

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA

Raquel Lira Ortiz da Silva

**Efeito da fotobiomodulação vascular sobre o perfil de macrófagos nas
diferentes fases do processo de regeneração em modelo de lesão
muscular aguda**

São Paulo, SP
2024

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA

Raquel Lira Ortiz da Silva

**Efeito da fotobiomodulação vascular sobre perfil de macrófagos nas
diferentes fases do processo de regeneração em modelo de lesão
muscular aguda**

Dissertação apresentada à Universidade Nove
de Julho como pré-requisito para a obtenção do
título de Mestre em Medicina biofotônica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

São Paulo
2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Raquel Lira Ortiz da.

Efeito da fotobiomodulação vascular sobre o perfil de macrófagos nas diferentes fases do processo de regeneração em modelo de lesão muscular aguda. / Raquel Lira Ortiz da Silva. 2024.

63 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari.

1. Reparo muscular. 2. Criolesão. 3. Fotobiomodulação vascular. 4. Laser em baixa intensidade. 5. Macrófago.
- I. Mesquita-Ferrari, Raquel Agnelli. II. Título

CDU 615.831

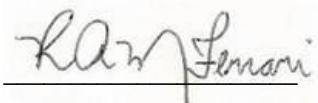
São Paulo, 19 de dezembro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Raquel Lira Ortiz da Silva

Título da Dissertação: “Efeito da fotobiomodulação vascular sobre o perfil de macrófagos nas diferentes fases do processo de regeneração em modelo de lesão muscular aguda”.

Presidente: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROF^a. DR^a. MONICA ROSAS DA COSTA IEMMA



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por Seu cuidado constante e Seus planos, que muitas vezes não compreendemos, mas que nos guiam.

À minha família, pelo apoio incondicional e carinho que sustentam minha jornada.

À vida, pelas oportunidades diárias de aprendizado e crescimento.

Principalmente à minha finada avó, uma mulher guerreira, que não abaixou a cabeça em nenhum momento e partiu em paz, como uma vencedora. Mulher que se orgulhava constantemente dos filhos e netos que possuía e da família que constituiu, sendo já em seu tempo uma mãe-solo.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus e minha família, pois desde o inicio acreditaram na minha capacidade e me apoiaram. Meu pais **Moises Ferreira Ortiz** e mãe **Maria Aparecida de Lira Ortiz**, que embora vindos de periferia e com poucos recursos, sempre incentivaram seus filhos a crescerem na vida. Com certeza fizeram grandes sacrifícios para que realizássemos nossos sonhos e para que hoje eu pudesse estar aqui conquistando um titulo tão importante como esse.*

*Agradeço ao meu marido **Carlos Henrique da Silva**, que nunca duvidou de mim, e até chegar nesse momento esteve sempre ao meu lado, me auxiliando e apoioando constantemente. Obrigada por sempre me dar coragem, me estimular e cuidar de mim em todos os momentos, mas principalmente naqueles em que eu perdi minhas forças.*

*Agradeço a Professora **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, pelos seus ensinamentos, posso dizer que tudo o que sei hoje está intimamente ligado a ela. Deixo aqui minha admiração a sua integridade, competência, força, resiliênciia e principalmente sabedoria.*

*A professora **Maria Fernanda Setubal Destro Rodrigues**, pelo auxílio nos processos metodológicos deste trabalho, além da sua disponibilidade e cuidado, principalmente no ato de ensinar.*

*Não posso deixar de agradecer as colegas **Tainá Caroline dos Santos Malavazzi**, pelo seu enorme conhecimento, disponibilidade ao ensino, paciênciia e disponibilidade, sua ajuda foi de grande valia, e **Aline dos Santos**, pelo apoio, auxílio e carisma, parceira desde o primeiro dia, crescemos juntas e mesmo que a distância em certos momentos, compartilhamos angustias, duvidas e alegrias, pessoas como vocês, dispostas a auxiliar e compartilhar tem se tornado cada vez mais raras nos tempos que vivemos hoje.*

*A **UNINOVE** pela concessão da bolsa de estudos, e pelo espaço fornecido, e aos **funcionários do laboratório** que cuidam e zelam pelo espaço e equipamentos usados diariamente por nós alunos, fazendo com que seja possível praticarmos o exercício da pesquisa laboratorial com excelênciia.*

Resumo

As lesões musculares causam uma importante restrição funcional, sendo mais comuns em indivíduos sedentários ou atletas de alto desempenho. Durante o processo de lesão muscular ocorre a ativação de células satélites e o recrutamento de células inflamatórias, por meio da sinalização de mediadores inflamatórios. Esse processo resulta na presença de neutrófilos e macrófagos, que exibem perfil pró ou anti-inflamatório, no microambiente muscular lesionado. No entanto, a perturbação desse processo pode ocasionar na formação de fibrose muscular, acarretando a limitação funcional e possíveis alterações morfológicas. A fotobiomodulação aplicada de forma local (FBML) ou vascular (FBMV), tem demonstrado na literatura ser capaz de modular o processo inflamatório, aumentar a vascularização, reduzir mionecrose e aumentar o diâmetro e área de secção transversa das fibras musculares, em aplicação preventivas (pré) e/ou terapêuticas (pós). Assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da FBMV, utilizando o laser em baixa intensidade (LBI), no recrutamento tecidual de macrófagos nos fenótipos M1 e M2 (CD68+; CD206+) em modelo experimental de lesão muscular aguda. Foram utilizados 85 ratos Wistar machos com 12 semanas de vida e avaliados nos seguintes grupos experimentais: G1- controle (n=5); G2 – criolesão sem tratamento (n=20); G3 sem criolesão + FBMV (n=20); G4- FBMV prévia + lesão (n=20); G5- lesão + FBMV (n=20). A aplicação da FBMV foi feita de forma pontual, sobre veia/artéria da base da cauda do animal (780 nm, 40mW, 80s e 3,2J). A eutanásia dos animais ocorreu em quatro períodos distintos: 1, 2, 5 e 7 dias após a realização da criolesão. O músculo Tibial Anterior foi coletado para análises de fenótipos de macrófagos M1 (CD68+) e M2 (CD 206+) através da imuno-histoquímica. Os dados foram submetidos a análise estatística. Observamos que a imunomarcação de células CD68+ revelou infiltrado inflamatório significativo no dia 1, com maior número de células no grupo FBMV prévia + lesão, pico no 2º dia e redução progressiva até o 7º dia nos grupos irradiados. As células CD206+ apresentaram maior número no grupo FBMV prévia + lesão no dia 1, pico no 2º dia e redução significativa no 7º dia, especialmente no grupo FBMV pós-lesão. O recrutamento celular foi mais evidente no 2º dia, seguido por queda ou estabilização nos grupos experimentais, dependendo da estratégia de FBMV utilizada. Concluímos que a FBMV foi capaz de modular o processo de recrutamento de macrófagos, porém a FBMV preventiva é capaz de adiantar a chegada dessas células no meio lesionado.

Palavras-chave: reparo muscular, criolesão, fotobiomodulação vascular, laser em baixa intensidade, macrófago.

Abstract

Muscle injuries cause significant functional restriction and are more common in sedentary individuals or high-performance athletes. During the muscle injury process, satellite cells are activated, and inflammatory cells are recruited through the signaling of inflammatory mediators. This process leads to the presence of neutrophils and macrophages, which exhibit either pro-inflammatory or anti-inflammatory profiles, in the injured muscle microenvironment. However, disruption of this process may result in the formation of muscle fibrosis, leading to functional limitation and potential morphological alterations. Photobiomodulation therapy, applied locally (PBML) or vascularly (PBMV), has been shown in the literature to modulate inflammatory processes, increase vascularization, reduce myonecrosis, and enhance fiber diameter and cross-sectional area, in both preventive (pre) and/or therapeutic (post) applications. This study aimed to evaluate the effects of PBMV using low-level laser therapy (LLLT) on macrophage recruitment in M1 and M2 phenotypes (CD68+; CD206+) in an experimental model of acute muscle injury. A total of 85 male Wistar rats (12 weeks old) were divided into the following experimental groups: G1 - control (n=5); G2 - cryoinjury without treatment (n=20); G3 - no cryoinjury + PBMV (n=20); G4 - PBMV prior + injury (n=20); G5 - injury + PBMV (n=20). PBMV was applied to the tail vein/artery (780 nm, 40 mW, 80 s, and 3.2 J). Euthanasia was performed at four time points: 1, 2, 5, and 7 days after cryoinjury. The tibialis anterior muscle was collected for macrophage phenotype analysis (M1 - CD68+; M2 - CD206+) via immunohistochemistry, and data were subjected to statistical analysis. CD68+ cell immunostaining revealed a significant inflammatory infiltrate on day 1, with the highest cell count in the PBMV prior + injury group, peaking on day 2 and progressively decreasing by day 7 in irradiated groups. CD206+ cells were most abundant in the PBMV prior + injury group on day 1, peaked on day 2, and significantly reduced by day 7, especially in the PBMV post-injury group. Cellular recruitment peaked on day 2, followed by a decline or stabilization depending on the PBMV strategy. We conclude that PBMV effectively modulates macrophage recruitment, with preventive PBMV accelerating the arrival of these cells in the injured environment.

Keywords: muscle repair, cryoinjury, vascular photobiomodulation, low-level laser therapy, macrophages

Resumo para leigos

Lesões nos músculos podem causar dificuldades nos movimentos e são comuns em pessoas sedentárias ou atletas de alta de esporte. Quando ocorre uma lesão, o corpo envia células de defesa para o lugar ferido e estimula a reparação da ferida. No entanto, se esse processo não funcionar corretamente, pode causar cicatrizes nos músculos, limitando os movimentos. Um tratamento chamado fotobiomodulação, feito com luz de laser, pode ajudar nesse processo. Ele melhora a circulação, reduz a morte das células musculares e acelera a recuperação, especialmente quando usado antes ou depois da lesão. Neste estudo, analisamos como esse tratamento ajuda a atrair células de defesa específicas em um modelo experimental. Para isso, utilizamos 85 ratos Wistar, divididos em cinco grupos: um grupo controle (sem lesão ou tratamento), um grupo apenas com lesão, um grupo sem lesão que recebeu o laser, e dois grupos lesionados que receberam o laser antes ou depois da lesão. O laser foi aplicado diretamente em uma veia ou artéria na base da cauda dos ratos, com parâmetros específicos (780 nm, 40 mW, 80 s, 3,2 J). Após 1, 2, 5 e 7 dias da lesão, os animais foram analisados, e o músculo lesionado foi coletado para identificar os diferentes tipos de macrófagos presentes. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente para entender os efeitos do tratamento. Observamos que, no primeiro dia após a lesão, o grupo que recebeu o tratamento com laser antes da lesão teve o maior número de células de defesa. Essas células aumentaram ainda mais no segundo dia, mas depois diminuíram gradualmente até o sétimo dia. As células responsáveis pelo reparo do músculo também foram mais abundantes no grupo que recebeu o laser antes da lesão, com o maior número no segundo dia e uma queda no sétimo dia, especialmente no grupo que recebeu o laser depois da lesão. O maior recrutamento de células aconteceu no segundo dia, com uma queda ou estabilização nos dias seguintes. Após a análise os resultados obtidos mostraram que o uso preventivo acelera o início do processo de recuperação.

Summary for Laypeople

Muscle injuries can cause movement difficulties and are common in sedentary individuals or high-performance athletes. When an injury occurs, the body sends defense cells to the injured area and stimulates the healing process. However, if this process doesn't work properly, it can lead to muscle scarring, limiting movement. A treatment called photobiomodulation, using laser light, can help in this process. It improves circulation, reduces muscle cell death, and speeds up recovery, especially when used before or after the injury. In this study, we analyzed how this treatment helps attract specific defense cells in an experimental model. For this, we used 85 Wistar rats, divided into five groups: a control group (no injury or treatment), a group with only the injury, a group without injury that received laser treatment, and two injured groups that received laser treatment before or after the injury. The laser was applied directly to a vein or artery at the base of the rats' tails, using specific parameters (780 nm, 40 mW, 80 s, 3.2 J). After 1, 2, 5, and 7 days of injury, the animals were analyzed, and the injured muscle was collected to identify the different types of macrophages present. The data was analyzed statistically to understand the treatment effects. We found that, on the first day after the injury, the group that received laser treatment before the injury had the highest number of defense cells. These cells increased further on the second day but then gradually decreased until the seventh day. The cells responsible for muscle repair were also more abundant in the group that received laser treatment before the injury, with the highest number on the second day and a decrease on the seventh day, especially in the group that received laser treatment after the injury. The highest recruitment of cells occurred on the second day, followed by a decrease or stabilization on the following days. After analyzing the results, we found that the preventive use of laser treatment accelerates the start of the recovery process.

Destaques

- 1. Analise do recrutamento de células macrófagos: Uma Abordagem Inovadora para a Modulação da Inflamação:** Este estudo oferece uma análise, por meio da técnica de Imuno-histoquímica, do processo de recrutamento de macrófagos, destacando seus principais fenótipos, pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2). A pesquisa explora um mecanismo inovador de entrega de energia utilizando luz de baixa intensidade aplicada de forma transcutânea via vascular. Essa abordagem apresenta um potencial promissor para o desenvolvimento de terapias não invasivas voltadas à modulação da inflamação, como já apontados por autores como Lopez et al (2022) (1) e Malavazzi et al (2024) (1).
- 2. Comparação dos Métodos de Aplicação da Fotobiomodulação: Impactos no Processo Inflamatório:** Este estudo analisa as diferenças entre os métodos de aplicação da fotobiomodulação, local e sistêmica, no contexto do processo inflamatório. São discutidos aspectos como as células irradiadas, o local e o tempo de aplicação, além de vantagens práticas, como facilidade no uso clínico e posicionamento do equipamento. Para o âmbito clínico, o estudo demonstra a eficiência da aplicação da luz em ambos os métodos, destacando as facilidades proporcionadas pela fotobiomodulação vascular, como sua aplicação única e descomplicada, otimizando tempo e proporcionando conforto tanto ao profissional quanto ao paciente. A pesquisa também enfatiza como a entrega da luz pode ser garantida, minimizando interferências do profissional e das condições inflamatórias locais da lesão, oferecendo insights valiosos para a otimização das aplicações terapêuticas.
- 3. Diferenças no foco terapêutico ou preventivo da aplicação da fotobiomodulação:** Este estudo explora as diferenças entre os objetivos terapêuticos e preventivos da fotobiomodulação, destacando como o momento de aplicação da luz afeta seus resultados. Observou-se que a aplicação preventiva, realizada antes da ocorrência da lesão, pode antecipar a chegada das células inflamatórias M1 e M2 ao local lesionado, promovendo uma resposta inflamatória mais eficiente. No contexto

clínico, a abordagem preventiva é relevante, pois ajuda a superar a dificuldade de prever quando e onde uma lesão ocorrerá, especialmente considerando que o tecido muscular está distribuído por todo o corpo. Contudo, o estudo também indica que a aplicação terapêutica é eficaz, as diferenciando pela capacidade da modalidade preventiva em prepara o ambiente muscular para uma possível lesão, reduzindo sintomas e proporcionando maior conforto ao paciente. Apesar dessas diferenças, o caminho para a resolução da lesão demonstrou ser semelhante em ambas as abordagens. Esses resultados reforçam a importância do momento da administração da luz como um elemento-chave para potencializar os benefícios da fotobiomodulação em diferentes cenários terapêuticos.

Highlights

- 1. Analysis of Macrophage Cell Recruitment: An Innovative Approach to Inflammation Modulation:** This study provides an analysis, using the immunohistochemistry technique, of the macrophage recruitment process, emphasizing their main phenotypes: pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2). The research explores an innovative energy delivery mechanism utilizing low-intensity light applied transcutaneously via vascular pathways. This approach shows promising potential for the development of non-invasive therapies aimed at modulating inflammation, as previously reported by authors such as Lopez et al. (2022) (1) and Malavazzi et al. (2024) (1).
- 2. Comparison of Photobiomodulation Application Methods: Impacts on the Inflammatory Process:** This study examines the differences between local and systemic photobiomodulation application methods in the context of the inflammatory process. It discusses aspects such as irradiated cells, application site, and duration, alongside practical advantages like ease of clinical use and equipment positioning. Clinically, the study demonstrates the efficiency of light application in both methods, highlighting the conveniences of vascular photobiomodulation, including its straightforward, single-application process, which optimizes time and provides comfort to both professionals and patients. The research also underscores how light delivery can be ensured, minimizing interference from professionals or the local inflammatory conditions of the lesion, offering valuable insights for optimizing therapeutic applications.
- 3. Differences in Therapeutic or Preventive Focus of Photobiomodulation Application:** This study explores the differences between therapeutic and preventive objectives in photobiomodulation, highlighting how the timing of light application influences outcomes. It was observed that preventive application, performed before injury occurrence, can expedite the arrival of M1 and M2 inflammatory cells at the injured site, fostering a more efficient inflammatory response. In clinical practice, the preventive approach is particularly relevant as it addresses the challenge of predicting when and where an injury will occur, especially

given the widespread distribution of muscle tissue throughout the body. However, the study also demonstrates that therapeutic application is effective, distinguishing the preventive modality by its ability to prepare the muscle environment for potential injury, thereby reducing symptoms and providing greater comfort to the patient. Despite these differences, the pathways to lesion resolution were found to be similar in both approaches. These findings emphasize the critical importance of timing in light administration as a key factor in maximizing the therapeutic benefits of photobiomodulation in various clinical scenarios.

Lista de Figuras

Figura 1 Fluxograma do modelo experimental	28
Figura 2. Processo de quantificação manual. (1) Iniciamos com abertura do arquivo, selecionando as fotos de forma aleatória.....	33
Figura 3. Processo de quantificação manual. (2) passo para seleção da ferramenta Point Selection Tools.	33
Figura 4. Processo de quantificação manual. (3) Marcação de células manualmente. (4) Obtenção do valor total de células marcadas	34
Figura 5. (A) imagem da imunomarcação de CD68 realizada na lâmina histológica do grupo controle. (B). Imagem da imunomarcação de CD206 realizada em uma lâmina histológico do grupo controle.	35
Figura 6. Imagem da imunomarcação realizada em uma lâmina histológica do grupo Sem criolesão + FBMV	35
Figura 7 Imagem representativa da imunomarcação do AC CD68+. (A). Lesão dia 01. (D). Lesão dia 02. (G). Lesão dia 05. (J). Lesão dia 07; B. FBMV prévia + lesão dia 01. (E). FBMV prévia + lesão dia 02. (H) FBMV prévia+ lesão dia 05. (K). FBMV prévia+ lesão dia 07; (C). Lesão + FBMV pós dia 01. (F) Lesão + FBMV pós dia 02. (I). Lesão + FBMV pós dia 05. (L). Lesão + FBMV pós dia 07	36
Figura 8. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 1 dia dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05. (* = Lesão vs FBMV prévia + Lesão (p< 0,0001) ; ** = FBMV prévia + Lesão vs Lesão+ FBMV pós (p< 0,0001))	37
Figura 9 Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 2 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05	37
Figura 10. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 5 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05	38
Figura 11. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05. (** = Lesão vs Lesão + FBMV pós (p<0,0001); * = FBMV prévia+lesão vs Lesão (p= 0,0018)).....	38
Figura 12. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 1,2, 5 e 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05	39
Figura 13. Imagem representativa da imunomarcação do AC CD206+. (A). Lesão dia 01. (D). Lesão dia 02. (G). Lesão dia 05. (J). Lesão dia 07; B. FBMV prévia + lesão dia 01. (E). FBMV prévia + lesão dia 02. (H) FBMV prévia+ lesão dia 05. (K). FBMV prévia+ lesão dia 07; (C). Lesão + FBMV pós dia 01. (F) Lesão + FBMV pós dia 02. (I). Lesão + FBMV pós dia 05. (L). Lesão + FBMV pós dia 07	40
Figura 14 Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 1 dia dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05. (* = Lesão vs FBMV prévia + lesão (p<0,0001); ** = FBMV prévia+lesão vs Lesão + FBMV pós Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05. (* = Lesão vs FBMV prévia + lesão (p<0,0001); ** = FBMV prévia+lesão vs Lesão + FBMV pós (p< 0,0001))	41

- Figura 15** Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 2 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05. (*) = Lesão vs FBMV prévia + lesão (p= 0,0225) 42
- Figura 16** Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 5 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05 42
- Figura 17** Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05. (*) = Lesão vs FBMV prévia + lesão (p= 0,0053); (**) = FBMV prévia+lesão vs Lesão + FBMV pós (p= 0,0482); Lesão vs Lesão + FBMV pós (p<0,0001)) 43
- Figura 18.** Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 1,2, 5 e 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média ± SEM (ANOVA/Tukey). p<0,05 44

Lista de Tabelas

Tabela 1 Parâmetros dosimétricos da FBMV	30
---	----

Lista de Abreviações

%: Porcento

°C: Graus Celsius

AST: Aspartato aminotransferase

CCL3: Tetracloreto de carbono- 3

CCL4: Tetracloreto de carbono - 4

CEUA: Comitê de ética em animais

CK: Creatina quinase

cm²: Centímetros quadrados

COVID-19: Coronavírus 2019

CS: Células satélites

DAB: Diaminobenzidina

et al: E colaboradores

FBM: Fotobiomodulação

FBML: Fotobiomodulação local

FBMV: Fotobiomodulação vascular

GaAlAs: Arseneto de Gálio-Alumínio

IFN-γ: Interferon gama

IGF-1

J: Joules

J/cm²: Joules por centímetros quadrados

kg: Quilograma

IL-1: Interleucina 1

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-17: Interleucina 17

IL-23: Interleucina 23

ILIB: Irradiação intravascular de laser

Laser: Light Amplification by Simulated Emission of Radiation

LBI: Laser de baixa intensidade

LED: Diodo emissor de luz

LDH: Lactato desidrogenase

M1: Macrófago de fenótipo M1

M2: Macrófago de fenótipo M2

mg: Miligrama

mW: Miliwatt

NaCl: Soro fisiológico

nm: Nanômetros

RO: Espécies reativas de oxigênio

s: Segundos

TA: Tibial anterior

TGF-β: Fator de crescimento transformador β (do inglês, Transforming Growth Factor)

Th1: T helper 1

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor)

UNINOVE: Universidade Nove de Julho

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFA: Fator de Crescimento Endotelial Vascular - A

Sumário

1 Introdução.....	17
1.1 Musculo Estriado Esquelético.....	17
1.2 Resposta inflamatória e recrutamento celular.....	18
1.3 Fotobiomodulação	18
2. Justificativa	24
3. Objetivos Gerais	26
3.1 Objetivos Específicos:	26
4. Metodologia	27
4.1 Modelo experimental	27
4.2 Procedimento de criolesão	28
4.3 Fotobiomodulação Vascular (FBMV).....	29
4.4 Eutanásia dos animais e remoção dos músculos.....	31
4.5 Imunomarcação (elastase, CD68, CD206).....	31
4.9 Quantificação.....	32
4.8 Análise estatística.....	34
5.Resultados.....	35
5.1 Analise quantitativa de macrófagos CD68+	36
5.2 Analise quantitativa de macrófagos CD206+	40
6.Discussão	45
7. Conclusão.....	50
8. Considerações finais	51
9 Anexos	52
9.1 Aprovação projeto CEUA Nº 1273010623	52
9.2 Comprovante de apresentação oral no X Bhiophotonics Internacional fórum 2024	53
10. Referências	54

1 Introdução

1.1 Musculo Estriado Esquelético

O músculo estriado esquelético é um tecido abundante no corpo humano, responsável por realizar funções de mobilidade e força. É composto das fibras musculares, vasos sanguíneos, nervos e matriz extracelular (1,2).

A lesão ao músculo esquelético pode ocorrer de diversas formas, podendo ser de caráter intrínseco, como as atrofias musculares, ou extrínsecas com a ocorrência de lesões traumáticas. Podem ocorrer independentemente da condição física, sendo todos os indivíduos suscetíveis ao acometimento, seja um sedentário ou um atleta de alta performance, mas as chances se tornam maiores quando o músculo é levado aos limites de suas funções, como no caso de atletas. (3,4,5)

O músculo esquelético possui uma notável capacidade de adaptação e regeneração, entretanto, esse processo pode ser comprometido. A cronificação das lesões pode ocorrer quando há perpetuação ou exacerbação de alguma das fases do processo inflamatório e de reparo. (3,6)

Durante o processo de regeneração muscular, inicialmente há a liberação de citocinas e moléculas quimioatrativas que farão a ativação das células satélites (CS) que são as células percussoras miogênicas presentes entre a camada basal e o sarcolema e que são responsáveis pela alta capacidade regenerativa do tecido muscular. As CS dão início ao processo de proliferação passando a ser denominadas de mioblastos que por fim entram em processo de citodiferenciação, para a regeneração da área lesionada ou a formação de novas fibras musculares. Apesar da capacidade regenerativa promovida pelas células satélites (CS), o tecido muscular permanece vulnerável ao insucesso na regeneração, que pode evoluir para fibrose. Esse processo compromete a morfologia e a funcionalidade do músculo (7,8,2)

Simultaneamente à CS, ocorre o recrutamento de células de defesa para o local da lesão, acompanhado por um aumento na vascularização e na permeabilidade capilar. Esse processo permite que os leucócitos, presentes na

corrente sanguínea, realizem a diapedese e alcancem a região lesionada, iniciando a remoção dos tecidos necróticos. (2,8,9,10)

1.2 Resposta inflamatória e recrutamento celular

Os neutrófilos (elastase+), células mieloides, são os primeiros leucócitos a chegar à área lesionada, já nas primeiras horas após a ocorrência da lesão. Eles desempenham funções de fagocitose de detritos celulares e liberam citocinas pró-inflamatórias, enzimas e radicais livres. Os neutrófilos permanecem como a população predominante por até 24 horas, e sua ativação prolongada pode causar danos teciduais adicionais. (11).

Após 24 horas, com a presença de citocinas produzidas por células Th1, como IFN- γ e TNF- α , há o recrutamento de macrófagos, em sua maioria de perfil M1 (CD68+, CD80+) pró-inflamatório realizando as funções de fagocitose e liberação de mediadores pró inflamatórios, como as citocinas IL- 1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23, IL-1IL-13 e VEGF e quimiocinas como CCL3, CCL4 e CXCL2. Passado o período de três dias, há a mudança da predominância e polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 (CD206+, CD108+), de perfil anti-inflamatório, realizando liberação de citocinas, enzimas e fatores de crescimento, como VEGFA, TGF- β , IGF-1 e IL-10, importantes na proliferação de fibroblastos e diferenciação das CS, caminhando para a resolução da inflamação com a indução do reparo tecidual, síntese de colágeno e remodelação. Porém, a persistência de macrófagos M1 no local da lesão pode gerar danos teciduais e a permanência de macrófagos M2 pode gerar a fibrose tecidual (11,12,13)

Neste contexto de inflamação e regeneração muscular, a fotobiomodulação (FBM) tem se apresentado como uma importante ferramenta na modulação destes processos. A FBM consiste na utilização de fontes de luz não ionizantes como o laser em baixa intensidade (LBI) ou diodo emissor de luz (LED) para modulação de processos. (14,15)

1.3 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação vascular (FBM vascular) foi desenvolvida com o objetivo de irradiar o sangue de forma não invasiva, diferenciando-se do método

ILIB (irradiação intravascular de sangue). Esse método utiliza a aplicação dos recursos de luz a partir da posição do dispositivo de emissão diretamente sobre a pele, em áreas onde estão localizadas veias ou artérias, como, por exemplo, a artéria radial, que é a mais utilizada atualmente (16).

A FBM possui como principal mecanismo de ação intracelular a entrega de energia luminosa ao citocromo C-oxidase (CCO), um cromóforo presente na mitocôndria. Esse processo estimula o aumento na produção de Adenosina Trifosfato (ATP) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (17,18). Além disso, há outros mecanismos secundários envolvendo canais iônicos. No entanto, Malavazzi et al. (2023) (19), em sua revisão sistemática, distingue a ação local da sistêmica, com base no componente celular presente no local irradiado. Assim, o principal alvo da FBMV são as células circulantes do ambiente intravascular, como hemácias, leucócitos, linfócitos e plaquetas. Nesse contexto, as porfirinas presentes nas hemácias tornam-se o principal alvo da luz, promovendo o aumento da permeabilidade celular e, consequentemente, do citoplasma, o que leva à formação do grupo heme (fundamental no transporte de oxigênio) (20).

Embora o mecanismo de ação da FBMV esteja intimamente relacionado aos componentes inflamatórios presentes na corrente sanguínea, a literatura atual ainda não apresenta estudos que investiguem o efeito da FBM aplicada de forma vascular, não invasiva e preventiva no recrutamento de células inflamatórias, como avaliado neste estudo. Essa lacuna torna a pesquisa inovadora e relevante para compreender como essa forma de irradiação modula o recrutamento de células inflamatórias para o músculo lesionado, além de explorar sua influência temporal nos diferentes fenótipos celulares, incluindo macrófagos M1 com perfil inflamatório (CD68+) e macrófagos M2 com perfil anti-inflamatório/reparador (CD206+).

As características de monocromaticidade, a estreita região espectral do laser em baixa intensidade, garantem a entrega controlada de energia aos tecidos biológicos, sendo estes responsáveis por muitos dos seus resultados positivos na fotobiomodulação, principalmente por ser uma terapia segura, não-invasiva e sem apresentar efeitos colaterais (21,22)

Estudos demonstram que, além de modular a resposta inflamatória, a FBML no tecido muscular se mostra capaz de modular o reparo tecidual, promover analgesia, modular a síntese e organização de colágeno e reduzir edema. (13,11,2,21)

Brito et al. (2017) (2), ao utilizar laser infravermelho (780 nm, 1 W/cm², 40 mW, 10 s por ponto, 8 pontos, totalizando 3,2 J) no tratamento de lesões musculares agudas em ratos idosos, identificou que a FBML preservou estruturas musculares, resultando em menor área de mionecrose e infiltrado inflamatório, além de aumento significativo de vasos sanguíneos e fibras imaturas. Esses achados foram corroborados por Alves et al. (2014) (1), que, ao avaliarem o uso de FBML no reparo muscular e redução de fibrose, também observaram a diminuição do número de células inflamatórias e da mionecrose, bem como aumento na vascularização e fibras imaturas, com melhor organização do colágeno.

França et al. (2012) (16) avaliaram o efeito da FBML no reparo muscular de ratos diabéticos, e Andreo et al. (2018) (17) exploraram a associação de FBML com o transplante de células precursoras miogênicas, ambos apresentando resultados positivos, como maior angiogênese, redução de mionecrose e modulação do infiltrado inflamatório, além de melhor organização das fibras colágenas.

A FBML aplicada de forma profilática apresenta eficácia também na prevenção de diversas doenças e sequelas, como por exemplo, no acometimento de mucosite orais (23), no fortalecimento neurológico contra doenças neurodegenerativas (24), na prevenção de sequelas decorrentes da lesão cerebral isquêmica (25) e em pacientes infectados com a nova cepa de coronavírus - COVID-19 - para prevenção da disfunção endotelial (26).

Adaboo et al. (2016) (4) investigaram o uso preventivo da FBML (780 nm, 15 mW, 3,8 J/cm², 10 segundos de exposição) em lesões musculares induzidas por criolesão, com posterior treino. O estudo revelou que a terapia acelerou a recuperação muscular por meio da angiogênese e melhorou a oxigenação tecidual, além de apresentar efeitos analgésicos e modulação do processo inflamatório. No entanto, o tratamento preventivo em lesões musculares enfrenta limitações, já que é difícil prever a localização exata da lesão. Lopez et al. (2022)

(3) sugere como alternativa o uso da Fotobiomodulação Vascular (FBMV), para tratar grandes áreas sem múltiplas aplicações e com tempo reduzido.

A FBMV consiste em irradiar o sangue de forma não invasiva transcutânea, como descrito por Fernandes et al (2021) (21), e tem ganhado destaque. Inicialmente conhecida como ILIB (Irradiação Intravascular de Laser), a técnica evoluiu para a aplicação transcutânea e transmucosa sob veias ou artérias, agora chamada FBMV. Embora menos estudada, a FBMV tem demonstrado efeitos como analgesia, melhora da circulação sanguínea, estimulação imunológica, redução da inflamação e benefícios em condições sistêmicas e musculoesqueléticas (14; 15; 20).

Schapochnik et al. (2023) avaliaram os efeitos da FBMV com LED em lesões pulmonares agudas, usando parâmetros de 660 nm, 100 mW e 15 J (5 J/cm²), com exposição de 150 segundos, e identificaram benefícios significativos na redução do infiltrado inflamatório e melhora da vascularização (20). De forma semelhante, Alonso et al. (2021) (21) observaram redução na migração celular e degeneração de monócitos em modelos de asma tratados com FBMV, enquanto Da Silva et al. (2020) (22) demonstraram redução no recrutamento de neutrófilos e na expressão de IL-1β, IL-6 e IL-17 em lesões pulmonares agudas.

Em modelos *in vivo* de lesão muscular, a FBMV também apresentou resultados promissores. Martinelli et al. (2022) (6) relataram aumento no diâmetro das fibras musculares e na área de secção transversa em modelo de hipertrofia compensatória com parâmetros de 780 nm, 80 J/cm², 40 mW, e 3,2 J.

Tobelem et al. (2023) (5) observaram melhorias morfológicas e funcionais no tecido muscular após lesão medular utilizando parâmetros semelhantes. Além disso, da Silva Leal (2020) (23) demonstraram efeitos positivos no controle da dor e na qualidade de vida de pacientes diabéticos com neuropatia após o uso de FBMV (660 nm, 100 mW, 1,6 W/cm², 180 J, 1800 s).

Lopez et al. (2022) (3) avaliou o efeito preventivo e terapêutico da FBMV em modelos de lesão muscular *in vivo*, com foco nos biomarcadores de lesão muscular, como creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e lactato. Ambos os tratamentos apresentaram bons resultados no reparo muscular, porém a aplicação preventiva resultou em melhores desfechos

histológicos, com redução da mionecrose, infiltrado inflamatório e edema, além da diminuição dos biomarcadores.

Por fim, Malavazzi et al. (2023) (27) realizaram uma revisão sistemática destacando a capacidade da FBMV, tanto na forma invasiva (ILIB) quanto não-invasiva, de modular propriedades bioquímicas, melhorar a hemodinâmica e o reparo de tecidos, incluindo o muscular e cutâneo. E em seu recente artigo, Malavazzi et al (2024) (28) analisaram em modelos *in vivo* de lesão muscular aguda as diferentes respostas inflamatórias e de reparo muscular em aplicação de FBMV antes e após a lesão, usando laser nos parâmetro de 780 nm; potência: 40 mW; área de aplicação: 0,04 cm²; densidade de energia: 80 J/ cm² e observou que a FBMV preventiva foi capaz de aumentar o número de neutrófilos circulantes, aumentar a concentração de hemoglobina nos eritrócitos em comparação a FBMV pós lesão e somente lesão, além de outros achados como a redução da presença de infiltrado inflamatório na análise histológica após 1, 5 e 7 dias com aumento das fibras imaturas após 5 dias. Contudo, ainda não há um consenso sobre os parâmetros dosimétricos ideais, embora os comprimentos de onda no espectro vermelho e infravermelho sejam os mais usados.

Nossos estudos sobre lesões musculares agudas e o uso de luz de baixa intensidade destaca evidências sólidas da eficácia dessa terapia ao longo dos anos (29,30,31,32,33). Analisamos diferentes aspectos do reparo muscular, considerando aplicações prévias ou posteriores à lesão, de forma local ou vascular. Ribeiro et al. (2015) (34) pode observar redução de mionecrose e infiltrado inflamatório, enquanto Junior et al. (2019) (35) e Souza et al. (2018) (36) detalharam os efeitos benéficos da FBM local na modulação do recrutamento de macrófagos e neutrófilos, células cruciais para a resolução inflamatória, utilizando técnicas como a imuno-histoquímica. Ao investigarmos a modalidade de aplicação da luz pela FBMV, estudos como os de Lopez et al. (2022) (32) e Malavazzi et al. (2024) (33) um efeito modulador dos mediadores inflamatórios relacionados, que estão intimamente relacionados ao recrutamento de macrófagos M1 e M2, promovendo resultados positivos. Ambos os trabalhos fornecem base para avançar na investigação dos efeitos da FBMV, tanto de forma preventiva quanto terapêutica, agora com foco específico nos perfis celulares fundamentais para o andamento da resposta inflamatória e sua

resolução, visto que não foram encontrados estudos referentes as questões aqui apontadas no presente estudo, o tornando inédito e de grande valor para o meio científico e também clínico-prático, pois os benefícios de um método de aplicação da luz de forma única e sistêmica, garante conforto ao paciente e ao profissional, principalmente aos atletas de alta performance, que ao levar seu corpo a níveis extremos de esforço estão altamente susceptíveis a terem diversos locais lesionados após a prática esportiva e depender de uma recuperação rápida para retornar as suas funções.

2. Justificativa

Considerando que a Fotobiomodulação Vascular (FBMV) tem demonstrado efeitos sistêmicos benéficos no tecido muscular, ainda há lacunas significativas na literatura em relação à compreensão dos mecanismos de ação envolvidos nessa forma de aplicação. Dessa forma, torna-se essencial o desenvolvimento de estudos e metodologias que esclareçam esses mecanismos.

A respeito do mecanismo da luz de baixa intensidade sobre o processo inflamatório nas lesões musculares agudas, já observamos nos estudos realizados por nossa equipe que a FBM é capaz de modular o infiltrado inflamatórios, antecipando a chegada as células e até mesmo reduzindo a quantidade de células inflamatórias no decorrer dos dias após a lesão em comparação aos grupos lesionados e não tratados, assim como melhorar outras aspectos relacionados ao reparo muscular, tanto na modalidade de aplicação local ou vascular. (37,3,28,1)

Ao abordar de maneira mais específica as questões relacionadas ao processo inflamatório e sua influência no reparo muscular, é fundamental destacar o papel crucial dos macrófagos na determinação do desfecho desse processo. O fenótipo M1 dos macrófagos desempenha uma função essencial no recrutamento de células de defesa. Contudo, quando sua atividade não é adequadamente regulada, pode ocorrer uma perpetuação do estado inflamatório, resultando na não resolução da lesão e em sua cronificação (9,38,39).

Por outro lado, os macrófagos de fenótipo M2 são indispensáveis para a formação de novas fibras musculares e para o reparo tecidual. Entretanto, o desequilíbrio na presença dessas células no local lesionado pode induzir à formação de fibrose, comprometendo a função muscular e promovendo alterações morfológicas significativas no tecido (9,38,39)..

Neste contexto, é fundamental compreender as principais células de defesa envolvidas no processo de lesão e nas fases iniciais da regeneração muscular, uma vez que a resposta imunológica desempenha um papel crucial na recuperação tecidual, principalmente as transições no fenótipo de macrófagos,

pois são ponto chaves para o reparo muscular efetivo, como apontado por Tidbal (2017) (8). Souza et al (2018) (12) trouxe resultados promissores a respeito da diferenciação de macrófagos durante a lesão muscular aguda após aplicação da FBM no comprimento de onda infra vermelho próximo, pois foi capaz de aumentar o número de fenótipo M2 e aumentar a expressão de citocinas anti-inflamatória já no segundo dia após a lesão, modulando de forma favorável o processo inflamatório. Assim Identificar e avaliar o recrutamento dessas células, especialmente os leucócitos, permitirá elucidar quais tipos celulares exercem maior influência na resposta à FBMV, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

3. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da FBMV utilizando o LBI na determinação do fenótipo das células inflamatórias em diferentes momentos durante o processo de regeneração após lesão muscular aguda em modelo animal.

3.1 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito da FBMV, aplicada de forma preventiva ou terapêutica, na quantidade de macrófagos de fenótipo M1 no sítio da lesão no músculo tibial anterior. A análise será realizada utilizando o marcador de anticorpo CD68+ por meio da técnica de imuno-histoquímica, nos períodos experimentais de 1, 2, 5 e 7 dias.
- Avaliar o efeito da FBMV, aplicada de forma preventiva ou terapêutica, na quantidade de macrófagos de fenótipo M2 no sítio da lesão no músculo tibial anterior. A análise será realizada utilizando o marcador de anticorpo CD206+ por meio da técnica de imuno-histoquímica, nos períodos experimentais de 1, 2, 5 e 7 dias.

4. Metodologia

Os experimentos foram realizados no laboratório de pesquisa do PPG em Medicina Biofotônica da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) no campus Vergueiro após a aprovação do Comitê de Ética em Animais (CEUA) da UNINOVE (Nº:1273010623)

4.1 Modelo experimental

Foram utilizados 85 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), ambos com doze semanas de vida, mantidos no biotério da UNINOVE em caixas plásticas apropriadas em ambiente climatizado com temperatura controlada (22 a 25°C), umidade relativa (40%), luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro) e com comida (NUTRILAB CR-1®) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo 1 – Controle:** animais sem nenhum procedimento (n=5);
- **Grupo 2 – Lesão:** criolesão no músculo TA dos animais (n=20);
- **Grupo 3 – Sem criolesão + FBMV:** criolesão no músculo TA e tratamento com FBMV (com os parâmetros descritos na tabela 1) (n=20);
- **Grupo 4 – FBMV prévia + Lesão:** tratamento preventivo com FBMV (com os mesmos parâmetros dosimétricos) 24 horas antes da criolesão do músculo TA (n=20);
- **Grupo 5 – Lesão + FBMV pós:** criolesão no músculo TA e o tratamento com FBMV 2 horas após a lesão (com os mesmos parâmetros dosimétricos) (n=20).

Os animais dos grupos 2, 3, 4, e 5 foram eutanasiados após 1, 2, 5 e 7 dias, sendo cinco animais de cada grupo sacrificados em cada período. Os pertencentes aos grupos controle (1) foram submetidos à eutanásia independentemente do período experimental.

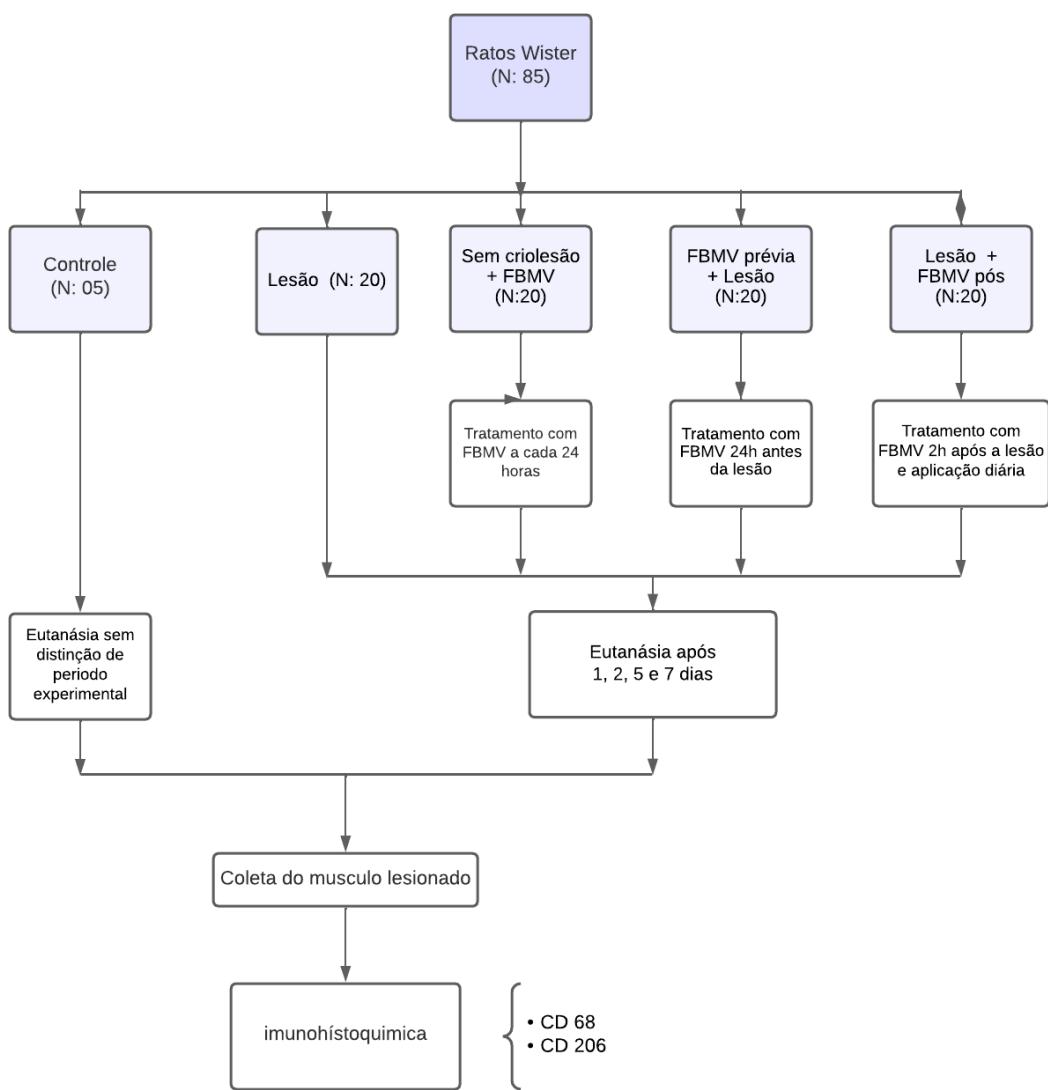


Figura 1 Fluxograma do modelo experimental

4.2 Procedimento de criolesão

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito na literatura (40,12,41,42,2). Realizaremos a pesagem dos animais e em seguida os animais foram submetidos a anestesia com administração intraperitoneal de 1 mL/kg de 1% ketamina HCL (Dopalen, Vetbrands, São Paulo, Brasil) e 2% xilazina (Anasedan, Vetbrands, São Paulo, Brasil). Foram utilizadas seringas com agulhas ultrafinas (modelo insulina, BD, Juiz de Fora, MG, Brasil) para a administração das drogas anestésicas. Após a indução anestésica, os animais

foram posicionados em uma superfície plana e realizaremos a assepsia e tricotomia da região que será submetida ao procedimento cirúrgico.

Para o procedimento de criolesão o músculo tibial anterior (TA), de ambas as patas posteriores foram expostos cirurgicamente. O procedimento consistiu na refrigeração da extremidade de uma haste metálica plana (3 mm de diâmetro), em nitrogênio líquido pelo período de 30 segundos e aplicação na superfície ventral do músculo exposto por duas vezes, com 10 segundos de duração cada aplicação. A sutura após a crioleta na região incisada com um fio de poliamida (5.0).

Foi realizada a lubrificação da superfície ocular de todos os animais utilizando gaze embebida em soro fisiológico (NaCl 0,9%) para evitar o ressecamento, para evitar hipotermia os animais foram mantidos em caixas plásticas sobre colchonete aquecido (36-37 °C) e ficarão sob observação até estarem livres do efeito dos anestésicos.

Para diminuir o desconforto e sensação dolorosa pós-operatório foi realizada a administração subcutânea de analgésico dipirona 50 mg/kg e tramadol 5 mg/kg (Cloridrato de tramadol a 2%) a cada 8 horas, durante 3 dias nos animais.

4.3 Fotobiomodulação Vascular (FBMV)

O equipamento de laser de diodo de Arseneto de gálio e alumínio (AlGaAs) Twin-laser® (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) foi utilizado para as irradiações. A irradiação da FBMV foi realizada pontualmente e em contato com a veia/artéria no dorso caudal dos animais com angulação de 90 graus e em íntimo contato com o tecido utilizando os parâmetros descritos na tabela 1.

FBMV

Comprimento de onda central [nm]	780
---	-----

Modo de Funcionamento	contínuo
Potência radiante média [mW]	40
Diâmetro de abertura [cm]	0,23
Irradiância na abertura [mW/cm²]	1000
Área do feixe [cm²]	0,04
Tempo de exposição [s]	80
Exposição radiante [J/cm²]	80
Número de pontos irradiados	1
Energia radiante por ponto [J]	3,2
Energia radiante total [J]	3,2
Técnica de aplicação	contato direto

Tabela 1 Parâmetros dosimétricos da FBMV

A irradiação foi realizada com bases nos parâmetros descritos por Ribeiro et al. (2015) (43), Alves et al. (2016) (37), Brito et al. (2017) (2), Lopez et al. (2022) (3). Para não ocorrer a refração do feixe do laser, a irradiação foi realizada adotando um ângulo de 90°C entre o emissor e a pele do animal (aplicação perpendicular). A terapia com FBMV foi realizada 24 horas antes da lesão (animais grupo FBMV prévia + criolesão) ou 2 horas após o procedimento de criolesão (animais grupo criolesão + FBMV e criolesão sem tratamento). A irradiação foi realizada a cada 24 h nos animais do grupo sem criolesão + FBMV.

Foram adotados intervalos de 24 horas entre os tratamentos, totalizando 1, 2, 5 e 7 sessões para os grupos avaliados nos tempos experimentais de 1, 2, 5 e 7 dias, até a eutanásia de cada grupo experimental. A potência de emissão de luz do laser foi aferida utilizando o "Laser Check power meter" (MM Optics, São Carlos – SP, Brasil) em todos os procedimentos experimentais, tanto antes de iniciar quanto ao finalizar.

4.4 Eutanásia dos animais e remoção dos músculos

Os animais foram eutanasiados após cada período experimental (1, 2, 5 e 7 dias) por meio da administração de uma superdose de anestésico, seguida da remoção do músculo tibial anterior (TA), precedida por assepsia, tricotomia e incisão para exposição e retirada da amostra. Os músculos TA de ambas as patas posteriores foram removidos, seccionados na região central e armazenados em refrigeração (-80°C) para análise microscópica através de imunohistoquímica. Além disso, amostras de medula óssea foram coletadas do fêmur para avaliação do recrutamento leucocitário e quantificação por citometria de fluxo.

4.5 Imunomarcação (elastase, CD68, CD206)

As amostras foram mantidas por 24 horas em solução de formol a 10%. Após esse período, os músculos foram seccionados transversalmente na região central da área lesionada, e submetidos a desidratação com banhos consecutivos em concentrações progressivas de álcool. Posteriormente, foram diafanizados e incluídos em parafina. Dois cortes de 4 µm de espessura foram realizados em micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha) para a avaliação dos marcadores anti-elastase, anti-CD68 e anti-CD206. Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia desengorduradas e silanizadas.

As lâminas com os cortes histológicos foram desparafinizadas com três banhos de 10 minutos em xanol, seguidos de hidratação em banhos sequenciais de soluções alcoólicas de concentrações decrescentes. Após esse processo, as lâminas foram lavadas com Wash Buffer 1X (EnVision™ FLEXWash Buffer (20x) 4x1ml (DM831, Referência K8007) e submetidas a recuperação antigênica em solução de ácido cítrico (pH 6,0) para os marcadores CD68 e CD206, e em solução Target Retrieval Solution High (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) 9x30ml (DM828, Referência K8004)) para o marcador Elastase. A recuperação foi seguida de lavagens adicionais com Wash Buffer 1X.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com incubação de Peroxidase Blocking Reagent (DAKO) nas lâminas, seguido de incubação overnight com os anticorpos primários anti-CD68 (1:100 - Nº GTX41868 – GenTex), anti-CD206 (1:150 - CD206/MRC1 (E6T5J) XP® Rabbit mAb #24595 – Cell Signaling) e anti-elastase (1:50 - Elastase Antibody (CELA3B/1257) – NovusBio) para identificação de macrófagos M1, macrófagos M2 e neutrófilos, respectivamente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas novamente com solução Wash Buffer 1X (Envision Tris Tween 20) e submetidas incubação do anticorpo secundário (Envision Flex™/ HRP) por 20 minutos e após, submetidos à reação de peroxidase com cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Envision Flex™) , seguida de coloração com hematoxilina de Mayer (DINAMICA CAS (517-28-2)). Os cortes foram desidratados e imersos em soluções de álcool de concentrações crescentes, seguidas de xanol. Os mesmos procedimentos foram realizados com as lâminas do grupo controle (animais sem criolesão e/ou tratamento).

4.9 Quantificação

Após o preparo das lâminas realizamos a quantificação por meio de fotos realizadas em microscópio com lente objetiva de 40X e magnitude de 400X. Para as fotos foram escolhidas 5 áreas aleatórias de cada lâmina histológica para posterior contagem das células marcadas por meio do software ImageJ.

O processo de contagem das células marcadas foi realizado de forma manual seguindo os seguintes passos:

1º Iniciamos a execução do software ImageJ e selecionamos uma das imagens fotografadas de forma aleatória, conforme representado na figura 2:

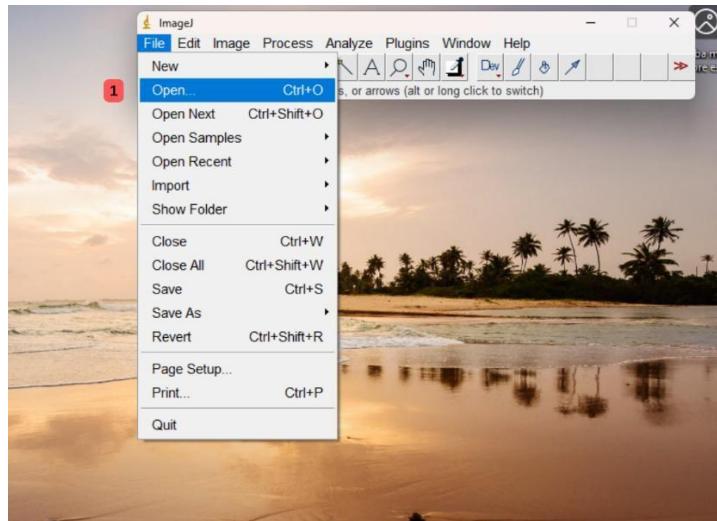


Figura 2. Processo de quantificação manual. (1) Iniciamos com abertura do arquivo, selecionando as fotos de forma aleatória

2º Após a seleção aleatória da imagem, selecionamos a ferramenta presente na régua chamada “Point Selection Tools”, clicando com o botão direito do mouse sobre o ícone representativo selecionamos a função “Multi-point Tool”, representado na figura 3:

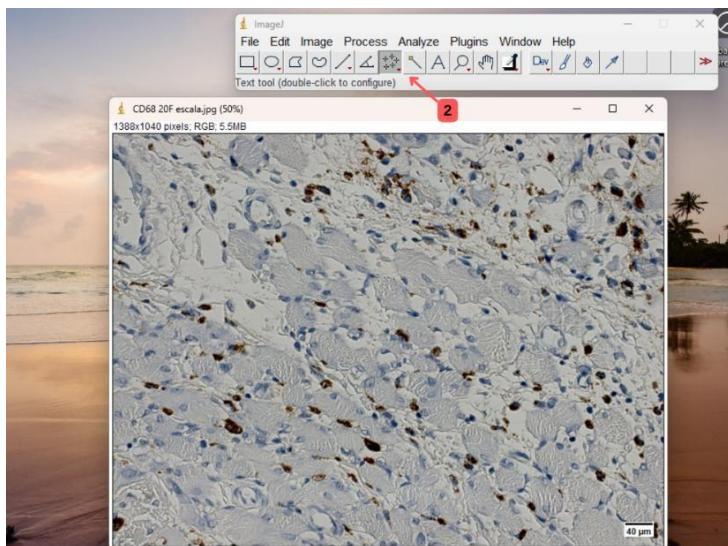


Figura 3. Processo de quantificação manual. (2) passo para seleção da ferramenta Point Selection Tools.

3º: A partir da seleção da ferramenta iniciamos a contagem manual das imagens circulares com tons amarronzados, onde visualizamos a representação

figurada de uma célula do tipo macrófago, que por sua vez está expressando as proteínas CD68 ou CD206. Como representado na figura 4:

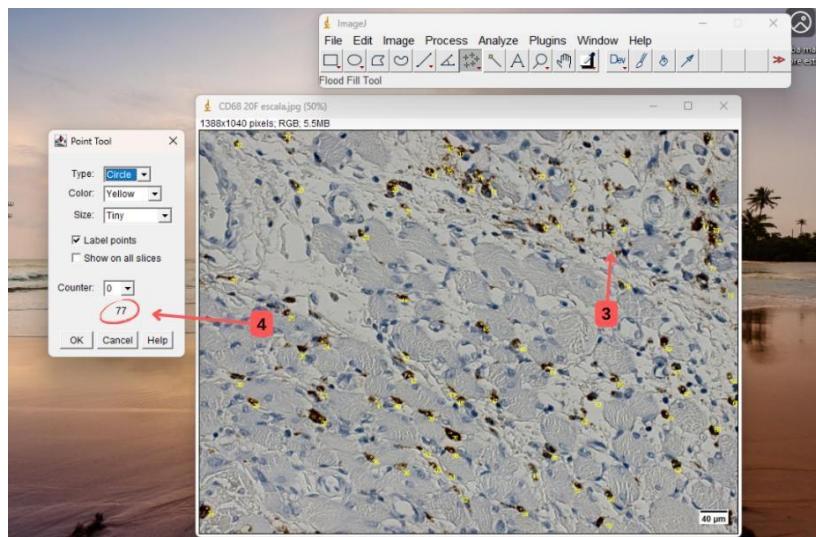


Figura 4. Processo de quantificação manual. (3) Marcação de células manualmente. (4) Obtenção do valor total de células marcadas.

4.8 Análise estatística

Utilizamos o software GraphPad Prism 8.0.1 (San Diego, CA, EUA) para elaborar a análise estatística dos dados adquiridos. Os dados obtidos passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para investigação da distribuição dos dados, após isso os dados foram comparados utilizando o método de análise ANOVA One Way e teste posthoc de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5. Resultados

Devido à ausência de lesão tecidual, os grupos Controle e Não Lesão + FBMV não apresentaram infiltrado inflamatório nos cortes histológicos, sendo, portanto, excluídos das análises quantitativas.

Na figura 05 são mostradas imagens representativas da imuno-histoquímica realizada nas lâminas histológicas de animais do grupo controle e na figura 6 imagens dos grupos sem criolesão + FBMV.

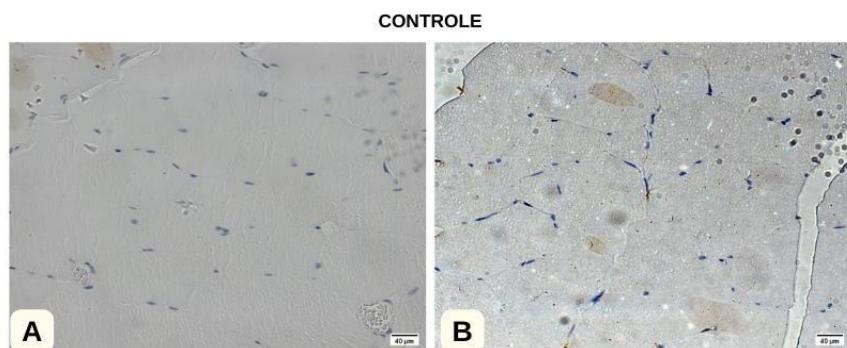


Figura 5. (A) imagem da imunomarcação de CD68 realizada na lâmina histológica do grupo controle. (B). Imagem da imunomarcação de CD206 realizada em uma lâmina histológico do grupo controle.

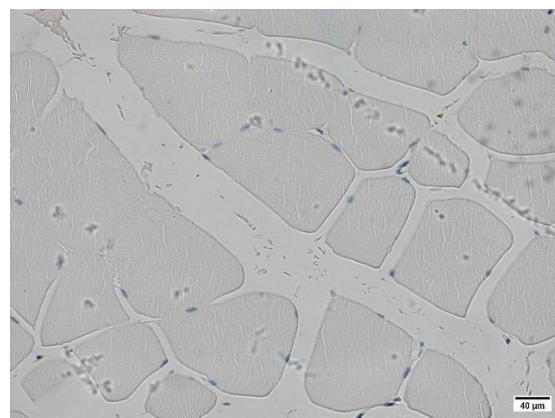


Figura 6. Imagem da imunomarcação realizada em uma lâmina histológica do grupo Sem criolesão + FBMV

5.1 Analise quantitativa de macrófagos CD68+

Na figura 07 podemos observar as imagens representativas dos resultados descritos a seguir sobre o processo de imunomarcação de CD68+ nos diferentes grupos experimentais.

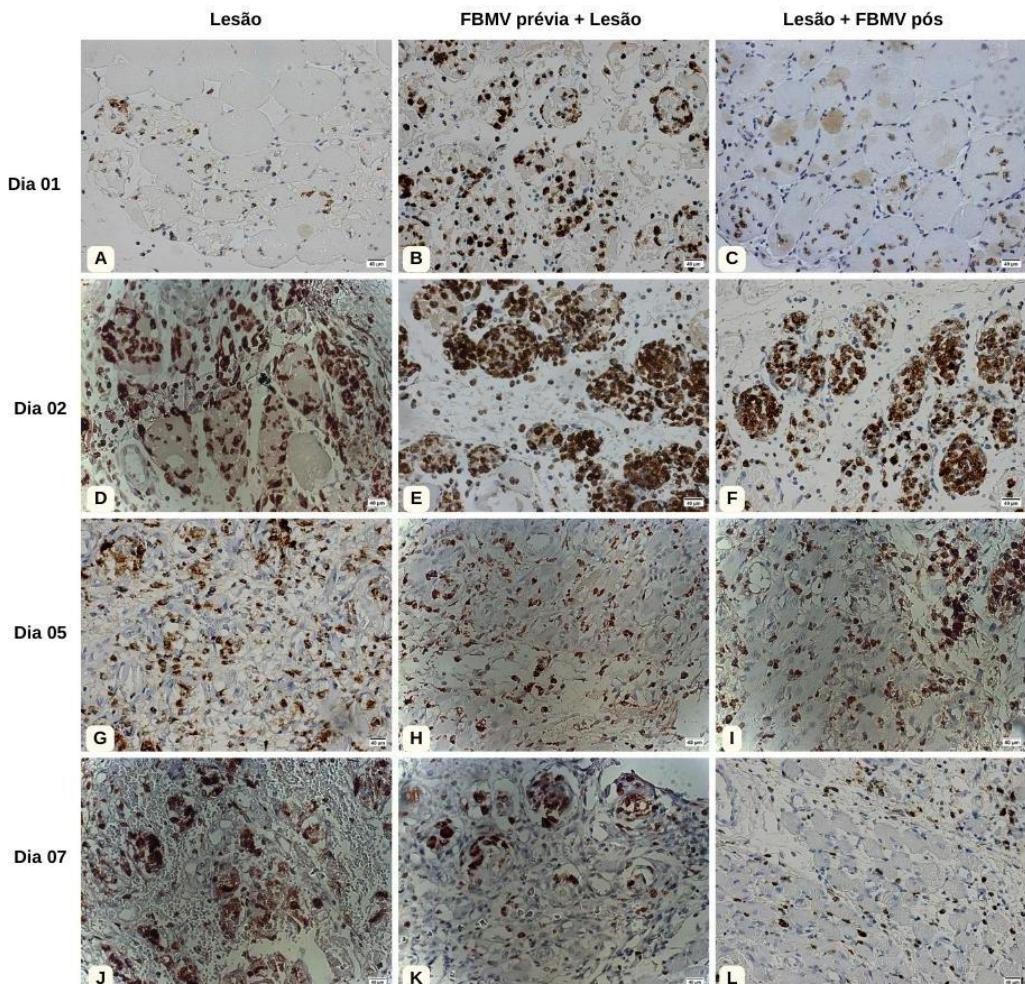


Figura 7 Imagem representativa da imunomarcação do AC CD68+. (A). Lesão dia 01. (D). Lesão dia 02. (G). Lesão dia 05. (J). Lesão dia 07; B. FBMV prévia + lesão dia 01. (E). FBMV prévia + lesão dia 02. (H) FBMV prévia+ lesão dia 05. (K). FBMV prévia+ lesão dia 07; (C). Lesão + FBMV pós dia 01. (F) Lesão + FBMV pós dia 02. (I). Lesão + FBMV pós dia 05. (L). Lesão + FBMV pós dia 07

A imunomarcação de células CD68+ no primeiro dia após a criolesão do músculo tibial anterior revelou a presença de infiltrado inflamatório nos grupos submetidos à Lesão ($P<0,0001$), FBMV prévia + lesão ($P<0,0001$) e FBMV pós + lesão ($P<0,0001$), em comparação aos grupos Controle e Não Lesão + FBMV. No entanto, no grupo FBMV prévia + lesão, foi observado um número significativamente maior de células CD68+ em comparação aos grupos Lesão ($P<0,0001$) e FBMV pós + lesão ($P<0,0001$). Não houve diferença

estatisticamente significativa entre os grupos lesão + FBMV pós e Lesão ($P=0,9556$), conforme representado na Figura 8.

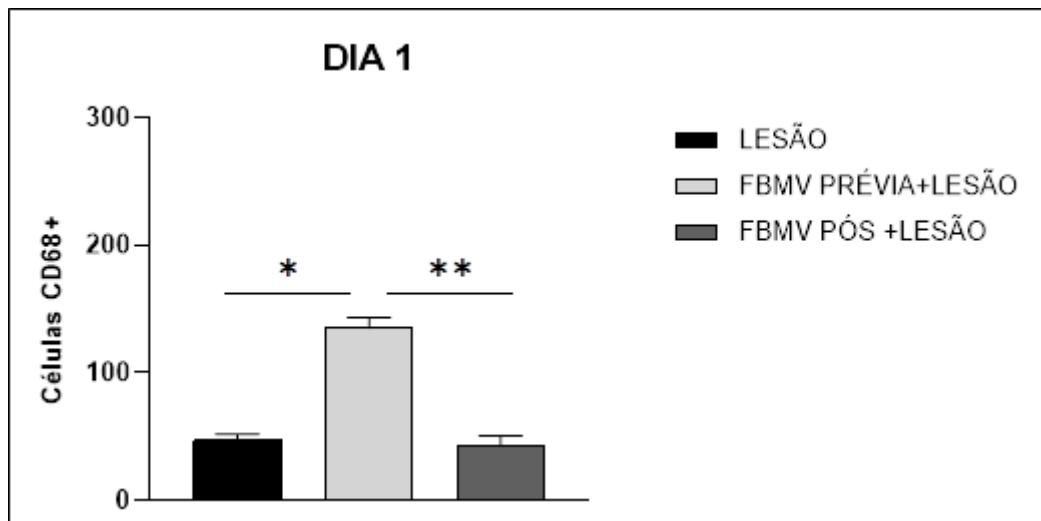


Figura 8. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 1 dia dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$. (* = Lesão vs FBMV prévia + Lesão ($p< 0,0001$) ; ** = FBMV prévia + Lesão vs Lesão+ FBMV pós ($p< 0,0001$))

Ao analisar as células CD68+ no dia 2, e no dia 5 (figura 10), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P = 0,8296$) entre os grupos lesionados.

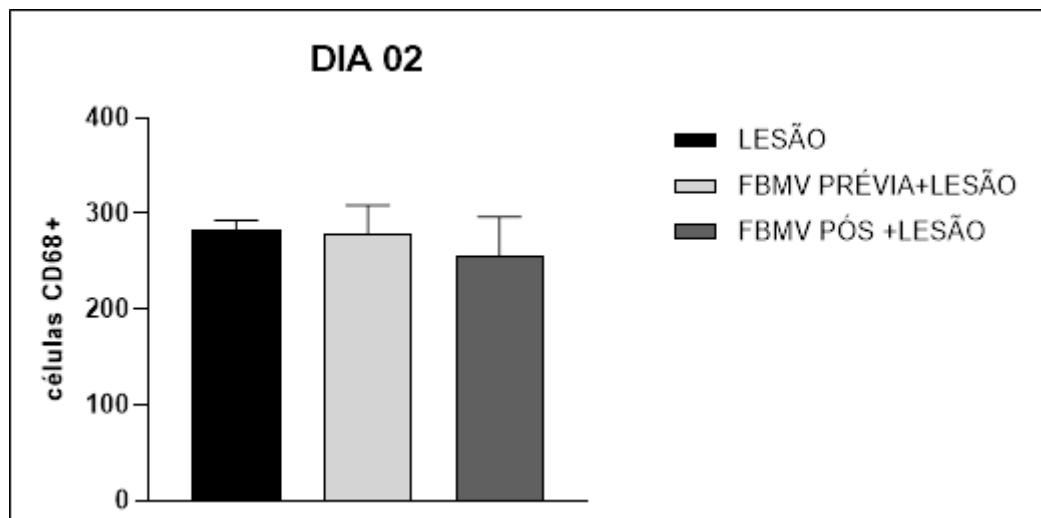


Figura 9 Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 2 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$.

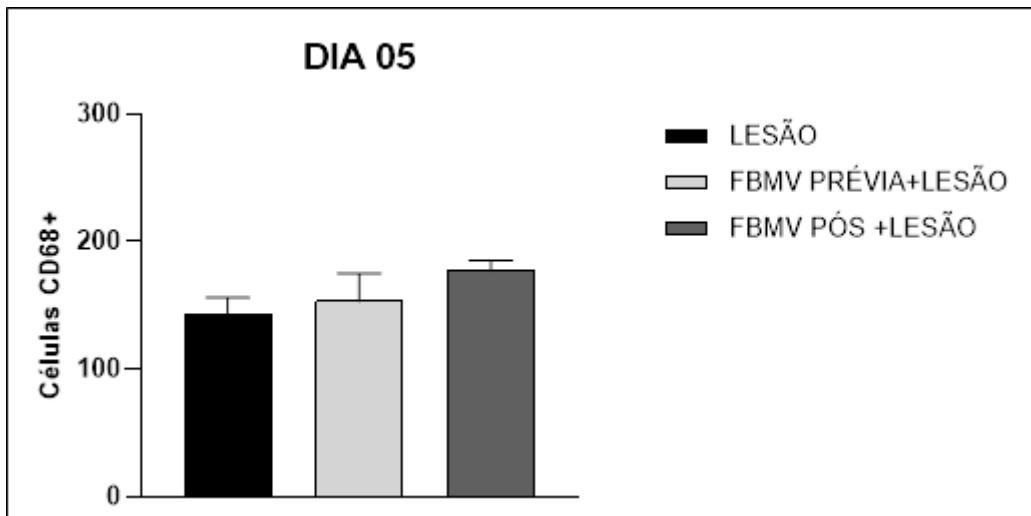


Figura 10. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 5 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$.

Após 7 dias, os resultados de imunomarcação das células CD68+ nos grupos lesionados revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Lesão e FBMV prévia + lesão ($P < 0,0018$) e entre Lesão e FBMV pós + lesão ($P < 0,0001$). Ambos os grupos que receberam FBMV apresentaram redução no número de células CD68+, em relação ao grupo somente lesão mas não houve diferença entre os grupo FBMV pré e pós lesão ($P = 0,2269$), conforme mostrado na Figura 11..

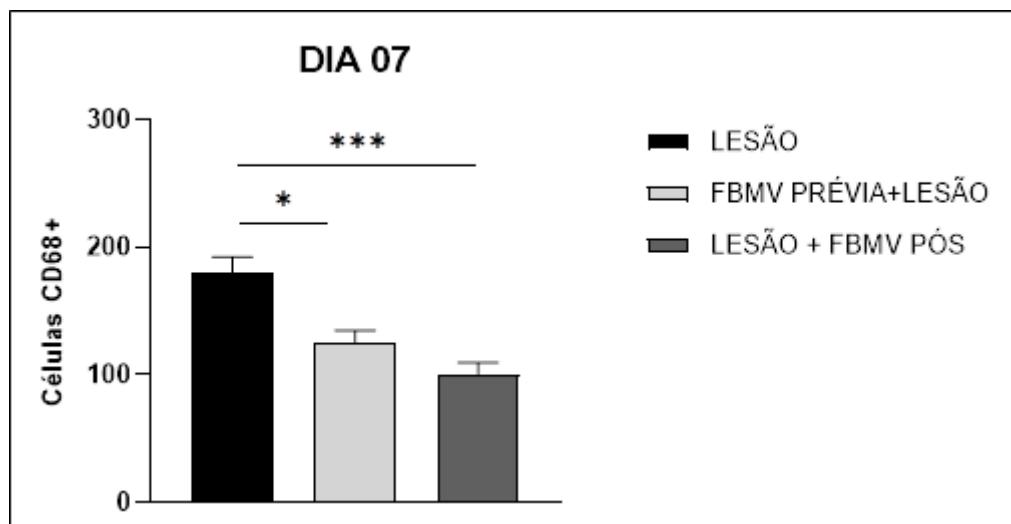


Figura 11. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$. (**=Lesão vs Lesão + FBMV pós ($p<0,0001$); * = FBMV prévia+lesão vs Lesão ($p= 0,0018$))

Ao comparar a imunomarcação de células CD68+ ao longo dos períodos avaliados em cada grupo lesionados, observou-se no grupo somente lesão um menor número de células no dia 1, seguido por um pico significativo no dia 2. Nos tempos de 5 e 7 dias, os níveis permaneceram elevados, sem diferença estatisticamente significativa entre esses períodos ($p = 0,4707$).

No grupo com irradiação prévia, também foi identificado um pico no número de células CD68+ no dia 2 em comparação ao dia 1 ($p = 0,0002$). Contudo, ao comparar o dia 1 com os dias 5 ($p = 0,8928$) e 7 ($p = 0,7058$), verificou-se uma estabilização, indicando retorno ao número inicial de células.

Já no grupo irradiado após a lesão, a análise revelou diferenças estatisticamente significativas entre o dia 1 e os tempos de 2 ($p = 0,0003$), 5 ($p < 0,0001$) e 7 dias ($p = 0,0053$), com um pico no dia 2. Não houve diferença entre os dias 2 e 5 ($p = 0,2752$), mas uma redução significativa no número de células foi observada entre os dias 5 e 7 ($p < 0,0001$). Esses resultados estão representados na Figura 12.

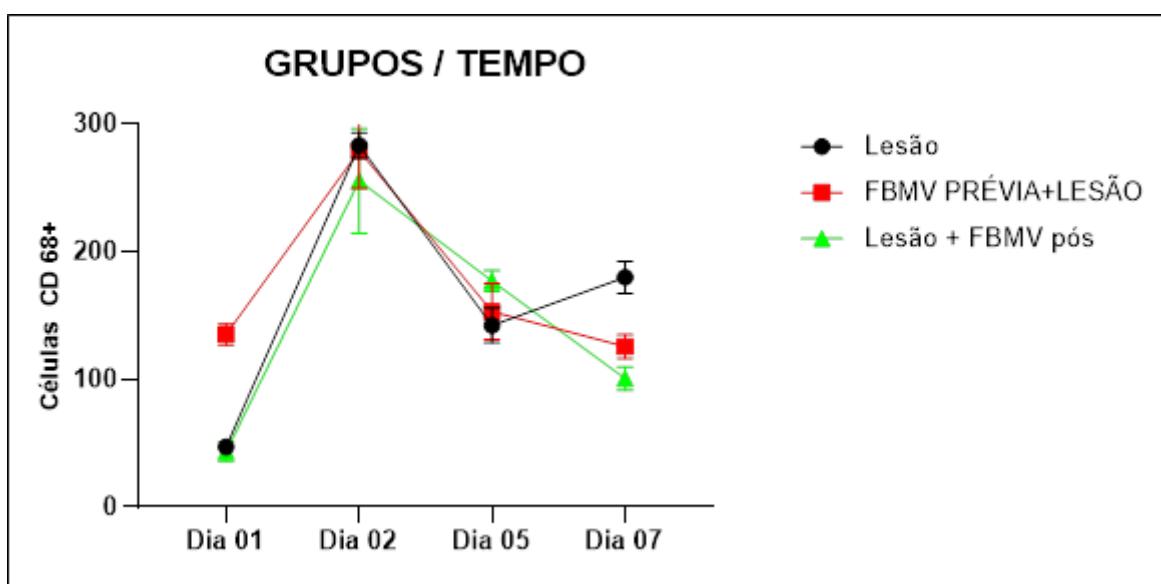


Figura 12. Análise das células CD 68+ por imunomarcação após 1,2, 5 e 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p < 0,05$.

5.2 Analise quantitativa de macrófagos CD206+

As imagens representativas da imunomarcação de CD206+ nos diferentes grupos experimentais e períodos avaliados estão contidas na figura 13

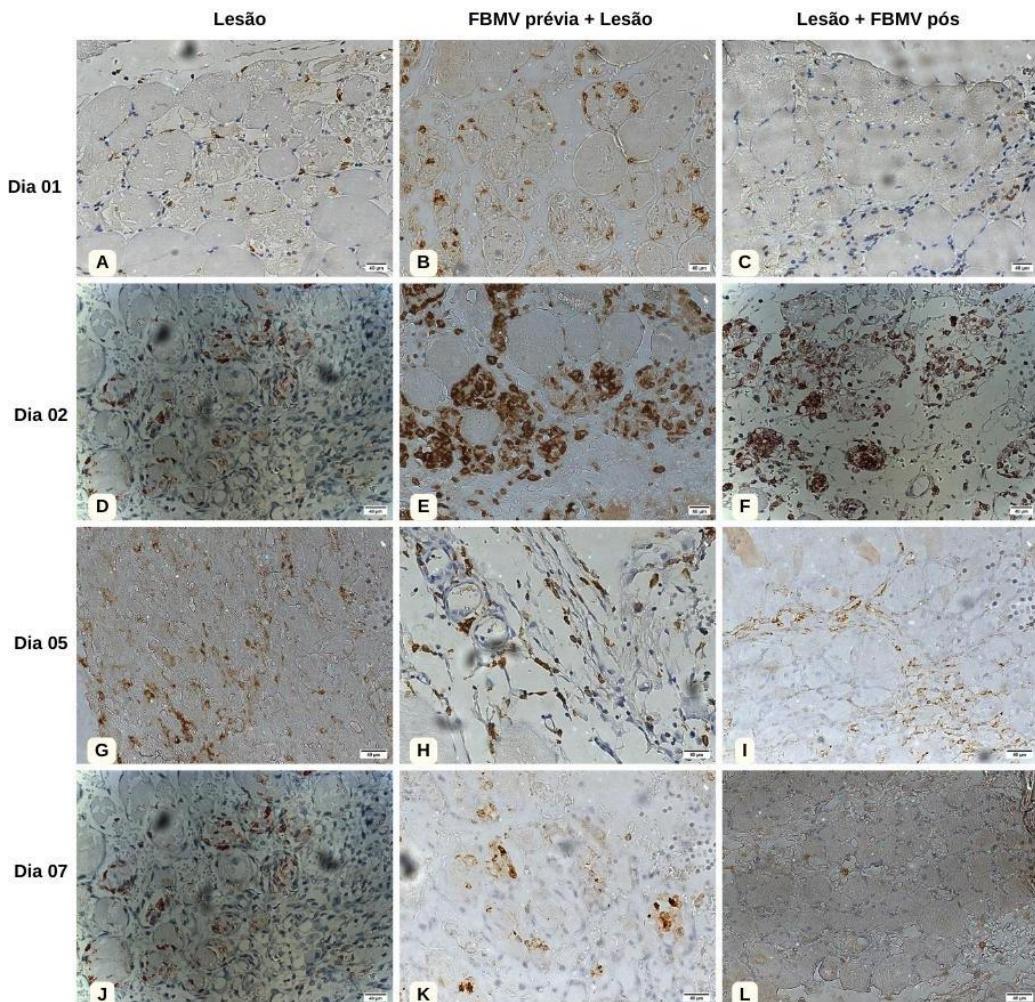


Figura 13. Imagem representativa da imunomarcação do AC CD206+. (A). Lesão dia 01. (D). Lesão dia 02. (G). Lesão dia 05. (J). Lesão dia 07; B. FBMV prévia + lesão dia 01. (E). FBMV prévia + lesão dia 02. (H) FBMV prévia+ lesão dia 05. (K). FBMV prévia+ lesão dia 07; (C). Lesão + FBMV pós dia 01. (F) Lesão + FBMV pós dia 02. (I). Lesão + FBMV pós dia 05. (L). Lesão + FBMV pós dia 07

Em relação ao tempo experimental de 01 dia observamos a presença de células CD206+, porém em menor quantidade nos grupos Lesão ($p <0,0001$) e Lesão + FBMV Pós ($p <0,0001$) em comparação ao grupo de FBMV prévia + Lesão. Não houve diferença estatística entre os grupos Lesão e Lesão + FBMV

pós, não foi identificada diferença estatisticamente significativa no processo de recrutamento celular ($p = 0,1321$), conforme evidenciado na Figura 14.

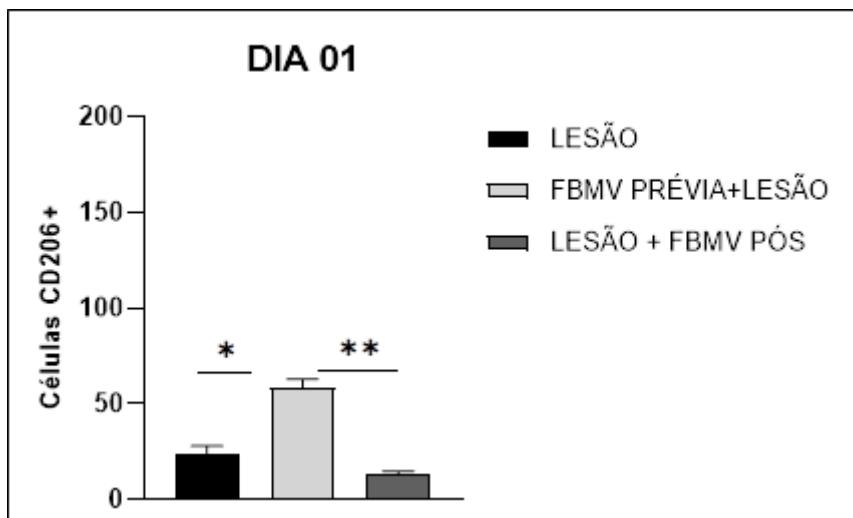


Figura 14 Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 1 dia dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$. (*) = Lesão vs FBMV prévia + lesão ($p<0,0001$); (**) = FBMV prévia+lesão vs Lesão + FBMV pós Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$. (*) = Lesão vs FBMV prévia + lesão ($p<0,0001$); (**) = FBMV prévia+lesão vs Lesão + FBMV pós ($p<0,0001$)

Após 2 dias foi observado que o número de células CD206+ no grupo FBMV prévia + lesão foi significativamente maior em comparação ao grupo Lesão ($p = 0,0225$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Lesão + FBMV pós ($p = 0,6322$). Além disso, o recrutamento celular apresentou paridade entre os grupos Lesão e Lesão + FBMV pós no segundo dia ($p = 0,1674$), conforme ilustrado na Figura 15.

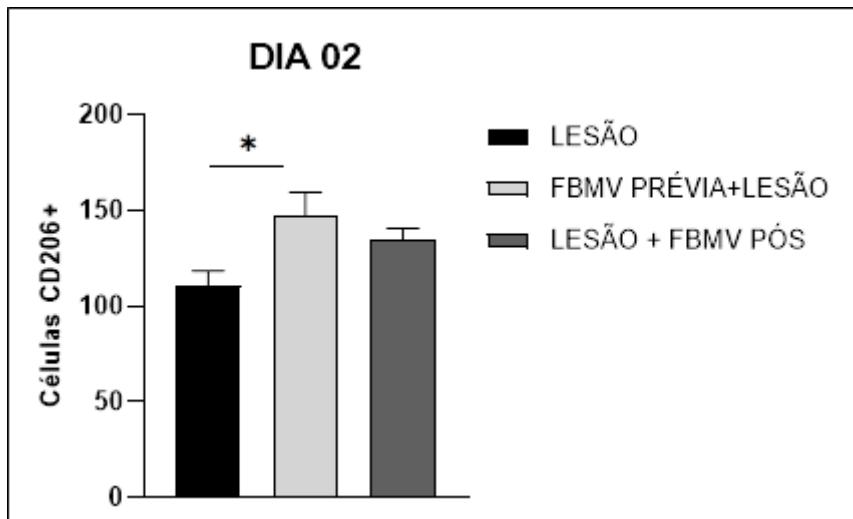


Figura 15 Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 2 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$. (*) = Lesão vs FBMV prévia + lesão ($p= 0,0225$)

Em 5 dias após lesão foi observada uma redução do total de células CD 206+ em comparação ao dia 2, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados ($p> 0,05$). (Figura 16)

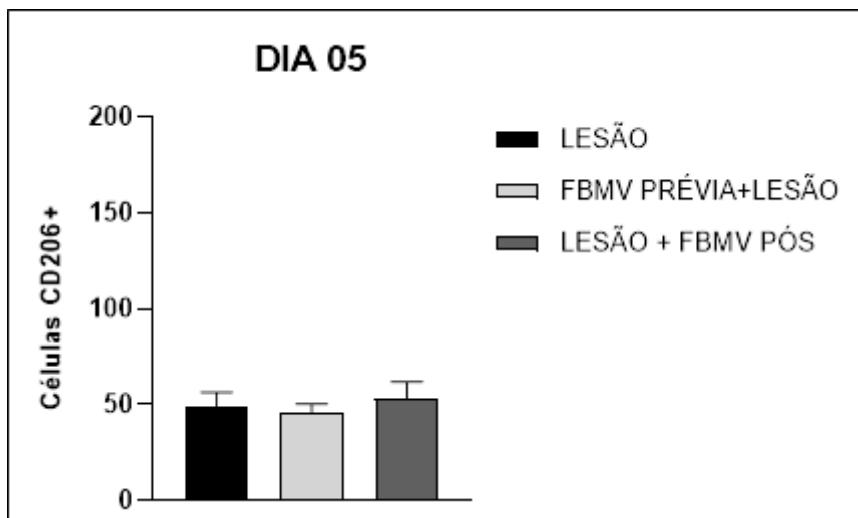


Figura 16 Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 5 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$.

Após 7 dias houve uma redução significativa do número de células entre os grupos Lesionados que receberam a FBMV seja previamente ($p= 0,0053$) ou após a lesão ($p <0,0001$) em comparação ao grupo somente lesionado. Ao compararmos os grupos que foram irradiados é possível observar uma redução mais acentuada no grupo Lesão + FBMV pós em comparação ao FBMV prévia + lesão ($p= 0,0482$). (Figura 17)

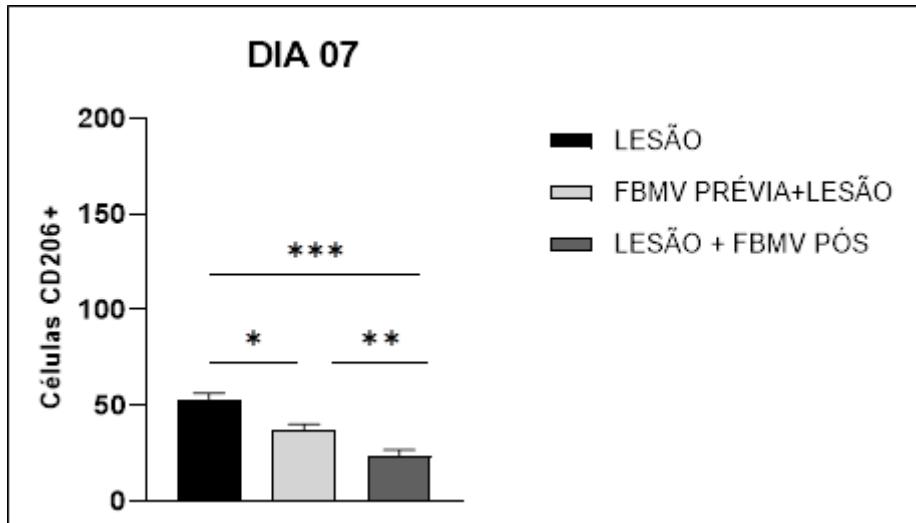


Figura 17 Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$. (*) = Lesão vs FBMV prévia + lesão ($p= 0,0053$); (**) = FBMV prévia+lesão vs Lesão + FBMV pós ($p= 0,0482$); Lesão vs Lesão + FBMV pós ($p<0,0001$)

Ao avaliar a influência do tempo nos diferentes grupos experimentais, observou-se que ambos iniciaram o pico de recrutamento celular no segundo dia, sendo este mais acentuado no grupo de irradiação prévia. Neste grupo, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dias 1 e 2 ($p < 0,0001$). No entanto, foi identificada uma redução no recrutamento de células CD206+ no dia 5, sem diferenças significativas em relação ao dia 1 ($p = 0,2857$) e ao dia 07 ($p = 0,3549$). Ainda assim, uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os dias 01 e 07 ($p = 0,0317$). Por outro lado, no grupo Lesão + FBMV pós, o recrutamento celular retornou ao número inicial no sétimo dia após a lesão ($p = 0,2167$), conforme apresentado na Figura 18.

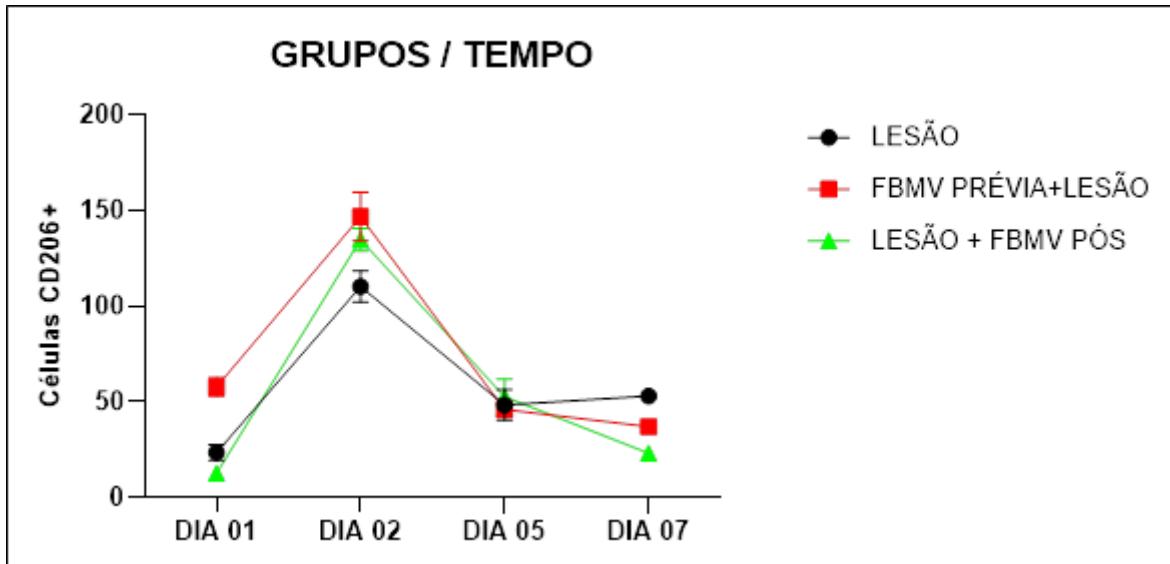


Figura 18. Análise das células CD 206+ por imunomarcação após 1,2, 5 e 7 dias dos grupos Lesão; FBMV prévia+Lesão; Lesão+ FBMV pós. Dados expressos em média \pm SEM (ANOVA/Tukey). $p<0,05$.

6. Discussão

De acordo com a literatura, a diferenciação de monócitos circulantes e seu recrutamento para o sítio lesionado tem início a partir de 48 horas. Isso é consistente com o recrutamento de macrófagos de fenótipo M1 observado no período experimental de 2 dias nos grupos Lesão e Lesão + FBMV pós. No entanto, ao analisarmos o grupo submetido à irradiação preventiva, foi observada uma antecipação na chegada dessas células ao sítio da lesão. (39,44,45,46),

O estudo de Junior et al. (2020) avaliou o efeito da FBM local pós-lesão utilizando os mesmos parâmetros dosimétricos (780 nm; 40 mW; 3,2 J total) sobre o infiltrado inflamatório em um modelo de lesão muscular aguda em ratos idosos, que apresentam uma resposta inflamatória mais tardia. O estudo utilizou tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias após a lesão, e os resultados mostraram um pico de recrutamento de macrófagos CD68+ no terceiro dia no grupo tratado com FBM local. Esses achados estão alinhados com os resultados do presente estudo, ao demonstrar que a FBM modulou o recrutamento desses macrófagos durante o reparo após lesão aguda. Além disso, assim como a forma de irradiação local, a FBMV também foi capaz de influenciar esse recrutamento, evidenciado pelo aumento observado já no primeiro dia no grupo que recebeu FBMV de forma preventiva.

Embora os períodos de análise entre o estudo de Junior et al. (2020) (38) e o presente estudo sejam diferentes, os resultados indicam que tanto a FBM local quanto a FBM vascular foram capazes de estimular o recrutamento de macrófagos CD68+. No presente estudo, o pico de recrutamento no grupo de irradiação pós-lesão foi observado em 2 dias, enquanto o estudo de Junior et al. (2020) (38) identificou o pico no terceiro dia, sem avaliar especificamente o intervalo de 2 dias, o que dificulta comparações diretas. Assim, não é possível afirmar se as diferenças observadas são decorrentes da forma de aplicação da FBM (local ou vascular) ou do método de tratamento (preventivo ou pós-lesão), mas os dados reforçam o potencial da FBM em modular o recrutamento dessas células inflamatórias.

Adicionalmente Souza et al. (2018) (12) avaliaram o efeito da FBM local (FBML) em um modelo de lesão muscular aguda semelhante ao presente estudo, utilizando dois comprimentos de onda diferentes (laser vermelho 660 nm, 70 mW, energia total de 8 J, e laser infravermelho 780 nm, 70 mW, energia total de 8 J). Seus resultados demonstraram que, em ambos os comprimentos de onda, houve uma redução no número de células CD68+ dois dias após a lesão. Esses achados contrastam com os resultados do presente estudo, que utilizou a técnica de FBM vascular (FBMV) com laser infravermelho (780 nm, 40 mW, 3,2 J total). No presente estudo, foi observado um pico de recrutamento de células CD68+ no grupo Lesão + FBMV pós-tratamento no segundo dia, enquanto no grupo FBMV prévia houve um aumento já no primeiro dia, seguido de um incremento no segundo dia, estabilizando-se no quinto dia e reduzindo no sétimo dia. No sétimo dia, os resultados do presente estudo convergiram com os de Souza et al. (2018) (12), indicando uma semelhança na resposta inflamatória no estágio final da avaliação. Essa diferença temporal pode estar relacionada aos tipos celulares presentes no campo irradiado em cada abordagem. Na FBMV, os efeitos são mediados pela interação da luz com componentes sanguíneos, enquanto na FBML o foco é diretamente no tecido lesionado, o que pode influenciar significativamente os padrões de recrutamento e a dinâmica inflamatória.

Zagatto et al. (2016) (47), que investigaram os efeitos da FBM aplicada localmente, utilizando laser ou LED em atletas de polo aquático submetidos a um regime rigoroso de treinamento de 4 horas diárias durante 6 dias, observaram que a aplicação da luz, tanto previamente quanto após a atividade física, foi capaz de modular algumas expressões de danos musculares, como os níveis de creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). Esses achados corroboram os dados apresentados por Lopez et al. (2021) (3). No entanto, no que diz respeito à expressão das citocinas pró-inflamatórias avaliadas no estudo (IL-1b e TNF-a), que são fundamentais para o recrutamento de células de perfil pró-inflamatório, como os macrófagos (CD68), não houve alterações significativas nos grupos irradiados. A justificativa apresentada pelos autores para esse resultado foi a pequena área irradiada, em função da aplicação local da luz. Em contraste, Malavazzi et al. (2024) (28) identificaram que que a

irradiação com FBMV em ratos foi capaz de elevar os níveis de TNF- α e IL-1 β , entre outras citocinas, já no primeiro dia de tratamento, o que pode refletir um aumento no recrutamento de macrófagos com perfil inflamatório para o local da lesão. Além disso, a irradiação promoveu um aumento no número de monócitos circulantes, células responsáveis pela migração e diferenciação de macrófagos no espaço extravascular. Esses efeitos foram observados tanto no segundo dia, com a terapia preventiva, quanto no quinto dia, com a aplicação pós-lesão muscular. Esses achados sugerem que a forma de aplicação da FBM — local ou vascular — influencia diretamente a liberação de mediadores pró ou anti-inflamatórios. Esses mediadores, por sua vez, desempenham um papel crucial no processo de recrutamento celular e na definição do curso da resposta inflamatória, determinando se ela resultará na perpetuação do processo inflamatório ou na sua resolução e subsequente reparo muscular.

Em uma análise in vivo, utilizando ratos Wistar com doença pulmonar aguda induzida, Macedo et al (2022) (48) realizaram aplicações locais com laser infravermelho nos comprimentos de onda de 808 nm; 30 mw; 1,68 J com objetivo de investigar seu efeito sobre infiltrado inflamatório pulmonar e mediadores inflamatórios como a IL -1b, concluindo que a FBM foi capaz de reduzir ambos os parâmetros analisados. Seus resultados corroboram com os de Scalo et al (2022) (49) (880nm, com 100mW e uma energia total de 1J) que semelhante a Malavazzi et al (2024) (28) (780 nm, 40mW, 3,2 J total) utilizaram modelos experimentais de lesão muscular em ratos Wistar, embora as dosimetrias sejam diferentes.

Em relação ao recrutamento e à modulação das células do fenótipo M2, com perfil anti-inflamatório, o presente estudo observou uma antecipação no recrutamento no grupo irradiado preventivamente, com um pico de concentração no segundo dia em ambos os grupos (FBMV prévia e FBMV pós), em comparação ao grupo lesionado. Esses resultados são consistentes com os observados em estudos como o de Jahani-Sherafat et al. (2024) (50), em modelo in vitro de doença celíaca, utilizando laser infravermelho nos comprimentos de onda de 810nm, 1J/cm², observaram uma redução da expressão de IL-6 e aumento de TGF-b e IL-10 levando a um aumento da expressão do marcador CD206, o que indica um recrutamento maior de macrófagos M2, o que corrobora

com os dados apresentados por Souza et al. (2018) (12) no grupo de irradiação local com laser infravermelho (780nm, 70mW, 8J) . Da mesma forma, Zhang et al (2019) (51) utilizaram a FBML em modelos in vitro de lesão medular e verificaram que a irradiação foi capaz de aumentar a expressão do marcador de macrófago M2 (ARG-1).

Visto que não foram evidenciados outros trabalhos que abordassem os questionamentos aqui levantados e estudados, o presente estudo caracteriza-se como uma pesquisa inédita. Um dos principais diferenciais desta investigação foi a capacidade da FBMV, quando aplicada de forma preventiva, de antecipar o recrutamento de células CD68+ e CD206+, bem como de células exclusivamente CD68+, demonstrando um efeito precoce na modulação celular.

Embora os resultados de Junior et al. (2019) (38) apontem para um aumento na concentração de células M2, esse aumento foi observado apenas após três dias da lesão, seguido por uma redução mais acentuada no sétimo dia, em comparação ao grupo apenas lesionado. Esses achados sugerem que a FBMV preventiva pode induzir um pico pró-inflamatório mais rápido, acelerando a resposta inflamatória inicial e, consequentemente, otimizando o reparo tecidual ao promover a chegada precoce de macrófagos pró-inflamatórios, como os CD206+.

Do ponto de vista clínico, é possível supor que os resultados obtidos neste estudo possam trazer benefícios significativos para as terapias de reabilitação, especialmente em atletas de alta performance. Esses indivíduos, frequentemente suscetíveis a lesões musculares, demandam recuperações mais rápidas para retornarem às suas funções. Assim, a aplicação da FBMV, tanto de forma preventiva quanto após as lesões, pode oferecer vantagens como a redução dos sintomas inflamatórios clássicos (dor, calor, rubor e edema), decorrente de sua ação direta sobre as células inflamatórias, mediada pelo método de aplicação da luz. Dessa forma, os atletas podem realizar as atividades de reabilitação de maneira mais eficaz, acelerando, assim, sua recuperação.

A progressão do número de células recrutadas, tanto CD68, quanto CD206, nos leva a sugerir que o efeito da FBMV sobre a modulação do processo inflamatório, a partir de uma redução dos números de células inflamatórias (27) e antecipação de picos de concentração, poderia levar a um reparo mais efetivo

do tecido muscular. Tombelem et al (2023) (5) e Martinelli et al (2022) (6) identificaram melhora no aspecto morfológico das fibras musculares após a lesão com método de tratamento a partir a aplicação de FBMV. Notavelmente na comparação de Malavazzi et al (2024) (28), entre a irradiação prévia e pós, os aspectos morfológicos das fibras musculares, como a presença de mionecrose e formação de novas fibras não divergem, o que pode nos levar a sugerir que a FBMV prévia é capaz de antecipar o recrutamento celular mediante uma resposta inflamatória, mas no processo de resolução da inflamação concomitantemente o reparo tecidual é relativamente semelhante (3). Esses achados também nos levam a sugerir que, do ponto de vista clínico, mesmo que a prontidão das células pareça ser mais eficaz quando a luz é aplicada de forma preventiva às lesões, isso não compromete a recuperação do tecido muscular. Essa constatação nos dá segurança de que, caso não seja possível realizar a aplicação prévia da FBMV, como no caso de um atleta que execute sua atividade sem a aplicação preventiva e venha a se lesionar em múltiplos locais, a aplicação da FBMV após o ocorrido ainda pode garantir uma boa recuperação muscular.

7. Conclusão

A FBMV demonstrou efeitos positivos na modulação e recrutamento dos diferentes fenótipos de macrófagos, tanto nas formas de aplicação preventiva quanto terapêutica após a lesão, antecipando o acúmulo de macrófagos dos fenótipos M1 e M2 no sítio da lesão. No entanto, os efeitos foram mais acentuados na aplicação preventiva.

Os presentes achados colaboraram com a evolução da linha de pesquisa do grupo a respeito das diversas respostas da FBMV no tecido muscular, o que nos abre portas para ampliarmos nossos olhares, como investigar se os presentes resultados encontrados são similares em portadores de comorbidades que podem influenciar nos reparos de tecidos, como por exemplo, as obesidades e diabetes e futuramente evoluirmos para os ramos da pesquisa clínica.

Embora façamos uso de parâmetros dosímetros pré estabelecidos na nossa linha de pesquisa como ideais, ainda existem divergências quanto a isso, sendo necessárias maiores pesquisas para padronização da dosimetria ideal, principalmente do ponto de visto clínico.

8. Considerações finais

A pesquisa destaca a flexibilidade da FBMV, que pode ser aplicada tanto na prevenção de danos musculares quanto na recuperação de lesões, modulando o recrutamento de macrófagos M1 e M2. Sua versatilidade amplia sua utilidade em contextos esportivos e clínicos. Por fim, os resultados apresentados abrem novas perspectivas para estudos futuros, como a análise de parâmetros específicos de aplicação e a combinação da FBMV com outras terapias complementares. Esses desdobramentos podem contribuir para o aprimoramento das estratégias de reabilitação e consolidar a técnica como uma abordagem indispensável no manejo de lesões musculares.

9 Anexos

9.1 Aprovação projeto CEUA Nº 1273010623



Universidade Nove de Julho
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da fotobiomodulação vascular e local no recrutamento leucocitário medular e na expressão de fatores inflamatórios e miogênicos em modelo animal de lesão muscular aguda", protocolada sob o CEUA nº 1273010623 (ID 000396), sob a responsabilidade de **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** e equipe; Aline Souza Silva ; Raquel Lira Ortiz da Silva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 18/10/2023.

We certify that the proposal "Effect of photobiomodulation vascular and local photobiomodulation on marrow leukocyte recruitment and expression of inflammatory and myogenic factors in animal model of acute muscle injury.", utilizing 110 Heterogenics rats (110 males), protocol number CEUA 1273010623 (ID 000396), under the responsibility of **Raquel Agnelli Mesquita Ferrari** and team; Aline Souza Silva ; Raquel Lira Ortiz da Silva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 10/18/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2023 a 08/2025 Área: Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde

Origem: Biotério - Unidade Vergueiro

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 11 a 13 semanas Quantidade: 110

Linhagem: Wistar

Peso: 220 a 235 g

São Paulo, 14 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais
Universidade Nove de Julho



9.2 Comprovante de apresentação oral no X Bhiophotonics Internacional fórum 2024

19/12/2024, 20:01

E-mail de Uninova - Trabalho selecionado para apresentação oral no 10 Fórum Internacional de Biofotônica (10 FIB)



Gmail

RAQUEL LIRA ORTIZ DA SILVA <raquel.lira.ortiz@univ.edu.br>

Trabalho selecionado para apresentação oral no 10 Fórum Internacional de Biofotônica (10 FIB)

1 mensagem

Raquel Agnelli Mesquita Ferrari <raquelmesquita@univ9.pro.br> 29 de outubro de 2024 às 20:54
 Para: RAQUEL LIRA ORTIZ DA SILVA <raquel.lira.ortiz@univ9.edu.br>, alinespbn@gmail.com, Tainá Santos <taina_caroline_santos@hotmail.com>, Bruna Caprioli <brunacaprioli@hotmail.com>, Maria Fernanda De Souza Setubal Destro <fernandarodrigues@univ9.pro.br>, "Prof. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA" <acrth@univ9.pro.br>, KRISTIANNE PORTA S FERNANDES <kporta@univ9.pro.br>, Raquel Mesquita <raquel.mesquita@gmail.com>
 Cc: "Prof. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA" <apligeiro@univ9.pro.br>

Prezado (a) Raquel Lira Ortiz da Silva

Em nome da Comissão Científica do X Fórum Internacional de Biofotônica (X FIB) tenho a honra de informá-lo que o seu trabalho intitulado "Effect of vascular photobiomodulation on M1 macrophage recruitment during muscle regeneration in an acute Injury model." foi selecionado para apresentação oral que ocorrerá no dia 4 de novembro de 2024 às 16h15min de modo online.

O link para acessar a SALA 1 (virtual para apresentação dos trabalhos) é: meet.google.com/aav-zbqw-wre. O apresentador do trabalho deverá acessar a sala virtual com 10 min de antecedência de sua apresentação. O link para acesso da sala acessando a sala pelo link .

Para esta modalidade, solicitamos ao autor que prepare uma versão gravada da apresentação em PowerPoint ou software similar. A gravação pode ser em português (com as respectivas legendas em Inglês acrescentadas a cada slide da apresentação) ou em Inglês. Os slides devem ser escritos em Inglês. Você deverá nos enviar sua apresentação (de no máximo 15 minutos) gravada até o dia 2 de novembro de 2024. Caso não possa fazer a apresentação algum dos co-autores poderá apresentar o trabalho.

O link para para a pasta do drive para salvar a apresentação é:

<https://drive.google.com/drive/folders/1Iw1ODDY0MjHgvq6UiujQobXCBjwzg1p?usp=sharing>

Qualquer dúvida ou problema entrar em contato com o chairperson responsável pela sua sala (em cópia neste e-mail). Por gentileza, seria importante fornecer um número de whatsapp para facilitar a comunicação com a Comissão Organizadora.

Será uma honra tê-lo (a) conosco.

Saudações,
Comissão Científica

—

—

Raquel Agnelli Mesquita Ferrari

Doutora dos Programas de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação e Medicina Biofotônica

Ful Professor, Rehabilitation Sciences and Medicine-Biophotonics

Universidade Nova de Juiz (UNINOVE)

Rua Vergueiro, 225, CEP 01504001, São Paulo-SP, Brazil

phone +55 (11) 3385-9222

10. Referências

1. Alves A, Fernandes K, Melo C, Yamaguchi R, França C, Teixeira D, et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci.* 2014; 29: p. 813-21.
2. de Brito A, Alves AN, Ribeiro BG, Barbosa DVDE, Magalhaes EMR, Fernandes PS, et al. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. *Lasers in Medical Science.* 2017; 33: p. 513-521.
3. Lopez TCC, Malavazzi TCdS, Rodrigues MFSD, Bach EE, Silva T, Hi EMb, et al. Histological and Biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *Journal of Biophotonics.* 2021 May; 15(5): p. 1-12.
4. Adabbo M, Paolillo F, Bossini P, Rodrigues N, Bagnato V, Parizotto N. Effects of Low-Level Laser Therapy Applied before Treadmill Training on Recovery of Injured Skeletal Muscle in Wistar Rats. *Photomed Laser Surg.* 2016; 34: p. 187-193.
5. Tobelem DdC, Andreo L, Silva T, Malavazzi TCS, Martinelli A, Horliana ACRT, et al. Systemic vascular photobiomodulation accelerates the recovery of motor activity in rats following spinal cord injury. *Laser Surg Med.* 2023; 55: p. 1-13.
6. Martinelli A, Andreo L, Malavazzi TCdS, Terena SML, Tobelem dC, Bussadori K, et al. Vascular photobiomodulation increases muscle fiber diameter and improves the gait during compensatory hypertrophy of plantar muscle in rats. *Journal of Biophotonics.* 2022; 15: p. 1-14.
7. Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell and Tissue Research.* 2019 Mar; 375(3): p. 575–588.
8. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2017; 17: p. 165–178.
9. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology.* 2014; 5: p. 1-22.
10. Rudziak P, Ellis CG, Kowalewska PM. Role and molecular mechanisms of pericytes in regulation of leukocyte diapedesis in inflamed tissues. *Mediators of inflammation.* 2019;: p. 1-9.

11. Junior EMdS, Mesquita-Ferrari R, França , Andreo L, Bussadori K, Fernandes PS. Modulating effect of low intensity pulsed ultrasound on the phenotype of inflammatory cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Dec; 96: p. 1147-1153.
12. Souza N, Mesquita-Ferrari , Rodrigues M, da Silva D, Ribeiro B, Alves A, et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med*. 2018 Oct; 22(10): p. 4922-4934.
13. Sousa dB, Rodrigues MFSD, Santos dS, Mesquita-Ferrari , Nunes , da Silva DdFT, et al. Differential expression of inflammatory and anti-inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after photobiomodulation with red or infrared lasers. *Lasers in Medical Science*. 2019 Mar; 35(2): p. 337-343.
14. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophysics*. 2017; 4(3): p. 337-361.
15. Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE Journal of quantum electronics*. 1987; 23: p. 1703-1717.
16. Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK, Franca CM. Vascular Photobiomodulation. *Photobiomodulation, Photomedicine and laser Sugery*. 2021: p. 1-2.
17. Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE Journal of quantum electronics*. 1987.
18. Zecha JAEM, Raber-Durlacher JE, Nair RG, et al. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer*. 2016: p. 2781–2792..
19. Malavazzi TCdS, Fernandes KPS, Lopez TCCL, Rodrigues MFSD, Horliana ACRT, Bussadori K, et al. Effect of the invasive and non-invasive systemic photobiomodulation using low-level laser in experimental models: A systematic review. *Laser in Medical Science*. 2023: p. 1-13.
20. Krishnamurthy , Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007.
21. Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK, Franca CM. Vascular Photobiomodulation. *Photobiomodulation, Photomedicine and laser Sugery*. 2021; 39: p. 1-2.

22. Sertaje RF, Gonçalves LL, Gomes AOG, Bruno LH, Fossati AL, Viarengo NO, et al. Vascular photobiomodulation in the treatment of children with temporomandibular disorders Study protocol for a randomized, controlled, blind, clinical trial. *Medicine*. 2022; 101(42): p. 1-4.
23. Cronshaw M, Parker , Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M. Photobiomodulation and Oral Mucositis:A Systematic Review. *dentistry journal*. 2020; 8(3) : p. 87.
24. Ganeshan , Skladnev NV, Kim J, Mitrofanis , Johnstone M. Pre-conditioning with Remote Photobiomodulation Modulates the Brain Transcriptome and Protects Against MPTP Insult in Mice. *Neuroscience*. 2019; 400: p. 85-97.
25. Lee , Park J, Park M, Kim N, Park K, Choi B, et al. Pre-conditioning with transcranial low-level light therapy reduces neuroinflammation and protects blood-brain barrier after focal cerebral ischemia in mice. *Restor Neurol Neurosci*. 2016; 34(2): p. 201-14.
26. Moskvin S, Askhadulin E, Kochetkov A. Low-Level Laser Therapy in Prevention of the Development of Endothelial Dysfunction and Clinical Experience of Treatment and Rehabilitation of COVID-19 Patients. *Rehabil Res Pract*. 2021; 2021: p. 1-8.
27. Malavazzi TCdS, Fernandes KPS, Lopez TCCL, Rodrigues MFSD, Horliana ACRT, Bussadori K, et al. Effect of the invasive and non-invasive systemic photobiomodulation using low-level laser in experimental models: A systematic review. *Laser in Medical Science*. 2023; 38: p. 1-13.
28. Malavazzi TCdS, Andreo L, Martinelli A, Rodrigues MFSD, Horliana ACRT, Bussadori SK, et al. Preventive and therapeutic vascular photobiomodulation decreases the inflammatory markers and enhances the muscle repair process in an animal model. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 2024; 256: p. 1-14.
29. Alves A, Fernandes K, Melo C, Yamaguchi R, França C, Teixeira D, et al. Modulating effect of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Lasers Med Sci*. 2014: p. 813-21.
30. Andreo L MfRRÃABA. Effects of Myogenic Precursor Cells (C2C12) Transplantation and Low-Level Laser Therapy on Muscle Repair. *Lasers Surg Med*. 2018: p. 781-91.

31. França C, de Loura Santana C, Takahashi C, Alves A, de Souza Mernick A, Fernandes K, et al. Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2013; p. 1331-8.
32. Lopez TCC, Malavazzi TCdS, Rodrigues MFSD, Bach EE, Silva T, Hi EMb, et al. Histological and Biochemical effects of preventive and therapeutic vascular photobiomodulation on rat muscle injury. *Journal of Biophotonics.* 2021; p. 1-12.
33. Malavazzi TCdS, Andreo L, Martinelli A, Rodrigues MFSD, Horliana ACRT, Bussadori SK, et al. Preventive and therapeutic vascular photobiomodulation decreases the inflammatory markers and enhances the muscle repair process in an animal model. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.* 2024.
34. Ribeiro BG AASLDFKCTGMea. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med.* 2015; p. 571-8.
35. Junior EMdS, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Magalhães EMR, Souza NHC, Alves AN, et al. The Effects of Photobiomodulation on Inflammatory Infiltrate During Muscle Repair in Advanced-Age Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020; p. 437-441.
36. Souza NHC MFRRMdSDRBAAea. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. *J Cell Mol Med.* 2018 March; p. 1-13.
37. Alves , Ribeiro B, Fernandes K, Souza N, Rocha L, Nunes F, et al. Comparative effects of low-level laser therapy pre- and post-injury on mRNA expression of MyoD, myogenin, and IL-6 during the skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 2016;: p. 679-85.
38. Junior EMdS, Mesquita-Ferrari RA, Rodrigues MFSD, Magalhães EMR, Souza NHC, Alves AN, et al. The Effects of Photobiomodulation on Inflammatory Infiltrate During Muscle Repair in Advanced-Age Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2020; 75: p. 437-441.
39. Robbins , Cotran. Capítulo 2 : Inflamação aguda e Crônica. In Robbins , Cotran. Patologia - Bases patológicas das doenças - 8^a edição.: Elsevier; 2012.
40. Mesquita-Ferrari R, Martins , Silva JJ, da Silva T, , Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes , Pavesi V, et al. Effects of low-level laser therapy on expression

- of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2011 May; 26(3): p. 335-40.
41. Andreo L, Mesquita-Ferrari R, Ribeiro B, Benitte A, de Fátima Nogueira T, França C, et al. Effects of Myogenic Precursor Cells (C2C12) Transplantation and Low-Level Laser Therapy on Muscle Repair. *Lasers Surg Med.* 2018; 50: p. 781-91.
 42. Junior E, Mesquita-Ferrari R, França C, Andreo , Bussadori S, Fernandes. Modulating effect of low intensity pulsed ultrasound on the phenotype of inflammatory cells. *Biomed Pharmacother.* 2017 Dec; 96: p. 1147-1153.
 43. Ribeiro BG, Alves A, dos Santos L, Fernandes K, Cantero T, Gomes M, et al. The effect of low-level laser therapy (LLLT) applied prior to muscle injury. *Lasers Surg Med.* 2015; 47: p. 571-8.
 44. Broughton , Janis JE, Attinger CE. The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2006; 117: p. 12S-34S.
 45. CAMPOS ACL, BORGES-BRAnCO , GROTH. Wound healing. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2007; 20(1): p. 51–58.
 46. Mildner A, Kim KW, Yona. Unravelling monocyte functions: from the guardians of health to the regulators of disease. *Discovery Immunology - OXFORD.* 2024; 3: p. 1-22.
 47. Zagatto AM, Ramos SdP, Nakamura FY, de Lira FS, Lopes-Martin RÁB, Carvalho RLdP. Effects of low-level laser therapy on performance, inflammatory markers, and muscle damage in young water polo athletes: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Lasers in Medical Science.* 2016;: p. 511–521.
 48. Macedo DB, Tim CR, Kido HW, Macedo JB, Martignago CCS, Renno ACM, et al. Influence of photobiomodulation therapy on the treatment of pulmonary inflammatory conditions and its impact on COVID-19. *Lasers in Medical Science.* 2022; 37: p. 1921–1929.
 49. Scalon D, Picada JN, de Sousa JT, da Silva AT, Colares JR, Marroni NAP. Photobiomodulation intervention improves oxidative, inflammatory, and morphological parameters of skeletal muscle in cirrhotic Wistar rats. *Lasers in Medical Science.* 2022; 37: p. 1973–1982.
 50. Jahani-Sherafat S, Mollaghaei S, Asri N, Rezaei Tavirani M, Baghaei K, Rostami-Nejad M. The Effect of Photobiomodulation and Akkermansia

- muciniphila on THP-1 Derived Macrophage Polarization Treated with Gliadin Peptide. *J Lasers Med Sci.* 2024; 9: p. 15:e21.
51. Zhang J, Sun , Zheng , Hu X, Wang Z, Liang Z, et al. Low-level laser therapy 810-nm up-regulates macrophage secretion of neurotrophic factors via PKA-CREB and promotes neuronal axon regeneration in vitro. *J Cell Mol Med.* 2020; 24(1): p. 476–487.
 52. Alonso P, Schapochnik A, Klein S, Brochetti R, Damazo A, de Souza Setubal Destro M, et al. Transcutaneous systemic photobiomodulation reduced lung inflammation in experimental model of asthma by altering the mast cell degranulation and interleukin 10 level 2021. *Lasers Med Sci.* 2021; 37: p. 1101-1109.
 53. Barnett-Vanes , Sharrock A, Birrell M, Rankin S. A single 9-colour flow cytometric method to characterise major leukocyte populations in the rat: Validation in a model of LPS-induced pulmonary inflammation. *PLoS One.* 2016; 11: p. 1-15.
 54. da Silva , dos Santos S, de Almeida P, Marcos R, Lino-dos-Santos-Franco A. Effect of systemic photobiomodulation in the course of acute lung injury in rats. *Lasers Med Sci.* 2020; 36: p. 965–973.
 55. da Silva VG, Martins. A ação sistêmica da terapia Intravascular Laser Irradiation of Blood (Ilib) para fortalecimento do sistema imunológico e processo inflamatório: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development.* 2022; 12: p. 1-10.
 56. da Silva Leal M, Lima M, Nicolau R, de Carvalho T, Abreu J, Pessoa D, et al. Effect of Modified Laser Transcutaneous Irradiation on Pain and Quality of Life in Patients with Diabetic Neuropathy. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2020 Mar; 38(3): p. 138-144.
 57. Elad S, Cheng K, Lalla R, Yarom N, Hong C, Logan R, et al. Mucositis Guidelines Leadership Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therap. *Cancer.* 2020; 126(19): p. 4423-4431.
 58. França C, de Loura Santana C, Takahashi C, Alves A, de Souza Mernick A, Fernandes K, et al. Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2013;: p. 1331-8.

59. Francis W, Ireland , Spear A, Jenner D, Watts S, Kirkman E, et al. Flow Cytometric Analysis of Hematopoietic Populations in Rat Bone Marrow. Impact of Trauma and Hemorrhagic Shock. *Cytometry Part A*. 2019 Nov; 95(11): p. 1167-1177.
60. Kloth C, Gruben N, Ochs M, Knudsen L, Lopez-Rodriguez E. Flow cytometric analysis of the leukocyte landscape during bleomycin-induced lung injury and fibrosis in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019 Jul; 317(1): p. L109–L126.
61. Krishnamurthy , Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 114: p. 345-358.
62. Li C, Fu B, Zhang , Tang B, Zhu , Zhao , et al. Application of retrograde dissection method for isolation of bone marrow cells from rat femurs and tibiae. *Genetics and Molecular Research*. 2016; 15(2): p. 1-9.
63. Schapochnik A, Alonso PT, Souza Vd, Rodrigues V, Quintela K, Cruz MdP, et al. Intravascular laser irradiation od blood (ILIB) used to treat lung diseases: a short critical review. *Laser in Medical Science*. 2023; 38: p. 1-7.
64. Wu J, Ren B, Wang , Lin H. Regulatory T cells in skeletal muscle repair and regeneration: recent insights. *Cell Death Dis*. 2022; 13: p. 680.
65. Zecha JAEM, Raber-Durlacher JE, Nair RG, et al. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer*. 2016; 24(6): p. 2781–2792.