4 h.

Gene	LBI 660	p-valor	Fold-regulation	Ativado M2a	LBI 780	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	0.35±0.10	0.93	-1.06	0.37±0.27	0.31±0.16	0.16	-1.20
<i>CCL3</i>	0.12±0.01	<b>0.05</b>	<b>-2.94</b>	0.35±0.09	0.20±0.04	0.12	-1.75
<i>CCL4</i>	0.07±0.02	0.37	-1.29	0.09±0.002	0.06±0.002	<b>0.0009</b>	<b>-1.51</b>
<i>CXCL2</i>	0.09±0.004	<b>0.03</b>	<b>-4.16</b>	0.37±0.08	0.24±0.11	0.22	-1.56
<i>IL-6</i>	0.06±0.02	0.37	-1.33	0.08±0.01	0.01±0.008	0.13	-8.33
<i>TNF-α</i>	0.02±0.006	<b>0.01</b>	<b>-2.50</b>	0.05±0.001	0.05±0.001	0.58	1.00
<i>IL1-β</i>	0.0003±0.00005	0.19	-3.33	0.001±0.001	0.001±0.0008	0.57	1.00
<i>TGFβ1</i>	0.05±0.004	0.12	1.40	0.07±0.009	0.11±0.01	<b>0.03</b>	<b>1.57</b>

Tabela 15: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm. M2a Período 24h.

Gene	LBI 660	p-valor	Fold-regulation	Ativado M2a	LBI 780	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	1.13±0.44	0.15	2.17	0.52±0.14	0.78±0.23	0.21	1.50
<i>CCL3</i>	0.41±0.01	0.17	-1.07	0.44±0.01	0.27±0.02	<b>0.002</b>	<b>-1.63</b>
<i>CCL4</i>	0.08±0.01	0.16	1.33	0.06±0.006	0.07±0.003	0.19	1.16
<i>CXCL2</i>	1.43±0.32	0.28	1.31	1.09±0.30	1.25±0.45	0.65	1.14
<i>IL-6</i>	0.13±0.04	0.74	1.08	0.12±0.03	0.08±0.02	0.15	-1.50
<i>TNFα</i>	0.06±0.02	0.28	2.00	0.03±0.009	0.02±0.005	0.06	-1.50
<i>IL1-β</i>	0.004±0.002	0.14	-2.50	0.01±0.004	0.001±0.0002	0.07	-10.0
<i>TGFβ1</i>	0.12±0.03	0.69	-1.08	0.13±0.01	0.07±0.009	<b>0.009</b>	<b>-1.88</b>
<i>VEGFA</i>	0.0003±0.0001	0.37	1.50	0.0002±0.0001	0.0001±0.0001	0.66	-2.00

Tabela 16: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm Perfil M2a. Comparação entre 4 e 24 horas.

Comparação entre 4 e 24 horas – M2a												
Gene	Ativado 4h	Ativado 24h	p-valor	Fold Regulation	LBI 660 4h	LBI 660 24h	p-valor	Fold Regulation	LBI 780 4h	LBI 780 24h	p-valor	Fold Regulation
<i>CCL2</i>	0.37±0.27	0.52±0.14	0.45	1.40	0.35±0.10	1.13±0.44	0.09	3.22	0.31±0.16	0.78±0.23	0.06	2.51
<i>CCL3</i>	0.35±0.09	0.44±0.018	0.24	1.25	0.12±0.01	0.41±0.01	0.0003	3.41	0.20±0.004	0.27±0.02	0.10	1.35
<i>CCL4</i>	0.09±0.002	0.06±0.006	0.02	-1.51	0.07±0.002	0.08±0.01	0.60	1.14	0.06±0.002	0.07±0.003	0.05	1.16
<i>CXCL2</i>	0.30±0.14	1.09±0.30	0.05	3.63	0.09±0.004	1.43±0.32	0.01	15.8	0.24±0.11	1.25±0.45	0.06	5.20
<i>IL6</i>	0.05±0.005	0.12±0.02	0.09	2.40	0.06±0.006	0.13±0.03	0.13	2.16	0.01±0.001	0.08±0.02	0.04	8.00

	0.03	0.03			0.02	0.04			0.008	0.02		
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.05 $\pm$ 0.001	0.03 $\pm$ 0.009	0.08	-1.66	0.02 $\pm$ 0.006	0.06 $\pm$ 0.02	0.11	3.00	0.05 $\pm$ 0.001	0.02 $\pm$ 0.005	0.008	-2.50
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.001 $\pm$ 0.001	0.0004 $\pm$ 0.0001	0.21	2.50	0.0003 $\pm$ 0.00005	0.0008 $\pm$ 0.00008	0.002	2.66	0.001 $\pm$ 0.0008	0.0003 $\pm$ 0.0001	0.22	-103
<i>TGF<math>\beta</math></i>	0.07 $\pm$ 0.009	0.13 $\pm$ 0.01	0.01	1.85	0.05 $\pm$ 0.004	0.12 $\pm$ 0.03	0.09	2.40	0.11 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.009	0.02	-1.58

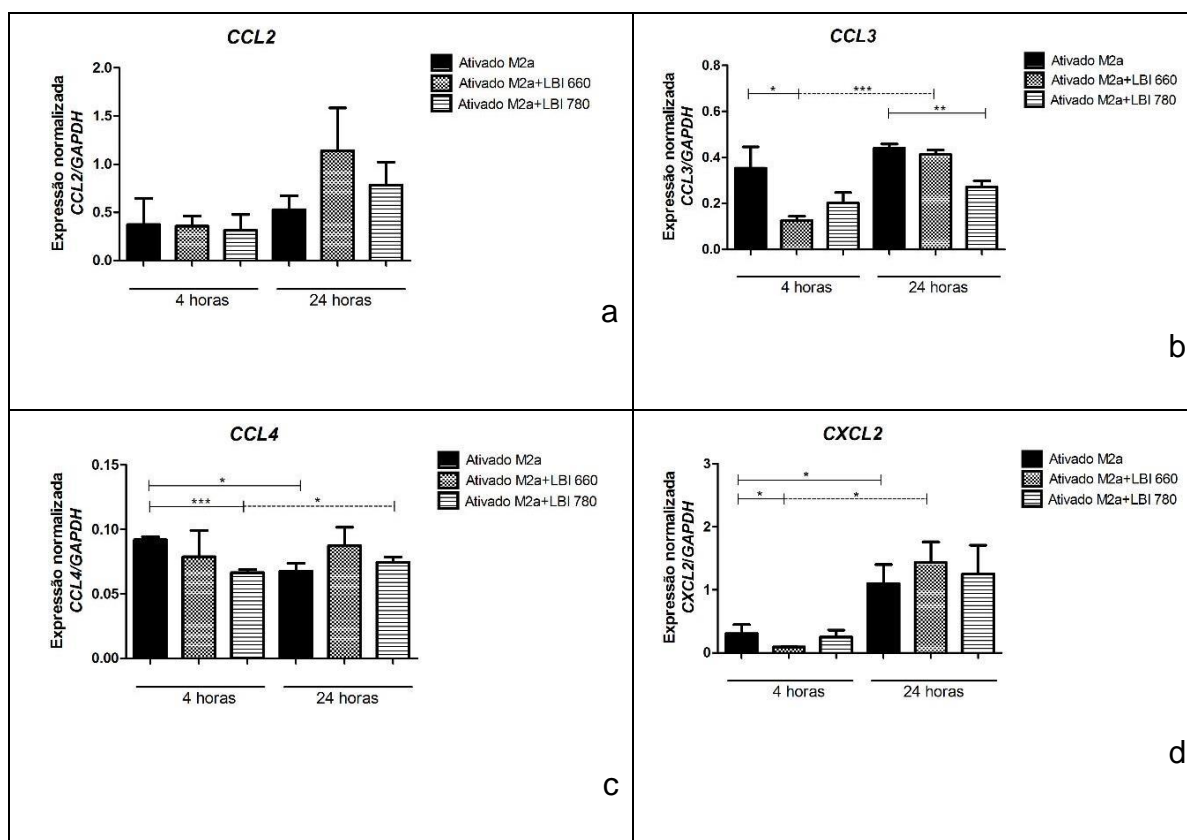
### a) Quimiocinas: *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *CXCL2*

Após o período de 4 horas, foi observada uma diminuição significativa na expressão gênica das quimiocinas *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -2,94) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -4,16) nas células do grupo ativado que recebeu a irradiação com LBI vermelho de 660nm em relação as células do grupo que recebeu somente ativação com IL-4 para um Perfil M2a. Já as quimiocinas *CCL2* e *CCL4* não apresentaram diferença estatística significativa nos seus valores de expressão na comparação dos macrófagos destes grupos avaliados. Por outro lado, na avaliação do efeito do LBI de 780 nm, foi possível observar que após 4 horas de incubação, os macrófagos irradiados neste parâmetro dosimétrico apresentaram uma diminuição significativa na expressão da quimiocina *CCL4* ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* -1,51) em relação aos macrófagos ativados. No entanto, não houve diferença estatística significativa na expressão dos genes *CCL2*, *CCL3* e *CXCL2* na comparação destes grupos no período de 4 horas (Tabela 14, Figura 19).

Nos ensaios realizados no período de 24 horas, os resultados permitiram observar que não houve diferença estatística significativa na expressão das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* entre as células do grupo ativado e irradiado com LBI vermelho de 660nm em relação as células do grupo que recebeu somente o tratamento com IL-4. Todavia, houve uma diminuição significativa na expressão gênica da citocina *CCL3* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -1,63) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI infravermelho de 780nm em relação as células do grupo ativado. Os genes *CCL2*, *CCL4* e *CXCL2* não apresentaram diferença estatística significativa nos seus valores de expressão,

entre as células do grupo ativado e irradiado (LBI 780 nm) em relação as células do grupo ativado (Tabela 15, Figura 19).

Na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, os macrófagos que receberam o tratamento com IL-4 apresentaram um aumento significativo na expressão de *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,63) e uma diminuição significativa na expressão de *CCL4* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,51) no período de 24 horas em relação 4 horas. Não houve diferença estatística significativa na expressão das quimiocinas *CCL2* e *CCL3* na comparação dos diferentes tempos de incubação pelos macrófagos ativados. As células que receberam o tratamento com IL-4 e a irradiação com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão das quimiocinas *CCL3* ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* 3,41) e *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 15,8) no período de 24 horas em relação 4 horas. Em relação as quimiocinas *CCL2* e *CCL4*, não houve diferença estatística significativa na comparação entre os períodos pelos macrófagos ativados e irradiados neste parâmetro dosimétrico. Os macrófagos ativados e irradiados com LBI de 780 nm não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão gênica das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas (Tabela 16, Figura 19).



**Figura 19.** Expressão gênica das quimiocinas *CCL2/MCP-1* (a), *CCL3/MIP-1 $\alpha$*  (b), *CCL4/MIP-1 $\beta$*  (c), *CXC2/MIP-2 $\alpha$*  (d) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo ativado (sem irradiação) com 0,01 $\mu$ g/mL de IL-4 e dos grupos ativados e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **b) Citocinas: IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-13**

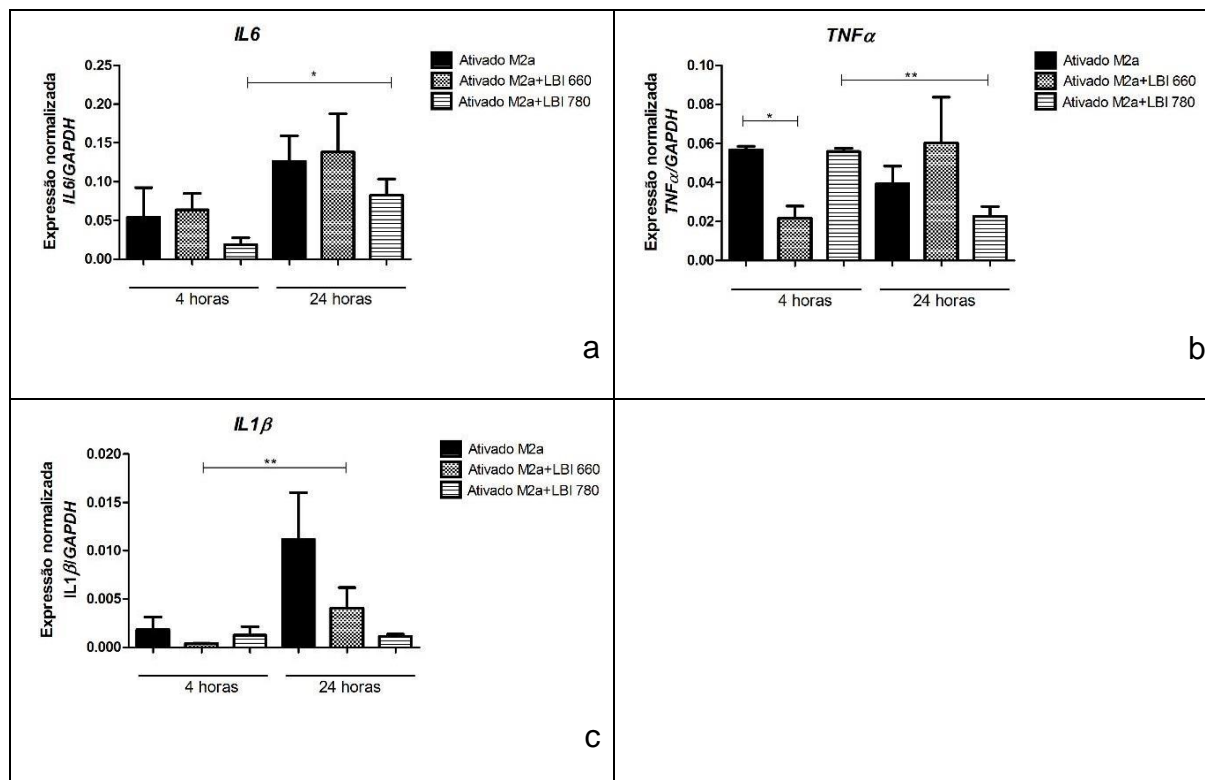
Com relação a avaliação das citocinas, os resultados permitiram observar que após o período de 4 horas, houve uma diminuição significativa na expressão gênica de *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -2,50) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado (tratamento com IL-4). Por outro lado, não houve diferença estatística significativa na expressão das citocinas *IL-6* e *IL-1 $\beta$*  nas células do grupo ativado que recebeu o tratamento com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado. Bem como, também foi observado que não houve diferença estatística significativa na expressão dos genes *IL-6*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  nos macrófagos do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm em relação aos macrófagos do grupo que recebeu somente ativação (Tabela 14, Figura 20).

Após o período de 24 horas, foi possível observar que não houve diferença estatística significativa na expressão das citocinas *IL-6*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  nos macrófagos dos grupos ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm em relação aos macrófagos do grupo que recebeu somente ativação (Tabela 15, Figura 20).

Já em relação ao fator tempo, foi visto que as células que receberam o tratamento com IL-4 não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão das citocinas *IL-6*, *TNF $\alpha$*  e *IL-1 $\beta$*  no período de 24 horas em relação 4 horas. Já as células que receberam ativação e irradiação com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo de *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 2,66) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* e *TNF $\alpha$*  nas células presentes neste grupo entre os períodos avaliados. Foi possível observar também que, os macrófagos que foram ativados e irradiados com LBI de 780 nm apresentaram um aumento significativo na expressão de *IL-6* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 8,00) bem como uma diminuição significativa na expressão de *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -2,50) no período de 24 horas em relação ao período de

4 horas. Enquanto isso, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-1 $\beta$*  nas células deste grupo entre os períodos avaliados (Tabela 16, Figura 20).

Os genes *IFN $\gamma$*  e *IL-13* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.



**Figura 20.** Expressão gênica das citocinas *IL-6* (a), *TNF $\alpha$*  (b) e *IL-1 $\beta$*  (c) pelo método qPCR array após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos ativados (sem irradiação) com 0,01 $\mu$ g/mL de IL-4 e dos grupos ativados e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### c) Fatores de crescimento: TGF $\beta$ 1, IGF1 e VEGFA

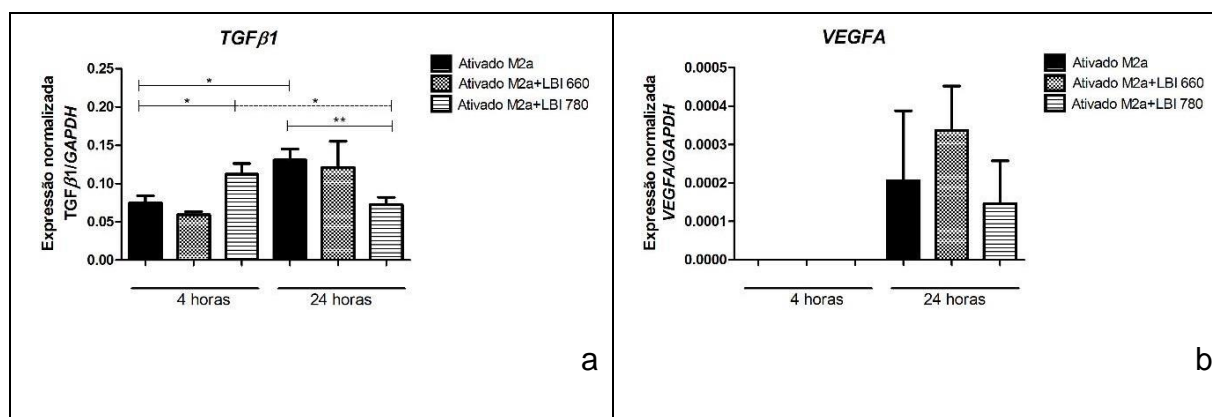
Nos ensaios realizados no período de 4 horas, foi possível observar um aumento significativo na expressão gênica do fator de crescimento *TGF $\beta$ 1* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,57) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm em relação as células do grupo somente ativado (tratamento com IL-4). Porém, neste período, não houve diferença estatística significativa na expressão deste gene entre as células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm e as células do grupo ativado. O gene *VEGFA* não foi expresso pelos

macrófagos presentes nestes grupos experimentais no período de 4 horas (Tabela 14, Figura 21).

Na avaliação da expressão de fatores de crescimento no período de 24 horas, foi visto que houve uma diminuição significativa na expressão gênica do fator de crescimento *TGFβ1* ( $p > 0.05$ , *fold-regulation* -1,88) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm em relação as células do grupo somente ativado (tratamento com IL-4). Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão de *VEGFA* entre as células do grupo ativado e irradiado nestes parâmetros dosimétricos em relação as células do grupo ativado. Além disso, foi observado que os macrófagos do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão dos genes *TGFβ1* e *VEGFA* em relação as células do grupo que recebeu somente ativação (Tabela 15, Figura 21).

Em relação a avaliação da expressão gênica do fator de crescimento *TGFβ1* na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, os resultados permitiram observar que as células que receberam o tratamento com IL-4 apresentaram um aumento significativo na expressão deste gene no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Já as células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm, apresentaram uma diminuição significativa na expressão deste fator de crescimento no período de 24h em relação ao período de 4h. Por outro lado, não houve diferença estatística significativa na expressão de *TGFβ1* nos macrófagos do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 entre os períodos avaliados. Como o gene *VEGFA* não foi expresso pelas células dos grupos experimentais no período de 4 horas, não foi possível realizar a comparação entre os diferentes períodos avaliados para este gene (Tabela 16, Figura 21).

O gene *IGF1* não foi expresso pelas células presentes nestes grupos experimentais nos períodos de 4 horas e 24 horas.



**Figura 21.** Expressão gênica dos fatores de crescimento  $TGF\beta 1$  (a) e  $VEGFA$  (b) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos ativado (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL-4 e dos grupos ativado e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.5. Avaliação de produção proteica por macrófagos de perfil M2a irradiados com laser - período 24 horas

Foi realizada a avaliação das proteínas IL-13, VEGFA, IGF1 e  $TGF\beta 1$ , que estão descritas na literatura como produtos do fenótipo M2a (Bosurgi et al. 2011, Duque & Descoteaux 2014, Martinez & Gordon 2014, Rószler 2015, Xuan et al. 2015).

##### a) IL-13

Não houve produção de IL-13 pelas células presentes nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação) e os grupos tratados com LBI de 660nm e 780nm.

##### b) $TGF\beta 1$

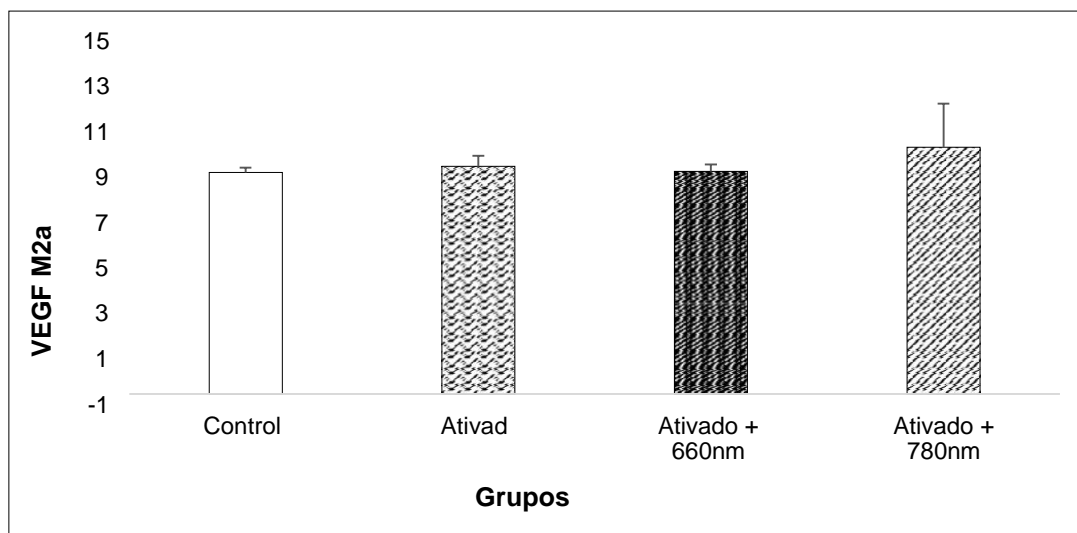
Foram realizados os testes de Imunoensaio ELISA para avaliar a síntese proteica do fator de crescimento  $TGF\beta 1$  através do sobrenadante das células presentes nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação), ativado e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm no período de 24 horas. Os ensaios foram realizados duas vezes nas amostras descritas anteriormente e uma vez em amostras provenientes de outras análises. Os testes foram feitos de acordo



com o fabricante, porém, não apresentaram os resultados esperados nos testes da curva padrão do kit R&D Mouse TGF $\beta$ 1 – DUO SET<sup>®</sup> DEVELOPMENT SYSTEM (DY71679), bem como, não houve produção de TGF $\beta$ 1 pelas células presentes nestes grupos. Portanto, será necessária uma nova análise do kit junto com um responsável pelo produto avaliado.

### c) VEGFA

Os resultados permitiram observar que em relação a produção de VEGFA, as células do grupo ativado apresentaram um aumento na produção deste fator de crescimento em relação as células do grupo controle ( $p > 0.05$ ). Por outro lado, houve uma diminuição na produção deste produto nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm, bem como, um aumento nas células do grupo ativado e tratado com LBI de 780 nm em relação as células do grupo somente ativado ( $p > 0.05$ ). No entanto, estes resultados referentes a produção deste fator de crescimento permitiram observar que, não houve diferença estatística significativa (Figura 22).



**Figura 22.** Dosagem proteica de VEGFA pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e do grupo ativado (sem irradiação) com  $0,1 \mu\text{g/mL}$  de IL-4 (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão.

#### 4.6. Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M2a – 4 e 24 h

Os resultados dos experimentos realizados para o fenótipo M2c estão aglutinados na Tabela 17.

Tabela 17: Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M2a.

PERFIL M2a				
Pcr array – 4 e 24 horas				Elisa – 24h
Citocinas	M2a x M Controle	M2a+ 660 nm x M2a	M2a+ 780 nm x M2a	Ativação e Tratamentos com Laser
CCL2	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
CCL3	↑ 4h	↓ 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	↓ 24h	
CCL4	↑ 4h	S# 4h	↓ 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
CXCL2	↑ 4h	↓ 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
IL-6	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
TNF- $\alpha$	↑ 4h	↓ 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
IL-1 $\beta$	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
TGF- $\beta$ 1	S# 4h	S# 4h	↑ 4h	Os ensaios foram realizados de acordo com o fabricante, porém, não apresentaram os resultados esperados nos testes da curva padrão do kit R&D Mouse TGF $\beta$ 1 – DUO SET <sup>®</sup> , bem como, não houve produção de TGF $\beta$ 1 pelas células presentes nos 4 grupos.
	↑ 24h	S# 24h	↓ 24h	
VEGFA	NE 4h	NE 4h	NE 4h	M2a x MCont = Aumento S#
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	M2a 660 nm x M2a = Redução S#)
				M2a 780 nm x M2a = Aumento S#

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	-----
<b>IL-13</b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	-----
<b>IGF-1</b>	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	-----

M Controle (Macrófago sem ativação). M2a (Macrófago ativado para perfil M2a).  
 ↑ (Aumento). ↓ (Diminuição) S# (Sem diferença estatística)

#### 4.7. Análise de expressão gênica por PCR array – Perfil M2c

##### 4.7.1. Avaliação do efeito do tratamento com IL-10 e dexametasona

Os valores de expressão dos genes avaliados no grupo controle e ativado perfil M2c (IL-10 e Dexametasona) nos períodos de 4 e 24 horas estão descritos nas Tabelas 18 e 19 e estão representados graficamente nas figuras 22, 23 e 24. O efeito da ativação do perfil M2c em relação ao controle (Tabela 18) bem como o efeito desta ativação entre os períodos de 4 e 24 horas foram analisados estatisticamente (Tabela 19). Somente os genes que apresentaram diferença estatística significativa bem como valores de *fold-regulation* maiores que 1,50 ou menores que -1,50 foram considerados como diferencialmente expressos (e estão em negrito). Os genes *IFN $\gamma$* , *IL-13*, *IGF1* e *VEGFA* não foram expressos pelos macrófagos de ambos os grupos.

Tabela 18: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos controle e ativado Perfil M2c. Períodos de 4 e 24 horas.

Gene	Período 4 horas				Período 24 horas			
	Controle	Ativado M2c	p-valor	<i>Fold-regulation</i>	Controle	Ativado M2c	p-valor	<i>Fold-regulation</i>
<i>CCL2</i>	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02	0.93	1.00	0.54 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.06	0.38	1.07
<i>CCL3</i>	0.06 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03	0.50	1.66	0.18 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.08	<b>0.04</b>	<b>2.27</b>
<i>CCL4</i>	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02	0.46	2.00	0.02 $\pm$ 0.005	0.05 $\pm$ 0.01	0.06	2.50
<i>CXCL2</i>	0.08 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	<b>0.01</b>	<b>1.75</b>	0.04 $\pm$ 0.007	0.11 $\pm$ 0.07	0.21	2.75
<i>IL-6</i>	0.009 $\pm$ 0.002	0.004 $\pm$ 0.002	0.14	-2.27	0.0003 $\pm$ 0.0001	0.0008 $\pm$ 0.0002	0.07	2.66
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.03 $\pm$ 0.0002	0.03 $\pm$ 0.004	0.90	1.00	0.04 $\pm$ 0.009	0.05 $\pm$ 0,007	0.28	1.25
<i>IL1-<math>\beta</math></i>	0.0003 $\pm$ 0.0000 5	0.0003 $\pm$ 0.0000 7	0.88	1.00	0.0009 $\pm$ 0.0000 6	0.002 $\pm$ 0.0002	<b>0.01</b>	<b>2.22</b>
<i>TGF<math>\beta</math>1</i>	0.08 $\pm$ 0.003	0.07 $\pm$ 0.006	0.19	-1.14	0.10 $\pm$ 0.002	0.20 $\pm$ 0.05	0.08	2.00

Tabela 19: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos controle e ativado Perfil M2c. Comparação entre 4 e 24 horas.

Comparaçã o entre 4 e 24 horas – M2c								
Gene	Controle 4h	Controle 24h	p-valor	Fold Regulation	Ativado 4h	Ativado 24h	p-valor	Fold Regulation
<b>CCL2</b>	0.05±0.01	0.54±0.01	0.0001	10.8	0.05±0.02	0.58±0.06	0.005	11.6
<b>CCL3</b>	0.06±0.03	0.18±0.02	0.01	3.00	0.13±0.07	0.41±0.08	0.02	3.15
<b>CCL4</b>	0.029±0.01	0.027±0.005	0.80	-1.07	0.04±0.02	0.05±0.01	0.37	1.25
<b>CXCL2</b>	0.08±0.01	0.04±0.007	0.04	-2.00	0.14±0.01	0.11±0.07	0.64	-1.28
<b>IL6</b>	0.009±0.002	0.0003±0.001	0.02	-33.3	0.007±0.005	0.0008±0.0002	0.16	-9.09
<b>TNFα</b>	0.03±0.0002	0.04±0.009	0.36	1.33	0.03±0.004	0.05±0.007	0.05	1.66
<b>IL-1β</b>	0.0003±0.00005	0.0009±0.00006	0.001	3.00	0.0003±0.00007	0.002±0.0002	0.006	6.66
<b>TGFβ</b>	0.085±0.003	0.10±0.002	0.004	1.17	0.07±0.006	0.20±0.05	0.05	2.85

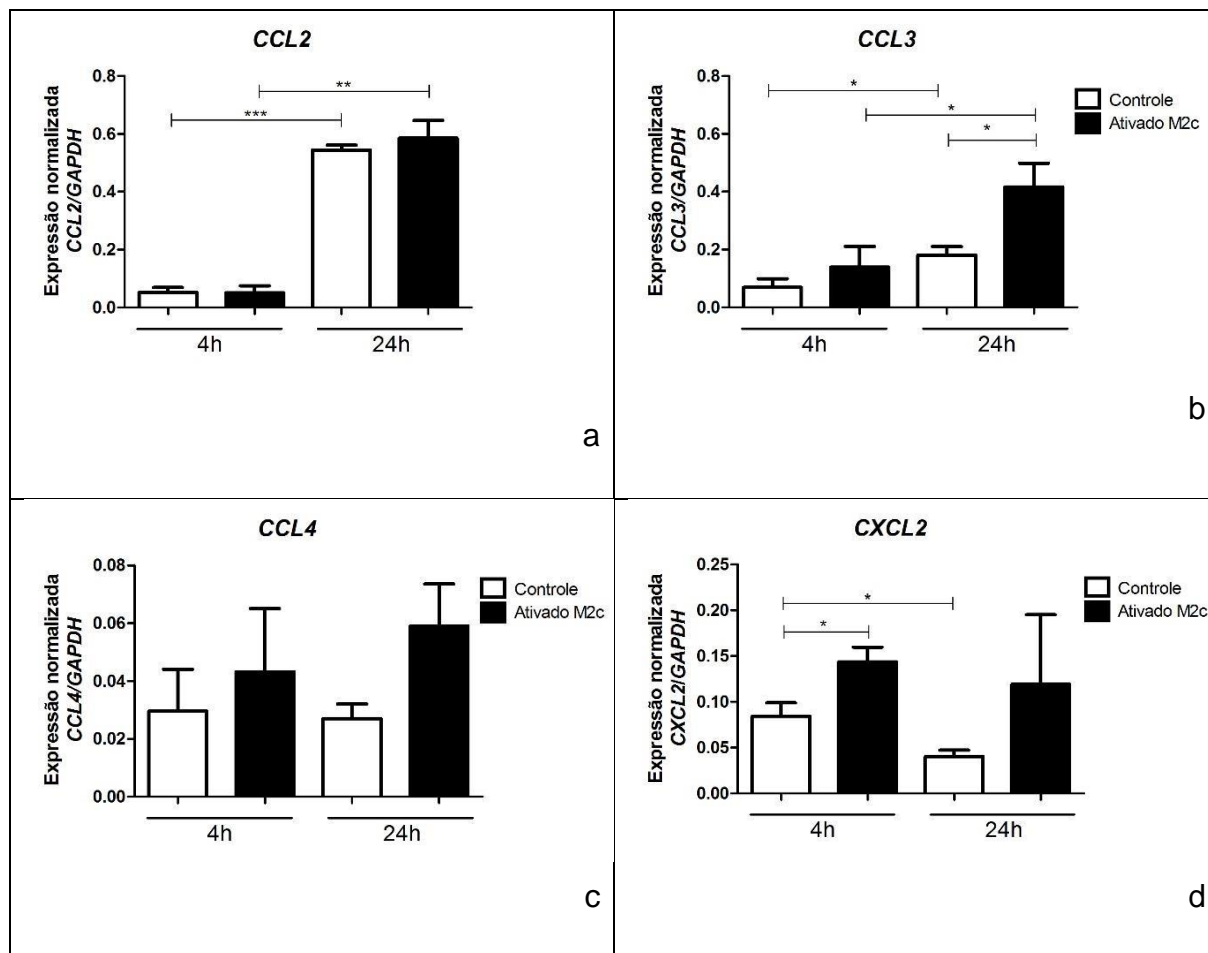
### a) Quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2

Em relação ao período de 4 horas, os resultados permitiram observar que houve um aumento significativo na expressão gênica de *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,75) nas células do grupo ativado (tratamento com IL-10 + Dexametasona) em relação as células do grupo controle. No entanto, as quimiocinas *CCL2*, *CCL3* e *CCL4* não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão gênica na comparação entre os macrófagos destes grupos experimentais (Tabela 18, Figura 23).

Em 24 horas, foi observado que houve um aumento significativo na expressão gênica da quimiocina *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,27) nas células do grupo ativado em relação as células do grupo controle. Já em relação a expressão gênica das quimiocinas *CCL2*, *CCL4* e *CXCL2*, não houve diferença estatística significativa na comparação dos grupos avaliados. (Tabela 18, Figura 23).

Em relação ao fator tempo, na Figura 23 foi possível observar que houve um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.001$ , *fold-regulation* 10,8) e *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,00, bem como, uma diminuição significativa nos níveis de expressão de *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -2,00) nas células do grupo controle no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Não houve diferença estatística significativa na expressão de *CCL4* entre os diferentes períodos nas células do grupo controle. Além disso, as células do grupo ativado apresentaram um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 11,6) e *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,15) no período de 24 horas em relação ao

período de 4 horas. Enquanto isso, não houve diferença estatística significativa na expressão dos genes *CCL4* e *CXCL2* nas células do grupo ativado entre dois períodos avaliados (Tabela 19).



**Figura 23.** Expressão gênica das quimiocinas *CCL2/MCP-1* (a), *CCL3/MIP-1 $\alpha$*  (b), *CCL4/MIP-1 $\beta$*  (c), *CXCL2/MIP-2 $\alpha$*  (d) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL-10 e  $0,08 \mu\text{g/mL}$  de Dexametasona. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### b) Citocinas: IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-13

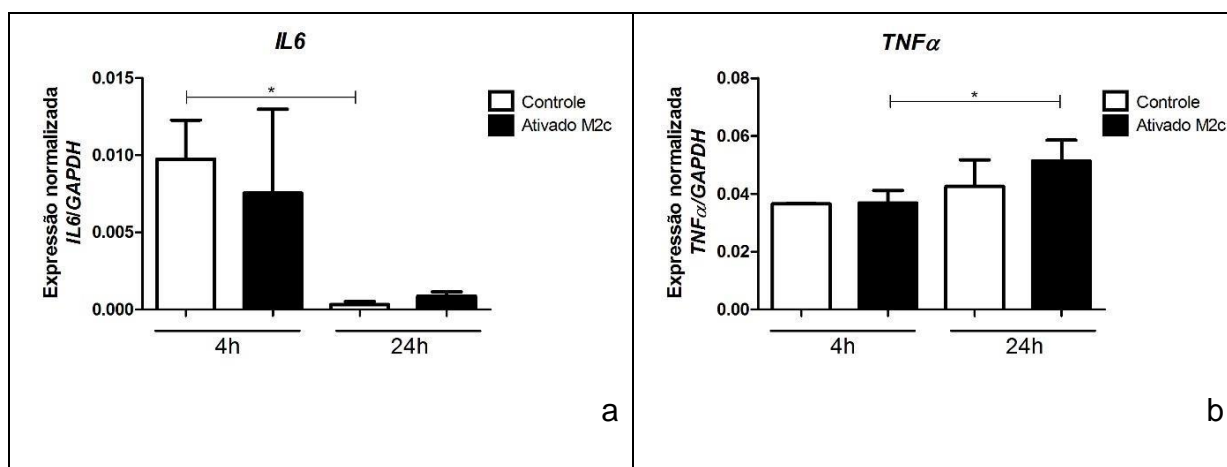
Na expressão de citocinas, os resultados permitiram observar que após o período de 4 horas, não houve diferença estatística significativa na expressão das citocinas *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  e *TNF $\alpha$*  nas células do grupo ativado (tratamento com

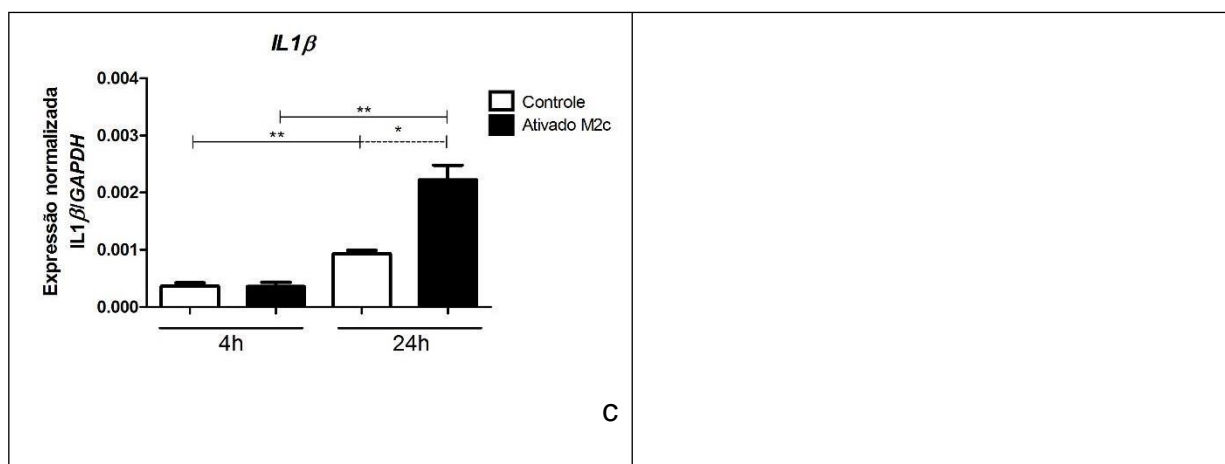
IL-10 + Dexametasona) perfil M2c em relação às células do grupo controle (Tabela 18, Figura 24).

No período de 24 horas, houve um aumento significativo na expressão gênica da citocina *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,22) nas células do grupo ativado em relação as células do grupo controle. Em relação à expressão dos genes *IL-6* e *TNF $\alpha$* , não houve diferença estatística significativa entre as células do grupo controle e ativado (Tabela 18, Figura 24).

Comparando os períodos de 4 e 24 horas, foi visto que as células do grupo controle apresentaram um aumento significativo na expressão da citocina *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 3,00), bem como, uma diminuição significativa na expressão do gene *IL-6* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -33,3) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Como também foi observado que não houve diferença estatística significativa na expressão de *TNF $\alpha$*  nas células do grupo controle entre os diferentes períodos avaliados. Por outro lado, foi observado que nas células do grupo ativado, houve um aumento significativo na expressão gênica das citocinas *IL-1 $\beta$*  ( $p > 0.01$ , *fold-regulation* 6,66) e *TNF- $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,66) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* entre os diferentes períodos nas células do grupo ativado (Tabela 19, Figura 24).

Os genes *IFN $\gamma$*  e *IL-13* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.





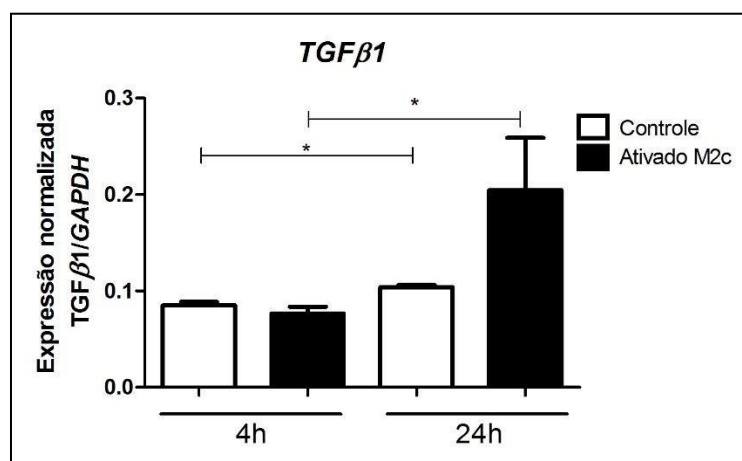
**Figura 24.** Expressão gênica das citocinas *IL-6* (a), *TNFα* (b) e *IL-1β* (c) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos controles (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL-10 e  $0,08 \mu\text{g/mL}$  de Dexametasona. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### c) Fatores de crescimento: *TGFβ1*, *IGF1* e *VEGFA*

Na avaliação da expressão do fator de crescimento *TGFβ1*, foi possível observar que não houve diferença estatística significativa na expressão deste gene nas células do grupo ativado (tratamento com IL-10 + Dexametasona) em relação as células do grupo controle nos períodos de 4 e 24 horas (Tabela 18, Figura 25).

Por outro lado, foi observado que na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas, as células do grupo ativado apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *TGFβ1* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,85) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Já com relação as células do grupo controle, não houve diferença estatística significativa na expressão deste gene na comparação entre os períodos observados (Tabela 19, Figura 25).

Os genes *IGF1* e *VEGFA* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.



**Figura 25.** Expressão gênica do fator de crescimento *TGF-β1* pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação e 4 e 24 horas de incubação após a irradiação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e do grupo ativado (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL- 10 e  $0,08 \mu\text{g/mL}$  de Dexametasona. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.7.2. Efeito do LBI sobre a expressão gênica de macrófagos – Perfil M2c

Na avaliação das irradiações com LBI de 660 nm e 780 nm, os macrófagos J774 foram ativados por 24 horas com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL- 10 e  $0,08 \mu\text{g/mL}$  de Dexametasona (Perfil M2c) e foi avaliada a expressão gênica (qPCR *array*) das quimiocinas *CCL2* (*MCP-1*), *CCL3* (*MIP-1α*), *CCL4* (*MIP-1β*), *CXCL2* (*MIP-2α*); citocinas: *IL-1β*, *IFNγ*, *IL-6*, *TNFα*, *IL-13* e fatores de crescimento *TGFβ1*, *IGF1* e *VEGFA*, após 4 e 24 horas de incubação. Os dados de expressão dos genes avaliados nos grupos controle, ativado e ativado e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm nos períodos de 4 e 24 horas estão descritos nas Tabelas 20 e 21 e estão representados graficamente nas figuras 26, 27 e 28. Em relação ao efeito da irradiação, também foi realizada a comparação entre os períodos de 4 e 24 horas (Tabela 22) e os valores foram avaliados estatisticamente. Somente os genes que apresentaram diferença estatística significativa bem como valores de *fold-regulation* maiores que 1,50 ou menores que -1,50 foram considerados como diferencialmente expressos (e estão em negrito). Os genes *IFNγ*, *IL- 13*, *IGF1* e *VEGFA* não foram expressos pelos macrófagos nos diferentes grupos experimentais nos períodos de 4 e 24 horas.

Tabela 20: Descrição dos valores de expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativado e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm. M2c Período de 4 h.



Gene	LBI 660	p-valor	Fold-regulation	Ativado M2c	LBI 780	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	0.07±0.03	0.41	1.40	0.05±0.02	0.09±0.01	0.10	1.80
<i>CCL3</i>	0.05±0.02	0.39	-2.00	0.10±0.03	0.11±0.03	0.75	1.10
<i>CCL4</i>	0.04±0.01	0.85	1.00	0.04±0.02	0.04±0.01	0.88	1.00
<i>CXCL2</i>	0.05±0.002	<b>0.01</b>	<b>-2.85</b>	0.14±0.015	0.16±0.005	0.13	1.14
<i>IL-6</i>	0.005±0.004	0.70	-1.40	0.007±0.005	0.008±0.005	0.76	1.14
<i>TNF-α</i>	0.018±0.0008	<b>0.01</b>	<b>-1.66</b>	0.03±0.004	0.06±0.007	<b>0.01</b>	<b>2.00</b>
<i>IL1-β</i>	0.0001±0.0000008	<b>0.03</b>	<b>-3.03</b>	0.0003±0.00007	0.0004±0.00003	0.06	1.33
<i>TGFβ1</i>	0.06±0.002	0.06	-1.17	0.07±0.006	0.10±0.0009	0.01	1.42

Tabela 21: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm. M2c Período 24h.

Gene	LBI 660	p-valor	Fold-regulation	Ativado M2c	LBI 780	p-valor	Fold-regulation
<i>CCL2</i>	0.66±0.07	0.24	1.13	0.58±0.06	0.19±0.0009	<b>0.008</b>	<b>-3.12</b>
<i>CCL3</i>	0.33±0.18	0.56	-1.25	0.41±0.08	0.07±0.01	<b>0.02</b>	<b>-5.88</b>
<i>CCL4</i>	0.05±0.02	0.77	-1.00	0.05±0.01	0.01±0.006	<b>0.05</b>	<b>-5.00</b>
<i>CXCL2</i>	0.19±0.16	0.51	1.72	0.11±0.07	0.02±0.01	0.17	-5.55
<i>IL-6</i>	0.001±0.001	0.61	1.25	0.0008±0.0002	0.0002±0.0001	0.06	-4.00
<i>TNFα</i>	0.03±0.005	<b>0.05</b>	<b>-1.66</b>	0.05±0.007	0.01±0.0007	<b>0.01</b>	<b>-5.00</b>
<i>IL1-β</i>	0.001±0.0005	0.17	-2.00	0.002±0.0002	0.0004±0.00002	<b>0.007</b>	<b>-5.00</b>
<i>TGFβ1</i>	0.11±0.01	0.12	-2.00	0.20±0.05	0.06±0.002	<b>0.04</b>	<b>-3.33</b>

Tabela 22: Descrição dos valores de expressão gênica (média ± desvio padrão) das células dos grupos ativado e ativados e irradiados com LBI de 660nm e 780 nm Perfil M2c. Comparação entre 4 e 24 h.

Comparação entre 4 e 24 horas – M2c												
Gene	Ativado 4h	Ativado 24h	p-valor	Fold Regulation	LBI 660 4h	LBI 660 24h	p-valor	Fold Regulation	LBI 780 4h	LBI 780 24h	p-valor	Fold Regulation
<i>CCL2</i>	0.05±0.02	0.58±0.06	0.005	11.6	0.07±0.03	0.66±0.07	0.006	9.42	0.09±0.01	0.19±0.0009	0.008	2.11
<i>CCL3</i>	0.13±0.07	0.41±0.08	0.02	3.15	0.05±0.02	0.33±0.18	0.12	6.60	0.11±0.03	0.07±0.01	0.25	-1.58
<i>CCL4</i>	0.04±0.02	0.05±0.01	0.37	1.25	0.04±0.01	0.05±0.02	0.45	1.25	0.04±0.01	0.01±0.006	0.13	-4.00
<i>CXCL2</i>	0.14±0.01	0.11±0.07	0.64	-1.28	0.05±0.002	0.10±0.06	0.45	2.00	0.16±0.005	0.02±0.01	0.002	-1.00
<i>IL6</i>	0.007±0.005	0.0008±0.0002	0.16	-9.09	0.005±0.004	0.001±0.001	0.26	-5.00	0.008±0.005	0.0002±0.0001	0.10	-50.0

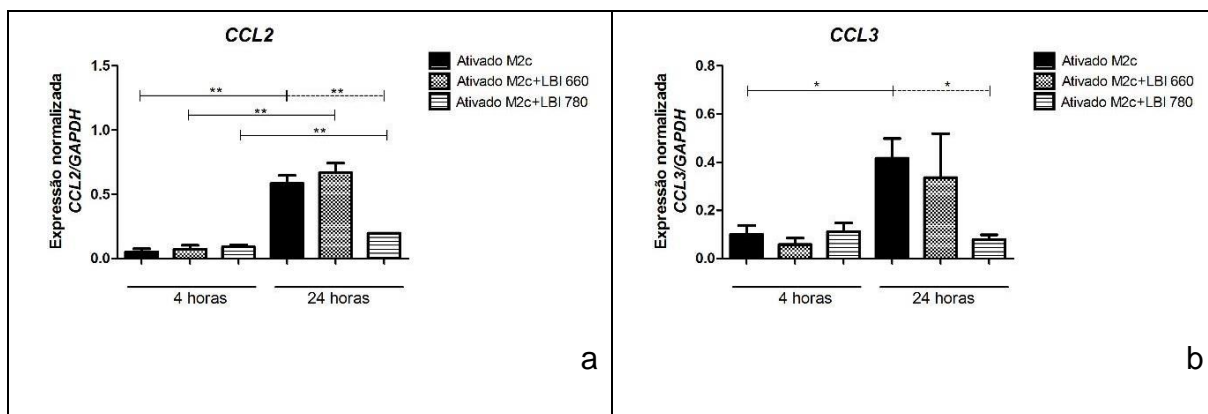
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.03 $\pm$ 0.004	0.05 $\pm$ 0.007	0.05 1.66	0.01 $\pm$ 0.0008	0.03 $\pm$ 0.005	0.02 3.00	0.06 $\pm$ 0.007	0.01 $\pm$ 0.0007	0.008 -6.25
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.0003 $\pm$ 0.00007	0.002 $\pm$ 0.0002	0.006 6.66	0.0001 $\pm$ 0.000008	0.001 $\pm$ 0.0005	0.05 10.0	0.0004 $\pm$ 0.00003	0.0004 $\pm$ 0.00002	0.18 1.00
<i>TGF<math>\beta</math></i>	0.07 $\pm$ 0.006	0.20 $\pm$ 0.05	0.05 2.85	0.06 $\pm$ 0.002	0.11 $\pm$ 0.01	0.03 1.83	0.10 $\pm$ 0.0009	0.06 $\pm$ 0.002	0.001 -1.66

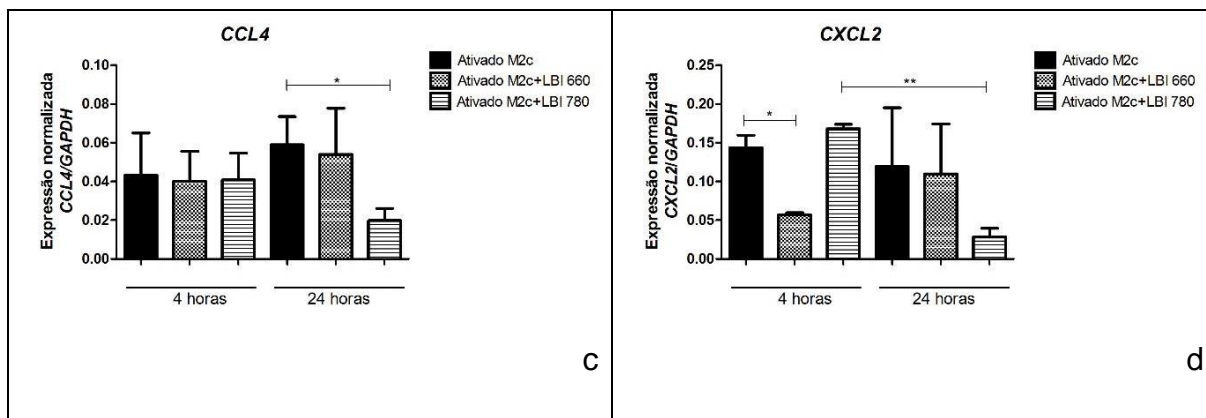
### a) Quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL4, CXCL2

Após o período de 4 horas, os resultados demonstraram uma diminuição significativa na expressão gênica da quimiocina *CXCL2* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -2,85) nas células do grupo ativado que recebeu a irradiação com LBI vermelho de 660nm em relação as células do grupo que recebeu somente ativação com IL-10 + Dexametasona para um Perfil M2c. Já as quimiocinas *CCL2*, *CCL3* e *CCL4* não apresentaram diferença estatística significativa nos seus valores de expressão na comparação dos macrófagos destes grupos observados. Em relação aos macrófagos ativados e irradiados com LBI de 780 nm, não houve diferença estatística significativa na expressão das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* na comparação destes grupos no período de 4 horas (Tabela 20, Figura 26).

Na avaliação da expressão de quimiocinas no período de 24 horas, foi visto que, houve uma diminuição significativa na expressão das citocinas *CCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -3,12), *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -5,88) e *CCL4* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -5,00) nas células do grupo ativado e tratado com LBI infravermelho de 780nm em relação as células do grupo ativado. Porém, não houve diferença estatística significativa na expressão de *CXCL2* entre os macrófagos presentes nestes grupos experimentais avaliados. Bem como na avaliação do efeito do tratamento Laser vermelho, não houve diferença estatística significativa na expressão gênica das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* nas células do grupo ativado e irradiado com LBI vermelho de 660nm em relação as células do grupo que recebeu somente ativação neste período (Tabela 21, Figura 26).

Na análise feita entre os períodos de 4 e 24 horas, os macrófagos que receberam o tratamento com IL-10 + Dexametasona (M2c) apresentaram um aumento significativo na expressão gênica das quimiocinas *CCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 11,6) e *CCL3* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,15) no período de 24 horas em relação 4 horas. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão das quimiocinas *CCL4* e *CXCL2* na comparação dos diferentes tempos de incubação pelos macrófagos ativados. As células que receberam o tratamento com IL-10+ Dexametasona e a irradiação com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão do gene *CCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 9,42) no período de 24 horas em relação 4 horas. Em relação as quimiocinas *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2*, não houve diferença estatística significativa na comparação entre os períodos pelos macrófagos ativados e irradiados neste parâmetro dosimétrico. Os macrófagos ativados e irradiados com LBI de 780 nm demonstraram um aumento significativo na expressão do gene *CCL2* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 2,11) no período de 24 horas em relação 4 horas. Além disso, foi visto que, não houve diferença estatística significativa nos valores de expressão gênica das quimiocinas *CCL3*, *CCL4* e *CXCL2* na comparação entre os períodos de 4 e 24 horas nas células deste grupo (Tabela 22, Figura 26).





**Figura 26.** Expressão gênica das quimiocinas *CCL2/MCP-1* (a), *CCL3/MIP-1 $\alpha$*  (b), *CCL4/MIP-1 $\beta$*  (c), *CXCL2/MIP-2 $\alpha$*  (d) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos ativados (sem irradiação) com 0,01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IL-10 e 0,08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dexametasona e dos grupos ativados e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### b) Citocinas: IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-13

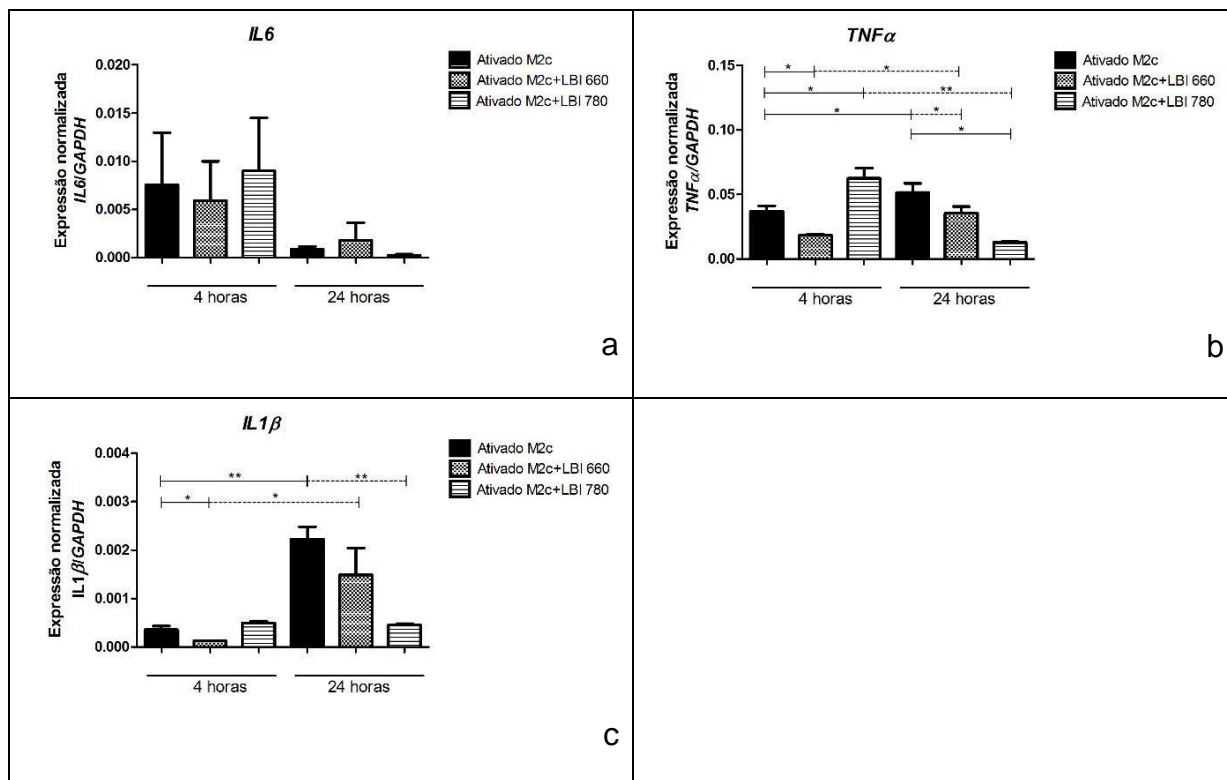
Sobre a avaliação da expressão de citocinas, os resultados permitiram observar que após o período de 4 horas, houve uma diminuição significativa na expressão gênica das citocinas TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,66) e IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -3,03) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado (tratamento com IL-10 + Dexametasona). Por outro lado, não houve diferença estatística significativa na expressão de IL-6 nas células do grupo ativado que foi irradiado nestes parâmetros dosimétricos em relação as células do grupo ativado. Como também foi observado que as os macrófagos do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm apresentaram um aumento na expressão do gene TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,00) em relação aos macrófagos somente ativados. Já em relação as citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$ , não houve diferença estatística significativa na expressão destes genes nos macrófagos destes grupos observados (Tabela 20, Figura 27).

Após o período de 24 horas, os resultados demonstraram que houve uma diminuição significativa na expressão gênica de TNF $\alpha$  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -1,66) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm em relação as células do grupo ativado. Mas, não houve diferença estatística significativa na

expressão dos genes *IL-6* e *IL-1 $\beta$*  nas células presentes nestes grupos avaliados. Ainda foi possível observar que as células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm apresentaram uma diminuição significativa na expressão de *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -5,00) e *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -5,00) em relação as células do grupo ativado. Porém, as células do grupo ativado e irradiado nestes parâmetros dosimétricos não apresentarem diferença estatística significativa nos valores de expressão do gene *IL-6* em relação as células do grupo somente ativado. (Tabela 21, Figura 27).

As análises realizadas nos períodos de 4 e 24 horas permitiram observar que as células que receberam o tratamento com (IL-10 + Dexametasona – Perfil M2c) apresentaram um aumento significativo na expressão das citocinas *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,66) e *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* 6,66) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Enquanto isso, foi observado que essas células não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão de *IL-6* na comparação destes períodos. As células que receberam ativação e irradiação com LBI de 660 nm também apresentaram um aumento significativo na expressão das citocinas *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 3,00) e *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 10,0) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Mas, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* nas células presentes neste grupo entre os períodos avaliados. Foi possível observar ainda que, os macrófagos que foram ativados e irradiados com LBI de 780 nm apresentaram uma diminuição significativa na expressão de *TNF $\alpha$*  ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -6,25) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Porém, não houve diferença estatística significativa na expressão de *IL-6* e *IL-1 $\beta$*  nas células deste grupo entre os períodos avaliados (Tabela 22, Figura 27).

Os genes *IFN $\gamma$*  e *IL-13* não foram expressos pelas células presentes nestes grupos nessas condições experimentais.



**Figura 27.** Expressão gênica das citocinas IL-6 (a), TNF- $\alpha$  (b) e IL-1 $\beta$  (c) pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) dos grupos ativado (sem irradiação) com 0,01 $\mu$ g/mL de IL-10 e 0,08  $\mu$ g/mL de dexametasona e dos grupos ativado e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

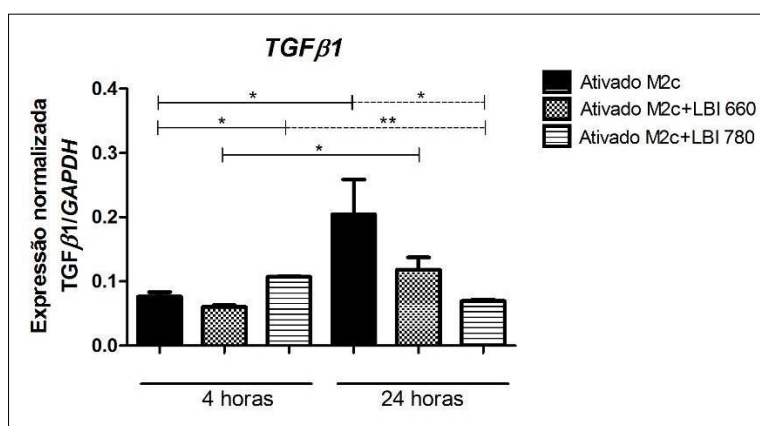
### c) Fatores de crescimento: TGF $\beta$ 1, IGF1 e VEGFA

Nos ensaios que avaliaram a expressão gênica dos fatores de crescimento, foi visto que (Tabela 20, Figura 28) após o período de 4 horas, não houve diferença estatística significativa na expressão de TGF $\beta$ 1 nas células dos grupos ativado e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm em relação as células do grupo somente ativado (tratamento com IL-10 + Dexametasona – Perfil M2c).

Na avaliação da expressão de TGF $\beta$ 1 no período de 24 horas, houve uma diminuição significativa na expressão gênica do fator de crescimento TGF $\beta$ 1 ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* -3,33) nas células do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 nm em relação as células do grupo somente ativado. Mas, os macrófagos do grupo ativado e irradiado com LBI de 660 nm não apresentaram diferença estatística significativa nos valores de expressão deste gene em relação as células do grupo que recebeu somente ativação (Tabela 21, Figura 28).

Na Figura 28, foi feita ainda a avaliação dos períodos de 4 e 24 horas e foi feita uma comparação entre os valores de expressão dos grupos, onde os resultados permitiram observar que as células ativadas Perfil M2c, bem como, as células ativadas e irradiadas com LBI de 660 nm apresentaram um aumento significativo na expressão de *TGFβ1* ( $p < 0.05$ , *fold-regulation* 2,85 e  $p < 0.05$ , *fold-regulation* 1,83, respectivamente) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas. Por outro lado, os macrófagos do grupo ativado e irradiado com LBI de 780 apresentaram uma diminuição significativa na expressão de *TGFβ1* ( $p < 0.01$ , *fold-regulation* -1,66) no período de 24 horas em relação ao período de 4 horas (Tabela 21).

Não houve expressão gênica dos fatores de crescimento *IGF1* e *VEGFA* pelas células dos respectivos grupos.



**Figura 28.** Expressão gênica do fator de crescimento TGF-β1 pelo método qPCR *array* após 24 horas de ativação. Foram avaliadas culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo ativado (sem irradiação) com  $0,01 \mu\text{g/mL}$  de IL-10 e  $0,08 \mu\text{g/mL}$  de dexametasona e dos grupos ativados e irradiados com LBI vermelho de 660nm e infravermelho de 780 nm. Barras representam médias e desvio padrão. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.8. Avaliação de produção proteica por macrófagos de perfil M2c irradiados com laser - período 24 horas

Para este ensaio, foram realizados 3 experimentos independentes onde os macrófagos foram ativados por 24 horas com  $0,1 \mu\text{g/mL}$  de IL-10 e  $0,8 \mu\text{g/mL}$  de dexametasona. Para o perfil M2c, até o momento foram dosadas as proteínas IL-13 e Vegfa que estão descritas na literatura como produtos deste fenótipo, sendo que, ainda será realizada a dosagem dos dois fatores de crescimento

TGF $\beta$ 1 e IGF1 também descritos na literatura (Bosurgi et al. 2011, Duque & Descoteaux 2014, Martinez & Gordon 2014, Rószler 2015, Xuan et al. 2015). Estes produtos foram dosados no sobrenadante das culturas após 24 horas de incubação (ou seja 48h após ativação) pelo método de Imunoensaio Elisa. Para as análises estatísticas foram realizados Teste T com correção de Welch e Teste Anova Tukey.

#### **a) IL-13**

Não houve produção de IL-13 pelas células presentes nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação) e os grupos tratados com LBI de 660nm e 780nm neste período.

#### **b) TGF $\beta$ 1**

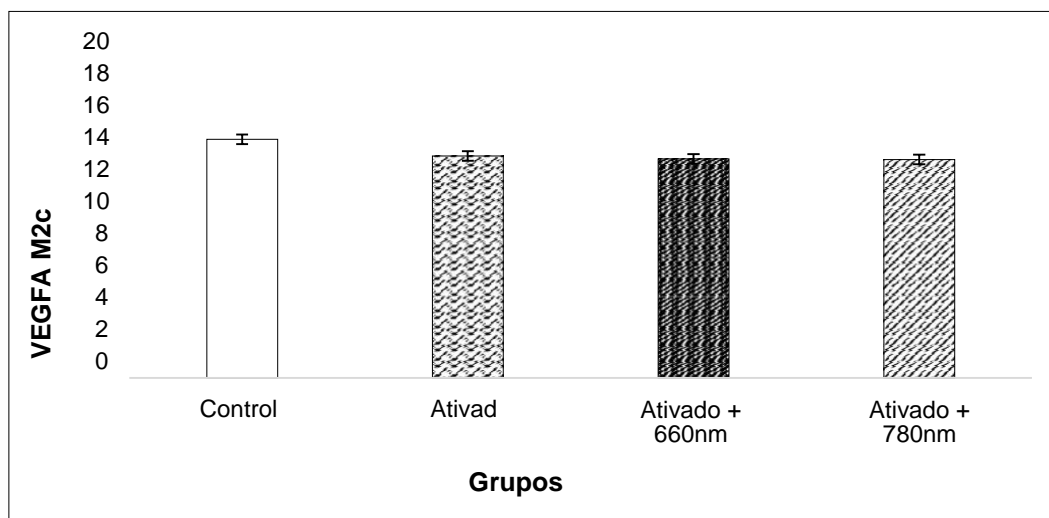
Foram realizados dois testes de Imunoensaio ELISA para avaliar a síntese proteica do fator de crescimento TGF $\beta$ 1 através do sobrenadante das células presentes nos grupos controle (sem ativação), ativado (sem irradiação), ativados e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm no período de 24 horas. Os ensaios foram realizados de acordo com o fabricante, porém, não apresentaram os resultados esperados nos testes da curva padrão do kit R&D Mouse TGF $\beta$ 1 – DUO SET<sup>®</sup> DEVELOPMENT SYSTEM (DY71679), bem como, não houve produção de TGF $\beta$ 1 pelas células presentes nestes grupos. Portanto, será necessária uma nova análise do kit junto com um responsável pelo produto avaliado.

#### **c) VEGFA**

Os resultados permitiram observar que em relação a produção de Vegfa, as células do grupo ativado apresentaram uma diminuição na produção deste fator de crescimento em relação as células do grupo controle ( $p > 0.05$ ). Da mesma forma, houve uma diminuição na produção deste produto nas células dos grupos ativados e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm, em relação as células do grupo somente ativado ( $p > 0.05$ ). No entanto, estes resultados referentes a produção deste fator de crescimento não foram estatisticamente significantes na



comparação entre as células dos grupos ativado e ativados tratados com LBI de 660 nm e 780 nm (Figura 29).



**Figura 29.** Dosagem proteica de VEGFA pelo método ELISA, no sobrenadante das culturas de células J774 ( $1 \times 10^6$  células/poço) do grupo controle (sem ativação) e dos grupos ativados (sem irradiação) com  $0,1 \mu\text{g/mL}$  de IL-10 e  $0,8 \mu\text{g/mL}$  de dexametasona (por 24 horas) e posteriormente irradiados com o LBI nos parâmetros descritos anteriormente. Barras representam médias e desvio padrão.

#### 4.9. Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M2c – 4 e 24 h

Os resultados dos experimentos realizados para o fenótipo M2a estão aglutinados na Tabela 23.

Tabela 23: Painel de expressão gênica e produção proteica Perfil M2c.

PERFIL M2c				
Pcr array – 4 e 24 horas				Elisa – 24h
Citocinas	M2c	M2c+ 660 nm	M2c+ 780 nm	Ativação e Tratamentos com Laser
	x M Controle	x M2c	x M2c	
CCL2	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	↓ 24h	
CCL3	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	↑ 24h	S# 24h	↓ 24h	
CCL4	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	↓ 24h	
CXCL2	↑ 4h	↓ 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
IL-6	S# 4h	S# 4h	S# 4h	-----
	S# 24h	S# 24h	S# 24h	
TNF-α	S# 4h	↓ 4h	↑ 4h	-----
	S# 24h	↓ 24h	↓ 24h	
IL-1β	S# 4h	↓ 4h	S# 4h	-----
	↑ 24h	S# 24h	↓ 24h	
TGF-β1	S# 4h	S# 4h	S# 4h	Os ensaios foram realizados de acordo com o fabricante, porém, não apresentaram os resultados esperados nos testes da curva padrão do kit R&D Mouse TGFβ1 – DUO SET®, bem como, não houve produção de TGFβ1 pelas células presentes nos 4 grupos.
	S# 24h	S# 24h	↓ 24h	
IFN-γ	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	-----
IL-13	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve produção de IL-13 pelas células dos grupos: controle, ativado e ativados e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm
VEGFA	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	M2a x M Cont = Redução S# M2a 660 nm x M2a = Redução S# M2a 780 nm x M2a = Redução S#
IGF-1	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve expressão gênica	Não houve produção de IGF-1 pelas células dos grupos: controle, ativado e ativados e irradiados com LBI de 660 nm e 780 nm

M Controle (Macrófago sem ativação). M2c (Macrófago ativado para perfil M2c).  
 ↑ (Aumento). ↓ (Diminuição) S# (Sem diferença estatística)

#### 4.10. Painel de expressão gênica e produção proteica de macrófagos J774 polarizados para perfil M1, M2a e M2c – 4 e 24 horas

Na tabela 24, pode ser observada uma síntese dos resultados dos experimentos realizados.

**Tabela 24:** Painel síntese da expressão gênica e proteica (destacado em vermelho) de macrófagos polarizados para os fenótipos M1, M2a e M2c e irradiados com LBI de 660 e 780 nm.

Ativação		
M1 ativado X M controle	M2a ativado X M controle	M2c ativado X M controle
↑ de <i>IL-6</i> (24h) ↓ de <i>CCL2</i> , <i>CCL4</i> , <i>CXCL2</i> e <i>TNFα</i> (24h) Proteica: ↑ <i>CCL4</i> e <i>IL-6</i>	↑ de <i>TGFβ1</i> (24h) ↑ de <i>CCL3</i> , <i>CCL4</i> , <i>CXCL2</i> e <i>TNFα</i> (4h)	↑ de <i>CXCL2</i> (4h) e <i>CCL3</i> e <i>IL1β</i> (24h)
Laser 660 nm		
M1 + Laser 660 X M1	M2a + Laser 660 X M2a	M2c + Laser 660 X M2c
↓ de <i>CCL3</i> , <i>CXCL2</i> e <i>TNFα</i> (4h) ↑ de <i>IL1β</i> (4h) e <i>CCL2</i> , <i>CXCL2</i> e <i>TNFα</i> (24h)	↓ de <i>CCL3</i> , <i>CXCL2</i> e <i>TNFα</i> (4h)	↓ de <i>CXCL2</i> , <i>TNFα</i> e <i>IL1β</i> (4h) e <i>TNFα</i> (24h)
Laser 780 nm		
M1 + Laser 780 X M1	M2a + Laser 780 X M2a	M2c + Laser 780 X M2c
↑ de <i>CCL2</i> , <i>IL1β</i> e <i>TGFβ1</i> (4h) ↓ de <i>CCL3</i> , <i>IL-6</i> e <i>TGFβ1</i> (24h) Proteica: ↓ <i>IL-6</i> e <i>TNFα</i>	↓ de <i>CCL4</i> (4h), <i>CCL3</i> e <i>TGFβ1</i> (24h) ↑ de <i>TGFβ1</i> (4h)	↑ de <i>TNFα</i> (4h) ↓ de <i>CCL2</i> , <i>CCL3</i> , <i>CCL4</i> , <i>TNFα</i> , <i>IL1β</i> e <i>TGFβ1</i> (24h)

## 5. DISCUSSÃO

A modulação das diferentes fases do processo de reparo tecidual se dá principalmente pela mudança do fenótipo dos macrófagos da região e consequentemente pela alteração do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados por eles <sup>9,6,11,7,12,8</sup>. Por esta razão, os macrófagos são considerados células alvo para as intervenções terapêuticas <sup>9,6,3,7</sup>.

Por outro lado, na área da reabilitação, muitos estudos têm evidenciado que o LBI é capaz de modular o processo de reparo <sup>35-44</sup>, mas ainda não foi descrito se a laserterapia é capaz de alterar o perfil de expressão dos diferentes fenótipos dos macrófagos envolvidos no reparo. Além disso, 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 <sup>57-59</sup>. Bem como, muitas publicações não informam todos os parâmetros utilizados para irradiação ou ainda apresentam erros nos cálculos das doses de energia aplicadas <sup>58,59</sup>.

O presente estudo, procurou elucidar este tema por meio de avaliações *in vitro*, onde foi avaliado o efeito do LBI vermelho de 660 nm e infravermelho 780 nm sobre a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento por macrófagos J774 induzidos para os fenótipos M1, M2a e M2c através de PCR *array* e dosagem de proteínas por ELISA.

Primeiramente buscou-se caracterizar a resposta da linhagem de macrófagos J774 à indução de mudança de fenótipo com a utilização dos ativadores clássicos descritos na literatura. O tratamento de linhagens de macrófagos com LPS e IFN $\gamma$ , por exemplo, costuma gerar um aumento na expressão de quimiocinas e citocinas de caráter pró inflamatório <sup>13,9,3,14,12,16,18</sup>.

No presente estudo foi observado que a indução para o fenótipo M1, pelo tratamento dos macrófagos J774 com LPS e IFN $\gamma$ , gerou uma diminuição na expressão gênica de *CCL2*, *CCL4*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (período de 24 h) e um

aumento na produção e expressão de IL-6 e da produção de CCL4 no mesmo período.

Alsharif 2009 relataram que macrófagos J774 ativados com LPS e IFN $\gamma$  se apresentaram achatados, estendidos, com vacúolos intracelulares visíveis e mais fortemente aderidos que macrófagos não ativados (arredondados ou alongados) após 18, 24 e 48 horas. Porém, expressão de CD80 (marcados de superfície clássica do fenótipo M1) foi ligeiramente reduzida, mas não significativamente, em macrófagos M1 em comparação com macrófagos M0 <sup>67</sup>.

Por sua vez, Reichard 2012 observou que a expressão de CD14/CD86 foi regulada positivamente em macrófagos J774A.1 polarizados M1 (LPS e IFN- $\gamma$ ) em comparação com células polarizadas M0 e uma diminuição de 31% no número de células viáveis após tratamento com IFN- $\gamma$  e LPS por 24 horas <sup>68</sup>.

Já Fernandes *et al.* 2015, relataram aumento na expressão de TNF $\alpha$  e iNOS e na produção proteica de IL-6, COX-2 e TNF $\alpha$  em culturas de macrófagos J774 tratados por um período de 24 horas com 1  $\mu$ g/mL de LPS e 0,2  $\mu$ g/mL de IFN-  $\gamma$  e o período de incubação após a ativação foi 24 horas <sup>15</sup>.

Por outro lado, já foi descrito o isolamento de clones de células mutantes resistentes a LPS na linhagem de macrófagos J774.1. Essas culturas foram caracterizadas por alta resistência ao LPS obtido de *Escherichia coli* (*E. coli*) e resistência cruzada a outros fragmentos de LPS e ao Lipídeo A, mas que eram capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF $\alpha$  mesmo apresentando resistência ao fator ativador <sup>69</sup>. Neste sentido ainda, De Falco *et al.* 2016 observaram que pequenas moléculas não peptídicas podem impedir a associação de IKK $\beta$  / NEMO inibindo a ativação de NF- $\kappa$ B em macrófagos J774 estimulados com LPS, impedindo assim a expressão e produção de produtos clássicos desta ativação <sup>70</sup>. Estes relatos, juntamente com outros que indicam que linhagens tumorais podem não responder como as derivadas de tecidos saudáveis <sup>60-62</sup>, poderiam auxiliar a explicar as diferenças encontradas nos resultados dos diferentes estudos e no presente.

Na avaliação do efeito da ativação para perfil M2a, foi possível observar um aumento na expressão gênica das quimiocinas e citocinas de caráter pró-

inflamatório *CCL3*, *CCL4*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  no período de 4 horas e um aumento na expressão gênica de *TGF $\beta$ 1* (24h) nos macrófagos ativados com IL-4 (M2a) em relação aos macrófagos não ativados.

O tratamento de linhagens de macrófagos com IL-4 teoricamente deveria gerar um aumento na expressão produtos anti-inflamatórios (como IL-10 e *TGF $\beta$ 1*) e diminuição de produtos pró-inflamatórios <sup>13,9,3,14,12,16,18</sup>.

Alsharif 2009 utilizou a linhagem J774 e demonstrou no seu estudo que, os macrófagos M2 induzidos por IL-4 embora não demonstraram alteração em sua morfologia, evidenciaram uma redução significativa em sua viabilidade (nos períodos de 18 e 24 h) e na expressão de CD80, CD163 e CD200R - receptor que previne a ativação de macrófagos inflamatórios <sup>71</sup>. A redução na expressão de CD163 e de CD200R seria um efeito oposto ao esperado quando do tratamento de macrófagos com IL-4 <sup>13,9,3,14,12,16,18</sup>, e poderiam estar ligados ao fato desta linhagem ter origem tumoral <sup>60-62</sup>.

Por outro lado, Reichard 2012 observou que células da linhagem J774A.1 tratadas com IL-4 não demonstraram alteração em sua morfologia, mas exibiram uma diminuição na viabilidade celular de 9% e diminuição na expressão dos marcadores CD14/CD86. Estes resultados estariam de acordo com o esperado sobre este perfil <sup>13,9,3,14,12,16,18</sup>.

Já com relação a ativação para o perfil M2c (tratamento com IL-10 e dexametasona), os resultados deste estudo mostraram que houve um aumento na expressão gênica das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias *CXCL2* (período de 4 horas) e *CCL3* e *IL1 $\beta$*  (período de 24 horas) sem alteração nos demais produtos. Novamente, de acordo com a literatura, a ativação para perfil M2 seria caracterizada por um aumento de produtos anti-inflamatórios e diminuição de produtos pró-inflamatórios <sup>13,9,3,14,12,16,18</sup>.

Só foi possível encontrar um estudo na literatura onde macrófagos J774 foram induzidos ao perfil M2 por tratamento somente com IL-10. Estas células mantiveram a morfologia arredondado e tiveram uma redução significativa em sua viabilidade no período de 24 h. Foi notado também, uma redução na expressão de CD80, CD163 e CD200R por estes macrófagos ativados em

relação as células não ativadas <sup>67</sup>. A redução na expressão de CD163 e de CD200R seria um efeito oposto ao esperado quando do tratamento de macrófagos com IL-10 <sup>13,9,3,14,12,16,18</sup> e também poderia estar ligado ao fato desta linhagem ter origem tumoral <sup>60-62</sup>.

Já em relação ao tratamento com a Laserterapia, a compilação dos estudos que envolvem macrófagos/monócitos e LBI foi demonstraram que o LBI no comprimento de onda vermelho foi capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios em monócitos humanos tratados com fitohemaglutinina <sup>46</sup>, macrófagos da linhagem alveolar AMJ2-C11 tratados com LPS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>47</sup> e monócitos U937 ativados com LPS <sup>48</sup>. No entanto, também existem relatos que indicam que esta irradiação foi capaz de aumentar a expressão e produção de citocinas e quimiocinas de perfil M1/pró-inflamatório em monócitos humanos THP-1 ativados com LPS <sup>49</sup>.

Além disso, neste mesmo contexto, foi observado que o LBI infravermelho também foi capaz de reduzir a expressão gênica de mediadores clássicos de inflamação em macrófagos de linhagem RAW 264.7 ativados com LPS <sup>51</sup>, macrófagos peritoneais ativados com tioglicolato + LPS + IFN $\gamma$  <sup>52</sup> e monócitos humanos THP-1 ativados com LPS <sup>49</sup>. Bem como, o infravermelho também demonstrou um aumento na expressão de quimiocinas pró-inflamatórias em monócitos humanos THP-1 ativados com LPS <sup>49</sup>.

Especificamente na linhagem de macrófagos J774 polarizados para perfil M1, tanto o LBI de 660 nm (vermelho) quanto o 780 nm (infravermelho) possibilitaram uma redução na atividade mitocondrial de macrófagos J774 ativados com LPS e IFN- $\gamma$  <sup>53</sup>. Adicionalmente, foi observado que estes mesmos parâmetros dosimétricos (660nm e 780 nm) provocaram uma diminuição na expressão ou produção de diversos mediadores de caráter pró-inflamatório <sup>15</sup>. Porém, somente o LBI de 660 nm foi capaz de aumentar a expressão gênica e proteica de citocinas características de fenótipo M1 (IL-6) <sup>15</sup>.

Desse modo, tanto o comprimento de onda vermelho quanto o comprimento de onda infravermelho demonstraram resultados importantes no que diz respeito a avaliação destas terapias sobre macrófagos e monócitos

polarizados implicando diretamente na prática clínica. Por este motivo foram escolhidos esses dois parâmetros dosimétricos para avaliação deste estudo.

No presente estudo, foi possível observar que a irradiação com laser vermelho de 660 nm nos macrófagos ativados para fenótipo M1, gerou um aumento na expressão gênica das quimiocinas *CCL2*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (24h) e da citocina *IL1 $\beta$*  (4h) e diminuição da expressão das quimiocinas pró-inflamatórias *CCL3*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  (4h).

Chen *et al.* 2014, também observaram que no período de 24 h, o LBI de 660nm (em diferentes doses de energia, entre elas, 1J - mesma dose de energia utilizada neste estudo) gerou aumento na expressão e produção de citocinas e quimiocinas de perfil M1/pró-inflamatório (*CCL2*, *CXCL10* e *TNF $\alpha$* ) por monócitos humanos THP-1 ativados com LPS, no comprimento de onda de 660 nm).

Já de Lima *et al.* 2010 demonstraram que o LBI vermelho foi capaz de reduzir a expressão de *MIP-2* (*CXCL2*) em macrófagos da linhagem alveolar AMJ2-C11 tratados com LPS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já, Souza *et al.* 2014 observaram que a irradiação com LBI de 660 nm (30mW) possibilitou uma diminuição na produção proteica de *TNF $\alpha$*  em monócitos U937 ativados com LPS.

Por sua vez, Fernandes *et al.* 2015 observaram uma diminuição na expressão gênica e síntese proteica de *TNF $\alpha$*  e um aumento na expressão gênica e síntese proteica de *IL-6* em macrófagos J774 ativados com LPS e *IFN $\gamma$*  no período de avaliação de 24 horas.

Já em relação ao efeito LBI infravermelho de 780 nm sobre macrófagos J774 polarizados para perfil M1, foi possível observar um aumento na expressão dos genes pró-inflamatórios *CCL2* e *IL1 $\beta$*  no período de 4 horas. Não foi encontrado na literatura, nenhum relato em relação aos efeitos do laser infravermelho neste período de 4 horas em macrófagos, mas, Chen *et al.* 2014 relataram que o LBI infravermelho de 808 nm também aumentou a expressão da quimiocina pró-inflamatória *CCL2* em duas doses de energia (1 e 2 J) em monócitos humanos THP-1 ativados com LPS no período de 24 horas.



Gavish *et al.* 2008 relataram que a irradiação com LBI de 780 nm foi capaz de reduzir a expressão gênica de *IL-6* por macrófagos murinos RAW 264.7 ativados com LPS.

Fernandes *et al.* 2015 relataram que a irradiação de macrófagos J774 ativados com LPS e IFN $\gamma$  com LBI de 780 nm gerou diminuição da expressão genica e produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos J774 ativados com LPS e IFN $\gamma$ .

Com relação aos efeitos do LBI de 660 nm e de 780 nm sobre macrófagos J774 tratados com IL-4 (fenótipo M2a), foi observado uma diminuição na expressão nas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias *CCL3*, *CXCL2* e *TNF $\alpha$*  pelos macrófagos ativados com IL-4 e irradiados com LBI de 660 nm no período de 4 h. Já o LBI de 780 nm, gerou uma diminuição da expressão genica das quimiocinas *CCL4* (período de 4 h) e *CCL3* (período de 24 h) e um aumento(4h) seguido de diminuição (24h) na expressão de TGF- $\beta$  pelos macrófagos tratados com IL-4 auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos na diminuição da fibrose observada nos tecidos lesionados irradiados com LBI. Não foi encontrado na literatura, nenhum estudo que tivesse avaliado o efeito do LBI sobre a atividade dos macrófagos M2a.

Finalmente, sobre os efeitos LBI de 660 nm e 780 nm sobre macrófagos J774 tratados com IL-10 + dexametasona (indução do fenótipo M2c), foi possível observar que o laser vermelho, gerou uma diminuição na expressão das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias *CXCL2*, *IL1 $\beta$*  e *TNF $\alpha$*  no período de 4 h e de *TNF $\alpha$*  no período de 24h. Já o LBI de 780 nm, gerou aumento na expressão de TNF $\alpha$  (4h) e diminuição na expressão das quimiocinas *CCL2*, *CCL3*, *CCL4*, *TNF $\alpha$*  e *IL1 $\beta$*  (período de 24h) e do fator de crescimento *TGF $\beta$ 1* pelos macrófagos M2c. Não foi possível localizar na literatura estudos que investigaram o efeito do LBI sobre macrófagos de fenótipo M2c.

Alguns outros resultados deste estudo mostraram algumas diferenças em relação a resultados descritos na literatura sobre o efeito do LBI de 660 nm e 780 nm em macrófagos ativados para perfil M1. Porém, deve-se considerar, além do período de avaliação, o fator de ativação, os parâmetros dosimétricos e a linhagem utilizada por este presente estudo, como discutido anteriormente.

## 6. CONCLUSÃO

Embora a linhagem celular J774 seja amplamente utilizada para avaliação dos efeitos de diferentes terapias sobre macrófagos pela facilidade de obtenção e manipulação, essas células não responderam conforme esperado frente aos diferentes modelos de polarização.

A compilação dos dados permite ainda inferir que as irradiações com LBI de 660 nm e 780 nm demonstraram capacidade de modular a expressão gênica nos diferentes perfis fenotípicos. Mas, somente o laser infravermelho (780 nm) foi capaz de diminuir a expressão gênica e proteica de mediadores pró-inflamatórios quando aplicado em macrófagos de fenótipo M1. Assim como, esta irradiação foi capaz de modular a expressão gênica de *TGF $\beta$ 1* em macrófagos M2a.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gosain A, Dipietro LA. Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*. 2004; 28 (3): 321-326.
- 2- Gou S, Dipietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res*. 2010; 89 (3): 219-229.
- 3- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013; 229 (2): 176-85.
- 4- Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of muscle cells in vitro. *J Physiol*. 2003; 547: 125–132.
- 5- Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288 (2): R345-53.
- 6- Bosurgi L, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Macrophages in injured skeletal muscle: a perpetuum mobile causing and limiting fibrosis, prompting or restricting resolution and regeneration. *Front Immunol*. 2011; 2: 62.
- 7- Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, Sailhan F, Chelly J, Pavlath GK, Mounier R, Kjaer M, Chazaud B. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 2013; 31 (2): 384-96.
- 8- Mokarram N, Bellamkonda RV. A perspective on immunomodulation and tissue repair. *Ann Biomed Eng*. 2014; 42 (2): 338-351.
- 9- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298 (5): R1173-87
- 10- Weidenbusch M, Anders HJ. Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. *J Innate Immun*. 2012; 4 (5-6): 463-77
- 11- Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews™ in Immunology*. 2012; 32 (6): 463-488.
- 12- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Reports*. 2014; 6: 13.
- 13- Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Anegon I, Catala L, Ifrah N, Descamps P, Gamelin E, Gascan H, Hebbar M, Jeannin P. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110. 2007; 4319-4330.

- 14- Duque AG, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014; 5:491.
- 15- Fernandes KPS, Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Silva Dde F, Rocha LA, Alves AN, Sousa Kde B, Bussadori SK, Hamblin MR, Nunes FD. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B.* 2015; 153: 344-51.
- 16- Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015; 816460.
- 17- Xuan W, Qu Q, Zheng B, Xiong S, Fan G. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *Journal of Leukocyte Biology.* 2015; 97 (1): 61-69.
- 18- Sun YY, Li XF, Meng XM, Huang C, Zhang L, Li J. Macrophage Phenotype in Liver Injury and Repair. *Scand J Immunol.* 2016.
- 19- Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl.* 1999; 57: 16-21.
- 20- Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, Bu D-X, Maganto-Garcia E, Azcutia V. IL-17 and TNF- $\alpha$  sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol.* 2012; 188 (12): 6287–99.
- 21- Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106 (17): 7119–24.
- 22- Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4 (4): 386–91.
- 23- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813 (5): 878-88.
- 24- Peresi E, Silva SMUR, Calvi SA, Marcondes-Machado J. Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol.* 2008;34(11):942-949.
- 25- Varella PPV, Forte WCN. Cytokines: a review. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001; 24 (4): 146-154.
- 26- Aman MJ. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem.* 1996; 271: 29265-29270.

- 27- Comerford I, McColl SR. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunol Cell Biol* (2011) 89(2):183–4.
- 28- Addison CL, Arenberg DA, Morris SB, Xue YY, Burdick MD, Mulligan MS. The CXC chemokine, monokine induced by interferon-gamma, inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis. *Hum Gene Ther* (2000) 11(2):247–61.
- 29- Pelus LM, Fukuda S. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Exp Hematol*. 2006; 34 (8): 1010–20.
- 30- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16 (5): 585–601.
- 31- Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832 (7): 989-97.
- 32- Mourkioti F, Rosenthal N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol*. 2005; (10): 535-42.
- 33- Tedgui A, Mallat Z. Anti-Inflammatory Mechanisms in the Vascular Wall. *Circ Res*. 2001; 88 (9): 877-87
- 34- Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, Tajbakhsh S, Albert M, Gherardi RK, Chrétien F. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum*. 2010; 62 (1): 268-79.
- 35- Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl)*. 1992; 186 (5): 497-503.
- 36- Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anat Rec*. 1993; 235 (3): 374-80.
- 37- 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*. 1995; 241 (1): 123-8.
- 38- Oliveira NM, Parizzotto NA, Salvini TF. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med*. 1999; 25 (1): 13-21.
- 39- Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC, Jr., Muscara MN, Aimbire F, Frigo L, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol*. 2006; 101 (1): 283-8.
- 40- Lindgard A, Hulten LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci*. 2007; 22 (1): 30-6.

- 41- Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol.* 2010; 85 (6): 849-55.
- 42- De Almeida P, Lopes-Martins RA, Tomazoni SS, Silva Jr JA, de Tarso Camillo de Carvalho P, Bjordal JM, Leal Junior EC. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem Photobiol.* 2011; 87 (5): 1159-63.
- 43- Alves AN, Fernandes KPS, Deana AM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA. Effects of low-level laser therapy on skeletal muscle repair: a systematic review, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2014; 93 (12): 1073–1085.
- 44- Loreti EH, Pascoal VL, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33 (2): 104-16.
- 45- Dube A, Bansal H, Gupta PK. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. *Photochem Photobiol Sci.* 2003; 2 (8): 851-5.
- 46- Mehra A, Afshar M, Afshar M, Mohyidin 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.* 2009; 24 (3): 194–200.
- 47- De Lima FM, Villaverde AB, Albertini R, de Oliveira AP, Faria Neto HC, 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.* 2010; 28 (6): 763-71.
- 48- Souza NHC, Marcondes PT, Albertini R, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KPS, Aimbire S. Low-level laser therapy suppresses the oxidative stress-induced glucocorticoids resistance in U937 cells: Relevance to cytokine secretion and histone deacetylase in alveolar macrophages. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2014; 130: 327–336.
- 49- Chen CH, Wang CZ, Wang YH, Liao WT, Chen YJ, Kuo CH, Kuo HF, Hung CH. Effects of Low-Level Laser Therapy on M1-Related Cytokine Expression in Monocytes via Histone Modification. *Hindawi Publishing Corporation.* 2014; 2014: 625048.
- 50- Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31 (3): 95-104.
- 51- Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. 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.* 2008; 40 (5): 371-8.

- 52- Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27 (1): 37-42.
- 53- Souza NHC, Mesquita-Ferrari RA, Silva DF, Nunes FD, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Brazilian Journal of Physical Therapy.* 2014; 18 (4): 308-314.
- 54- Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989; 9 (5): 497-505.
- 55- Bolton P, Young S, Dyson M. Macrophage responsiveness to light therapy: a dose response study. *Laser Ther.* 1990; 2 (3):101-6.
- 56- Bolton P, Young S, Dyson M. Macrophage responsiveness to light therapy with varying power and energy densities. *Laser Ther.* 1991; 3: 105-11.
- 57- Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response.* 2011; 9 (4): 602-18.
- 58- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 (1): S3-40.
- 59- Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. 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.* 2011; 29 (5): 285-304.
- 60- Ralph P, Nakoinz I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature.* 1975; 257, 393.
- 61- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 1978. 15, 261.
- 62- Zhuang L, Pound JD, Willems JJLP, Taylor HA, Forrester LM, Gregory CD. Pure populations of murine macrophages from cultured embryonic stem cells. Application to studies of chemotaxis and apoptotic cell clearance. *Journal of Immunological Methods.* 2012; 385 (1-2): 1–14.
- 63- Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol.* 2002; 168 (12): 6404-11.

- 64- Korhonen R, Lahti A, Hämäläinen M, Kankaanranta H, Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol*. 2002; 62 (3): 698-704.
- 65- 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; 88 (5): 1211-6.
- 66- Souza NHC. Comparação do efeito do laser em baixa intensidade (660 e 780 nm) sobre a polarização de macrófagos e a modulação da expressão e síntese de citocinas envolvidas no reparo muscular. Universidade Nove de Julho; 2016.
- 67- AlSharif SS. The impact of HSV-1 infection on cell viability, morphology, and CD markers expression by unpolarized and cytokine-polarized J774A.1 mouse macrophages. Wright State University; 2015.
- 68- Reichard A. The effects of HSV-1 Challenge on polarized Murine Macrophages: an in Vitro Mouse Using the J774A.1 Murine Macrophage Cell Line. 2012; p70.
- 69- Amano F, Akamatsu Y. A Lipopolysaccharide (LPS)-Resistant Mutant Isolated from a Macrophage-like Cell Line, J774.1, Exhibits an Altered Activated-Macrophage Phenotype in Response to LPS. *Infection and immunity*. 1991; 2166-2174.
- 70- De Falco F, Di Giovanni C, Cerchia C, De Stefano D, Capuozzo A, Irace C, Iuvone T, Santamaria R, Carnuccio R, Lavecchia A. Novel non-peptide small molecules preventing IKK $\beta$ /NEMO association inhibit NF- $\kappa$ B activation in LPS-stimulated J774 macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2016; 104: 83-94.
- 71- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science*. 2000; 290 (5497): 1768-71.



## 8. ANEXO

Artigo	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Densidade de Potência (mW/cm <sup>2</sup> )	Energia Total (J)	Densidade de Energia (J/cm <sup>2</sup> )	Célula	Efeitos Observados (↑=aumento, ↓=diminuição)
Young et al (1989)	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	O sobrenadante dos monócitos irradiados com 0,9 e 1,2 J ↑ a proliferação de fibroblastos
Bolton et al (1991)	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)	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)	780		2		2,2	Macrófago murino RAW 264.7 ativado com LPS	↓RNAm para MCP-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 não altera RNAm para TNF $\alpha$ . ↓proteínas MCP-1 e IL-1 $\beta$
Sousa et al (2009)	780	70	1750	0,21	3	Macrófago peritoneal murino ativado com tioglicolato+LPS+IFN $\gamma$	↓ TNF $\alpha$

Artigo	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Densidade de Potência (mW/cm <sup>2</sup> )	Energia Total (J)	Densidade de Energia (J/cm <sup>2</sup> )	Célula	Efeitos Observados (↑=aumento, ↓=diminuição)
Mehrsai et al (2009)	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)	660	30		7,56	4,5	AMJ2-C11 macrófago alveolar ativado com LPS ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↓RNAm para MIP-2, ↓ ROS intracelular, ↓NF-kB
Kushibiki et al (2013)	405 664 808	-	100	-	-	Macrófagos diferenciados de THP-1 e outros 9 tipos celulares tratadas com Ester forbol	Após irradiação com laser azul, níveis de ROS aumentaram em todos os tipos de células, avaliados por citometria de fluxo em 60 e 120s.
Souza et al (2014)	660	30	-	-	4.5	Monócitos U937 ativados com LPS	↓ Produção proteica de TNF-alfa e IL-8
Souza et al (2014)	660 780	15 70	57,4 275	-	0,41 1,15	Macrófagos J774 ativados com LPS e IFN-γ	↑ AM de macrófagos ativados em 3 dias. ↓AM de macrófagos em 1 dia e ↑AM em 3 dias.
Chen et al (2014)	660 808	6 170	0.8	1 2 3	1 2 3	Monócitos humanos THP-1 ativados com LPS	LBI 660nm↑ expressão e produção de citocinas e quimiocinas (M1), nº de cópias mitocondriais e mRNA de proteína complexo IV (1J/cm <sup>2</sup> ).
Fernandes et al (2015)	660 780	15 70	57,4 275	0,22 0,08	5,60 2,02	Macrófagos J774 ativados com LPS e IFN-γ	↑mRNA e proteína de IL-6 (24h), ↓mRNA e proteína de TNF-α em 24h e 72 h e ↓proteína de COX-2 nos 2 períodos avaliados. ↓mRNA de TNF-α e iNOS e proteína de IL-6 (24 h), TNF-α e COX-2 em 24h e 72h.

ANEXO 1. Resumos dos artigos que avaliaram in vitro o efeito da luz sobre macrófagos e seus precursores (monócitos) \*luz pulsada.