

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MAYARA SANTOS DE CASTRO

**FOTOBIMODULAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA ATIVIDADE  
MICROBICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO* E ANÁLISE DA  
EXPRESSÃO GÊNICA EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DESTAS CÉLULAS**

Alfenas/MG  
2018

MAYARA SANTOS DE CASTRO

**FOTOBIMODULAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA ATIVIDADE  
MICROBICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO* E ANÁLISE DA  
EXPRESSÃO GÊNICA EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DESTAS CÉLULAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas  
pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).  
Orientador: Prof. Dr. Felipe Fornias Sperandio  
Coorientadora: Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima  
Brigagão

Alfenas/MG  
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Castro, Mayara Santos de  
C355a Fotobiomodulação do burst oxidativo e da atividade microbicida de  
monócitos humanos in vitro e análise da expressão gênica em macrófagos  
derivados destas células / Mayara Santos de Castro. -- Alfenas/MG, 2018.  
127 f.: il. -

Orientador: Felipe Fornias Sperandio.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade  
Federal de Alfenas, 2018  
Bibliografia.

1. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. 2. Monócitos. 3. Macrófagos.  
4. NADPH oxidase. 5. Espécies de Oxigênio Reativas. 6. Candida albicans.  
I. Sperandio, Felipe Fornias. II. Título.

CDD-617.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG . CEP 37130-000



**MAYARA SANTOS DE CASTRO**

**“FOTOBIMODULAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO E DA ATIVIDADE MICROBICIDA DE MONÓCITOS HUMANOS *IN VITRO* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF-A, IL-10 E SOD1 EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DESTAS CÉLULAS”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 21/02/2018

Profª. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profª. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: Ester S. Caixeta Nogueira

*Ao Deus de Abraão, Isaque e Jacó, a Cristo e ao Espírito Santo, que é o meu Deus, que fez os céus, a terra, o mar e tudo o que neles há.*

*Aos meus pais, Simone e Jorge, e às minhas irmãs, Joyce e Mylena, sinônimos de amor, união e perseverança.*

*Ao Prof. Dr. João Adolfo, a quem eu escolhi como Mestre desde os meus primeiros passos na Odontologia.*

*Dedico...*

## *AGRADECIMENTOS*

*A Deus, meu refúgio e baluarte, Deus meu, em quem confio! Obrigada por sempre estar comigo e operar em mim tanto o querer quanto o realizar... Olho para as minhas mãos e vejo que nada posso sem Ti... Obrigada por ser a minha força e esperança... Obrigada pelo seu amor de Pai... Obrigada pela capacitação em realizar este trabalho! Quero te louvar e cantar as tuas maravilhas por onde eu for... A Ti, toda honra e toda glória para todo o sempre!*

*À minha família, obrigada pelo apoio e amor incondicionais. Agradeço por sonharem comigo os meus sonhos... E por sempre poder contar com vocês! Em especial, agradeço aos meus pais, **Simone e Jorge**, por não medirem esforços para que eu e as minhas irmãs atinjamos os nossos objetivos, pela educação que nos deram e pela dedicação e amor que nos são destinados em todos os momentos de nossas vidas. Às minhas irmãs, **Joyce e Mylena**, obrigada pela amizade incomparável e por fazerem suas a minha felicidade... Minha eterna gratidão! Amo vocês!*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Felipe Fornias Sperandio**, obrigada pelos preciosos conhecimentos transmitidos. Sua orientação foi um presente de Deus para mim... Obrigada por mesmo estando distante, ter se feito tão presente. O admiro pelo profissional e notável pesquisador que és... E agradeço-lhe pela oportunidade e privilégio de ter sido sua orientanda e de ter realizado este trabalho. Obrigada pelas correções sempre oportunas e criteriosas. Obrigada pela disponibilização do equipamento de laser para as execuções experimentais e, também, por tudo o que aprendi com você sobre laserterapia, terapia fotodinâmica, além de Patologia Bucal... Minha eterna e sincera gratidão pela atenção, incentivo e ensinamentos, os quais contribuíram grandemente na minha formação. Muito obrigada por tudo!*

*À minha coorientadora, **Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão**, obrigada por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG para a realização deste trabalho. Sou grata pela sua confiança em aceitar ser minha coorientadora. Obrigada por todo auxílio e disponibilidade... Obrigada pelos reagentes concedidos para o isolamento*

*dos monócitos do sangue periférico, para o ensaio de quimioluminescência e de atividade microbiana; e, principalmente, obrigada pelos conhecimentos transmitidos!*

*Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, não tenho palavras para expressar a minha gratidão por tudo o que aprendi com você! Obrigada por ter aberto as portas da Clínica de Estomatologia da UNIFAL-MG para mim, onde pude aprender o verdadeiro sentido da Odontologia. Obrigada por ter se alegrado com cada pequena conquista minha... Obrigada pelos direcionamentos nos momentos de incertezas... Obrigada por toda atenção e paciência... Tenho certeza que para onde quer que eu vá, levarei e praticarei os seus ensinamentos. Eu jamais me esquecerei das minhas raízes...*

*Ao Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco (in memoriam), agradeço por dedicar algumas preciosas horas de sua vida para me ensinar e cultivar *Candida albicans* para a realização deste trabalho. Obrigada por ter aberto as portas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG para mim e por ter me recebido tão bem... Hoje o céu está mais alegre com a sua presença! Minha eterna gratidão!*

*À Profa. Dra. Marisa Ionta, agradeço imensamente por ter aberto as portas do Laboratório de Biologia Animal Integrativa da UNIFAL-MG para o cultivo dos monócitos e realização dos experimentos de Biologia Molecular. Sem a sua colaboração, grande parte deste trabalho não seria possível... Muito obrigada por tudo!*

*À Profa. Dra. Marta Miyazawa, minha admiração pela pesquisadora nata que és. Muito obrigada pelo auxílio intelectual e prático na realização deste trabalho. Nunca me esquecerei das vezes que ficou até de noite no laboratório me ajudando com os experimentos... Obrigada por tudo o que você me ensinou durante este tempo em que tive o privilégio de conviver com você. Obrigada pela amizade cultivada! Agradeço-lhe, também, pelos primers de CD68, CD163 e CD204 concedidos, além do PMA e do M-CSF, os quais foram essenciais para as execuções experimentais. Muito obrigada!*

*À Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira, obrigada pelo auxílio intelectual e financeiro para a realização das PCR<sub>s</sub> em tempo real. A sua colaboração abrilhantou o presente trabalho e sou imensamente grata por isso! Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e por toda atenção a mim destinada. Obrigada pela dedicação e pela oportunidade de aprender com você!*

*À Profa. Dra. Marina Lara de Carli, obrigada por toda atenção e carinho com que sempre me tratou! Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e amor em ensinar!*

*À Profa. Dra. Francisca Isabel Ruela, agradeço por sempre me incentivar e por ter me permitido ajudar no Projeto de Extensão de Atendimento a Pacientes com Necessidades Especiais. A admiro pelo grande coração que tens! Obrigada por todos os ensinamentos!*

*Ao Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira, obrigada pela realização e orientação criteriosa da estatística deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, agradeço pelo LPS concedido para as execuções experimentais.*

*Ao doutorando em Ciências Farmacêuticas, Cláudio Daniel Cerdeira, obrigada por ter me ajudado e pelos ensinamentos durante os experimentos iniciais desta pesquisa.*

*Ao aluno de Iniciação Científica, Antônio Maciel Fregnan, obrigada pelo auxílio na realização da reação de Griess.*

*Ao Laboratório de Análises Clínicas da UNIFAL-MG, agradeço pelas inúmeras coletas de sangue realizadas para que este trabalho fosse possível, além da concessão dos tubos de EDTA e de soro. Agradeço em especial ao funcionário e mestrando em Ciências Farmacêuticas, Gustavo Andrade Brancaglioni, o qual realizou prontamente a grande*

*maioria das coletas.*

*Ao Laboratório de Anatomia Patológica da UNIFAL-MG, em especial ao Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira, à técnica Maria Ângela e à funcionária Maria Helena, obrigada pelo carinho com que sempre me receberam... Ao Prof. Dr. Alessandro, agradeço pelos preciosos conhecimentos transmitidos sobre Patologia Bucal.*

*A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da UNIFAL-MG, muito obrigada por me ensinarem a arte de ensinar! Agradeço por todas as aulas ministradas e por todas as experiências compartilhadas, as quais acrescentaram muito na minha formação.*

*À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, obrigada pela prontidão e eficiência com que sempre me atenderam. Obrigada por lutarem para o crescimento deste Programa de Pós-graduação.*

*Aos meus colegas de mestrado, especialmente ao Clenivaldo, Nelson, Bianca, Joyce e Maria Clara, obrigada por terem feito esta caminhada mais alegre e colorida... Obrigada pelos momentos bons vividos juntos, pelas ansiedades amenizadas e pelas gargalhadas compartilhadas!*

*Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia e do Laboratório de Biologia Animal Integrativa da UNIFAL-MG, obrigada pela dedicação e disposição constantes em ajudar. Vocês foram essenciais para que este trabalho se tornasse realidade.*

*Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da UNIFAL-MG, em especial, à Luciana e à Dona Luzia, agradeço pelo carinho e atenção com que sempre me trataram. Muito obrigada!*

*À Faculdade de Odontologia da UNIFAL-MG, por ter proporcionado o meu aprendizado desde a graduação.*

*À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pela estrutura e oportunidade de realizar este curso de mestrado.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, permitindo-me dedicar com afinco ao mestrado e à realização deste trabalho.*

*Aos voluntários que aceitaram participar desta pesquisa, obrigada por literalmente doarem o sangue pela Ciência, sem vocês este trabalho não seria possível. Minha sincera gratidão!*

*Aos irmãos da Igreja Presbiteriana de Alfenas, obrigada pelos momentos preciosos de oração e comunhão. Vocês sempre estarão em meu coração!*

*Às minhas amigas, Kelly Soares e Thaís Carmello, obrigada pelo amor fraternal, pelos momentos alegres que vivemos juntas e por todos os sonhos compartilhados. Que a nossa amizade seja eterna!*

*Esta conquista é nossa! E que venham novos sonhos...*

*“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.”*

*1 Coríntios 13: 1-2.*

## RESUMO

A fotobiomodulação (PBM) utiliza a luz nas porções do espectro visível e infravermelho para estimular a produção de trifosfato de adenosina (ATP), síntese de ácidos nucleicos, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proliferação celular, promovendo resultados terapêuticos benéficos, como a aceleração do reparo tecidual, analgesia e ativação de células do sistema imune. Deste modo, a presente pesquisa visou elucidar os efeitos da PBM sobre monócitos humanos *in vitro*, a fim de possivelmente estimular o *burst* oxidativo e, conseqüentemente, potencializar a defesa imune celular contra micro-organismos, além de analisar a expressão gênica em nível de RNA mensageiro (mRNA) de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 em macrófagos derivados destas células. Neste contexto, culturas primárias de monócitos humanos foram irradiadas com o laser de diodo InGaAlP (660nm)/ GaAlAs (780nm) - Twin Flex<sup>®</sup> (MMO, São Carlos, SP, Brasil), operando com potência de 40mW, área de feixe de 0,04cm<sup>2</sup>, densidade de potência de 1W/cm<sup>2</sup> e doses independentes de 200J/cm<sup>2</sup>, 400J/cm<sup>2</sup> e 600J/cm<sup>2</sup>. Após isto, as células foram submetidas ao ensaio de quimioluminescência para avaliação do *burst* oxidativo e quantificação da produção de ROS intracelulares e extracelulares. Ensaio da atividade microbicida foi realizado contra o fungo *Candida albicans*. Como controles positivo e negativo, utilizou-se o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e o *diphenyleneiodonium* (DPI), respectivamente. A viabilidade celular foi verificada por meio do reagente azul de *Trypan*. Adicionalmente, os monócitos humanos irradiados foram cultivados por 72 horas, a fim de observar a diferenciação destas células em macrófagos mediante estímulos relacionados a macrófagos ativados pela via clássica (M1) (LPS e *Candida albicans*) e a macrófagos ativados pela via alternativa (M2) (M-CSF). O RNA total foi extraído de cada grupo experimental e submetido à transcrição reversa e PCR em tempo real. GAPDH foi utilizado como controle endógeno e a expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup>. A produção de nitrito (NO<sub>2</sub>) também foi mensurada através da reação de Griess. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA e teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Para dados com variâncias desiguais, utilizou-se o Kruskal-Wallis e pós-teste de Newman-Keuls. Desta forma, os monócitos irradiados apresentaram um aumento significativo na produção de ROS intracelulares e extracelulares comparativamente ao grupo controle ( $P < 0,001$ ), sendo o comprimento de onda de 660nm e a dose de 400J/cm<sup>2</sup>, os parâmetros que mais se destacaram ( $P < 0,001$ ). Como consequência deste perfil funcional elevado dos monócitos irradiados, a capacidade fungicida dos mesmos contra *Candida albicans* mostrou-se bastante aumentada ( $P < 0,001$ ). Além disso, observou-se que a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) não causou danos à viabilidade celular dos monócitos nos dias subsequentes à irradiação laser. A análise da expressão gênica revelou que a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) aumentou significativamente a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  pelos monócitos irradiados ( $P = 0,0302$ ), aproximando-os de uma resposta imune Th1. Complementarmente, um aumento significativo na produção de NO<sub>2</sub> pelos monócitos irradiados também foi observado ( $P < 0,05$ ). Portanto, a PBM, como empregada neste estudo, foi capaz de aumentar a geração de ROS e NO<sub>2</sub>, intensificar a atividade microbicida contra *Candida albicans* e aumentar a expressão de TNF- $\alpha$ , sugerindo uma modulação da PBM na indução de agentes pró-inflamatórios relacionados ao perfil funcional de M1. Vislumbramos em um futuro próximo, a reprodução desses resultados em monócitos humanos *in vivo*, colaborando no tratamento de candidoses orais, por exemplo.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Monócitos. Macrófagos. NADPH oxidase. Espécies reativas de oxigênio. *Candida albicans*.

## ABSTRACT

Photobiomodulation (PBM) comprises the use of light within the visible and infrared spectrum to stimulate the production of adenosine triphosphate (ATP), nucleic acid synthesis, generation of reactive oxygen species (ROS) and cell proliferation, thus promoting beneficial therapeutical results, such as the acceleration of tissue repair, analgesia and activation of cells of the immune system. In that way, the present research aimed to elucidate the effects of PBM on human monocytes *in vitro* by possibly stimulating the oxidative burst of these cells and, consequently, enhancing the cellular immune defense against microorganisms, in addition to analyzing the gene expression at the messenger RNA (mRNA) level of CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 and SOD1 in macrophages derived from these cells. Thus, primary cultures of human monocytes were irradiated with an InGaAlP (660nm)/ GaAlAs (780nm) - Twin Flex<sup>®</sup> diode laser (MMO, São Carlos, SP, Brazil), operating with power of 40mW, beam area of 0.04cm<sup>2</sup>, power density of 1W/cm<sup>2</sup> and independent doses of 200J/cm<sup>2</sup>, 400J/cm<sup>2</sup> e 600J/cm<sup>2</sup>. Cells were then submitted to the chemiluminescence assay for oxidative burst evaluation and quantification of intracellular and extracellular ROS production. A microbicidal activity assay was performed against the fungus *Candida albicans*. As positive and negative controls, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and diphenyleneiodonium (DPI) were used, respectively. Cell viability was verified by Trypan blue reagent. Besides, irradiated human monocytes were cultured for 72 hours in order to observe the differentiation of these cells into macrophages by stimuli related to macrophages activated by the classical pathway (M1) (LPS and *Candida albicans*) and macrophages activated by the alternative pathway (M2) (M-CSF). Total RNA was extracted from each experimental group and submitted to reverse transcription and real-time PCR. GAPDH was used as endogenous control and the relative expression of each gene was calculated using the 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup> method. The production of nitrite (NO<sub>2</sub>) was also measured by the Griess reaction. The results obtained were analyzed by ANOVA and Tukey's test at a significance level of 5%. For data with unequal variances, Kruskal-Wallis and Newman-Keuls post-test were used. In that way, irradiated monocytes presented a significant increase in intracellular and extracellular ROS production compared to the control group ( $P < 0.001$ ). The wavelength of 660nm and the dose of 400J/cm<sup>2</sup> were the most relevant parameters ( $P < 0.001$ ). As a consequence of this high functional profile of the irradiated monocytes, the fungicidal capacity of the monocytes against *Candida albicans* was shown to be greatly increased ( $P < 0.001$ ). In addition, it was observed that PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) did not cause damage to the cell viability of monocytes in the days following laser irradiation. Analysis of the gene expression revealed that PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) significantly increased the expression of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  by the irradiated monocytes ( $P = 0.0302$ ), bringing them closer to a Th1 immune response. Additionally, a significant increase in NO<sub>2</sub> production by irradiated monocytes was also observed ( $P < 0.05$ ). Therefore, PBM, as employed in this study, was able to increase ROS and NO<sub>2</sub> generation, enhance microbicidal activity against *Candida albicans* and increase TNF- $\alpha$  expression, suggesting a modulation of PBM in the induction of related pro-inflammatory agents to the functional profile of M1. We envisage in a near future, the reproduction of these results in human monocytes *in vivo*, which would collaborate to the treatment of oral candidoses, for example.

Keywords: Photobiomodulation. Monocytes. Macrophages. NADPH oxidase. Reactive oxygen species. *Candida albicans*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Espectro eletromagnético destacando alguns dos principais comprimentos de onda utilizados na PBM.....	28
Figura 2 -	Diagrama ilustrativo do mecanismo de ação da PBM sobre as células irradiadas.....	30
Figura 3 -	Maturação de fagócitos mononucleares e células dendríticas.....	34
Figura 4 -	Morfologia dos monócitos.....	34
Figura 5 -	Polarização de macrófagos.....	37
Figura 6 -	Fagocitose e destruição intracelular de micro-organismos.....	39
Figura 7 -	Ativação do complexo enzimático NADPH oxidase dos fagócitos.....	40
Figura 8 -	Estrutura do Gp91phox (Nox2).....	40
Figura 9 -	Metabólitos de oxigênio gerados por fagócitos.....	44
Figura 10 -	Sangue coletado de homens adultos e saudáveis que consentiram em participar da pesquisa.....	49
Figura 11 -	Isolamento dos monócitos do sangue periférico humano.....	51
Figura 12 -	Laser de diodo InGaAlP/ GaAlAs, Twin Flex <sup>®</sup> (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).....	53
Figura 13 -	Aparelho contador de colônias CP600 Plus <sup>®</sup> (Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil).....	55
Figura 14 -	Irradiação laser realizada em sala escura e com a ponta da caneta laser tocando perpendicularmente o fundo da placa transparente de 24 poços.	58
Figura 15 -	Cada grupo experimental foi realizado em uma placa de cultivo de 24 poços distinta, sendo que as células foram semeadas apenas nos poços das extremidades (poços indicados pelas setas), a fim de evitar o espalhamento e a interferência da luz laser com os poços vizinhos.....	60
Figura 16 -	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 cultivada em meio BHI.....	62
Figura 17 -	O processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos foi acompanhado por 72 horas, observando a mudança no aspecto morfológico das células.....	63
Figura 18 -	Placa de 96 poços após a reação de Griess.....	67
Figura 19 -	ROS intracelulares e extracelulares geradas por monócitos humanos.....	72

Figura 20 -	ROS extracelulares geradas por monócitos humanos.....	75
Figura 21 -	Médias de UFC/mL de <i>Candida albicans</i> .....	77
Figura 22 -	Interação estatisticamente significativa entre tratamento e tempo de incubação.....	80
Figura 23 -	UFC/mL de <i>Candida albicans</i> que cresceram nas placas de <i>Petri</i> referentes aos diferentes grupos experimentais em seus respectivos tempos de incubação.....	81
Figura 24 -	Viabilidade celular determinada pelo método de exclusão utilizando o reagente azul de <i>Trypan</i> .....	83
Figura 25 -	Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos versus monócitos + laser).....	85
Figura 26 -	Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos + LPS versus monócitos + LPS + laser).....	86
Figura 27 -	Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos + <i>C. albicans</i> versus monócitos + <i>C. albicans</i> + laser).....	87
Figura 28 -	Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos + PMA + M-CSF).....	87
Figura 29 -	Abundância relativa de mRNA dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163 e CD204 em macrófagos derivados de monócitos humanos após 72 horas de isolamento do sangue periférico, tratamentos e incubação.....	90
Figura 30 -	Abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10, e da enzima SOD1 em macrófagos derivados de monócitos humanos após 72 horas de isolamento do sangue periférico, tratamentos e incubação.....	93
Figura 31 -	Curva padrão de amostras pré-determinadas de nitrito de sódio (NaNO <sub>2</sub> ).....	95
Figura 32 -	Concentração de nitrito (NO <sub>2</sub> ) produzido pelos diferentes grupos experimentais durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos.....	97
Figura 33 -	Principais conclusões.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais avaliados por meio da quimioluminescência .....	53
Tabela 2 -	Grupos experimentais avaliados no ensaio de atividade microbica.....	56
Tabela 3 -	Grupos experimentais avaliados no ensaio de diferenciação de monócitos em macrófagos.....	60
Tabela 4 -	Sequência dos <i>primers</i> e tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb).....	65
Tabela 5 -	Médias expressas em URL referentes aos grupos experimentais com monócitos não “primados” e monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com luminol).....	70
Tabela 6 -	Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos não “primados” (quimioluminescência com luminol).....	71
Tabela 7 -	Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com luminol).....	71
Tabela 8 -	Médias expressas em URL referentes aos grupos experimentais com monócitos não “primados” e monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com isoluminol).....	74
Tabela 9 -	Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos não “primados” (quimioluminescência com isoluminol).....	74
Tabela 10 -	Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com isoluminol).....	74
Tabela 11 -	Médias de UFC/mL mensuradas nos diferentes grupos experimentais em seus respectivos tempos de incubação (“ensaio de <i>Killing</i> ”).....	77
Tabela 12 -	Análise de variância (ANOVA) das médias de UFC/mL de <i>Candida albicans</i> .....	77
Tabela 13 -	Análise de variância (ANOVA) do tratamento dentro de cada nível de tempo de incubação.....	79

Tabela 14 -	Análise de variância (ANOVA) do tempo de incubação dentro de cada nível de tratamento.....	79
Tabela 15 -	Médias de viabilidade celular dos monócitos após a irradiação laser determinadas pelo reagente azul de <i>Trypan</i> .....	82
Tabela 16 -	Análise de variância (ANOVA) das médias de viabilidade celular dos monócitos após a irradiação laser.....	82
Tabela 17 -	Médias de abundância relativa de mRNA dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163 e CD204 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos.....	88
Tabela 18 -	Médias de abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10, e da enzima SOD1 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos.....	91
Tabela 19 -	Expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 e determinação do perfil funcional predominante.....	94
Tabela 20 -	Médias expressas em $\mu$ M da concentração de nitrito (NO <sub>2</sub> ) produzido pelos diferentes grupos experimentais durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ActB -	Beta-actina
ADP -	Difosfato de adenosina
AIDS -	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA -	Análise de variância
AP-1 -	<i>Activator protein 1</i>
APF -	<i>3'-p-(aminophenyl) fluorescein</i>
Arg1 -	Arginase-1
ATCC -	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP -	Trifosfato de adenosina
BHI -	<i>Brain heart infusion</i>
Br <sup>-</sup> -	Íon brometo
Ca -	Cálcio
Ca <sup>+2</sup> -	Íon cálcio
CaCl <sub>2</sub> -	Cloreto de cálcio
cAMP -	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cDNA -	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cl <sup>-</sup> -	Íon cloreto
ClO <sup>-</sup> -	Ânion hipoclorito
cm <sup>2</sup> -	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub> -	Dióxido de carbono
Ct -	<i>Cycle threshold</i>
CV -	Coefficiente de variação
DAG -	Domínio de ligação de diacilglicerol
DAMPs -	Padrões moleculares associados ao dano
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DNase -	Desoxirribonuclease
DPI -	<i>Diphenyleneiodonium</i>
EPIs -	Equipamentos de proteção individual
EPM -	Erro padrão da média
F -	<i>Primer forward</i>

FAD -	Flavina adenina dinucleotídeo
Fc -	F calculado
fMLP -	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
GaAlAs -	Arseneto de gálio alumínio
GaAs -	Arseneto de gálio
GAPDH -	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDI -	Inibidor de dissociação do nucleotídeo guanina
GEFs -	Fatores de troca de nucleotídeos de guanina
GL -	Graus de liberdade
GM-CSF -	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GTP -	Trifosfato de guanosina
H <sub>2</sub> O -	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	Peróxido de hidrogênio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -	Ácido ortofosfórico
Hb -	Hemoglobina
Hp -	Haptoglobina
He-Ne -	Hélio-neônio
HOCl -	Ácido hipocloroso
HPF -	<i>3'-p-(hydroxyphenyl) fluorescein</i>
HRP -	<i>Horseradish</i> peroxidase
Γ -	Íon iodeto
IL -	Interleucina
IFN-γ -	Interferon gama
InGaAlP -	Índio gálio alumínio fósforo
iNOS -	Óxido nítrico sintase indutível
IRF3 -	<i>Interferon-regulatory factor 3</i>
J -	Joule
J/cm <sup>2</sup> -	Joule por centímetro quadrado
LBD -	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LED -	<i>Light emitting diode</i>
LLLT -	<i>Low-level laser therapy</i>
LPS -	Lipopolissacarídeo

M0 -	Macrófagos não polarizados/ não estimulados
M1 -	Macrófagos ativados pela via clássica
M2 -	Macrófagos ativados pela via alternativa
MAPK -	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF -	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MD-2 -	Proteína mieloide diferenciadora 2
METs -	Armadilhas extracelulares de macrófagos
MgCl <sub>2</sub> -	Cloreto de magnésio
MHC II -	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
min -	Minuto
mL -	Mililitro
mM -	Milimolar
MoETs -	Armadilhas extracelulares monocíticas
MOI -	Multiplicidade de infecção
MPO -	Mieloperoxidase
mRNA -	Ácido ribonucleico mensageiro
mW -	Milliwatt
NAD -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaNO <sub>2</sub> -	Nitrito de sódio
NF-κB -	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng/mL -	Nanograma por mililitro
nm -	Nanômetro
NO -	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> -	Nitrito
O <sub>2</sub> -	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -	Ânion superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> -	Oxigênio singlete
OH• -	Radical hidroxila
PAMPs -	Padrões moleculares associados ao patógeno
PB1 -	Domínios Phox e Bem 1
PBM -	<i>Photobiomodulation</i>

pb -	Pares de base
PBS -	Solução de tampão salina-fosfato
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
PDT -	<i>Photodynamic therapy</i>
PKC -	Proteína quinase C
PMA -	Forbol 12-miristato 13-acetato
PX -	Domínios de homologia Phox
QM -	Quadrados médios
qPCR -	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
R -	<i>Primer reverse</i>
R <sup>2</sup> -	Coefficiente de determinação
RNA -	Ácido ribonucleico
RNase -	Ribonuclease
RNS -	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS -	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm -	Rotações por minuto
SFB -	Soro fetal bovino
SCN <sup>-</sup> -	Íon tiocianato
SH3 -	Domínios de homologia Src
SOD -	Superóxido dismutase
SQ -	Soma de quadrados
SRCR -	<i>Scavenger receptors cystein-rich</i>
STAT -	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β -	Fator de crescimento transformante beta
Th1 -	Resposta imune do tipo 1
Th2 -	Resposta imune do tipo 2
TLR -	Receptores semelhantes a <i>Toll</i>
TLR2 -	Receptores semelhantes a <i>Toll</i> do tipo 2
TLR4 -	Receptores semelhantes a <i>Toll</i> do tipo 4
TNF-α -	Fator de necrose tumoral alfa
TPR -	Domínios de repetição tetratricopeptídica

Tregs -	Células T regulatórias
TSA -	Ágar triptona de soja
U -	Unidade
UFC -	Unidades formadoras de colônias
UFC/mL -	Unidades formadoras de colônias por mililitro
URL -	Unidades relativas de luz
VEGF -	Fator de crescimento endotelial vascular
W -	Watts
W/cm <sup>2</sup> -	Watts por centímetro quadrado
μL -	Microlitro
μm -	Micrometro
μM -	Micromolar
λ -	Comprimento de onda
°C -	Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Laser em baixa intensidade.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Monócitos.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3</b>	<b>O complexo NADPH oxidase dos fagócitos.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Ativação e inibição do complexo NADPH oxidase dos fagócitos.....</i></b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Cultura primária de monócitos humanos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Coleta de sangue.....</i></b>	<b>48</b>
<b>4.1.1.1</b>	<b><i>Critérios de inclusão.....</i></b>	<b>48</b>
<b>4.1.1.2</b>	<b><i>Critérios de exclusão.....</i></b>	<b>49</b>
<b>4.1.1.3</b>	<b><i>Riscos.....</i></b>	<b>49</b>
<b>4.1.1.4</b>	<b><i>Benefícios.....</i></b>	<b>50</b>
<b>4.1.2</b>	<b><i>Isolamento dos monócitos.....</i></b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de quimioluminescência.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.1</b>	<b><i>Irradiação laser.....</i></b>	<b>52</b>
<b>4.2.2</b>	<b><i>Considerações sobre a execução experimental.....</i></b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio de atividade microbicida dos monócitos contra <i>Candida albicans</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>Cultivo de Candida albicans.....</i></b>	<b>55</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>Opsonização.....</i></b>	<b>56</b>
<b>4.3.3</b>	<b><i>Grupos experimentais e considerações.....</i></b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise da viabilidade celular nos dias subsequentes à irradiação laser.....</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>Diferenciação dos monócitos em macrófagos e análise da expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-10 e SOD1 em nível de RNA mensageiro (mRNA).....</b>	<b>59</b>

4.5.1	<i>Diferenciação dos monócitos em macrófagos e delineamento dos grupos experimentais</i> .....	59
4.5.2	<i>Irradiação laser</i> .....	61
4.5.3	<i>Candida albicans</i> .....	61
4.5.4	<i>Morfologia das células</i> .....	62
4.5.5	<i>Análise da expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-10 e SOD1 em nível de RNA mensageiro (mRNA)</i> .....	63
4.5.5.1	<i>Armazenamento das células</i> .....	63
4.5.5.2	<i>Extração do RNA e transcrição reversa</i> .....	64
4.5.5.3	<i>PCR em tempo real (qPCR)</i> .....	64
4.6	<b>Mensuração da produção de nitrito (NO<sub>2</sub>) durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos</b> .....	65
4.6.1	<i>Componentes do reagente de Griess</i> .....	66
4.6.2	<i>Montagem da placa e leitura espectrofotométrica</i> .....	66
4.7	<b>Análise estatística</b> .....	67
5	<b>RESULTADOS</b> .....	69
5.1	<b>Quantificação da produção de ROS intracelulares e extracelulares</b> .....	69
5.1.1	<i>Quimioluminescência utilizando o substrato luminol</i> .....	69
5.1.2	<i>Quimioluminescência utilizando o substrato isoluminol</i> .....	73
5.2	<b>Resposta fungicida dos monócitos contra <i>Candida albicans</i></b> .....	76
5.3	<b>Viabilidade celular dos monócitos após a irradiação laser</b> .....	82
5.4	<b>Diferenciação dos monócitos em macrófagos e análise da expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-10 e SOD1 em nível de RNA mensageiro (mRNA)</b> .....	83
5.4.1	<i>Morfologia das células</i> .....	83
5.4.2	<i>Expressão gênica dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163 e CD204 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos</i> .....	88
5.4.3	<i>Abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF-<math>\alpha</math> e IL-10, e da enzima SOD1 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos</i> .....	91
5.4.4	<i>Determinação do perfil funcional</i> .....	93

<b>5.5</b>	<b>Mensuração da produção de nitrito (NO<sub>2</sub>) durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos.....</b>	<b>94</b>
<b>5.5.1</b>	<b><i>Curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>).....</i></b>	<b>94</b>
<b>5.5.2</b>	<b><i>Concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) produzido pelos diferentes grupos experimentais.....</i></b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>108</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>110</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>122</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>125</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>126</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fotobiomodulação (PBM, do inglês *photobiomodulation*), também conhecida como terapia com laser em baixa intensidade (LLLT - *low-level laser therapy*) ou, simplesmente, como laserterapia (BUCHAIM et al., 2017; MOSKVIN, 2017; SOLMAZ; ULGEN; GULSOY, 2017), tem sido empregada com sucesso em diferentes ramos da medicina regenerativa e da odontologia, atuando especialmente na aceleração do reparo tecidual, na diminuição da dor e na ativação de células do sistema imune (CERDEIRA et al., 2016; ESLAMIPOUR; MOTAMEDIAN; BAGHERI, 2017; HEIDARI et al., 2017). Ressalta-se que por muito tempo, o termo LLLT foi frequentemente utilizado tanto por clínicos quanto por pesquisadores (HAMBLIN, 2017); no entanto, atualmente, considera-se a designação LLLT muito ampla e subjetiva, podendo referir-se à terapia fotodinâmica (PDT - *photodynamic therapy*) e à optogenética (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015). Estas duas últimas técnicas, também utilizam a luz em baixa intensidade através da irradiação laser ou do diodo emissor de luz (LED - *light emitting diode*), porém, requerem moléculas fotorreceptoras exógenas e uso de corantes fotossensíveis ou de atuadores optogenéticos, respectivamente (ARANY, 2012; ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015). Sendo assim, o termo PBM é mais adequado e específico, reservando-se para a terapia de luz nas porções do espectro visível e infravermelho, não ionizante e não térmica, aplicada sobre moléculas fotorreceptoras endógenas diretamente no local alvo (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015).

Os mecanismos de ação da PBM ainda não foram integralmente elucidados, entretanto, sabe-se que os seus efeitos ocorrem mediante um aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial, causado por mudanças fotofísicas e fotoquímicas nas moléculas fotorreceptoras e pela excitação de componentes da cadeia respiratória, tendo como consequência a produção de trifosfato de adenosina (ATP) e a proliferação celular (SMITH, 1991), além da síntese de ácidos nucleicos [ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA)], alterações na concentração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) (KARU, 1989).

Neste contexto, a PBM também pode demonstrar a capacidade de aumentar a resposta desencadeada por células do sistema imune frente a micro-organismos (HEMVANI; CHITNIS; BHAGWANANI, 2005; BURGER et al., 2015), uma vez que a elevação da produção de ROS decorrente da PBM, teoricamente, pode levar à intensificação da atividade microbicida dos fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) (NATHAN; ROOT, 1977),

principalmente por meio do estímulo à produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é convertido a um composto hipoclorito altamente reativo pela enzima mieloperoxidase (MPO), exclusiva destas células (CONDINO NETO et al., 1996).

Na verdade, a geração de ROS por fagócitos ocorre mediante o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, mais especificamente pela isoforma fagocitária Nox2, a qual reduz o oxigênio molecular ( $O_2$ ) à ânion superóxido ( $O_2^-$ ) através de um processo chamado *burst* oxidativo (DALE; BOXER; LILES, 2008; RADA; LETO, 2008). Deste modo, o complexo NADPH oxidase mostra-se essencial para a atividade microbicida dos fagócitos, permitindo que estas células ajam eficientemente na defesa do organismo contra diversas infecções (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Todavia, estudos abordando os efeitos da PBM sobre a resposta imune protagonizada por fagócitos, principalmente por monócitos, são escassos e frequentemente controversos (HULTEN; HOLMSTROM; SOUSSI, 1999; LINDGARD et al., 2007). É bem conhecido que a atuação das células do sistema imune é determinante no desenvolvimento e/ou regressão de várias doenças, podendo ser alterada por meio de sinais e estímulos específicos que irão gerar uma resposta pró ou anti-inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Recentemente, Cerdeira et al. (2016) relataram que a PBM foi capaz de ativar o complexo NADPH oxidase de neutrófilos humanos, de modo a estimular o *burst* oxidativo e, conseqüentemente, potencializar a atividade microbicida destas células. Paralelamente, faz-se necessário elucidar os efeitos da PBM sobre o complexo NADPH oxidase de monócitos humanos (células precursoras de macrófagos) e, também, sobre a sua resposta contra micro-organismos, uma vez que os monócitos, juntamente com os neutrófilos, são as primeiras células do sistema imune a entrarem em contato com os agentes infecciosos (HALDER et al., 2017).

Sendo assim, a PBM mostra-se promissora no aumento da geração de ROS e na intensificação da atividade microbicida dos monócitos (CALLAGHAN et al. 1996; HEMVANI; CHITNIS; BHAGWANANI, 2005). Além disso, uma elevação da geração de ROS pode desencadear um aumento na expressão de genes, na secreção de citocinas e quimiocinas ou, então, a ativação de vias de sinalização (LIU et al., 2005). Chen et al. (2014) constataram que a PBM foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas relacionadas à resposta imune do tipo 1 (Th1) [fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), CCL2 e CXCL10] por monócitos humanos da linhagem celular THP-1 (*American Type Culture Collection* - ATCC), destacando a necessidade de mais estudos relacionados à interferência da PBM na polarização dos macrófagos. Portanto, o presente trabalho abordou os efeitos da PBM sobre monócitos oriundos de sangue periférico humano e sobre a

diferenciação destas células em macrófagos, investigando o *burst* oxidativo, a atividade microbicida contra *Candida albicans* e a expressão de genes associados às distintas polarizações dos macrófagos, a fim de colaborar na elucidação do referido tema, além de possivelmente destacar a PBM como uma potencial aliada do sistema imune.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Laser em baixa intensidade

O termo LASER é o acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação), cuja teoria foi proposta por Albert Einstein em 1917, elucidando os princípios físicos da emissão estimulada de radiação e classificando-a como de “alta intensidade” (com potencial destrutivo) ou de “baixa intensidade” (sem potencial destrutivo) (EINSTEIN, 1917). No entanto, esta teoria tornou-se realidade apenas em 1960, quando Theodore Maiman construiu o primeiro emissor de luz laser a rubi (MAIMAN, 1960).

Para a produção da luz laser, são necessários equipamentos que possuam uma fonte externa que utiliza energia para excitar átomos através do bombeamento de um meio ativo, o qual determina o comprimento de onda da luz emitida (SILVA, 2007). O meio ativo pode ser constituído por materiais sólidos (por exemplo, rubi, neodímio e érbio), líquidos (corantes orgânicos), gasosos [argônio, hélio-neônio (He-Ne) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)] e semicondutores [arseneto de gálio (GaAs), arseneto de gálio alumínio (GaAlAs) e índio gálio alumínio fósforo (InGaAlP)] (DAMANTE, 2003). Sendo assim, os átomos excitados emitem fótons que se propagam em várias direções dentro de um tubo contendo espelhos em suas extremidades, designado como cavidade ressonante. Em uma das extremidades, os espelhos são totalmente refletores e na outra extremidade, são parcialmente refletores (80% da luz é refletida e 20% emitida ao exterior através do espelho). Os fótons emitidos que se propagam paralelamente ao eixo da cavidade ressonante podem encontrar outro átomo excitado e estimular a emissão de fótons adicionais coerentes, amplificando e gerando um grande fluxo de luz com alto nível energético (GENOVESE, 2000; SILVA, 2007).

Entretanto, os lasers cujo meio ativo consiste em materiais semicondutores (lasers de diodo) possuem um mecanismo de funcionamento peculiar, apresentando várias camadas de polos positivos e negativos, com emissão da radiação pelas faces laterais (DAMANTE, 2003). Essas faces laterais são polidas perpendicularmente à saída do feixe de luz, comportando-se como os espelhos da cavidade ressonante e permitindo que esses equipamentos sejam mais compactos (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). Deste modo, a emissão de luz pelos lasers de diodo ocorre através da passagem de corrente elétrica entre as camadas positivas e negativas (DAMANTE, 2003; GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Atualmente, o interesse pelas propriedades do laser tem recaído sobre aplicações clínicas, onde lasers em alta intensidade são utilizados para a incisão e coagulação de tecidos (ABDULJABBAR et al., 2017), e lasers em baixa intensidade são empregados para a modulação de processos biológicos, como a aceleração do reparo tecidual, a diminuição da dor e da inflamação, e a ativação de células do sistema imune (CERDEIRA et al., 2016; ESLAMIPOUR; MOTAMEDIAN; BAGHERI, 2017; HEIDARI et al., 2017). É importante ressaltar que a luz laser utilizada nessas aplicações terapêuticas possui características específicas que a difere da luz convencional, como monocromaticidade (possui apenas um comprimento de onda ou uma faixa reduzida de comprimentos de onda), coerência (o feixe de luz se propaga na mesma direção no tempo e no espaço e com a mesma frequência) e colimação (não há divergência do feixe de luz emitido) (MISERENDINO; PICK, 1995; ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014).

Por conseguinte, a interação da luz laser com o tecido irradiado é dependente do comprimento de onda, da densidade de energia (dose ou fluência), e da densidade de potência (intensidade ou irradiância) utilizada, além das propriedades inerentes ao tecido em questão (DE CASTRO et al., 2005). Deste modo, a PBM utiliza a luz nas porções do espectro visível e infravermelho, aplicando comprimentos de onda que variam entre 600 e 900nm, conforme ilustrado na Figura 1, e proporcionando fótons de baixa energia, os quais não causam efeitos mutagênicos e nem ionizantes (DAMANTE, 2003).

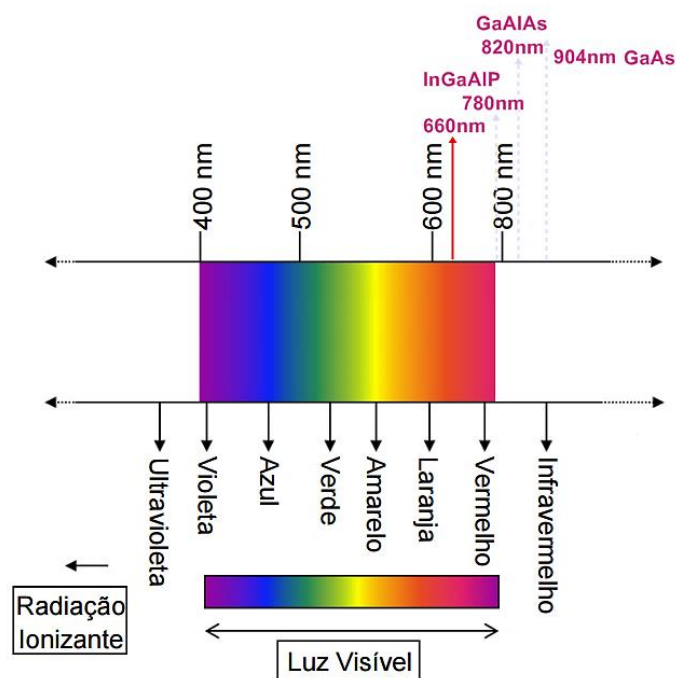


Figura 1 - Espectro eletromagnético destacando alguns dos principais comprimentos de onda utilizados na PBM.  
Fonte: Adaptado de DAMANTE, 2003.

Em relação à densidade de energia, enfatiza-se que este é o parâmetro essencial na possibilidade de estímulo, inibição ou não manifestação dos efeitos terapêuticos do laser (RIBEIRO; ZEZZEL, 2004). A densidade de energia consiste na quantidade de energia, expressa em Joules (J), dividida pela área do *spot* do laser utilizado ou por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ) (RIBEIRO; ZEZZEL, 2004). Adicionalmente, a densidade de potência é estabelecida pela potência do laser, mensurada em Watts (W), dividida por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ) (RIBEIRO; ZEZZEL, 2004). É importante ressaltar que durante a realização da PBM não é possível detectar um aumento significativo na temperatura dos tecidos irradiados, uma vez que a potência empregada varia entre 5 e 500mW; em contraste, lasers operando em alta intensidade podem utilizar uma potência de até 300W dependendo do procedimento cirúrgico a ser efetuado (SOBANKO; ALSTER, 2008).

Os mecanismos de ação da PBM ainda não foram integralmente elucidados, porém, sabe-se que a absorção de luz ocorre em moléculas fotorreceptoras tipicamente encontradas nas mitocôndrias do tecido alvo (MOSKVIN, 2017). Karu (1989) sugeriu que as respostas biológicas das células à radiação emitida nas regiões do espectro visível (vermelho) ocorrem devido a mudanças fotofísicas e fotoquímicas nestas moléculas fotorreceptoras, promovendo alterações no estado redox de componentes da cadeia respiratória mitocondrial, acelerando a transferência de elétrons e aumentando a síntese de ATP. Complementarmente, Karu, Andreichuk e Ryabykh (1993) concluíram que após a ativação do fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, pode ocorrer um aumento na concentração de  $O_2^-$ , e que este pode servir como fonte de elétrons para a fosforilação de difosfato de adenosina (ADP), transformando-o em ATP. Além disso, também foi sugerido que após a absorção de luz pelas moléculas fotorreceptoras, especificamente pelas porfirinas e flavoproteínas, pode ocorrer a síntese de DNA e RNA mediante as mudanças nas reações de óxido-redução da célula, principalmente devido a um aumento na produção de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (KARU et al., 1984). Já Smith (1991), estudando a radiação infravermelha, propôs que esta radiação é capaz de iniciar a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas celulares, gerando reações finais semelhantes às da luz laser vermelha (Figura 2). Elucidativamente, ocorre a ativação de canais de cálcio (Ca) da membrana celular através das modificações fotofísicas geradas pela radiação, induzindo a entrada de íons cálcio ( $Ca^{+2}$ ) para o meio intracelular e, também, a proliferação celular (SMITH, 1991; BREITBART et al., 1996; LUBART et al., 1997).

Portanto, há um consenso na literatura de que a ação da PBM baseia-se no aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial causado por mudanças fotofísicas e fotoquímicas nas

moléculas fotorreceptoras e excitação de componentes da cadeia respiratória [por exemplo, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD)], tendo como consequência a produção de ATP e a proliferação celular (SMITH, 1991), além da síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), alterações na concentração de cAMP e aumento na geração de ROS (KARU, 1989). Interessantemente, as alterações do pH intracelular, relacionadas com a ativação de ATPases e seguidas pelas alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, parecem ser um caminho comum para a transdução do sinal e amplificação de todas as reações citadas acima (SMITH, 1991; MENEGUZZO, 2007).

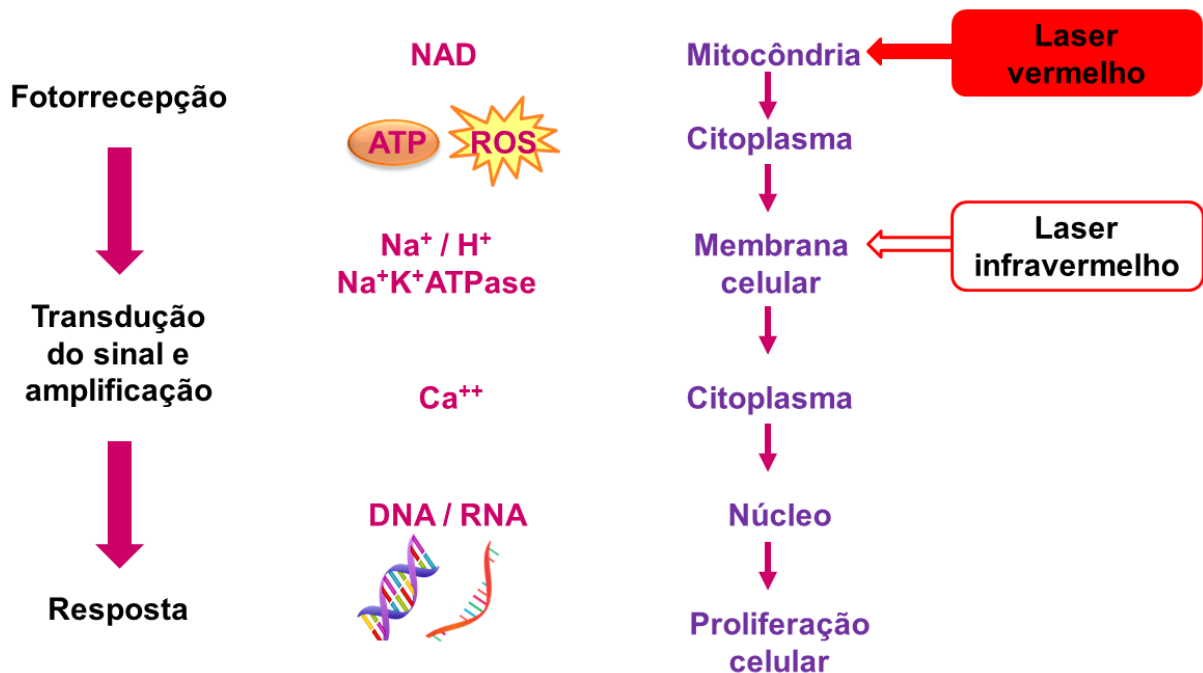


Figura 2 - Diagrama ilustrativo do mecanismo de ação da PBM sobre as células irradiadas.  
Fonte: Adaptado de SMITH, 1991.

Efeitos inibitórios da PBM por superdosagem de energia no tecido/ célula alvo têm sido relatados por alguns pesquisadores (KARU, 1987; FRIEDMAN et al., 1991). Sendo assim, altas doses de energia são capazes de danificar as moléculas fotorreceptoras e diminuir a ação da PBM; doses ainda maiores podem destruir estas moléculas fotorreceptoras, causando inibição no crescimento e letalidade de culturas celulares (KARU, 1987). No entanto, utilizando doses estimulatórias adequadas e o comprimento de onda que possui afinidade com os fotorreceptores, os processos celulares que aceleram a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial prevalecem (MENEGUZZO, 2007).

Deste modo, alguns dos principais efeitos estimulatórios da PBM observados em estudos *in vitro* e *in vivo* são os seguintes: aceleração do reparo tecidual, com aumento na

proliferação de fibroblastos, síntese de fibras colágenas e maturação acelerada de queratinócitos; proliferação condral, de queratinócitos, de células endoteliais, de mioblastos e de outros tipos celulares; produção de matriz óssea; aumento da agressividade de células neoplásicas malignas; aumento do potencial de ação de células nervosas; regeneração de nervos; síntese proteica; elevação da expressão de fatores de crescimento e citocinas; além da potencialização do sistema imunológico devido à ativação de leucócitos (SPERANDIO et al., 2013; SPERANDIO et al., 2015; BURGER et al., 2015; TRAJANO et al., 2016; BUCHAIM, et al., 2017; SOLMAZ; ULGEN; GULSOY, 2017; YILDIRIMTURK et al., 2017).

Neste contexto, a PBM também pode demonstrar uma excelente capacidade de estimular a resposta desencadeada por células do sistema imune frente a micro-organismos (BJORDAL et al., 2011; BURGER et al., 2015). Teoricamente, o aumento da produção de ROS como consequência da PBM pode associar-se à intensificação da atividade microbicida dos leucócitos (NATHAN; ROOT, 1977), principalmente através do estímulo à produção de  $H_2O_2$  que é convertido a um composto hipoclorito altamente reativo mediante a enzima MPO presente nestas células (CONDINO NETO et al., 1996). Conforme demonstrado por Hemvani, Chitnis e Bhagwanani (2005), utilizando o equipamento de laser He-Ne, operando no comprimento de onda de 632,8nm com potência de 3mW e tempo de irradiação de 5 minutos, a PBM aumentou significativamente a atividade fagocítica de monócitos humanos *in vitro* contra o *Mycobacterium fortuitum* ( $P = 0,012$ ).

Além da atuação das ROS consequentes da PBM na potencialização do sistema imunológico, também evidencia-se o estímulo à produção de citocinas e quimiocinas que irão induzir respostas imunes específicas; por exemplo, em um estudo realizado por Chen et al. (2014), um laser de GaAlAs, operando no comprimento de onda de 660nm ( $1-2J/cm^2$ ), foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas relacionadas à resposta imune Th1 (TNF- $\alpha$ , CCL2 e CXCL10) por monócitos humanos da linhagem celular THP-1 (ATCC). Os autores também concluíram que a PBM induziu a acetilação das histonas H3 e H4 e trimetilação de H3K4 na área promotora do gene TNF- $\alpha$ , sugerindo que a PBM atua na regulação epigenética das células do sistema imune (CHEN et al., 2014). Recentemente, a modificação de histonas tornou-se um novo alvo para o desenvolvimento de fármacos antialérgicos (BARNES; ADCOCK; ITO, 2005), por conseguinte, os resultados de Chen et al. (2014) destacam a PBM como uma agente promissora no auxílio ao tratamento de doenças alérgicas.

Na verdade, os monócitos são células efetoras imunitárias importantes que possuem plasticidade eficaz na resposta à diversos sinais e estímulos, permitindo-lhes a mudança de

fenótipo e a alteração de suas fisiologias mediante ambas as respostas imune inata e adaptativa (MOSSER; EDWARDS, 2008). Entretanto, estudos elucidando os efeitos da PBM sobre essas células são bastante escassos e, por vezes, controversos (HULTEN; HOLMSTROM; SOUSSI, 1999; LINDGARD et al., 2006). Recentemente, Cerdeira et al. (2016) relataram que a PBM foi capaz de ativar o complexo enzimático NADPH oxidase de neutrófilos humanos, de modo a estimular o *burst* oxidativo e, conseqüentemente, potencializar a ação contra micro-organismos destas células. Portanto, também mostra-se necessário elucidar os efeitos da PBM sobre o *burst* oxidativo e a atividade microbicida de monócitos humanos.

## 2.2 Monócitos

O sistema imune participa ativamente na defesa contra micro-organismos mediante reações iniciais da imunidade inata e respostas tardias da imunidade adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Deste modo, a imunidade inata fornece a primeira linha de defesa contra os micro-organismos, através de mecanismos celulares e bioquímicos capazes de responder rapidamente às infecções (VAJJHALA et al., 2017). Esses mecanismos reagem aos produtos de micro-organismos [padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), incluindo ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos complexos e carboidratos, como lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias Gram-negativas, ácido lipoteicoico em bactérias Gram-positivas, oligossacarídeos com resíduos de manose terminal encontrados em glicoproteínas de micro-organismos e glucanas associadas a fungos] (TAGHAVI et al., 2017) e, também, de células lesionadas [padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), abrangendo proteínas induzidas por estresse (HSPs), proteínas nucleares (HMGB1) e cristais (urato monossódico)] (SHAO et al., 2017), respondendo essencialmente da mesma forma para exposições repetidas e sendo específicos para estruturas que são comuns a grupos de micro-organismos relacionados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Sendo assim, a imunidade inata utiliza vários tipos de receptores celulares codificados por genes herdados, moléculas solúveis no sangue e secreções mucosas para reconhecer PAMPs e DAMPs (TAGHAVI et al., 2017; SHAO et al., 2017). Os receptores celulares para patógenos e moléculas associadas a dano são chamados de receptores de reconhecimento de padrão e são expressos na superfície, em vesículas fagocíticas e no citosol das células do sistema imune (VAJJHALA et al., 2017). Contrapondo-se à imunidade inata, a imunidade adaptativa, ou seja, imunidade que se desenvolve em resposta à “adaptação à infecção”,

possui a habilidade de distinguir diferentes produtos microbianos e não microbianos (especificidade), além de ser capaz de responder mais vigorosamente a exposições repetidas ao mesmo micro-organismo (memória) (LIONGUE; JOHN; WARD, 2011). Os receptores da imunidade adaptativa são codificados por genes gerados por recombinação somática de segmentos em precursores de linfócitos maduros, resultando em uma ampla variedade de receptores específicos para diferentes antígenos (OTTOLINI et al., 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Por conseguinte, as células constituintes das respostas imunes inata e adaptativa são os fagócitos, células dendríticas, linfócitos e vários outros leucócitos que agem para eliminar os antígenos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Os fagócitos, incluindo neutrófilos, monócitos e macrófagos, são as células cuja função primária é ingerir e destruir os micro-organismos, de modo que as suas respostas funcionais consistem nas seguintes etapas sequenciais: (1) recrutamento das células para o local de infecção; (2) reconhecimento e ativação pelos micro-organismos; e (3) ingestão e destruição dos micro-organismos pelo processo de fagocitose (DALE; BOXER; LILES, 2008). Além disso, pelo contato direto e pela secreção de citocinas, os fagócitos se comunicam com outras células a fim de promover ou regular as respostas imunes (MUNAWARA et al., 2017).

Os monócitos (células circulantes no sangue) e macrófagos (células residentes teciduais) são designados como fagócitos mononucleares (HANIFFA, M.; BIGLEY, V.; COLLIN, 2015). Os monócitos se originam de uma célula precursora comum da linhagem mieloide da medula óssea, sendo a diferenciação em monócitos dirigida por citocinas, como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (Figura 3) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Estas células representam de 1 a 3% do total de leucócitos circulantes em um homem adulto saudável, possuindo de 10 a 15µm de diâmetro, complexo de Golgi bastante desenvolvido, citoplasma abundante (levemente basófilo) contendo lisossomos, vacúolos fagocíticos e filamentos de citoesqueleto, além de um único núcleo em forma de “rim” ou “pata de cavalo” com cromatina delicada, porém, sem nucléolo visível (Figura 4) (PERES; CURI, 2005). Os monócitos são heterogêneos, com pelo menos dois subtipos distinguíveis pelas proteínas de superfície celular e cinética de migração para os tecidos. Uma população é denominada inflamatória, pois é rapidamente recrutada do sangue para os sítios de inflamação tecidual. O outro subtipo consiste em monócitos precursores de macrófagos que estão constitutivamente presentes nos tecidos normais (NORRIS et al., 1979; FIDGOR et al., 1982; AKIYAMA et al., 1983).

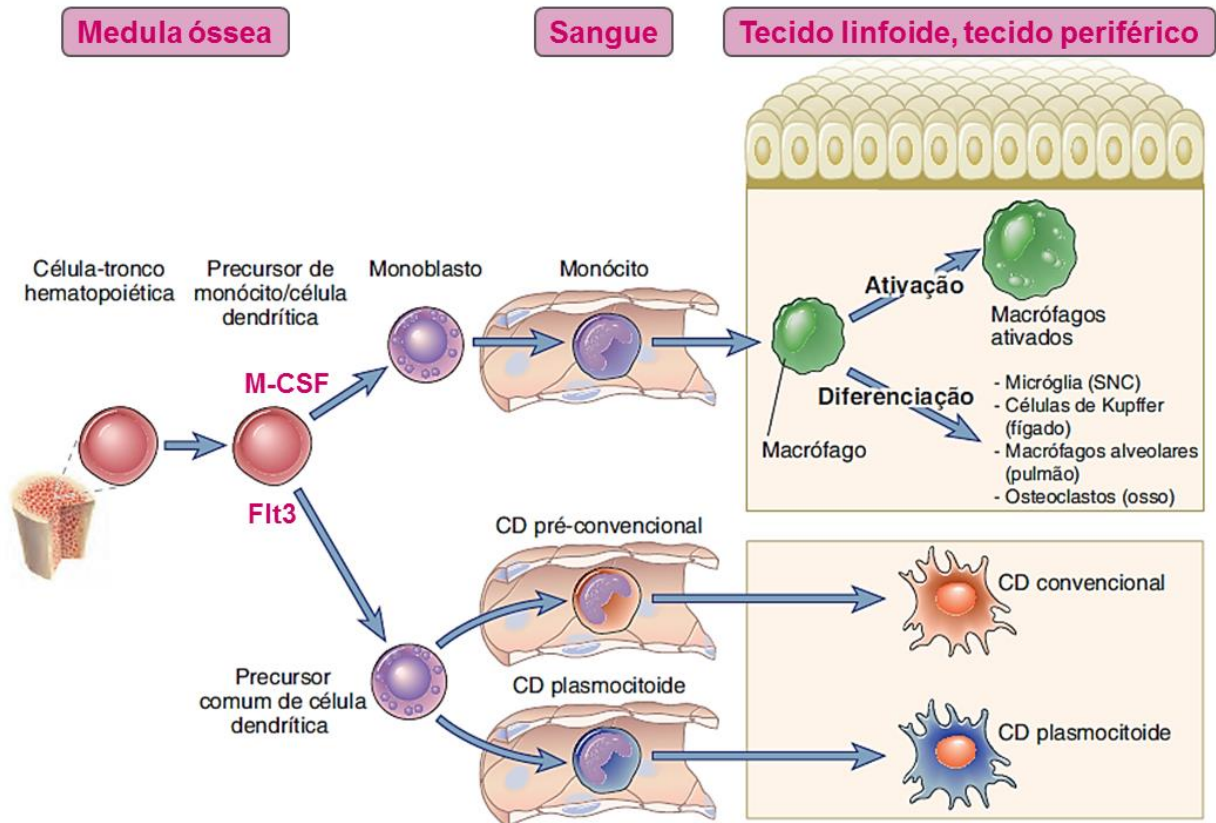


Figura 3 - Maturação de fagócitos mononucleares e células dendríticas.

Nota: Os monócitos e as células dendríticas são derivados de uma célula precursora comum da linhagem mieloide na medula óssea, sendo que a diferenciação em monócitos e células dendríticas é dirigida por citocinas, como o M-CSF e o ligante de Flt3, respectivamente. Existem pelo menos duas populações de monócitos sanguíneos (não mostradas), que são precursores, respectivamente, de macrófagos que se acumulam nos tecidos em resposta à infecções (os quais tornam-se ativados para realizar funções antimicrobianas e/ou de reparo tecidual) e de macrófagos que estão constitutivamente presentes nos tecidos normais (podendo diferenciar-se em formas especializadas, como ocorre no sistema nervoso central (SNC), no fígado, no pulmão e no tecido ósseo).

Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015.

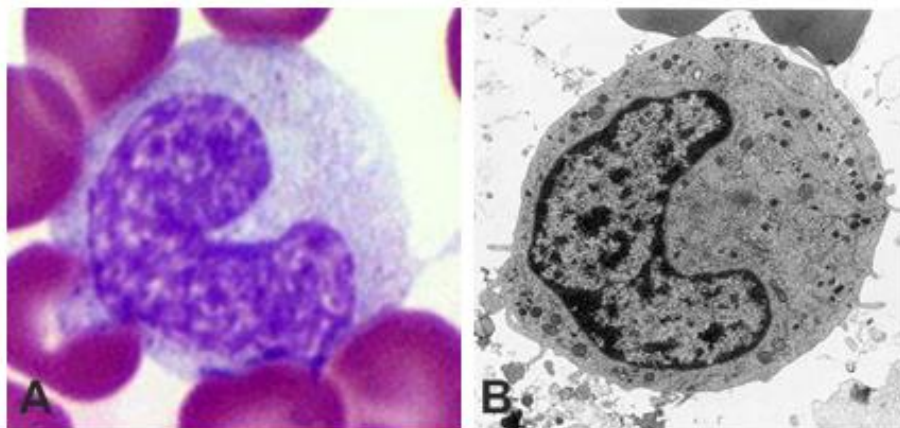


Figura 4 - Morfologia dos monócitos. (A) Microscopia óptica de luz; (B) Microscopia eletrônica.

Fonte: Adaptado de *Phagocytes*. Disponível em: <<http://www.leukos.us>> Acesso em: 29 Jun. 2017.

Este processo de recrutamento de monócitos do sangue para os tecidos depende, primariamente, da adesão dos monócitos ao revestimento endotelial das vênulas pós-capilares e, em seguida, do movimento através do endotélio e da membrana basal subjacente para dentro do tecido extravascular (LEY et al., 2007; MULLER, 2011). Trata-se de um processo com múltiplas etapas, no qual cada etapa é coordenada por quimiocinas (“citocinas quimiotáticas”, as quais estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a sua migração do sangue para o tecido), além de moléculas de adesão (selectinas e integrinas) (LEY et al., 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As quimiocinas das famílias CC (também denominadas  $\beta$ ) e CXC (ou  $\alpha$ ) são produzidas por leucócitos e, também, por células teciduais, como as células endoteliais, as células epiteliais e os fibroblastos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). No caso de infecções, o reconhecimento de micro-organismos através dos receptores das células do sistema imune inato induz a produção e secreção de quimiocinas nos tecidos, as quais ligam-se ao sulfato de heparina dos proteoglicanos sobre as células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares e são apresentadas aos receptores de quimiocinas dos leucócitos circulantes, que se ligam às superfícies endoteliais através de interações com as moléculas de adesão (LEY et al., 2007).

Deste modo, são os receptores de quimiocinas expressos nos monócitos que irão determinar o comportamento migratório destas células (ROJAS et al., 2017). Os monócitos inflamatórios (principal subtipo recrutado para os sítios de inflamação) expressam o receptor CCR2, que é capaz de se ligar a várias quimiocinas; entretanto, a quimiocina mais importante para o recrutamento de monócitos é a CCL2 (MCP-1) (FRANÇA, et al., 2017). Por conseguinte, o recrutamento dos monócitos inflamatórios ocorre quando as células teciduais expressam e secretam CCL2 em resposta à infecção (ROJAS et al., 2017). A outra população de monócitos, não expressa o receptor CCR2, porém, expressa o CX<sub>3</sub>CR1 (YAMASAKI et al., 2014). O ligante desse receptor, a quimiocina CX<sub>3</sub>CL1 é expressa tanto na forma solúvel quanto na forma de molécula ligada à membrana, podendo, também, sustentar a adesão dos monócitos ao endotélio (YAMASAKI et al., 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Interessantemente, as citocinas pró-inflamatórias TNF e interleucina (IL)-1 secretadas durante a resposta imune inata aos micro-organismos, além de induzir a produção local de quimiocinas, também induzem a expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais (LEY et al., 2007). Assim, os monócitos circulantes ligam-se a essas moléculas e respondem às quimiocinas, expressando ligantes de L-selectina, P-selectina e E-selectina e utilizando todas essas três selectinas para mediar as interações iniciais de “rolamento” com as células endoteliais ativadas por citocinas (LEY et al., 2007). Em sequência, os monócitos

expressam as integrinas LFA-1 e VLA-4, que se ligam, respectivamente, à ICAM-1 e à VCAM-1 endoteliais, causando uma parada estável desses leucócitos (MULLER, 2011; LEY et al., 2007). Após isto, ocorre a transmigração dos leucócitos através do endotélio, cujo processo exige uma ruptura transitória e reversível das proteínas envolvidas nas junções de adesão, que mantêm as células endoteliais pós-capilares unidas entre si, especialmente o complexo VE-caderina (MULLER, 2011). Acredita-se que a ativação de cinases durante a ligação entre as integrinas leucocitárias, ICAM-1 e VCAM-1, sejam responsáveis pela ruptura do complexo VE-caderina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Ao atingirem o tecido extravascular, os monócitos iniciam o processo de diferenciação em macrófagos. Os macrófagos inflamatórios tornam-se então ativados para realizar funções antimicrobianas (M1 - macrófagos ativados pela via clássica, os quais induzem uma resposta imune Th1) ou de reparo tecidual em resposta a infecções e/ou lesão tecidual [M2 - macrófagos ativados pela via alternativa, os quais induzem uma resposta imune do tipo 2 (Th2)] (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; DE CARLI et al., 2016). Os estímulos e funções oriundas desta polarização de macrófagos estão ilustradas na Figura 5. Vale ressaltar, que após o término do estímulo inicial e da reação inflamatória, os macrófagos morrem ou vão para o sistema linfático, porém, em áreas de inflamação crônica há a permanência dos macrófagos devido ao recrutamento contínuo de monócitos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Elucidativamente, M1 são induzidos por produtos microbianos [LPS e endotoxinas], por sinais derivados de células T [principalmente, a citocina interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )] e por substâncias estranhas que incluem cristais e material particulado (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; LI; LEVIN; KAPLAN, 2016). Esses macrófagos classicamente ativados possuem: alta capacidade para apresentar antígenos; elevada produção de IL-1, IL-12 e IL-23; além da produção de intermediários tóxicos [ROS, óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas], aumentando a habilidade em destruir os micro-organismos fagocitados e estimulando a inflamação (MANTOVANI et al., 2004).

Em contraste, M2 são induzidos pela IL-4 e IL-13, produzidas por linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, entre outras células. Esta ativação alternativa de macrófagos visa principalmente a reparação tecidual, não tendo atuação microbicida (MANTOVANI et al., 2004; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Por conseguinte, M2 são caracterizados por baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e elevada produção de IL-10, fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e arginase-1 (Arg1) (MANTOVANI et al., 2004; DE CARLI et al., 2016), promovendo a angiogênese, a ativação de fibroblastos e

estimulação de síntese de colágeno, bem como, efeitos anti-inflamatórios (GORDON; MARTINEZ, 2010; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Portanto, por ser um dos fatores determinantes na regressão e/ou desenvolvimento de doenças, os monócitos e macrófagos têm emergido como importantes alvos terapêuticos no tratamento de diversas patologias humanas (LI; LEVIN; KAPLAN, 2016). Imunorregulações relacionadas à M1 desempenham um importante papel na imunidade antimicrobiana e antitumoral, bem como no tratamento de doenças alérgicas (CHEN et al., 2014). No entanto, estímulos relacionados à ativação de M2, embora favoreçam o reparo tecidual, podem exacerbar doenças autoimunes e fibrose, principalmente em mulheres, devido à capacidade do hormônio estrogênio em aumentar as respostas do tipo 2 (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Deste modo, mostra-se relevante compreender e ser capaz de controlar a polarização de macrófagos, a fim de induzir uma resposta pró ou anti-inflamatória em casos específicos, potencializar a imunidade inata contra micro-organismos ou tratar desordens imunológicas (CHEN et al. 2014).

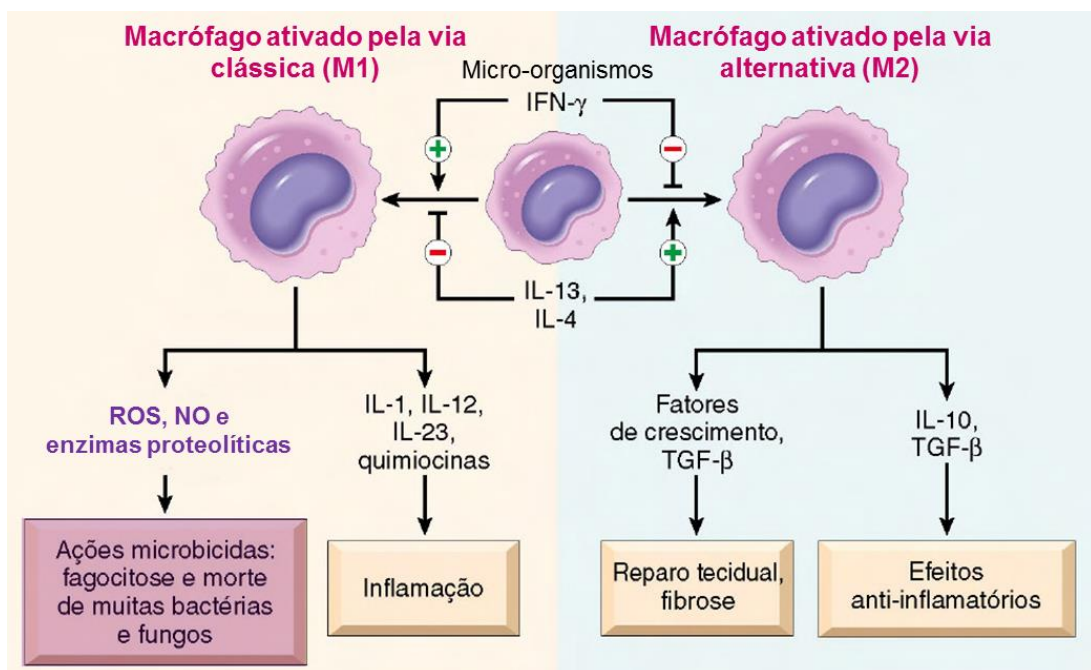


Figura 5 - Polarização de macrófagos.

Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013.

### 2.3 O complexo NADPH oxidase dos fagócitos

Monócitos e macrófagos ativados, além dos neutrófilos, são capazes de matar os micro-organismos através do processo de fagocitose e consequente produção de ROS, NO e enzimas proteolíticas (DALE; BOXER; LILES, 2008). A ligação entre os receptores de

reconhecimento de padrão destes fagócitos e os micro-organismos é a primeira etapa deste processo (BLASIUS; BEUTLER, 2010). Além disso, os fagócitos também apresentam receptores de alta afinidade por certas opsoninas, incluindo moléculas de anticorpos, proteínas do sistema complemento e lectinas plasmáticas, sendo estes receptores importantes para a fagocitose de diversos micro-organismos revestidos por opsoninas, por exemplo: no caso de um indivíduo que responda a uma infecção por meio da síntese de anticorpos IgG, estas imunoglobulinas se ligam ao antígeno e as regiões Fc dos anticorpos ligados podem interagir com FC $\gamma$ RI (receptor de alta afinidade específico para IgG) expresso por fagócitos; o resultado final é a fagocitose eficiente dos micro-organismos (TINGUELY, C.; SCHALLER, M.; NYDEGGER, 2001). Uma vez que diversos anticorpos podem ser produzidos, ligando-se a vários antígenos, a opsonização mediada por anticorpos permite a fagocitose de um amplo espectro de patógenos, maior do que a conseguida por receptores de reconhecimento de padrão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Sendo assim, após a ligação dos micro-organismos aos receptores dos fagócitos e/ou opsoninas, a membrana plasmática da região dos receptores começa a se redistribuir e estende uma projeção em formato de taça ao redor do patógeno, formando a vesícula intracelular. Esta vesícula, chamada fagossomo, contém o patógeno ingerido e se solta da membrana plasmática. Os receptores de superfície também enviam sinais de ativação que estimulam as atividades microbicidas dos fagócitos. Em seguida, a fusão dos fagossomos com os lisossomos resulta na formação de fagolisossomos, onde concentra-se a maioria dos mecanismos microbicidas, os quais consistem essencialmente na geração de ROS, NO e enzimas proteolíticas (Figura 6) (DALE; BOXER; LILES, 2008; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A geração de ROS por fagócitos ativados ocorre mediante existência do complexo enzimático NADPH oxidase nestas células, mais especificamente a isoforma fagocitária Nox2, a qual reduz o O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub><sup>-</sup> através de um processo chamado *burst* oxidativo (RADA; LETO, 2008; DALE; BOXER; LILES, 2008). Resumidamente, a enzima NADPH é doadora de elétrons para o O<sub>2</sub>, conforme demonstrado na seguinte reação:  $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 > \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^- + \text{H}^+$  (DEVLIN, 2011). Em seguida, O<sub>2</sub><sup>-</sup> é reduzido à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que por sua vez, é convertido à radical hidroxila (OH•) e à um composto hipoclorito altamente reativo pela enzima fagocitária MPO (CONDINO NETO et al., 1996).

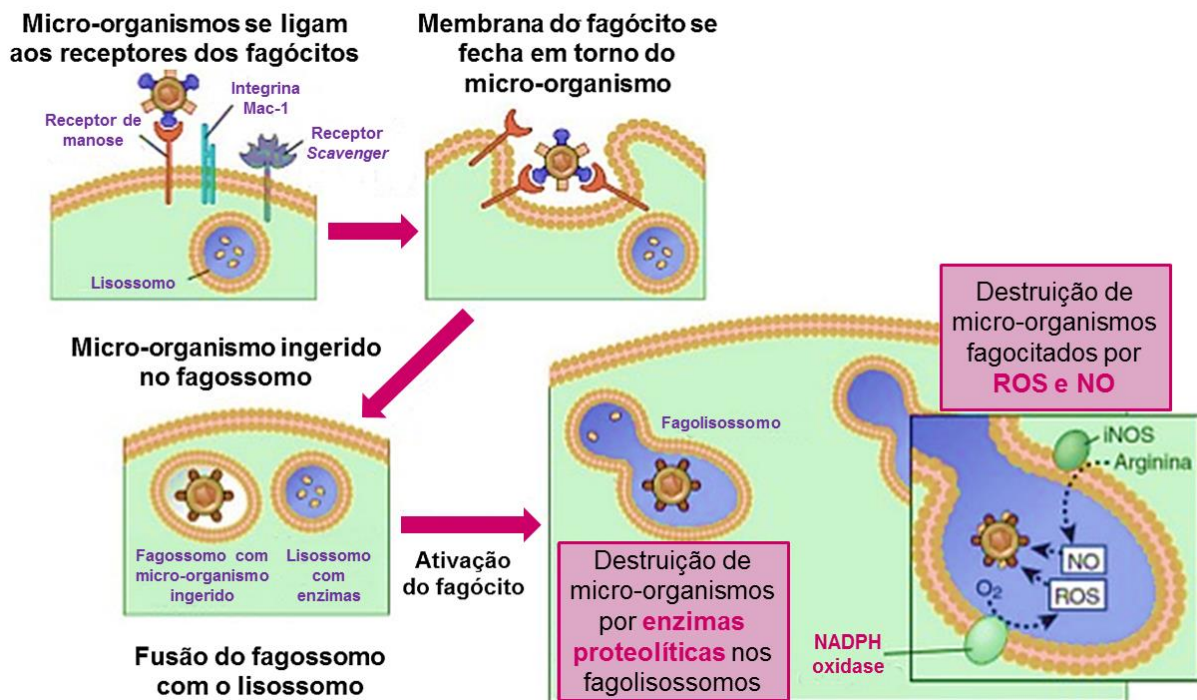


Figura 6 - Fagocitose e destruição intracelular de micro-organismos.  
 Fonte: Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015.

Na verdade, o *burst* oxidativo é caracterizado por um aumento abrupto do consumo de oxigênio após a ativação dos fagócitos (DEVLIN, 2011). Esta “explosão” oxidativa não se relaciona com a respiração mitocondrial, pois envolve a redução direta do  $O_2$  por um elétron e a produção de  $O_2^-$  como consequência (RADA; LETO, 2008). A conversão do NADPH citoplasmático em  $NADP^+$  liberta dois elétrons e um próton; o próton permanece no citoplasma, enquanto os dois elétrons são transportados através da membrana plasmática/fagossomal e se ligam às duas moléculas de oxigênio, resultando na formação de dois  $O_2^-$  no espaço extracelular ou intrafagossomal, assim como demonstrado na reação descrita anteriormente (RADA; LETO, 2008). O componente central do complexo NADPH oxidase é o flavocitocromo b558, um heterodímero embutido na membrana e constituído por uma glicoproteína maior (gp91phox, produto do gene *CYBB*, localizado no cromossomo X) e uma proteína menor de 22kD (p22phox, produto do gene *CYBA*) (CASBON et al., 2012; STASIA, 2016). Além disso, outros quatro componentes citosólicos pertencem ao complexo: p47phox, p67phox, p40phox e Rac1 ou Rac2 (Figura 7) (DALE; BOXER; LILES, 2008; RADA; LETO, 2008).



A menor subunidade do flavocitocromo é a p22phox, a qual é constituída por 194 aminoácidos, fornecendo um local de encaixe para as subunidades citosólicas devido à sua ligação com p47phox, além de estabilizar o heterodímero (NAUSEEF, 2004). Os componentes citosólicos contêm vários domínios moduladores, incluindo domínios de homologia Src (SH3), domínios de repetição tetratricopeptídica (TPR), domínios Phox e Bem 1 (PB1), domínios de homologia Phox (PX) e domínios ricos em prolina, capazes de efetuar interações intra e intermoleculares entre proteína-proteína e proteína-lipídio (DALE; BOXER; LILES, 2008; RADA; LETO, 2008). Esses domínios são essenciais na união das subunidades citosólicas umas às outras e aos componentes ligados à membrana, promovendo assim a montagem da oxidase funcional (CASBON et al., 2012; STASIA, 2016).

Já a p47phox é composta por 390 aminoácidos e é fortemente fosforilada durante a ativação do complexo NADPH oxidase, sendo esta reação necessária para interromper interações autoinibitórias e permitir a sua ligação à p22phox e aos lipídeos da membrana (EL-BENNA et al., 2009). Sendo assim, a p47phox se liga à p22phox, à gp91phox e à p67phox, promovendo interações entre a p67phox e o flavocitocromo (RADA; LETO, 2008). A P67phox contém 526 aminoácidos e, após a ativação, também sofre fosforilação e liga-se ao trifosfato de guanosina (GTP)-Rac, permitindo o fluxo de elétrons através do flavocitocromo (LI et al., 2007). Ambos os domínios PX da p47phox e da p40phox se ligam aos fosfatidilinositol-fosfatos nas membranas dos fagócitos ativados (EL-BENNA et al., 2008). A p40phox se liga à p67phox (que não contém domínios PX) e está envolvida em associações estabilizadoras de p47phox e p67phox com a membrana fagosomal (RADA; LETO, 2008). Além disso, durante a ativação deste complexo, Rac se transloca para a membrana independentemente das três subunidades citosólicas de phox. Nos fagócitos em repouso, ou seja, não ativados, as três subunidades citosólicas de phox formam um complexo citosólico e Rac é mantido inativo com o inibidor de dissociação do nucleotídeo guanina (GDI) (PICK, 2014). Com a ativação, Rac separa-se de GDI e é transportado para a membrana, seguido da troca de GDI para GTP, promovida por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) ativados pelas proteínas PI, P3 e G (RADA; LETO, 2008; PICK, 2014).

Deste modo, a ativação do complexo NADPH oxidase permite a redução de duas moléculas de  $O_2$  em dois  $O_2^-$  (Figura 9) (DEVLIN, 2011). Em um pH neutro (assim como no interior do fagolisossomo), a forma não protonada de superóxido é dominante (RADA; LETO, 2008). Os  $O_2^-$  geralmente doam um elétron e reduzem outros substratos químicos, como por exemplo, o citocromo c. Dois  $O_2^-$  podem reagir entre si e resultar em  $O_2$  e  $H_2O_2$  ao consumir dois prótons à medida que o pH aumenta (NAUSEEF, 2014). Esta dismutação de

$O_2^-$  ocorre espontaneamente e é mais rápida em valores de pH mais baixos, no entanto, a reação pode ser catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 9) (NAUSEEF, 2014). Em contrapartida, o  $O_2^-$  produzido é pouco tóxico, pois ele reage bastante devagar com diferentes biocompostos e não consegue chegar em locais distantes do local de produção, sendo impermeável às membranas (NAUSEEF, 2014). Sendo assim, o  $H_2O_2$  é gerado durante o *burst* oxidativo em grandes quantidades através da dismutação espontânea ou mediada por SOD do  $O_2^-$  (NAUSEEF, 2014). A toxicidade do  $H_2O_2$  é bem conhecida, pois ele reage rapidamente com um amplo espectro de compostos biologicamente importantes, entretanto, os seus derivados são geralmente muito mais reativos. O  $H_2O_2$  é permeável à membrana e relativamente estável, podendo se difundir para longe do local de produção (NAUSEEF, 2014). Além disso, o  $H_2O_2$  é mais tóxico para os micro-organismos quando liberado em altas concentrações do que quando produzido de uma maneira constante, porém, muito lenta (NAUSEEF, 2014). Tanto micro-organismos quanto fagócitos são expostos ao  $H_2O_2$  no fagolisossomo, contra o qual eles precisam desenvolver mecanismos de defesa. Deste modo, as catalases podem dividir o  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e  $O_2$  (Figura 9) (OTSUNI et al., 2011).

A toxicidade do  $H_2O_2$  pode ser aumentada por diferentes mecanismos (GEISZT et al., 2003). Em primeiro lugar, através de reações com peroxidases e haeltos ou pseudohaeltos para formar ácidos *hypohalous* ou ácidos *pseudohypohalous* (RADA; LETO, 2008); e em segundo lugar, por meio da conversão em  $OH\bullet$  (um dos metabólitos de oxigênio mais reativos) pela reação de Fenton (Figura 9) ( $H_2O_2 + Fe^{2+} > Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet$ ) ou pela reação de Haber-Weiss ( $H_2O_2 + O_2^- > H^+ > O_2 + H_2O + OH\bullet$ ) (DEVLIN, 2011) ou, ainda, pela auto-oxidação de  $Fe^{2+}$  (RADA; LETO, 2008). Existem várias peroxidases no corpo humano, que se diferem em termos de estrutura, síntese e localização, mas que possuem uma característica em comum: elas aumentam drasticamente a taxa de reações dependentes de  $H_2O_2$ ; por si só, elas não são tóxicas, mas ao converterem compostos não tóxicos, usando o  $H_2O_2$ , em metabólitos tóxicos altamente reativos, tornam-se antimicrobianas (NAUSEEF, 2014). Os substratos preferidos das peroxidases incluem haeltos ou pseudohaeltos com pouca atividade antimicrobiana, em contraste com os ácidos *hypohalous* formados, os quais são altamente reativos, instáveis e muito tóxicos (RADA; LETO, 2008).

Apenas os fagócitos possuem a enzima MPO (KLEBANOFF, 2005). Após a fagocitose, a MPO é liberada para o lúmen fagossomal, sendo capaz de catalisar a conversão dos íons cloreto ( $Cl^-$ ), iodeto ( $I^-$ ), brometo ( $Br^-$ ) e tiocianato ( $SCN^-$ ) em ácidos, mas o  $Cl^-$  é o substrato fagossomal mais abundante, de modo que o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) é o principal produto da MPO nos fagolisossomos dos fagócitos (Figura 9) (DALE; BOXER; LILES,

2008). O HOCl é permeável à membrana e reage rapidamente com diversos componentes celulares, pois ele é capaz de: (1) “cloretar” fenóis e aminas (cloraminas); (2) oxidar centros de ferro, grupos sulfídricos, grupos de enxofre-éter, proteínas *heme* e lipídeos; e (3) realizar ligações cruzadas e covalentemente “cloretar” ou “iodar” proteínas (RADA; LETO, 2008). As cloraminas são agentes oxidantes mais fracos, mas duram por um maior período de tempo. Além disso, através de mecanismos distintos, o  $^1\text{O}_2$  também pode ser produzido, sendo altamente reativo e capaz de oxidar várias moléculas alvo (NISHINAKA et al., 2011). É importante destacar que existem outras espécies reativas (por exemplo, NO,  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , ONOO,  $\text{HNO}_2$  e  $\text{ONOOCO}_2^-$ ) que podem ser formadas no fagolisossomo dos fagócitos, as quais podem contribuir para a morte do micro-organismo ou, no caso de uma função fagocítica descontrolada, causar danos aos próprios tecidos (KALYANARAMAN, B.; HARD, M.; ZIELONKA, 2016).

Portanto, evidencia-se também a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS - *reactive nitrogen species*), principalmente o NO, a qual ocorre mediante a ação da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (KALYANARAMAN, B.; HARD, M.; ZIELONKA, 2016). A iNOS mostra-se ausente nos fagócitos em repouso, porém, ela pode ser expressa em resposta a produtos microbianos que ativam os receptores semelhantes a *Toll* (TLR), que são receptores da família evolutivamente conservada dos receptores de reconhecimento de padrão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Assim, a iNOS catalisa a conversão de arginina a citrulina, com liberação do gás NO, de difusão livre (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; KALYANARAMAN, B.; HARD, M.; ZIELONKA, 2016). No interior dos fagolisossomos, o NO pode se combinar ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou ao  $\text{O}_2^-$ , gerados via NADPH oxidase, formando radicais de peroxinitrito altamente reativos capazes de matar os micro-organismos (RADA; LETO, 2008; KALYANARAMAN, B.; HARD, M.; ZIELONKA, 2016).

Além de ROS e enzimas reativas de nitrogênio, os fagócitos ativados também podem produzir enzimas proteolíticas na sua atuação contra os micro-organismos, destacando-se a elastase e a catepsina G (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Todos esses produtos microbicidas são eficientes, especialmente em infecções agudas, entretanto, em infecções mais prolongadas e/ou quando os fagócitos são fortemente ativados, a liberação desses produtos para o ambiente extracelular, que pode ocorrer mediante a morte do fagócito, é capaz de danificar os tecidos normais do hospedeiro, afetando as células vizinhas e causando uma lesão tecidual. Entre os danos mais graves ocasionados pelas ROS e pelas RNS, destacam-se aqueles causados ao DNA, envolvendo a clivagem da ligação fosfodiéster, alteração da ribose e oxidação de bases (CIRCU et al., 2009; RACHEK et al., 2009).

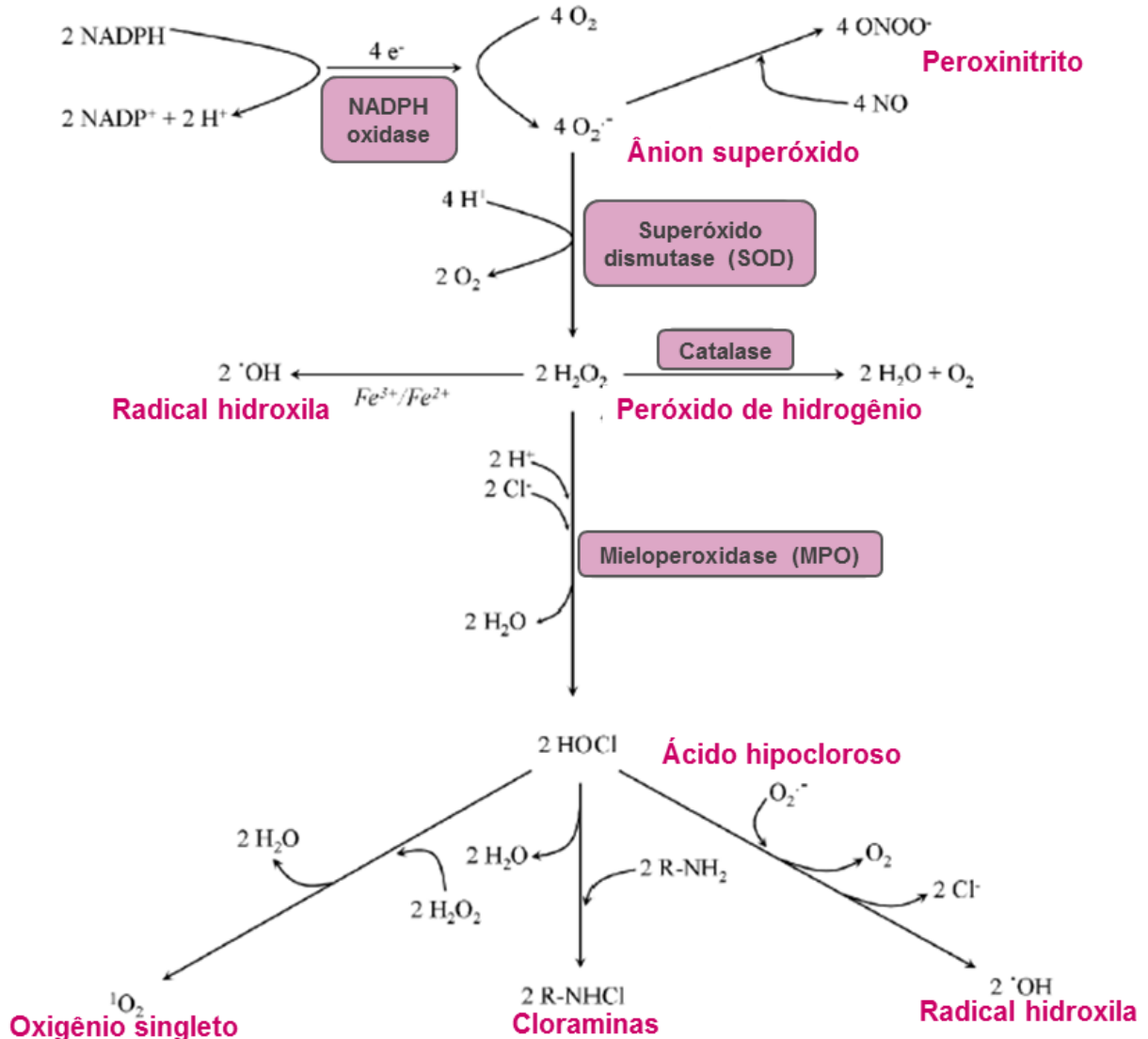


Figura 9 - Metabólitos de oxigênio gerados por fagócitos.  
Fonte: Adaptado de RADA; LETO, 2008.

Especificamente em monócitos, observa-se uma menor expressão de NADPH oxidase, além de menor produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, comparativamente aos neutrófilos (DALE; BOXER; LILES, 2008; RADA; LETO, 2008). Igualmente, a oxidase é translocada para as membranas do fagolisossomo após a fagocitose e libera radicais de O<sub>2</sub><sup>-</sup> para o interior do fagolisossomo, onde a MPO converte os haletos em íons *hypohalous* tóxicos (KLEBANOFF, 2005). Entretanto, é relatado na literatura que monócitos deficientes em MPO são capazes de matar *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, porém, de uma forma menos eficiente do que os seus homólogos saudáveis (RADA; LETO, 2008). Quando os monócitos se diferenciam em macrófagos, embora a sua habilidade para fagocitar micro-organismos aumente, a sua capacidade microbicida diminui mediante a diminuição dos produtos dos mecanismos oxidativos (RADA; LETO, 2008; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; ABBAS; LICHTMAN;

PILLAI, 2015). Além disso, foi relatado que as ROS derivadas do complexo NADPH oxidase podem reprimir a expressão e a atividade da 5-lipoxigenase em macrófagos alveolares de camundongos, resultando em uma menor síntese de leucotrienos (classe de mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico e produzidos pela via da lipoxigenase) (RADA; LETO, 2008).

Portanto, o complexo NADPH oxidase é essencial para a atividade microbicida dos monócitos, permitindo que estas células ajam eficientemente na defesa do organismo contra diversas infecções. Estímulos que possivelmente potencializem esta ação dos monócitos contra micro-organismos, relacionados a uma maior produção de metabólitos de oxigênio altamente reativos e que não causem danos às próprias células, devem ser melhor estudados e elucidados, uma vez que estes podem emergir como adjuvantes terapêuticos na resolução de diversas patologias. Deste modo, a PBM pode mostrar-se promissora na elevação do perfil funcional dos monócitos.

### ***2.3.1 Ativação e inibição do complexo NADPH oxidase dos fagócitos***

Além da fagocitose de micro-organismos, uma grande variedade de agentes solúveis ou particulados é capaz de estimular e ativar, seletivamente ou em conjunto, o complexo NADPH oxidase dos fagócitos (JESIATIS et al., 1991). Entre os solúveis, estão incluídos os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), a concanavalina A, os leucotrienos, as citocininas, os ionóforos de cálcio, o fluoreto de sódio e os ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA); em relação aos substratos particulados, destacam-se as bactérias e leveduras opsonizadas que atuam pela via alternativa do complemento, os complexos imunes formados pela interação antígeno/ anticorpo que atuam pela via clássica do complemento e a estreptolisina O (JESIATIS et al., 1991).

Elucidativamente, o PMA e alguns de seus análogos são promotores tumorais capazes de disparar o *burst* oxidativo dos fagócitos através da ativação direta da proteína quinase C (PKC), independentemente dos receptores de membranas (SANTOS, 2016). Estes forbóis são agonistas que se ligam diretamente ao domínio de ligação de diacilglicerol (DAG) da PKC, ativando-a por mudança conformacional e aumento da afinidade pelo  $\text{Ca}^{+2}$ . Sendo assim, esta ativação permite a fosforilação de resíduos de serina e de treonina em uma vasta gama de substratos proteicos (DYKE, 1991). Segal (2008) mostrou *in vitro* que a proteína p47phox pode ser um substrato para PKC, sendo que a fosforilação nos seus diferentes resíduos de serina inicia a ativação do complexo NADPH oxidase dos fagócitos.

Como inibidor do complexo NADPH oxidase dos fagócitos, destaca-se o *diphenyleneiodonium* (DPI), conforme relatado por Ellis, Mayer e Jones (1988) pesquisando os efeitos do DPI sobre neutrófilos humanos *in vitro*. Estes autores concluíram que o DPI na concentração de 10 $\mu$ M foi capaz de diminuir a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por neutrófilos, indicando que o DPI atua no sistema de transporte de elétrons do flavocitocromo b558. Além disso, eles mostraram que a capacidade microbida dos neutrófilos contra *Staphylococcus aureus* diminuiu significativamente com a adição do DPI ( $P < 0,05$ ) (ELLIS; MAYER; JONES, 1988).

Interessantemente, Cerdeira et al. (2016) demonstraram que a PBM também pode ativar o complexo NADPH oxidase de fagócitos, uma vez que a quantidade de oxidantes gerados após a realização da PBM foi efetivamente reduzida a níveis basais com o uso do DPI. Neste estudo, neutrófilos humanos foram irradiados *in vitro* utilizando um equipamento de laser de diodo InGaAlP/ GaAlAs, operando nos comprimentos de onda de 660nm e de 780nm, respectivamente, com uma potência de 40mW, tempo de irradiação de 480 segundos e energia total de 19,2J, resultando no aumento da produção de ROS, tais como OH• e ânion hipoclorito (ClO<sup>-</sup>), além de aumentar a capacidade fungicida desses fagócitos contra *Candida albicans*. É importante ressaltar que o comprimento de onda de 660nm foi significativamente mais efetivo do que o de 780nm ( $P < 0,01$ ) (CERDEIRA et al., 2016). Por conseguinte, também é esperado que a PBM seja capaz de ativar o complexo NADPH oxidase de monócitos humanos, colaborando significativamente na resposta imune protagonizada por estas células.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Elucidar os efeitos da PBM sobre monócitos humanos *in vitro*, analisando o *burst* oxidativo e a atividade microbicida destas células após as irradiações efetuadas com diferentes comprimentos de onda (660nm e 780nm) e densidades de energia (200, 400 e 600J/cm<sup>2</sup>), além de investigar a expressão gênica em nível de RNA mensageiro (mRNA) de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 em macrófagos derivados destas células.

#### 3.2 Objetivos específicos

Quantificar a produção de ROS intracelulares e extracelulares pelos monócitos humanos irradiados; analisar se a resposta fungicida destas células contra *Candida albicans* foi influenciada pela PBM; identificar o comprimento de onda e a densidade de energia mais eficaz na elevação do perfil funcional dos monócitos; avaliar a viabilidade celular dos monócitos frente à PBM; observar morfológicamente a diferenciação dos monócitos em macrófagos sob diferentes estímulos; determinar o perfil de expressão gênica dos macrófagos diferenciados; mensurar a concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) produzido durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos; e relacionar os resultados obtidos com possíveis novas aplicações terapêuticas da PBM.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi apreciada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) sob o parecer de número 1.980.248 (ANEXO A). Após a obtenção desta aprovação, os experimentos foram iniciados e desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia e no Laboratório de Biologia Animal Integrativa da UNIFAL-MG.

### 4.1 Cultura primária de monócitos humanos

#### 4.1.1 Coleta de sangue

O sangue periférico humano contém cerca de  $5-10 \times 10^6$  leucócitos/mL, dos quais aproximadamente 1-3% são monócitos (PERES; CURI, 2005). Sendo assim, os monócitos utilizados nesta pesquisa foram obtidos através da coleta de sangue da veia braquial do voluntário que aceitou participar mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - APÊNDICE B). Esta etapa foi efetuada por profissionais capacitados no Laboratório Central de Análises Clínicas da UNIFAL-MG (LACEN) e o volume total de sangue coletado de cada indivíduo foi de 16mL (4 tubos de 4mL contendo anticoagulante EDTA - tubos BD Vacutainer<sup>®</sup> EDTA K2, Vacutainer, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 10). Ressalta-se que para a obtenção de soro humano a fim de opsonização do fungo *Candida albicans*, o sangue foi coletado em tubos de 5mL contendo ativador de coágulo (Injex Vácuo<sup>®</sup> soro com gel, Injex Indústrias Cirúrgicas, Ourinhos, SP, Brasil) (Figura 10). Além disso, para cada experimento foi realizada a mistura do sangue de diferentes indivíduos (quimioluminescência: 2 indivíduos; ensaio da atividade microbicida: 3 indivíduos; ensaio de viabilidade celular: 2 indivíduos; diferenciação dos monócitos em macrófagos e análise da expressão gênica: 2 indivíduos; e mensuração da produção de NO<sub>2</sub>: 2 indivíduos), de modo que os resultados obtidos não fossem específicos e característicos do sistema imune de apenas 1 indivíduo. Devido às repetições dos experimentos e triplicatas dos grupos, o número total de diferentes voluntários participantes foi igual a 62.

##### 4.1.1.1 Critérios de inclusão

Os monócitos foram obtidos de indivíduos do gênero masculino, com a faixa etária de 20 a 50 anos, sem alterações sistêmicas, não tabagistas, não etilistas e que não possuíam histórico de infecções recentes, bem como de utilização prévia de anti-inflamatórios e antibióticos (no mínimo 15 dias). Estes indivíduos foram abordados aleatoriamente e recrutados na UNIFAL-MG, pessoalmente pelos pesquisadores envolvidos portando o TCLE, abrangendo funcionários e estudantes desta instituição.

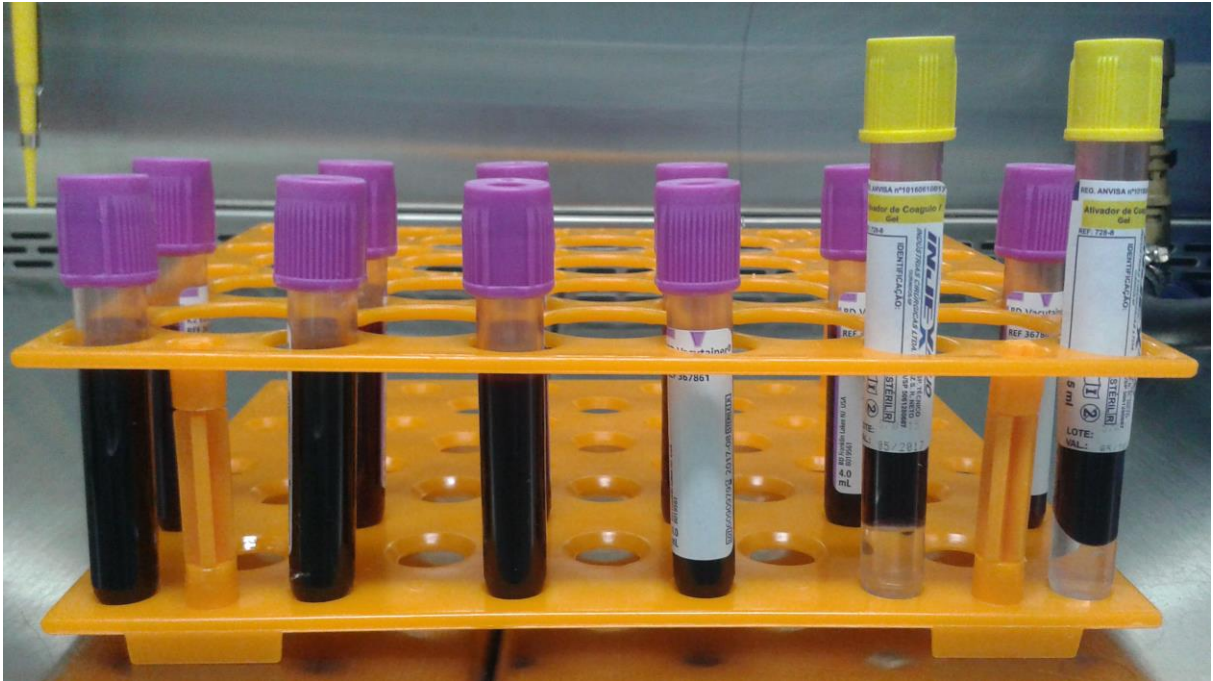


Figura 10 - Sangue coletado de homens adultos e saudáveis que consentiram em participar da pesquisa.  
Fonte: Da autora.

#### 4.1.1.2 Critérios de Exclusão

Indivíduos que não atenderam aos critérios de inclusão citados acima não puderam participar como voluntários da pesquisa. Elucidativamente, foram estes: mulheres (devido a possíveis influências hormonais na resposta imune) (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009), homens que não possuíam a faixa etária determinada, ou que possuíam alguma alteração sistêmica [principalmente condições imunossupressoras, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), diabetes mellitus, leucemia, entre outras], indivíduos transplantados, ou ainda, tabagistas, etilistas, ou que estavam sob terapia com corticosteroides e quimioterápicos, ou que possuíam histórico de infecções e utilização de anti-inflamatórios e antibióticos recentemente.

#### 4.1.1.3 Riscos

Os riscos inerentes a esta pesquisa limitaram-se aos atos da coleta de sangue do voluntário e da manipulação de material biológico. Em relação à coleta, dor, hematoma e outros desconfortos locais poderiam ocorrer, bem como, mais raramente, desmaio, quebra da agulha e infecções no local da punção. Com relação à manipulação de material biológico, ressalta-se o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas não relatadas/ ocultadas pelo voluntário da pesquisa. Portanto, cuidados foram tomados para minimizar esses riscos, tais como: coleta de sangue cuidadosa com agulhas de qualidade, técnicas de redução de estresse no momento da punção se necessárias, anamnese prévia minuciosa e uso de equipamentos de proteção individual (EPIs). O material não utilizado ou que sobrou dos experimentos foi descartado conforme a legislação sanitária.

#### *4.1.1.4 Benefícios*

A obtenção de células por cultura primária possibilita a utilização experimental de células recém-extraídas, além de proporcionar uma amostra mais heterogênea por ser originada de diferentes voluntários, impedindo a geração de uma resposta individualizada e específica de apenas 1 indivíduo, o que ocorreria se fosse utilizada uma linhagem celular comercial. Adicionalmente, este tipo de obtenção de células possui um menor custo do que a aquisição de células estabelecidas. Por conseguinte, o voluntário que consentiu em participar desta pesquisa, doando 16mL de sangue, colaborou para o desenvolvimento científico, especificamente, para a elucidação dos efeitos da PBM sobre monócitos humanos *in vitro*.

#### *4.1.2 Isolamento dos monócitos*

Após a coleta do sangue em tubos contendo anticoagulante EDTA, o sangue foi diluído em solução de tampão salina-fosfato [PBS, pH = 7,4 : NaCl (120mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,7mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,3mM) e KCl (5mM)] estéril (proporção de 1:1) e, cuidadosamente, depositado com a ajuda de uma pipeta *Pasteur* de plástico em tubos Falcon de 15mL contendo Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences) (proporção de 1:3 de sangue diluído). Assim, prosseguiu-se à centrifugação a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos e em temperatura ambiente. Após a centrifugação, os leucócitos formaram uma banda (anel) na interface (*buffy coat*), o qual foi removido utilizando uma pipeta de 1000µL, de modo que a ponta da mesma tocasse a parede do tubo na região do *buffy coat*, procedendo-se, então, a aspiração e transferência para outro tubo Falcon vazio. Movimentos circulares

podem ser realizados para facilitar este procedimento de aspiração e transferência do *buffy coat*. Novamente, o conteúdo aspirado foi diluído em PBS (proporção de 1:1) e centrifugado a 1000 rpm durante 9 minutos, a fim de reduzir a contaminação com o Ficoll-Histopaque e plaquetas. Deste modo, os leucócitos formaram um precipitado (*pellet*) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 5mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e transferido para uma garrafa de cultivo celular de 25mL (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) (PERES; CURI, 2005) (Figura 11).

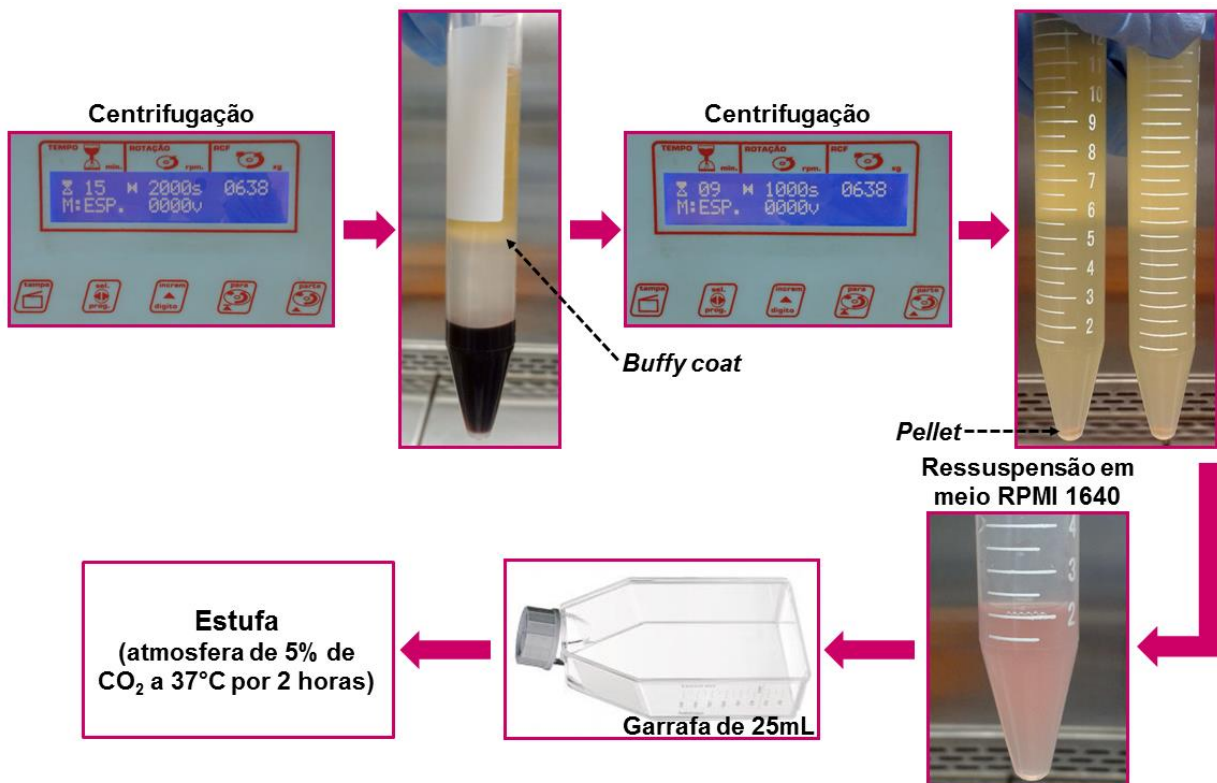


Figura 11 - Isolamento dos monócitos do sangue periférico humano.  
Fonte: Da autora.

Conforme descrito acima, foram obtidos os leucócitos do sangue periférico coletado, porém, os monócitos tiveram que ser separados dos linfócitos. Para isto, a garrafa contendo as células foi levada à estufa e incubada por 2 horas a uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após este tempo, os monócitos aderiram ao fundo da garrafa e os linfócitos ficaram em suspensão no meio de cultura. Por conseguinte, o sobrenadante foi removido e descartado, e as células aderidas ao fundo da garrafa (monócitos) foram lavadas delicadamente, duas vezes, com 2mL de PBS. Os monócitos foram desaderidos por método mecânico (*cell scraper*) e ressuscitados em PBS de modo a obter-se uma suspensão de  $1 \times 10^6$  células/mL (a contagem das células foi efetuada em câmara de Neubauer sob microscopia óptica de luz e, neste momento, também foi avaliada a viabilidade celular pelo método de exclusão utilizando

o azul de *Trypan* a 0,2% (Sigma-Aldrich), o qual cora intensamente as células mortas) para proceder-se imediatamente aos experimentos determinados (PERES; CURI, 2005; ELIGINI et al., 2013). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 4.2 Ensaio de quimioluminescência

O ensaio de quimioluminescência, utilizando os substratos aminophthalhydrazide (luminol 97%, Sigma-Aldrich) e 4-aminophthalhydrazide (isoluminol 97%, Sigma-Aldrich), visou avaliar o *burst* oxidativo dos monócitos, possibilitando a quantificação da produção de ROS através da emissão de luz integrada por segundos (BABIOR, 1984). Destaca-se que o luminol é capaz de mensurar as ROS intracelulares e extracelulares, enquanto o isoluminol quantifica apenas as ROS extracelulares (RÁJECKÝ; LOJEK; CÍZ, 2012; CERDEIRA, et al., 2016). Por conseguinte, após o isolamento dos monócitos do sangue periférico, através deste experimento foi possível quantificar as ROS produzidas pelos seguintes grupos: (1) controle: apenas monócitos; (2) controle positivo: monócitos com a adição de PMA (100ng/mL, Sigma-Aldrich); (3) monócitos irradiados com laser vermelho (comprimento de onda = 660nm); (4) monócitos irradiados com laser infravermelho (comprimento de onda = 780nm); e (5) controle negativo: monócitos com a adição de DPI (32µM, Sigma-Aldrich) (Tabela 1).

### 4.2.1 Irradiação laser

O equipamento utilizado para as irradiações foi o laser de diodo InGaAlP (660nm)/GaAlAs (780nm) - Twin Flex<sup>®</sup> (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 12) operando nos comprimentos de onda já mencionados (660nm e 780nm) com potência de 40mW, área de feixe de 0,04cm<sup>2</sup>, densidade de potência de 1W/cm<sup>2</sup> e doses independentes de 200J/cm<sup>2</sup>, 400J/cm<sup>2</sup> e 600J/cm<sup>2</sup>, tendo os respectivos tempos de 200, 400 e 600 segundos. A irradiação laser foi realizada em sala escura a fim de que a luz convencional não interferisse de alguma maneira na absorção dos comprimentos de onda da luz laser pelas células. Além disso, a irradiação foi realizada de modo que a ponta da caneta laser tocasse perpendicularmente o fundo do substrato transparente contendo as células (CERDEIRA et al., 2016). Não houve interferência da luz laser com as células dos grupos controles em nenhum momento durante o experimento.

Tabela 1 - Grupos experimentais avaliados por meio da quimioluminescência.

<b>1. Controle*</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
<b>2. Controle (+)*</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>PMA (100ng/mL)</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
<b>3. Irradiados (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>)*</b>	<b>3a</b> Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>laser (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>) durante 200 segundos</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
	<b>3b</b> Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>laser (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>) durante 400 segundos</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
	<b>3c</b> Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>laser (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>) durante 600 segundos</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
<b>4. Irradiados (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>)*</b>	<b>4a</b> Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>laser (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>) durante 200 segundos</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
	<b>4b</b> Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>laser (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>) durante 400 segundos</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
	<b>4c</b> Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + <b>laser (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>) durante 600 segundos</b> + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )
<b>5. Controle (-)*</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + <b>DPI (32<math>\mu\text{M}</math>) (incubação durante 10 minutos)</b> + glicose (10mM) + $\text{CaCl}_2$ (1mM) + $\text{MgCl}_2$ (1,5mM) + HRP (8U/mL) + luminol (50 $\mu\text{M}$ ) ou isoluminol (50 $\mu\text{M}$ )

\*Este grupo também foi realizado utilizando monócitos “primados” com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.



Figura 12 - Laser de diodo InGaAlP/GaAlAs, Twin Flex® (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil).

Fonte: SPERANDIO, 2012.

#### 4.2.2 Considerações sobre a execução experimental

Os monócitos ( $1 \times 10^6$  células/mL) de todos os grupos experimentais foram pipetados em tubos Eppendorf de 1,5mL e, em seguida, foram adicionados glicose (10mM), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ , 1mM), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ , 1,5mM) e *horseradish* peroxidase (HRP, 8U/mL, Sigma). No grupo controle negativo (DPI,  $32\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich), este inibidor do complexo NADPH oxidase dos fagócitos foi adicionado às células e incubado por 10 minutos antes da inclusão destes reagentes citados (glicose,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e HRP). Nos grupos irradiados com os comprimentos de onda de 660nm e 780nm, após a adição dos reagentes mencionados, foram realizadas as irradiações durante 200, 400 e 600 segundos, para ambos os comprimentos de onda; e no grupo controle positivo, o PMA (100ng/mL, Sigma-Aldrich) foi acrescentado após a adição de glicose,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e HRP. Por último, foi adicionado o luminol ( $50\mu\text{M}$ ) ou o isoluminol ( $50\mu\text{M}$ ) em cada grupo, e as leituras foram realizadas em um luminômetro GloMax<sup>TM</sup> 20/20 (Promega) durante 30 minutos, de forma que os resultados foram reportados em unidades relativas de luz (URL) (DAHLGREN; KARLSSON; BYLUND, 2007).

Ressalta-se que neste experimento, todos os grupos experimentais mencionados foram repetidos, também, com monócitos “primados” com LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich). Os monócitos “primados”, ou seja, sensibilizados, caracterizam-se por serem mais predispostos a se tornarem ativos do que os em repouso (DALE; BOXER; LILES, 2008). Para isto, após o isolamento dos monócitos do sangue periférico, os mesmos foram novamente incubados, desta vez com uma concentração de  $1\mu\text{g/mL}$  de LPS, durante 2 horas e, em seguida, procedeu-se ao experimento igualmente descrito para os monócitos não “primados”.

#### 4.3 Ensaio de atividade microbica dos monócitos contra *Candida albicans*

A fim de avaliar a atividade microbica dos monócitos contra *Candida albicans*, foi realizado o “ensaio de Killing” mediante adaptações da metodologia proposta por Green, Winterbourn e Hampton (2007). Sendo assim, uma solução de *Candida albicans* (ATCC 10231, *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) [ $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL] opsonizadas em soro de sangue humano foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  durante 20, 40 e 60 minutos, juntamente com os monócitos recém isolados do sangue periférico ( $1 \times 10^6$  células/mL) constituindo os grupos controle, irradiados (comprimentos de onda de 660nm e 780nm, com potência de 40mW, área de feixe de  $0,04\text{cm}^2$  e dose de

400J/cm<sup>2</sup>) e controle negativo (DPI, 32µM, Sigma-Aldrich), acrescidos com glicose (10mM), CaCl<sub>2</sub>, (1mM) e MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), de modo que a multiplicidade de infecção (MOI) obtida foi igual a 10. Após os diferentes tempos de incubação (20, 40 e 60 minutos), todos os grupos experimentais foram diluídos (10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup>) em H<sub>2</sub>O deionizada (Milli-Q®, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) com pH = 11 para lisar os monócitos e parar a reação. Em seguida, cada diluição (10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup>) foi dispensada em placas de *Petri* contendo ágar triptona de soja (TSA) enriquecido com 5% de glicose e, então, incubada a 37°C durante 24 horas. A quantificação de *Candida albicans* viáveis foi determinada pela contagem do número de colônias que cresceram na placa de *Petri* utilizando o aparelho contador de colônias CP600 Plus® (Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil) e expressando os resultados em UFC (Figura 13). Maiores detalhes deste experimento estão descritos a seguir.

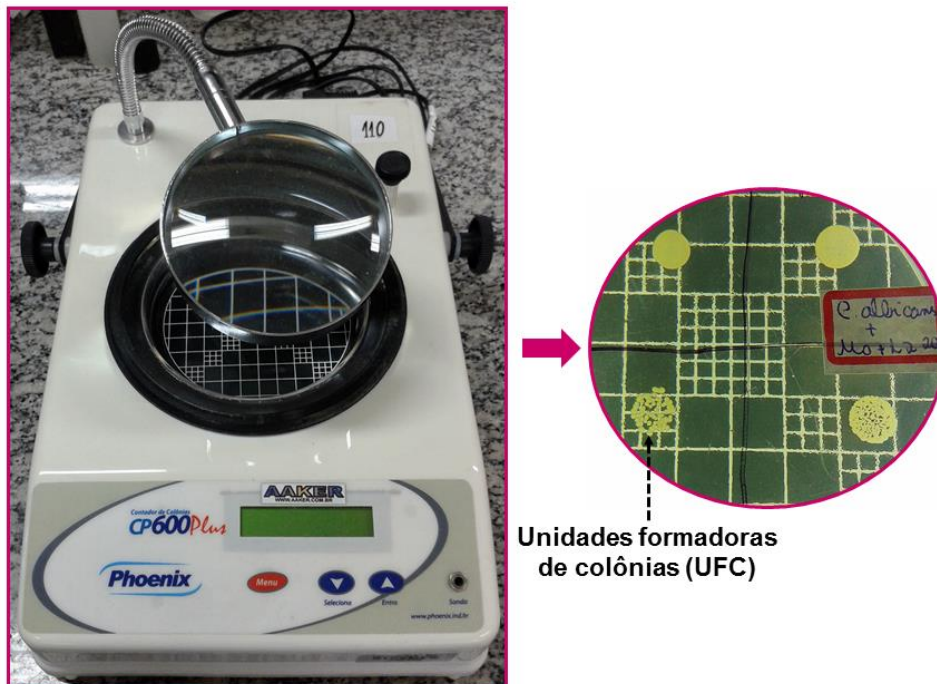


Figura 13 - Aparelho contador de colônias CP600 Plus® (Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil).

Fonte: Da autora.

#### 4.3.1 Cultivo de *Candida albicans*

A linhagem padrão de *Candida albicans* ATCC 10231 que estava mantida a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG foi incubada a 37°C *overnight* em tubo de vidro contendo caldo infusão cérebro e coração (BHI - *brain heart infusion*, Kasvi). Após isto, esta suspensão de *Candida albicans* foi transferida para um tubo Falcon de

50mL e centrifugada a 3400 rpm durante 7 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuscitado em PBS (pH = 7,4) de modo a obter-se o padrão de turvação 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) estabelecido pela escala de McFarland (SUTTON, 2011). Para a realização do experimento, esta suspensão de *Candida albicans* foi ajustada para  $1 \times 10^7$  UFC/mL.

### 4.3.2 Opsonização

O sangue humano coletado em tubos de 5mL contendo ativador de coágulo (Injex Vácuo® soro com gel) foi transferido para um tubo Falcon de 15mL e mantido em repouso durante 2 horas. Em seguida, transferiu-se apenas o soro para outro tubo Falcon, o qual foi centrifugado a 2400 rpm durante 7 minutos em temperatura ambiente. Apenas o sobrenadante obtido por meio desta centrifugação foi utilizado na opsonização. Deste modo, tanto a suspensão de *Candida albicans* quanto a de monócitos foi incubada a 37°C com uma concentração de 20% de soro obtido, durante 1 hora, a fim de realizar a opsonização previamente à avaliação da atividade microbica (CERDEIRA et al., 2016).

### 4.3.3 Grupos experimentais e considerações

Tabela 2 - Grupos experimentais avaliados no ensaio de atividade microbica.

<b>A. <i>Candida albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i> ( $1 \times 10^7$ UFC/mL) + glicose (10mM) + CaCl <sub>2</sub> (1mM) + MgCl <sub>2</sub> (1,5mM)
<b>B. <i>Candida albicans</i> + monócitos</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + CaCl <sub>2</sub> (1mM) + MgCl <sub>2</sub> (1,5mM) + <i>Candida albicans</i> ( $1 \times 10^7$ UFC/mL)
<b>C. Monócitos irradiados (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>, <math>400\text{J}/\text{cm}^2</math>)</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + CaCl <sub>2</sub> (1mM) + MgCl <sub>2</sub> (1,5mM) + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ ) durante 400 segundos + (por último) <i>Candida albicans</i> ( $1 \times 10^7$ UFC/mL)
<b>D. Monócitos irradiados (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>, <math>400\text{J}/\text{cm}^2</math>)</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + glicose (10mM) + CaCl <sub>2</sub> (1mM) + MgCl <sub>2</sub> (1,5mM) + laser ( $\lambda = 780\text{nm}$ ) durante 400 segundos + (por último) <i>Candida albicans</i> ( $1 \times 10^7$ UFC/mL)
<b>E. Controle (-)</b>	Monócitos ( $1 \times 10^6$ células/mL) + DPI (32 $\mu\text{M}$ ) (incubação durante 10 minutos) + glicose (10mM) + CaCl <sub>2</sub> (1mM) + MgCl <sub>2</sub> (1,5mM) + (por último) <i>Candida albicans</i> ( $1 \times 10^7$ UFC/mL)

( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

Após a realização da opsonização, os grupos experimentais conforme descritos na Tabela 2 foram efetuados em tubos Falcon e incubados a 37°C durante um tempo total de 60 minutos. No entanto, foram retiradas amostras destes mesmos tubos Falcon para mensurar a

atividade microbicida dos monócitos aos 20 minutos de incubação e, também, aos 40 e 60 minutos decorridos. Portanto, este experimento caracteriza-se como um modelo longitudinal. Assim, a amostra obtida de cada tempo mencionado foi diluída em H<sub>2</sub>O deionizada (Milli-Q<sup>®</sup>) com pH = 11, de modo a cessar a reação e melhor avaliar cada tempo de incubação. Elucidativamente, três diferentes diluições (10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup>) de cada amostra, ou seja, de cada tempo de incubação, foram então realizadas em tubos Eppendorf, a fim de facilitar a posterior contagem de UFC que cresceram nas placas de *Petri* contendo TSA. Além disso, é importante ressaltar que a única dose de irradiação utilizada (400J/cm<sup>2</sup>), para ambos os comprimentos de onda de 660nm e 780nm, foi escolhida e determinada no ensaio de quimioluminescência, sendo esta, a que mais se destacou na produção de ROS intracelulares e extracelulares (vide RESULTADOS). Também, destaca-se que o PMA não foi utilizado nos grupos avaliados neste experimento, pois ele agiria como um coestímulo, uma vez que o micro-organismo *Candida albicans* já é capaz de ativar, por si só, o complexo NADPH oxidase dos fagócitos.

#### **4.4 Análise da viabilidade celular nos dias subsequentes à irradiação laser**

Determinada a dose de irradiação e o comprimento de onda mais eficaz através dos ensaios de quimioluminescência e de atividade microbicida dos monócitos contra *Candida albicans* (400J/cm<sup>2</sup> e 660nm, respectivamente; vide RESULTADOS), os efeitos desses parâmetros sobre a viabilidade dos monócitos humanos *in vitro* foram investigados mediante o método de exclusão utilizando o reagente azul de *Trypan* a 0,2% (Sigma-Aldrich). Para isto, os monócitos do grupo controle (monócitos não irradiados) e os monócitos irradiados com laser vermelho a 400J/cm<sup>2</sup> foram cultivados em placas de 24 poços contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, São Paulo, Brasil) e 1% de antibiótico (estreptomicina/ penicilina; 10000U/mL; ThermoFisher), a 37°C e em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas após a irradiação laser.

A concentração da suspensão de células utilizada foi igual a 3 x 10<sup>5</sup> células/mL, sendo que em cada poço foram dispensadas 1,5 x 10<sup>5</sup> células com um volume final de meio de cultura de 500µL. As células do grupo controle e do grupo irradiados foram semeadas em triplicata experimental em placas distintas, além disso, também foram realizadas placas separadas para os seguintes tempos: 0, 24 e 48 horas. Elucidativamente, a irradiação laser foi realizada imediatamente após o isolamento dos monócitos do sangue periférico e plaqueamento (apenas no primeiro dia do experimento), em sala escura e com a ponta da caneta laser tocando perpendicularmente o fundo das placas transparentes de 24 poços

contendo as células. Visando evitar a interferência da luz laser aplicada às células dispensadas em um poço específico da placa de cultivo com os poços vizinhos, as células não foram semeadas nos poços de sua adjacência (Figura 14).

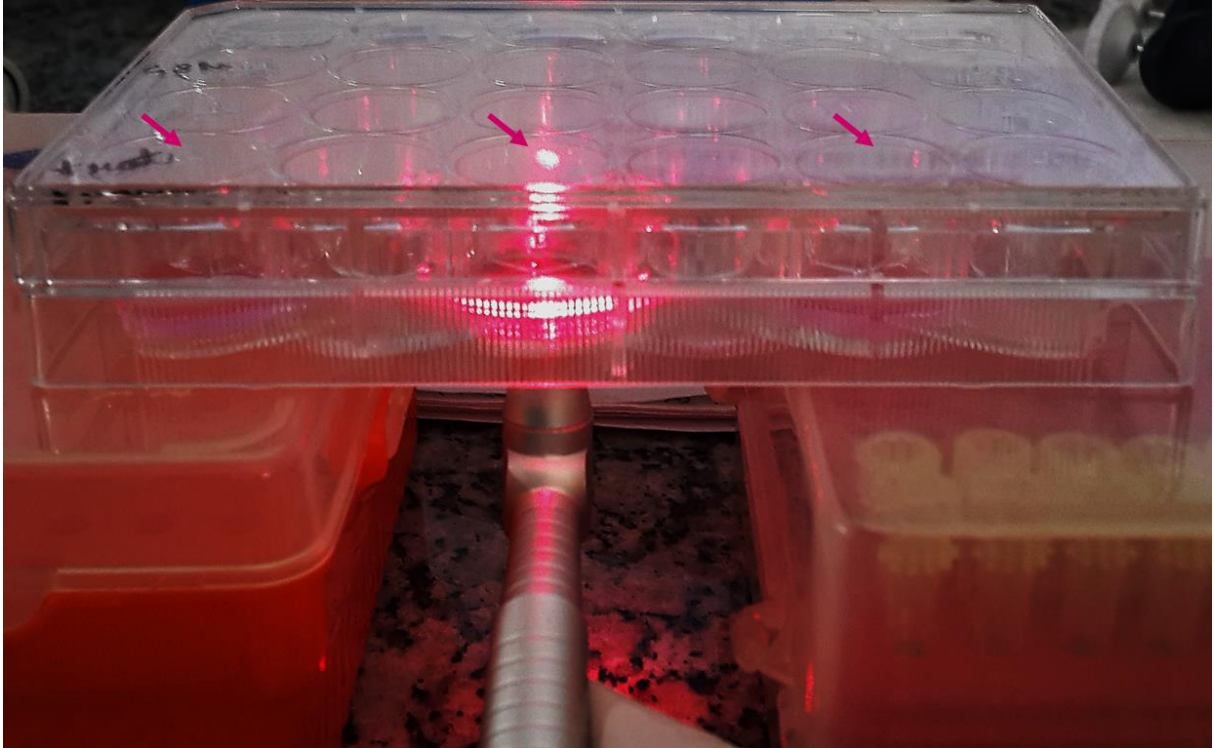


Figura 14 - Irradiação laser realizada em sala escura e com a ponta da caneta laser tocando perpendicularmente o fundo da placa transparente de 24 poços. As setas indicam os poços onde foram semeadas as células.

Fonte: Da autora.

Sendo assim, foi efetuada uma contagem manual das células em câmara de Neubauer referente a cada tempo subsequente à irradiação laser (0, 24 e 48 horas), avaliando a viabilidade celular dos grupos experimentais mencionados. A suspensão de células de cada tempo a ser avaliado foi obtida por digestão enzimática (tripsina/ EDTA) (Sigma-Aldrich), seguida de centrifugação a 1500rpm por 10 minutos e ressuspensão do *pellet* em meio de cultura, misturando 10 $\mu$ L da suspensão de células com 10 $\mu$ L do reagente azul de *Trypan* (fator de diluição igual a 2) e pipetando esses 20 $\mu$ L na câmara de Neubauer. O azul de *Trypan* é excluído do citoplasma de células viáveis; já as células mortas são incapazes de excluí-lo e permanecem azuis (PERES; CURI, 2005). Deste modo, a proporção entre o número de células vivas e o total (vivas e mortas) forneceu a porcentagem da viabilidade celular. Para a contagem do número de células, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\frac{n^{\circ} \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{n^{\circ} \text{ de quadrados contados na câmara de Neubauer}} = n^{\circ} \text{ de células/mL}$$

#### **4.5 Diferenciação dos monócitos em macrófagos e análise da expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 em nível de RNA mensageiro (mRNA)**

É relatado na literatura que após o isolamento dos monócitos do sangue periférico e cultivo destas células durante 7 dias, pode-se observar uma diferenciação espontânea dos monócitos em macrófagos (ELIGINI et al., 2013). No entanto, este processo pode ser acelerado e modulado por meio da adição de diferentes estímulos, por exemplo: LPS (induzindo a diferenciação dos monócitos em M1) (JAGUIN et al., 2013), micro-organismos (também induzindo um perfil de M1) (LABONTE; TRAMPONT; HAHN, 2014), M-CSF (induzindo a diferenciação dos monócitos em M2) (DING et al., 2012), dentre outros. Sendo assim, na presente pesquisa também foi realizada a diferenciação de monócitos humanos em macrófagos, a fim de determinar o perfil imune induzido por distintos estímulos conforme detalhado nos subtópicos a seguir.

##### ***4.5.1 Diferenciação dos monócitos em macrófagos e delineamento dos grupos experimentais***

Os monócitos isolados do sangue periférico de diferentes indivíduos (2 homens doadores por réplica experimental) foram cultivados em placas de cultura de 24 poços com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo 10% de SFB (Cultilab, São Paulo, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (estreptomicina/ penicilina; 10000U/mL; ThermoFisher). As células foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Os seguintes grupos experimentais foram delineados: (I) monócitos (controle); (II) monócitos + laser (comprimento de onda = 660nm e densidade de energia = 400J/cm<sup>2</sup>); (III) monócitos + LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) (controle M1) (JAGUIN et al., 2013); (IV) monócitos + LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) + laser (660nm, 400J/cm<sup>2</sup>); (V) monócitos + *Candida albicans*; (VI) monócitos + *Candida albicans* + laser (660nm, 400J/cm<sup>2</sup>); e (VII) monócitos + PMA + M-CSF (Gibco) (controle M2) (DING et al., 2012) (Tabela 3).

Em cada réplica experimental, foram realizados 4 poços por grupo, de modo que cada poço possuía 1,5 x 10<sup>5</sup> células com um volume final de 500µL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Além disso, cada grupo foi preparado em placas distintas, ocupando apenas os poços das extremidades (Figura 15), a fim de evitar o espalhamento e a interferência da luz laser aplicada às células de um poço específico com os poços vizinhos.

Tabela 3 - Grupos experimentais avaliados no ensaio de diferenciação de monócitos em macrófagos.

<b>I. Monócitos (controle)</b>	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL)
<b>II. Monócitos + laser</b> ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL) + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )
<b>III. Monócitos + LPS</b> (controle M1)	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL) + LPS (100ng/mL) (JAGUIN et al., 2013)
<b>IV. Monócitos + LPS + laser</b> ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL) + LPS (100ng/mL) + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )
<b>V. Monócitos + <i>Candida albicans</i></b>	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL) + <i>Candida albicans</i> ( $3 \times 10^6$ UFC/mL)
<b>VI. Monócitos + <i>Candida albicans</i> + laser</b> ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL) + <i>Candida albicans</i> ( $3 \times 10^6$ UFC/mL) + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )
<b>VII. Monócitos + PMA + M-CSF</b> (controle M2)	Monócitos ( $3 \times 10^5$ células/mL) + PMA (10ng/mL) + M-CSF (10ng/mL) (DING et al., 2012)

( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.



Figura 15 - Cada grupo experimental foi realizado em uma placa de cultivo de 24 poços distinta, sendo que as células foram semeadas apenas nos poços das extremidades (poços indicados pelas setas), a fim de evitar o espalhamento e a interferência da luz laser com os poços vizinhos.

Fonte: Da autora.

#### 4.5.2 Irradiação laser

Assim como nos experimentos anteriormente efetuados, utilizou-se o equipamento laser InGaAlP (660nm)/ GaAlAs (780nm) - Twin Flex<sup>®</sup> (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil), operando com potência de 40mW, área de feixe de 0,04cm<sup>2</sup> e densidade de potência de 1W/cm<sup>2</sup> (1 ponto por cm<sup>2</sup> do poço). Ressalta-se que apenas o comprimento de onda de 660nm e a densidade de energia de 400J/cm<sup>2</sup> foram empregados neste experimento, por serem os parâmetros que mais se destacaram nos ensaios de quimioluminescência e de atividade microbica (vide RESULTADOS). Novamente, a irradiação laser foi realizada em uma sala escura a fim de que a luz convencional não interferisse de alguma maneira na absorção do comprimento de onda da luz laser pelas células. Além disso, a irradiação foi realizada de modo que a ponta da caneta laser tocasse perpendicularmente o fundo das placas transparentes de 24 poços. Deste modo, as células foram irradiadas imediatamente após o isolamento do sangue periférico e plaqueamento dos grupos determinados, ou seja, apenas no primeiro dia do experimento. Vale destacar que no grupo “monócitos + *Candida albicans* + laser”, os monócitos foram irradiados antes de serem colocados em contato com o fungo.

#### 4.5.3 *Candida albicans*

Similarmente ao ensaio de atividade microbica, a linhagem de *Candida albicans* ATCC 10231 que estava mantida a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG foi utilizada neste experimento, sendo incubada a 37°C *overnight* em tubo de vidro contendo meio sólido de infusão cérebro e coração (BHI - *brain heart infusion*, Kasvi) (Figura 16). Após isto, a *Candida albicans* foi coletada em fluxo laminar e ressuspensa em PBS (pH = 7,4) de modo a obter-se o padrão de turvação 0,5 (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) estabelecido pela escala de McFarland (SUTTON, 2011). Especificamente para este experimento, esta suspensão de *Candida albicans* foi ajustada para 3 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, constituindo-se MOI igual a 10. É importante destacar que tanto a suspensão de *Candida albicans* quanto os monócitos dos grupos que iriam receber o fungo, foram incubados a 37°C com uma concentração de 20% de soro humano, durante 1 hora, a fim de realizar a opsonização previamente ao contato das células com o fungo (CERDEIRA et al., 2016).



Figura 16 - *Candida albicans* ATCC 10231 cultivada em meio BHI.

Fonte: Da autora.

#### ***4.5.4 Morfologia das células***

Todos os grupos experimentais foram observados e fotografados diariamente em microscópio óptico invertido em contraste de fase, sequencialmente nos determinados tempos: 0, 24, 48 e 72 horas. A diferenciação dos monócitos em macrófagos foi sugerida pela mudança na morfologia das células (DING et al., 2012; JAGUIN et al., 2013). Morfologicamente, considerou-se como monócitos as células que permaneceram com o formato arredondado, característica esta, também possível de ser observada imediatamente ao isolamento dos monócitos do sangue periférico. Já as células que exibiram mudanças em seu aspecto morfológico, apresentando-se alongadas, fusiformes e, por vezes, estrelárias, foram consideradas como macrófagos (DING et al., 2012; JAGUIN et al., 2013) (Figura 17).

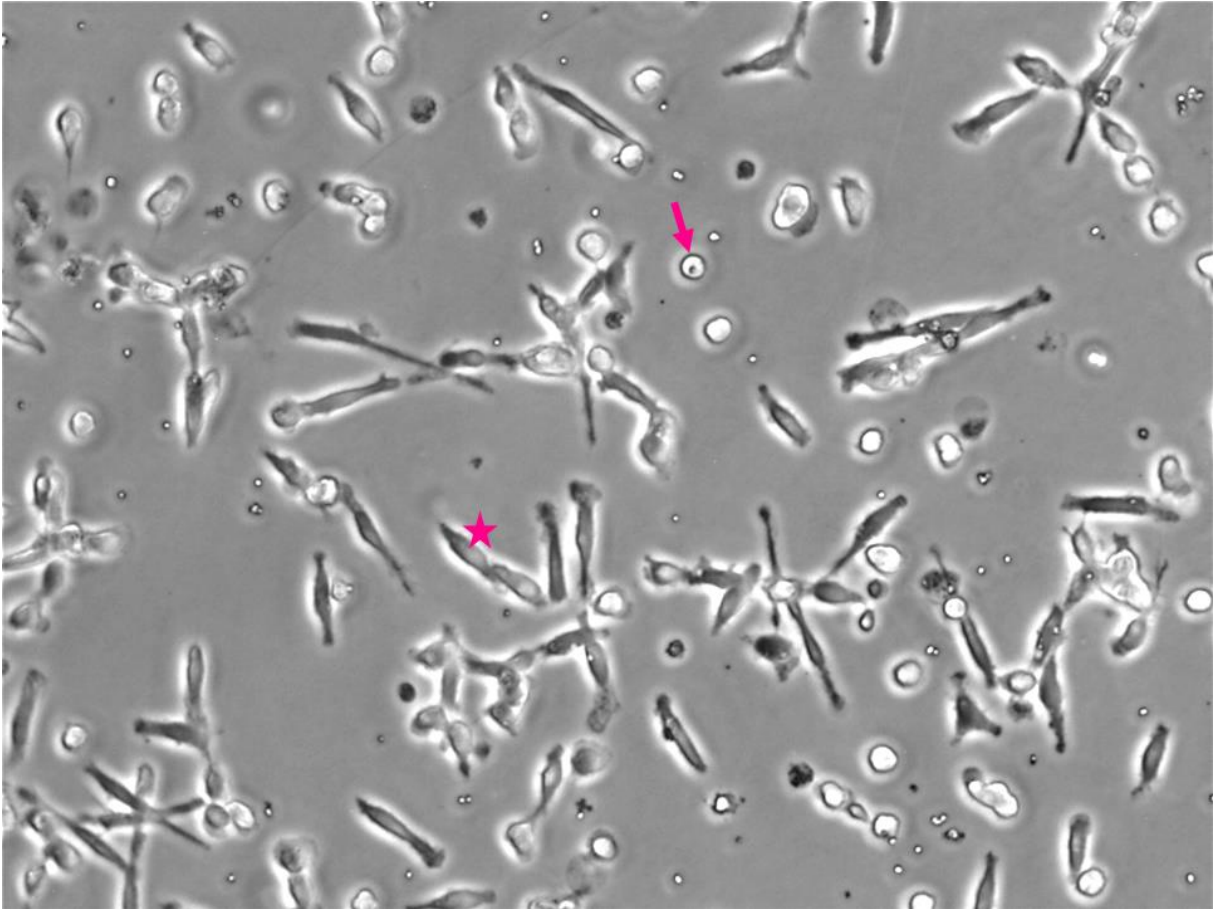


Figura 17 - O processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos foi acompanhado por 72 horas, observando a mudança no aspecto morfológico das células. Os monócitos (seta) apresentam uma morfologia arredondada, enquanto os macrófagos (estrela) deixam de ser células arredondadas e tornam-se alongadas, fusiformes, por vezes, estrelárias.

Nota: Imagem obtida por microscopia invertida em contraste de fase (400X).

Fonte: Da autora.

#### ***4.5.5 Análise da expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 em nível de RNA mensageiro (mRNA)***

##### ***4.5.5.1 Armazenamento das células***

Ao completar 72 horas de experimento, o sobrenadante de todos os grupos foi recolhido e os poços contendo as células foram lavados com PBS para a posterior adição de tripsina/ EDTA (Sigma-Aldrich) e desaderência das células do fundo da placa de cultura. Sendo assim, as placas contendo tripsina/ EDTA foram incubadas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos. Após isto, foi adicionado meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) enriquecido com 10% de SFB aos poços, a fim de inativar a tripsina/ EDTA. Tanto o sobrenadante recolhido anteriormente quanto as células desaderidas foram centrifugados juntamente a 1500rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido de todos os grupos experimentais foi

ressuspendido em 350µL de tampão de lise do *Kit RNeasy Micro*<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA). As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA.

#### 4.5.5.2 Extração do RNA e transcrição reversa

O RNA total foi extraído das 3 repetições de cada grupo experimental utilizando o *Kit RNeasy Micro*<sup>®</sup> (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e, então, eluído em 20µL de água livre de ribonuclease (RNase). A concentração de RNA total das amostras foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Em seguida, 95ng de RNA total foram incubados com desoxirribonuclease (DNase) (1U; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para a eliminação de uma possível contaminação com DNA genômico e, após isto, submetidos à reação de transcrição reversa utilizando *Random primers* e *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25°C por 10 min, a 37°C por 120 min e, finalmente, a 85°C por 5 min para a inativação da enzima.

#### 4.5.5.3 PCR em tempo real (qPCR)

Para a análise de expressão gênica em nível de mRNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizou-se o termociclador ABI Prism 7500<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), adotando o protocolo de amplificação do *Kit Power Sybr Green Master Mix*<sup>®</sup> (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com um volume final de 10µL e as condições para a amplificação dos genes foram: 95°C por 10 minutos (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto (40 ciclos), seguidos de curva de dissociação padrão. A sequência dos *primers* e o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) estão apresentados na Tabela 4. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi amplificada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

Os genes constitutivos  $\beta$ -actina (ActB), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e RNA ribossômico 18S foram testados através do programa geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002) para a seleção do controle endógeno mais estável para o

tipo celular analisado. Os resultados indicaram que o GAPDH foi o melhor controle endógeno para os monócitos/ macrófagos. Sendo assim, os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH. A abundância relativa de mRNA foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4 - Sequência dos *primers* e tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb).

Genes	Sequência	Tamanho do fragmento (pb)
<b>GAPDH</b>	F: 5'-GGATTTGGTCGTATTGGGC-3' R: 5'-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3'	206
<b>ActB</b>	F: 5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' R: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	193
<b>18S</b>	F: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	150
<b>CD68</b>	F: 5'-CGAGCATCATTCTTTACCA-3' R: 5'-CACTGGGGCAGGAGAAACT-3'	111
<b>CD80</b>	F: 5'-CACCTTGCCCTTACGTATCT-3' R: 5'-CTACTTCTGTGCCACCATATT-3'	93
<b>CD163</b>	F: 5'-CTCATCCCGTCAGTCATCCT-3' R: 5'-AAGCCGCTGTCTCTGTCTTC-3'	112
<b>CD204</b>	F: 5'-GAATGGCAAAATCCAAGAGAA-3' R: 5'-GCACTTGTCTCTTTTCATAGCC-3'	113
<b>IL-6</b>	F: 5'-GGAGACTTGCTGGTGAAA-3' R: 5'-CTGGCTTGTTCCTCACTACTC-3'	99
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	F: 5'-AGAGGGAGAGAAGCAACTACA-3' R: 5'-GGGTCAGTATGTGAGAGGAAGA-3'	103
<b>IL-10</b>	F: 5'-GCTGGAGGACTTTAAGGGTTAC-3' R: 5'-GATGTCTGGGTCTTGGTTCTC-3'	106
<b>SOD1</b>	F: 5'-GTGCAGGGCATCATCAATTTTC-3' R: 5'-GGCCTTCAGTCAGTCCTTTAAT-3'	85

F= *primer forward*; R= *primer reverse*.

Fonte: Da autora.

#### 4.6 Mensuração da produção de nitrito (NO<sub>2</sub>) durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos

A fim de ilustrar a presente pesquisa, a mensuração da produção de NO<sub>2</sub> pelas células durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos (grupos experimentais mencionados no subtópico 4.5.1) foi realizada através do método colorimétrico de Griess (GREEN et al., 1982). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida (Vetec) e 0,1% de naftiletlenodiamino-bicloridrato (Sigma-Aldrich) em ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 5% (Merck).

#### 4.6.1 Componentes do reagente de Griess

Ácido ortofosfórico 5%	
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% P.A. (Merck).....	20mL
Água deionizada Milli-Q.....	320mL
Solução A: sulfanilamida 1% p/v	
Sulfanilamida (Vetec).....	0,5g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5%.....	50mL
Solução B: naftiletenodiamino-bicloridrato 0,1% p/v	
Naftiletenodiamino-bicloridrato (Sigma-Aldrich).....	0,05g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5%.....	50mL

As soluções estoque A e B foram realizadas e mantidas a 4°C. No momento do experimento, 25µL da solução A foi misturada com 25µL da solução B (em cada poço de uma placa tipo ELISA de 96 poços contendo as amostras), formando o reagente de Griess.

#### 4.6.2 Montagem da placa e leitura espectrofotométrica

As amostras (50µL de sobrenadante recolhido de cada grupo experimental às 72 horas do ensaio de diferenciação dos monócitos em macrófagos) foram transferidas em duplicatas, para uma placa tipo ELISA de 96 poços. O mesmo volume (50µL) do reagente de Griess (25µL da solução A + 25µL da solução B) foi adicionado em cada poço (Figura 18). Elucidativamente, foi avaliado o sobrenadante dos seguintes grupos após 72 horas de incubação a 37° em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>: (I) monócitos (controle); (II) monócitos + laser (comprimento de onda = 660nm e densidade de energia = 400J/cm<sup>2</sup>); (III) monócitos + LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) (controle M1) (JAGUIN et al., 2013); (IV) monócitos + LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) + laser (660nm, 400J/cm<sup>2</sup>); (V) monócitos + *Candida albicans*; (VI) monócitos + *Candida albicans* + laser (660nm, 400J/cm<sup>2</sup>); (VII) monócitos + PMA + M-CSF (Gibco) (controle M2) (DING et al., 2012); (VIII) monócitos + PMA; e (IX) monócitos + PMA + laser (Tabela 3).

Após 10 minutos de reação, a densidade óptica (absorbância) foi medida por espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, UK), utilizando um filtro de



dos ensaios de atividade microbiana e viabilidade celular foram submetidos ao teste ANOVA com medidas repetidas. Já a análise de expressão gênica foi submetida ao teste de Kruskal-Wallis. O *software* utilizado foi o R (R CORE TEAM, 2016) com o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013).

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nas abordagens experimentais realizadas estão descritos nos subtópicos abaixo. Todos os experimentos foram iniciados com uma viabilidade celular  $\geq$  a 95% ( $P < 0,01$ ).

### 5.1 Quantificação da produção de ROS intracelulares e extracelulares

#### 5.1.1 Quimioluminescência utilizando o substrato luminol

Através do substrato luminol, foi possível mensurar a produção total de ROS (intracelulares e extracelulares) pelos monócitos. Inicialmente, foram avaliados apenas os monócitos não “primados”, os quais aumentaram significativamente a sua geração de ROS após a realização da PBM operando nos comprimentos de onda de 660nm e 780nm, e com densidades de energia de 200 e 400J/cm<sup>2</sup>, comparativamente ao controle ( $P < 0,001$ ). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre esses quatro grupos irradiados. Além disso, quando avaliada a densidade de energia de 600J/cm<sup>2</sup>, para ambos os comprimentos de onda (660nm e 780nm), nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação ao controle.

Os controles positivo (PMA) e negativo (DPI) comportaram-se satisfatoriamente, ambos diferindo-se significativamente de todos os grupos avaliados, especialmente em relação ao grupo controle ( $P < 0,001$ ). O PMA literalmente provocou uma “explosão” oxidativa, induzindo uma produção de ROS bastante elevada pelos monócitos ( $P < 0,001$ ). Em contraste, o inibidor do complexo NADPH oxidase, DPI, proporcionou uma mensuração de ROS abaixo dos níveis basais, ou seja, na presença de DPI, os monócitos produziram menos ROS em comparação ao grupo controle ( $P < 0,001$ ). As médias expressas em URL das triplicatas independentes de todos os grupos deste experimento estão representadas na Tabela 5 e a análise de variância desses resultados está sintetizada na Tabela 6. Adicionalmente, a Figura 19A ilustra as diferenças estatísticas determinadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) entre os grupos experimentais relatados acima.

Utilizando-se da mesma metodologia para avaliar a produção de ROS intracelulares e extracelulares por monócitos “primados” com LPS, foi possível observar que estas células apresentaram um perfil funcional mais elevado, gerando mais ROS do que as células que não foram “primadas” ( $P < 0,001$ ). Novamente, verificou-se que a PBM operando nos

comprimentos de onda de 660nm e 780nm, e com densidades de energia de 200 e 400J/cm<sup>2</sup>, eficientemente conseguiu aumentar a produção de ROS pelos monócitos “primados” em comparação ao grupo controle, porém, desta vez, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre esses quatro tratamentos, sendo que os parâmetros da irradiação laser com comprimento de onda de 660nm e densidade de energia de 400J/cm<sup>2</sup> foram os que mais se destacaram ( $P < 0,001$ ).

Para os monócitos “primados” com LPS, a PBM efetuada com a densidade de energia de 600J/cm<sup>2</sup>, em ambos os comprimentos de onda (660nm e 780nm), também não diferiu significativamente do grupo controle. E assim como esperado, os controles positivo (PMA) e negativo (DPI) cumpriram bem as suas funções, estimulando intensamente e inibindo o complexo NADPH oxidase dos monócitos, respectivamente ( $P < 0,001$ ). Portanto, observando os resultados obtidos nesta abordagem experimental com os monócitos “primados”, pode-se concluir que a melhor dose de PBM para estimular os monócitos nestas condições a produzirem mais ROS é a de 400J/cm<sup>2</sup> operando no comprimento de onda de 660nm ( $P < 0,001$ ). As médias expressas em URL das triplicatas independentes dos grupos relatados neste experimento e a análise de variância dos dados estão representadas na Tabela 5 e na Tabela 7, respectivamente. A Figura 19B ilustra as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre cada grupo experimental.

Tabela 5 - Médias expressas em URL referentes aos grupos experimentais com monócitos não “primados” e monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com luminol).

Grupos experimentais	URL (médias)	
	Monócitos não “primados”	Monócitos “primados” com LPS
<b>Controle</b>	16709	18690
<b>Controle (+) PMA</b>	69998	83493
<b>Laser (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>, 200J/cm<sup>2</sup>)</b>	25612	30139
<b>Laser (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>, 200J/cm<sup>2</sup>)</b>	22498	27787
<b>Laser (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>, 400J/cm<sup>2</sup>)</b>	27818	42085
<b>Laser (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>, 400J/cm<sup>2</sup>)</b>	24801	38433
<b>Laser (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>, 600J/cm<sup>2</sup>)</b>	18816	16934
<b>Laser (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>, 600J/cm<sup>2</sup>)</b>	15774	16599
<b>Controle (-) DPI</b>	8698	8706

Comprimento de onda. (+) Positivo. (-) Negativo.

Fonte: Da autora.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos não “primados” (quimioluminescência com luminol).

<b>Varição</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Valor P</b>
<b>Tratamento</b>	8	7480809730	935101216	67,013	<b>0,00001</b>
<b>Bloco</b>	2	23331997	11665998	0,836	0,45151
<b>Resíduo</b>	16	223265020	13954064	—	—
<b>Total</b>	26	7727406747	—	—	—

**CV = 14,57%**

(CV) Coeficiente de variação. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios. (Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com luminol).

<b>Varição</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Valor P</b>
<b>Tratamento</b>	8	$1,190 \times 10^{10}$	1498795966	2636,33	<b>0,000001</b>
<b>Bloco</b>	2	$3,1474 \times 10^6$	1573684	2,77	0,092816
<b>Resíduo</b>	16	$9,0963 \times 10^6$	568516	—	—
<b>Total</b>	26	$1,2003 \times 10^{10}$	—	—	—

**CV = 2,4%**

(CV) Coeficiente de variação. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios. (Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

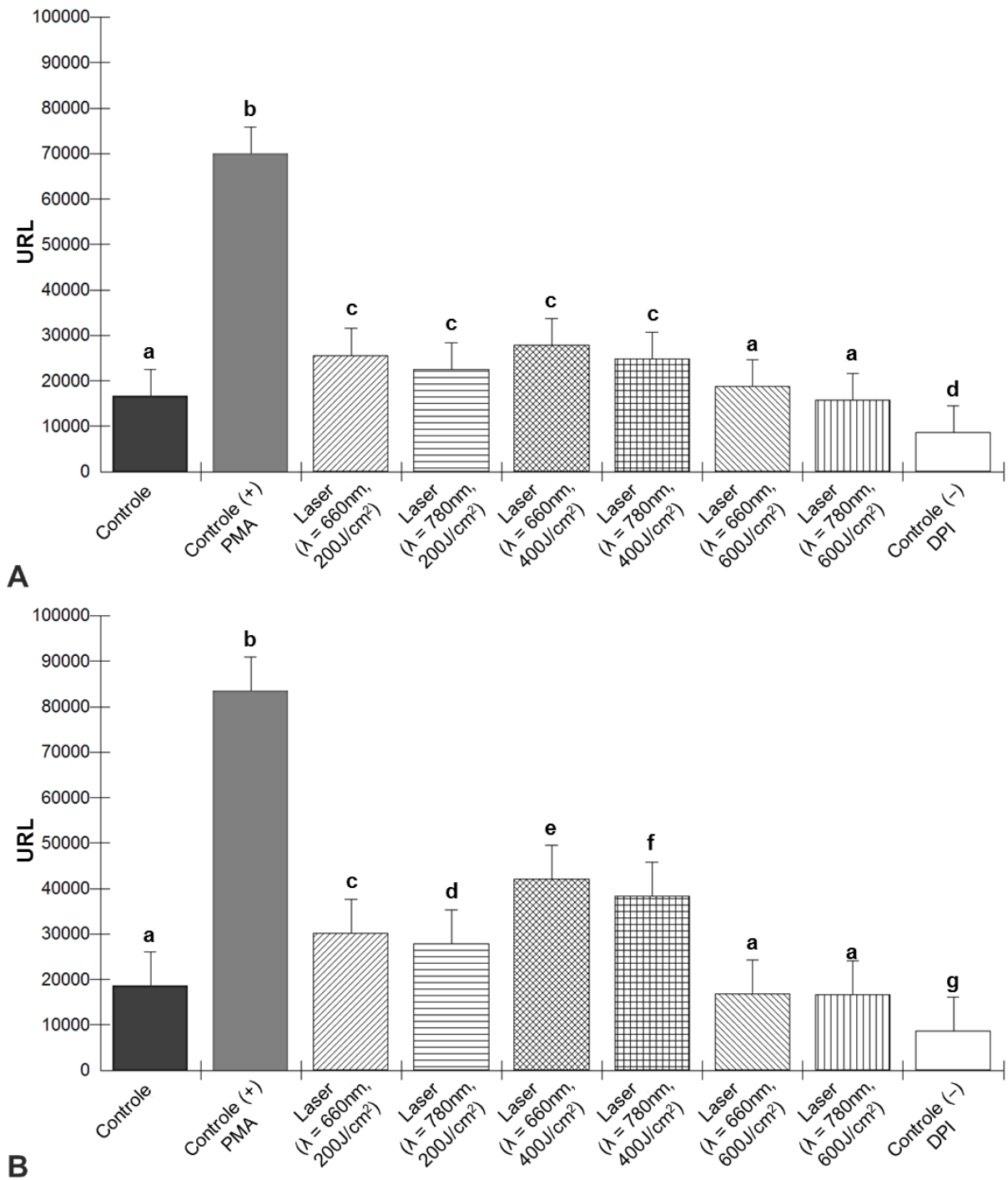


Figura 19 - ROS intracelulares e extracelulares geradas por monócitos humanos. (A) Grupos experimentais com monócitos não “primados”; (B) Grupos experimentais com monócitos “primados” com LPS.  $P < 0,001$ . Médias seguidas pela mesma letra, por experimento, não se diferem estatisticamente de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

### 5.1.2 Quimioluminescência utilizando o substrato isoluminol

A quantificação apenas das ROS extracelulares produzidas tanto por monócitos não “primados” quanto por monócitos “primados” com LPS, foi realizada mediante o ensaio de quimioluminescência e o substrato isoluminol. Sendo assim, ao avaliar os monócitos não “primados”, pôde-se constatar que a PBM foi capaz de estimular significativamente uma maior produção de ROS extracelulares considerando todos os parâmetros de irradiação empregados neste experimento [200, 400 e 600J/cm<sup>2</sup>, com ambos os comprimentos de onda (660nm e 780nm)] ( $P < 0,001$ ). Novamente foi observado que a dose de irradiação mais efetiva foi a de 400J/cm<sup>2</sup> com o comprimento de onda de 660nm, a qual obteve uma diferença estatisticamente significativa em relação a todos os outros grupos avaliados ( $P < 0,001$ ). Os controles positivo (PMA) e negativo (DPI) também apresentaram diferenças significativas em relação aos outros grupos ( $P < 0,001$ ), de modo que o PMA induziu uma produção bastante expressiva de ROS extracelulares, contrapondo-se ao DPI, o qual reduziu o perfil oxidativo dos monócitos a níveis menores do que os basais ( $P < 0,001$ ). Na Tabela 8, encontram-se as médias expressas em URL obtidas através das triplicatas independentes dos grupos avaliados neste experimento e, também, a Tabela 9 sintetiza a análise de variância desses dados. Mais didaticamente, as diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) entre os grupos experimentais abordados acima estão ilustradas na Figura 20A.

Em relação à produção de ROS extracelulares por monócitos “primados” com LPS, os resultados obtidos mostraram novamente um perfil funcional elevado destas células comparativamente aos monócitos não “primados” ( $P < 0,001$ ). Neste experimento, todos os grupos avaliados diferiram significativamente uns dos outros, com exceção apenas dos grupos irradiados com uma densidade de energia de 600J/cm<sup>2</sup>, os quais não obtiveram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes comprimentos de onda utilizados (660nm e 780nm). Enfaticamente, a dose de irradiação que mais se destacou foi a de 400J/cm<sup>2</sup> operando no comprimento de onda de 660nm ( $P < 0,001$ ). Os controles positivo (PMA) e negativo (DPI) reagiram adequadamente, proporcionando resultados de “explosão” oxidativa e de inibição a níveis inferiores aos basais, respectivamente ( $P < 0,001$ ). A Tabela 8 apresenta as médias expressas em URL das triplicatas independentes dos diferentes grupos deste experimento. Além disso, a Tabela 10 sintetiza a respectiva análise de variância dos dados e a Figura 20B ilustra as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre cada grupo experimental.

Tabela 8 - Médias expressas em URL referentes aos grupos experimentais com monócitos não “primados” e monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com isoluminol).

Grupos experimentais	URL (médias)	
	Monócitos não “primados”	Monócitos “primados” com LPS
Controle	11448	13418
Controle (+) PMA	19844	29861
Laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $200\text{J}/\text{cm}^2$ )	13177	17016
Laser ( $\lambda = 780\text{nm}$ , $200\text{J}/\text{cm}^2$ )	12114	15742
Laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	13507	21448
Laser ( $\lambda = 780\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	12528	19530
Laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $600\text{J}/\text{cm}^2$ )	13081	14783
Laser ( $\lambda = 780\text{nm}$ , $600\text{J}/\text{cm}^2$ )	12030	14438
Controle (-) DPI	6391	6517

Comprimento de onda. (+) Positivo. (-) Negativo.

Fonte: Da autora.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos não “primados” (quimioluminescência com isoluminol).

Varição	GL	SQ	QM	Fc	Valor P
Tratamento	8	282763707	35345463	18272,9	<b>0,00000001</b>
Bloco	2	49152	24576	12,7	0,00049669
Resíduo	16	30949	1934	—	—
Total	26	282843807	—	—	—

**CV = 0,35%**

(CV) Coeficiente de variação. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios.

(Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) das médias expressas em URL obtidas dos grupos experimentais com monócitos “primados” com LPS (quimioluminescência com isoluminol).

Varição	GL	SQ	QM	Fc	Valor P
Tratamento	8	982107272	122763409	7433,3	<b>0,00000001</b>
Bloco	2	248804	124402	7,5	0,0049521
Resíduo	16	264245	16515	—	—
Total	26	982620320	—	—	—

**CV = 0,76%**

(CV) Coeficiente de variação. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios.

(Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

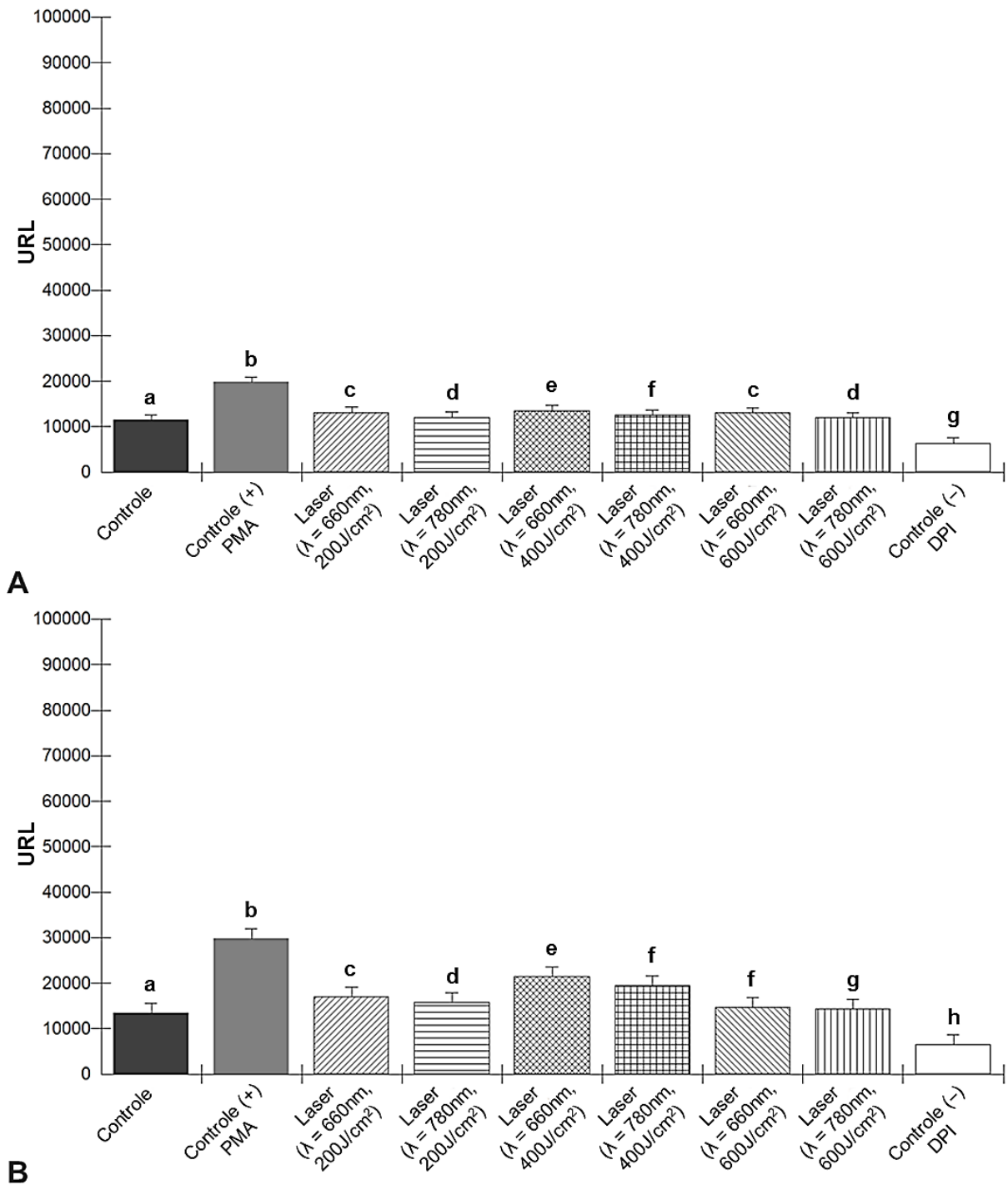


Figura 20 - ROS extracelulares geradas por monócitos humanos. (A) Grupos experimentais com monócitos não “primados”; (B) Grupos experimentais com monócitos “primados” com LPS.  $P < 0,001$ . Médias seguidas pela mesma letra, por experimento, não se diferem estatisticamente de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

Portanto, com base nos resultados obtidos através do ensaio de quimioluminescência, é possível afirmar que a PBM foi capaz de estimular significativamente o *burst* oxidativo dos monócitos humanos, mais especificamente mediante as densidades de energia de 200 e 400J/cm<sup>2</sup> operando em ambos os comprimentos de onda (660nm e 780nm) ( $P < 0,001$ ).

Porém, destaca-se a superioridade do comprimento de onda vermelho (660nm) comparativamente ao comprimento de onda infravermelho (780nm) em relação à capacidade de induzir a produção de ROS por monócitos, principalmente quando utilizada a dose de 400J/cm<sup>2</sup>. Sendo assim, os efeitos da PBM sobre a geração de ROS por monócitos humanos são dependentes tanto do comprimento de onda empregado quanto da densidade de energia aplicada.

## 5.2 Resposta fungicida dos monócitos contra *Candida albicans*

Com a identificação dos parâmetros da PBM mais efetivos na estimulação do *burst* oxidativo de monócitos humanos (400J/cm<sup>2</sup>), o “ensaio de *Killing*” contra o fungo *Candida albicans* permitiu avaliar de uma maneira prática se a PBM também é capaz de influenciar na resposta microbicida dos monócitos. Satisfatoriamente, foi possível observar que os monócitos irradiados a 400J/cm<sup>2</sup> tiveram sua capacidade fungicida significativamente elevada, especialmente aos 60 minutos de incubação, onde o comprimento de onda vermelho (660nm) apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao comprimento de onda infravermelho (780nm) e, também, em relação aos demais grupos avaliados, proporcionando um menor crescimento de UFC/mL na placa de *Petri* ( $P < 0,001$ ).

Elucidativamente, aos 20 minutos de incubação, verificou-se que os monócitos irradiados (400J/cm<sup>2</sup>) com os comprimentos de onda de 660nm e 780nm, não diferiram significativamente entre si. As médias de UFC/mL das duplicatas independentes obtidas durante este tempo de incubação estão descritas na Tabela 11 e ilustradas na Figura 21. Já aos 40 minutos, os monócitos irradiados com o comprimento de onda de 660nm obtiveram uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos “*Candida albicans*”, “*Candida albicans* + monócitos” e controle negativo (DPI) ( $P < 0,001$ ), no entanto, continuaram não diferindo significativamente daqueles irradiados com 780nm (Tabela 11 e Figura 21). Finalmente, aos 60 minutos de incubação, o grupo irradiado com comprimento de onda de 660nm se diferenciou significativamente de todos os outros grupos experimentais ( $P < 0,001$ ) (Tabela 11 e Figura 21). Em relação ao controle negativo (DPI), embora uma elevada quantidade de UFC/mL tenha sido mensurada para este grupo comparativamente ao grupo “*Candida albicans* + monócitos” (Tabela 11), diferenças estatisticamente significativas entre esses dois grupos não foram observadas em ambos os tempos de incubação.

Tabela 11 - Médias de UFC/mL mensuradas nos diferentes grupos experimentais em seus respectivos tempos de incubação ("ensaio de Killing").

Grupos experimentais	UFC/mL (médias)		
	20 min	40 min	60 min
<i>Candida albicans</i>	372500*	440000**	450000**
<i>Candida albicans</i> + monócitos	312500*	385000**	355000**
Monócitos irradiados ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	250000*	290000**	160000**
Monócitos irradiados ( $\lambda = 780\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	262500*	332500**	285000**
Controle (-)	345000*	405000**	380000**

\* $P = 0,001898$  e \*\* $P < 0,001$  de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda. (-) Negativo.

Fonte: Da autora.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) das médias de UFC/mL de *Candida albicans*.

Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor P
Tratamento	4	$1,2856 \times 10^{11}$	$3,2140 \times 10^{10}$	30,658	<b>0,001033</b>
Tempo de incubação	2	$2,0435 \times 10^{10}$	$1,0218 \times 10^{10}$	75,221	<b>0,0000001</b>
Tratamento x tempo de incubação	8	$1,8457 \times 10^{10}$	$2,3071 \times 10^6$	16,985	<b>0,0000071</b>
CV 1 = 9,66 %					
CV 2 = 3,48 %					

(CV) Coeficiente de variação. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios.

(Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

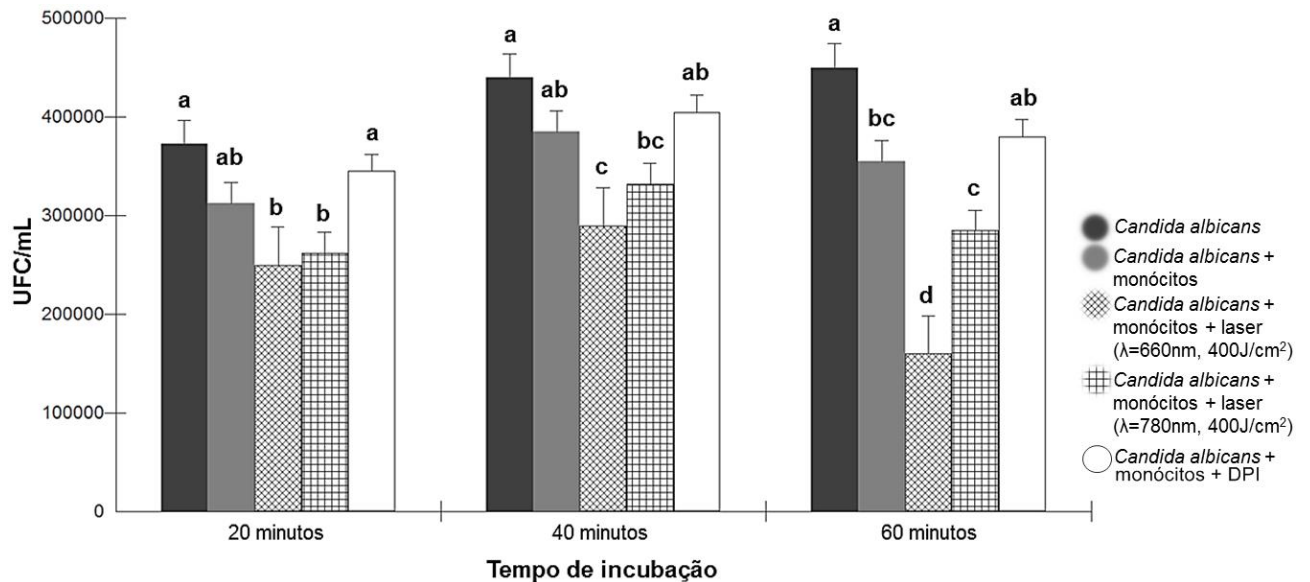


Figura 21 - Médias de UFC/mL de *Candida albicans*.  $P < 0,001$ . Médias seguidas pela mesma letra, por tempo de incubação, não se diferem estatisticamente de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

Interessantemente, a análise de variância dos grupos mostrou uma interação estatisticamente significativa entre “tratamento” e tempo de incubação ( $P < 0,001$ ), conforme é possível verificar nas Tabelas 12, 13 e 14 e, ilustrativamente, na Figura 22. Sendo assim, quando avaliado apenas o grupo “*Candida albicans*”, foi possível observar que a média de UFC/mL obtida no tempo de incubação de 20 minutos diferiu significativamente dos tempos sequenciais de 40 e 60 minutos ( $P < 0,001$ ), porém, entre esses dois últimos tempos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Quantitativamente neste grupo experimental, pôde-se notar um maior crescimento de UFC/mL de *Candida albicans* com o passar do tempo de incubação (Tabela 13 e Figura 22). Em acórdância, o grupo “*Candida albicans* + monócitos” também apresentou no tempo de incubação de 20 minutos uma diferença estatisticamente significativa quando comparado aos tempos de 40 e 60 minutos ( $P < 0,001$ ), sem evidenciar diferenças significativas entre esses dois últimos tempos.

Contrapondo-se aos demais grupos experimentais, o grupo com monócitos irradiados a  $400\text{J}/\text{cm}^2$  com comprimento de onda de 660nm obteve diferenças estatisticamente significativas entre todos os tempos de incubação ( $P < 0,001$ ), de modo que um menor crescimento de UFC/mL de *Candida albicans* foi observado aos 60 minutos de incubação. Já no grupo com monócitos irradiados a  $400\text{J}/\text{cm}^2$  com comprimento de onda de 780nm, foi verificado que a média de UFC/mL referente ao tempo de incubação de 20 minutos diferiu significativamente apenas do tempo de 40 minutos ( $P < 0,001$ ). E semelhantemente ao grupo “*Candida albicans*”, o grupo controle negativo (DPI) apresentou uma média de UFC/mL obtida mediante o tempo de incubação de 20 minutos significativamente diferente das médias referentes aos tempos de 40 e 60 minutos e, também, sem demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre esses dois últimos tempos de incubação. Além disso, neste grupo experimental foi observada uma quantidade crescente de UFC/mL de *Candida albicans* com o decorrer do tempo de incubação. A Figura 23 ilustra a quantidade de UFC/mL de *Candida albicans* que cresceram nas placas de *Petri* de todos os grupos durante os diferentes tempos de incubação.

Tabela 13 - Desdobrando a interação estatisticamente significativa entre tratamento e tempo de incubação: análise de variância (ANOVA) do tratamento dentro de cada nível de tempo de incubação.

Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor P
<b>Tratamento: tempo (20 minutos)</b>	4	2,1965 x 10 <sup>10</sup>	5,49125 x 10 <sup>9</sup>	12,480114	<b>0,001898</b>
<b>Tratamento: tempo (40 minutos)</b>	4	2,831 x 10 <sup>10</sup>	7,0775 x 10 <sup>9</sup>	16,085227	<b>0,000825</b>
<b>Tratamento: tempo (60 minutos)</b>	4	9,674 x 10 <sup>10</sup>	2,4185 x 10 <sup>10</sup>	54,965909	<b>0,000011</b>
<b>Erro combinado</b>	7,67	3374650840	4,4 x 10 <sup>8</sup>	—	—

(GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios. (Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

Tabela 14 - Desdobrando a interação estatisticamente significativa entre tratamento e tempo de incubação: análise de variância (ANOVA) do tempo de incubação dentro de cada nível de tratamento.

Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor P
<b>Tempo: <i>Candida albicans</i></b>	2	7108333333	3554166667	26,165644	<b>0,000106</b>
<b>Tempo: <i>Candida albicans</i> + monócitos</b>	2	5308333333	2654166667	19,539877	<b>0,000351</b>
<b>Tempo: monócitos irradiados (<math>\lambda = 660\text{nm}</math>, 400J/cm<sup>2</sup>)</b>	2	17733333333	8866666667	65,276074	<b>0,001492</b>
<b>Tempo: monócitos irradiados (<math>\lambda = 780\text{nm}</math>, 400J/cm<sup>2</sup>)</b>	2	5108333333	2554166667	18,803681	<b>0,000002</b>
<b>Tempo: Controle (-)</b>	2	3633333333	1816666667	13,374233	<b>0,001492</b>
<b>Erro combinado</b>	10	1358333333	135833333	—	—

( $\lambda$ ) Comprimento de onda. (-) Negativo. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios. (Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

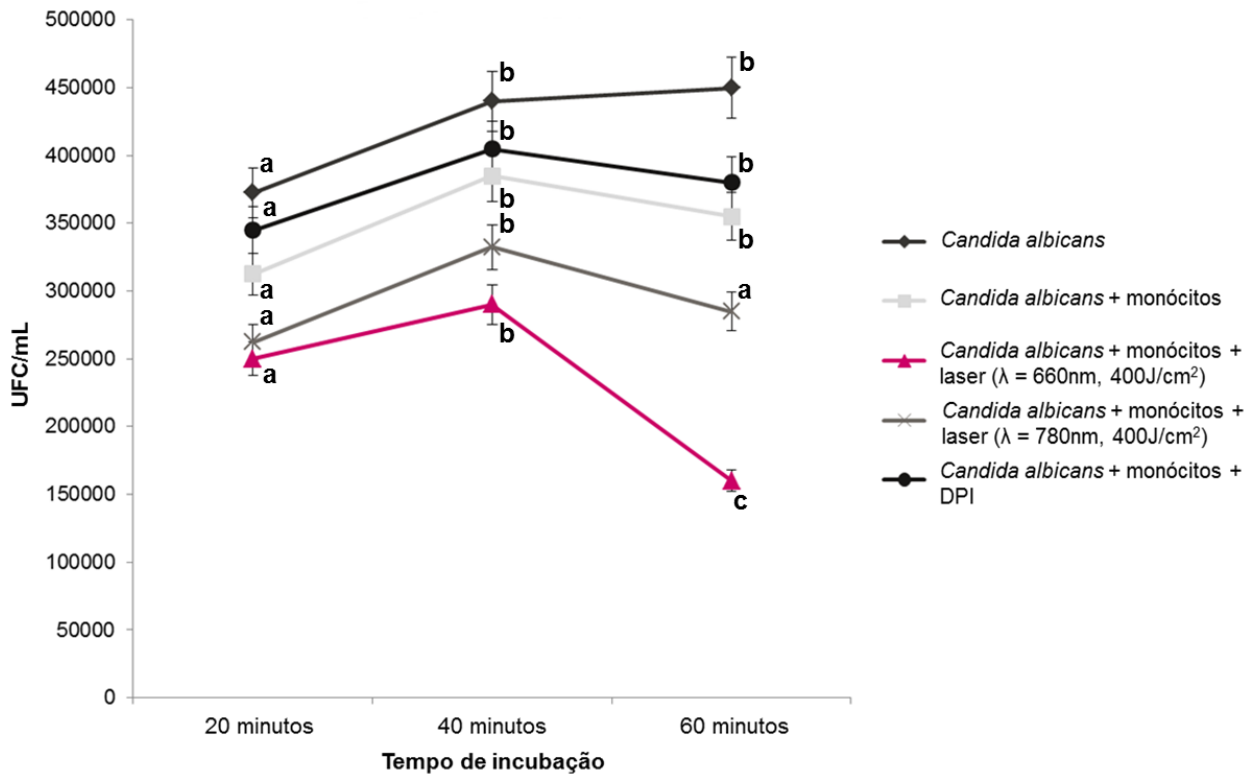


Figura 22 - Interação estatisticamente significativa entre tratamento e tempo de incubação.  $P < 0,001$  de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

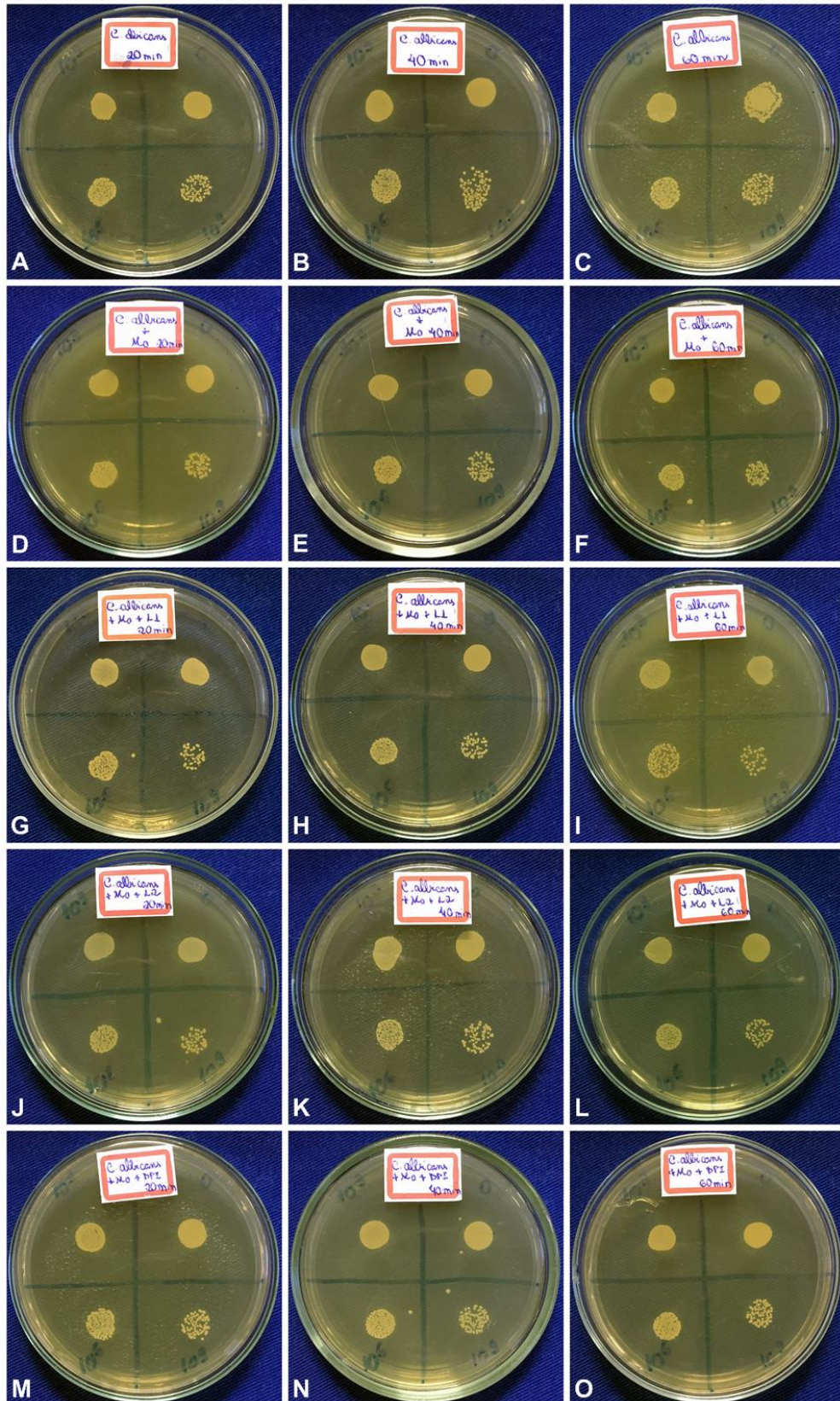


Figura 23 - UFC/mL de *Candida albicans* que cresceram nas placas de Petri referentes aos diferentes grupos experimentais em seus respectivos tempos de incubação. (A) *C. albicans* 20 min (B) 40 min (C) 60 min; (D) *C. albicans* + monócitos 20 min (E) 40 min (F) 60 min; (G) *C. albicans* + monócitos irradiados ( $\lambda = 660\text{nm}$ ,  $400\text{J}/\text{cm}^2$ ) 20 min (H) 40 min (I) 60 min; (J) *C. albicans* + monócitos irradiados ( $\lambda = 780\text{nm}$ ,  $400\text{J}/\text{cm}^2$ ) 20 min (K) 40 min (L) 60 min; (M) *C. albicans* + monócitos + DPI 20 min (N) 40 min (O) 60 min.

Fonte: Da autora.

### 5.3 Viabilidade celular dos monócitos após a irradiação laser

Através do método de exclusão utilizando o reagente azul de *Trypan* foi possível determinar a viabilidade celular dos monócitos imediatamente após e nos dias subsequentes à irradiação laser. Assim como esperado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e irradiados (comprimento de onda de 660nm e densidade de energia de 400J/cm<sup>2</sup>) em todos os tempos avaliados (0, 24 e 48 horas) ( $P = 0,99248$ ), indicando que a dose de irradiação empregada neste experimento não gerou danos à sobrevivência dos monócitos. Os dados obtidos estão descritos nas Tabelas 15 e 16, e ilustrados na Figura 24.

Tabela 15 - Médias de viabilidade celular dos monócitos após a irradiação laser determinadas pelo reagente azul de *Trypan*.

Grupos experimentais	Viabilidade celular (%)		
	0 hora	24 horas	48 horas
Monócitos (controle)*	100%	82,3%	73,6%
Monócitos irradiados ( $\lambda = 660\text{nm}$ , 400J/cm <sup>2</sup> )*	100%	80,5%	75,7%

$P = 0,99248$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e irradiados de acordo com a análise de variância ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) das médias de viabilidade celular dos monócitos após a irradiação laser.

Variação	GL	SQ	QM	Fc	Valor P
Tratamento	1	0,000005	0,000005	0,0001	<b>0,99248</b>
Tempo	2	0,014347	0,007173	3,7790	<b>0,06991</b>
Tratamento x tempo	2	0,002145	0,001072	0,5649	<b>0,58953</b>
<b>CV 1 = 26,74 %</b>					
<b>CV 2 = 5,11 %</b>					

(CV) Coeficiente de variação. (GL) Graus de liberdade. (SQ) Soma de quadrados. (QM) Quadrados médios. (Fc) F calculado.

Fonte: Da autora.

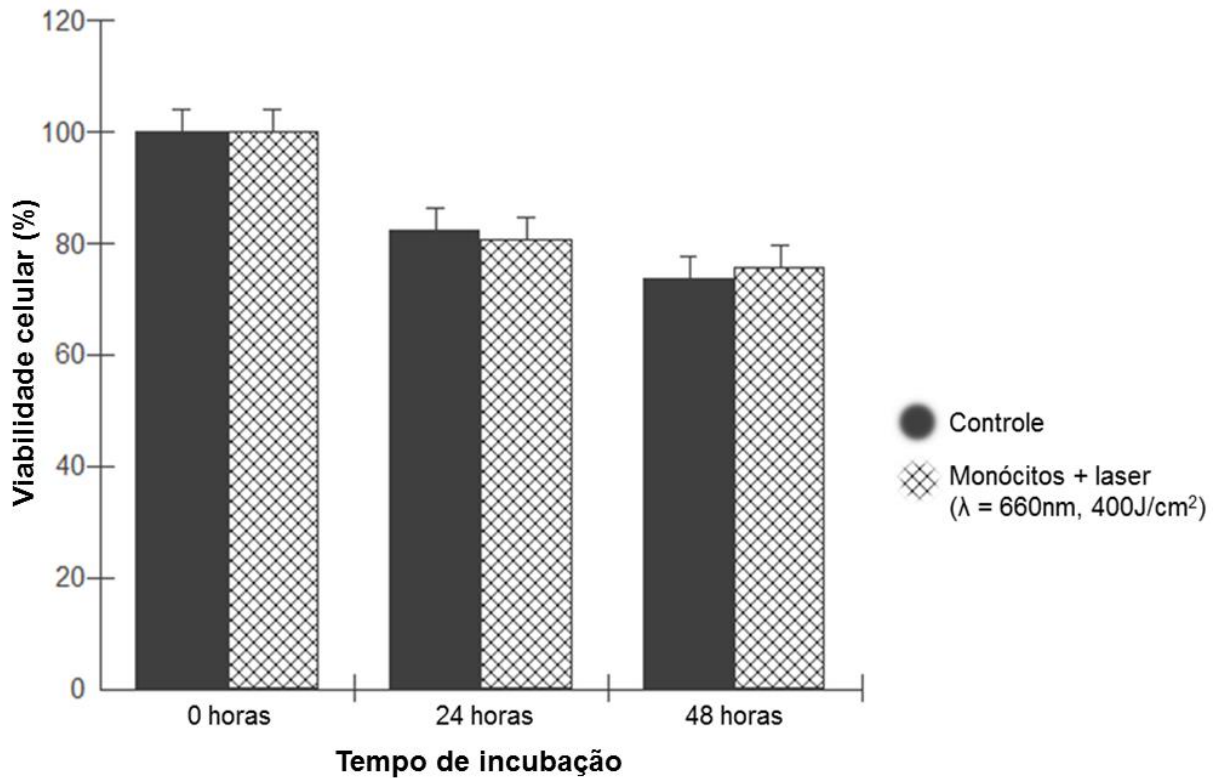


Figura 24 - Viabilidade celular determinada pelo método de exclusão utilizando o reagente azul de *Trypan*.  $P = 0,99248$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e irradiados de acordo com a análise de variância ao nível de significância de 5%. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

#### 5.4 Diferenciação dos monócitos em macrófagos e análise da expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 em nível de RNA mensageiro (mRNA)

##### 5.4.1 Morfologia das células

O processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos pôde ser observado pela mudança na morfologia das células ao longo das 72 horas de experimento. Sendo assim, as imagens obtidas por microscopia invertida em contraste de fase mostraram diferenças entre o grupo controle (apenas monócitos) e os demais grupos avaliados. No tempo referente à 0 hora, as células de todos os grupos apresentaram a morfologia arredondada típica dos monócitos. Destaca-se que imediatamente após a realização da irradiação laser, não foram observadas alterações morfológicas nas células dos grupos que a receberam. No grupo controle, as células continuaram a exibir o padrão morfológico arredondado em todos os tempos de incubação avaliados (24, 48 e 72 horas) (Figura 25A, C, E, G); no entanto, foi possível observar que no tempo de 72 horas, algumas células começaram a apresentar uma

discreta mudança em sua morfologia, mostrando-se mais “achatadas” do que anteriormente e exibindo pequenos prolongamentos (Figura 25G).

Interessantemente, ao comparar as células do grupo “monócitos + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ ,  $400\text{J}/\text{cm}^2$ )” às células do grupo controle, foi possível sugerir uma aceleração no processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos mediada pela PBM. Neste grupo, no tempo de incubação de 24 horas, foram observadas numerosas células que perderam a morfologia arredondada e tornaram-se alongadas/ fusiformes, além de bem aderidas ao fundo da placa de cultivo (Figura 25D); nos tempos subsequentes (48 e 72 horas), essas células alongadas aumentaram em número e tornaram-se maiores, adotando a morfologia típica de macrófagos (Figura 25F, H).

Em relação ao grupo “monócitos + LPS”, também foi possível observar às 24 horas de incubação, várias células alongadas/ fusiformes e estrelárias (Figura 26C); às 48 e às 72 horas, essas células alongadas aumentaram em número e tamanho (Figura 26E, G). Comparativamente, o grupo “monócitos + LPS + laser”, também apresentou células com alteração morfológica no tempo de 24 horas, porém, subjetivamente, verificou-se uma maior proporção de células alongadas neste grupo irradiado do que no grupo “monócitos + LPS” (Figura 26D); nos tempos de 48 e 72 horas, o processo de diferenciação em macrófagos prosseguiu e as células mostraram-se bem aderidas ao fundo da placa (Figura 26F, H).

Nos grupos em que a *Candida albicans* estava presente (“monócitos + *Candida albicans*” e “monócitos + *Candida albicans* + laser”), discretas células alongadas/ fusiformes puderam ser visualizadas em meio às hifas do fungo, principalmente nos tempos de incubação de 48 e 72 horas (Figura 27). Finalmente, no grupo “monócitos + PMA + M-CSF”, as células mostraram-se bem aderidas desde a adição do PMA; às 48 horas de incubação, a alteração na morfologia de algumas células foi notada e às 72 horas, o padrão morfológico característico de macrófagos pôde ser observado (Figura 28). Vale ressaltar que ao final do experimento, em todos os grupos que receberam estímulos, uma grande proporção de células permaneceu com o aspecto morfológico arredondado dos monócitos. Além disso, é importante destacar que o padrão de diferenciação celular de cada grupo avaliado manteve-se uniforme nas 3 réplicas experimentais.

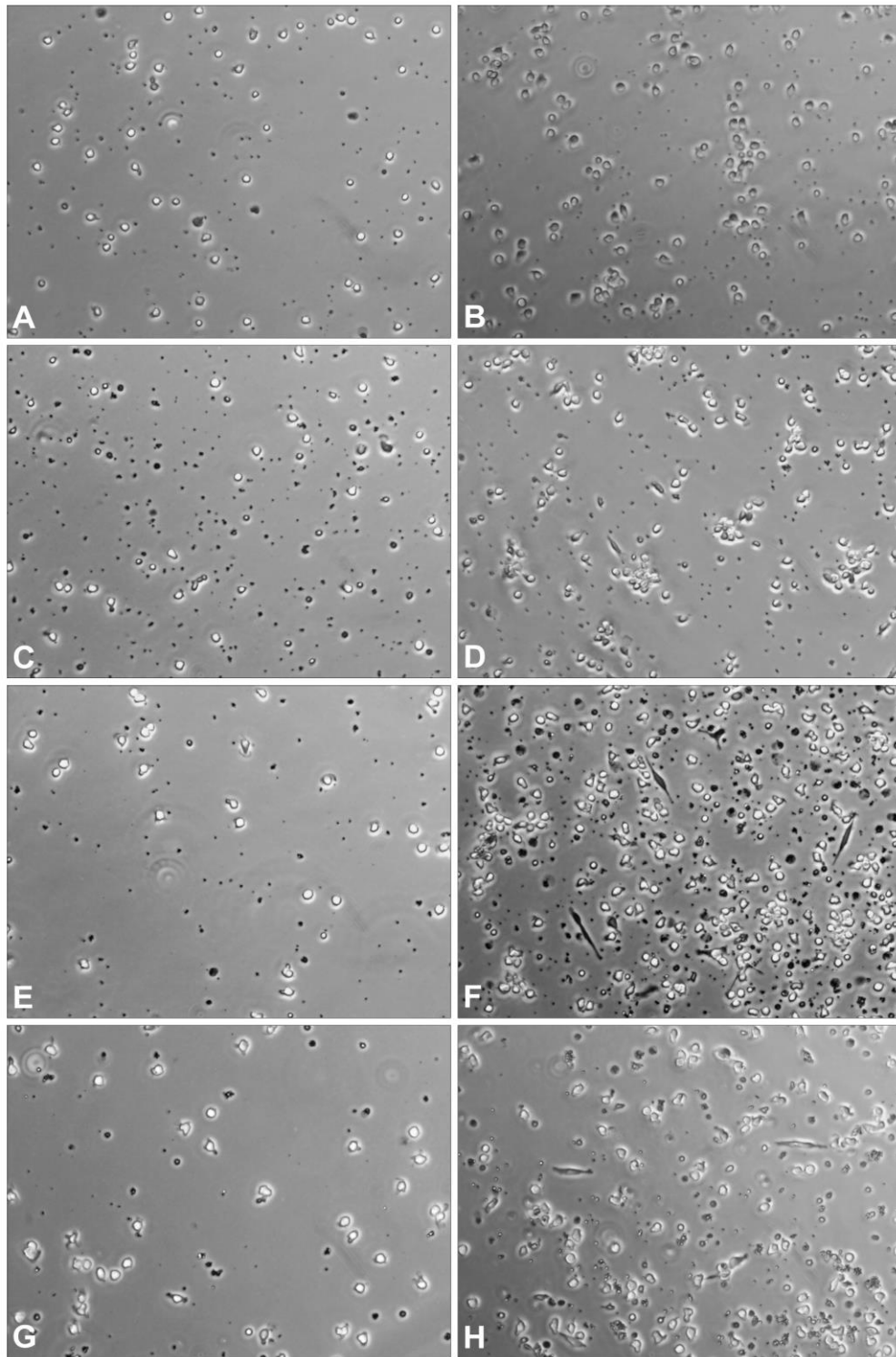


Figura 25 - Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos versus monócitos + laser). (A) Monócitos: 0 hora; (B) Monócitos + laser: 0 hora; (C) Monócitos: 24 horas; (D) Monócitos + laser: 24 horas; (E) Monócitos: 48 horas; (F) Monócitos + laser: 48 horas; (G) Monócitos: 72 horas; (H) Monócitos + laser: 72 horas.

Nota: Imagens obtidas por microscopia invertida em contraste de fase (400X).

Fonte: Da autora.

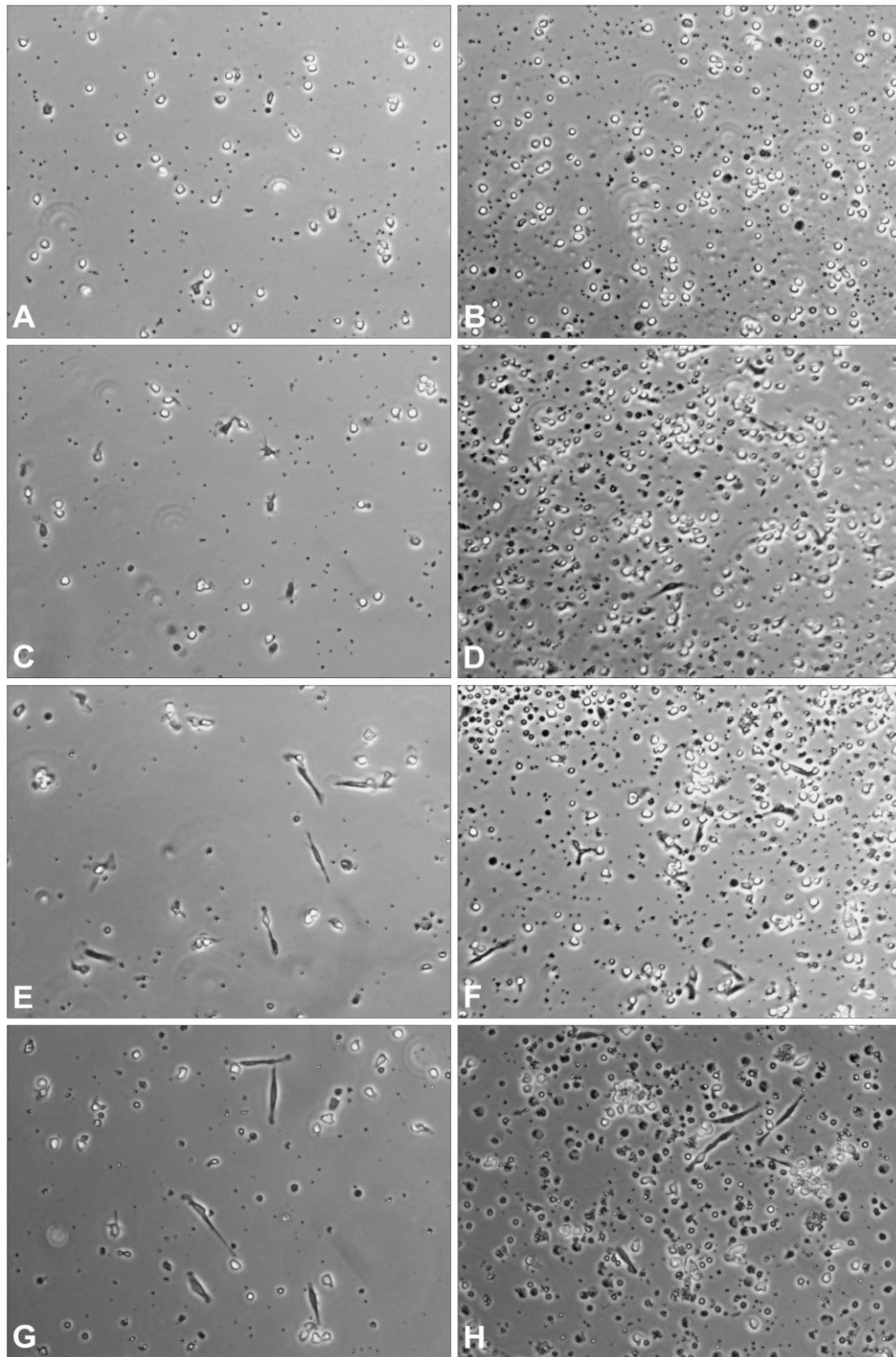


Figura 26 - Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos + LPS versus monócitos + LPS + laser). (A) Monócitos + LPS: 0 hora; (B) Monócitos + LPS + laser: 0 hora; (C) Monócitos + LPS: 24 horas; (D) Monócitos + LPS + laser: 24 horas; (E) Monócitos + LPS: 48 horas; (F) Monócitos + LPS + laser: 48 horas; (G) Monócitos + LPS: 72 horas; (H) Monócitos + LPS + laser: 72 horas.

Nota: Imagens obtidas por microscopia invertida em contraste de fase (400X).

Fonte: Da autora.

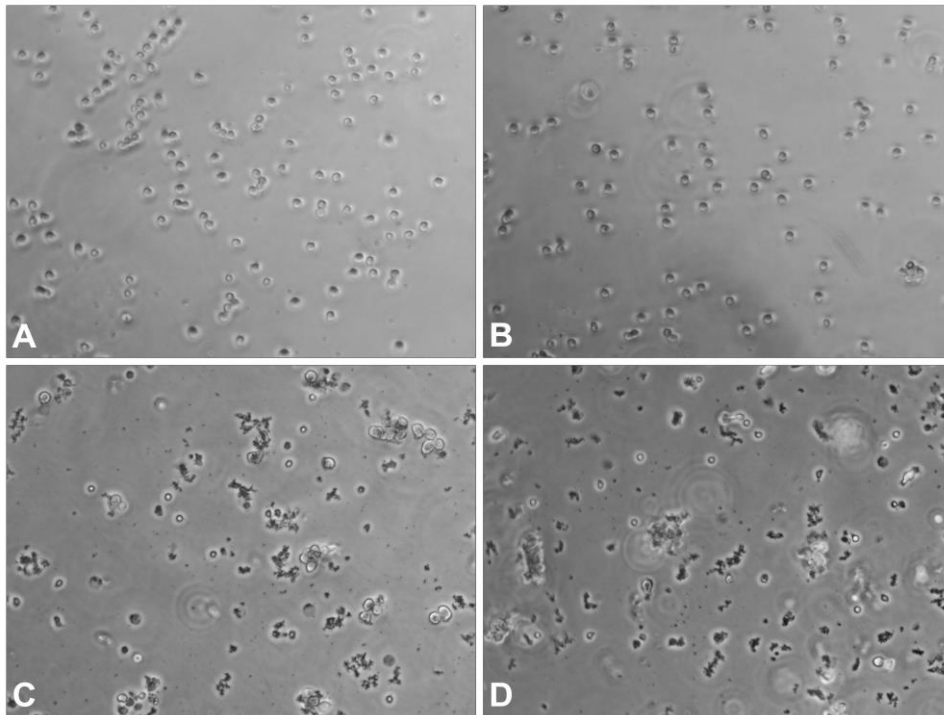


Figura 27 - Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos + *C. albicans* versus monócitos + *C. albicans* + laser). (A) Monócitos + *C. albicans*: 0 hora; (B) Monócitos + *C. albicans* + laser: 0 hora; (C) Monócitos + *C. albicans*: 72 horas; (D) Monócitos + *C. albicans* + laser: 72 horas.

Nota: Imagens obtidas por microscopia invertida em contraste de fase (400X).

Fonte: Da autora.

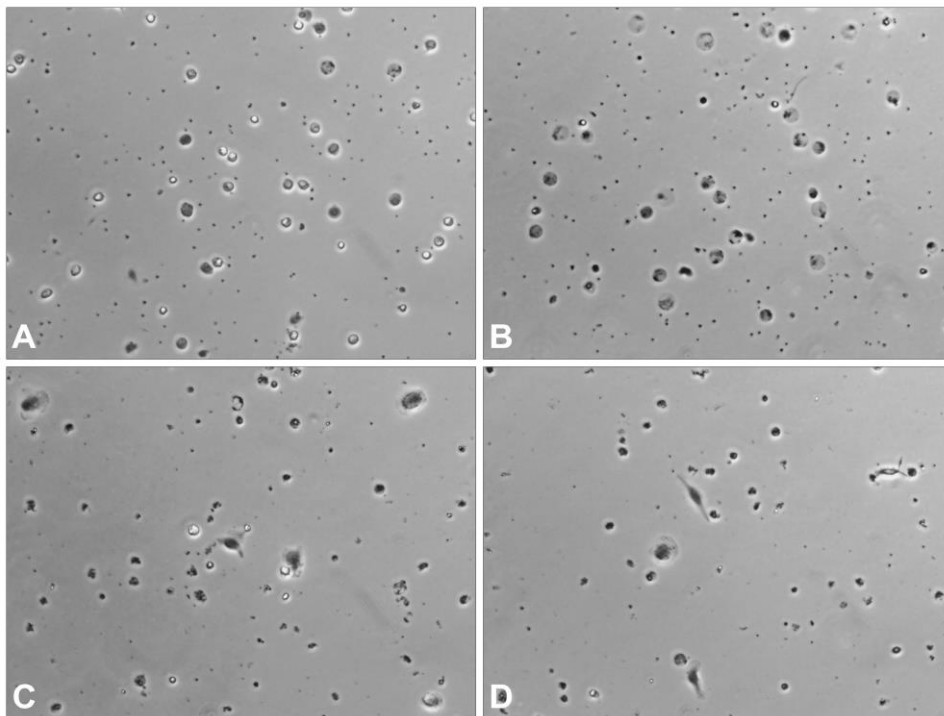


Figura 28 - Aspecto morfológico observado durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos (monócitos + PMA + M-CSF). (A) 0 hora; (B) 24 horas; (C) 48 horas; (D) 72 horas.

Nota: Imagens obtidas por microscopia invertida em contraste de fase (400X).

Fonte: Da autora.

#### 5.4.2 Expressão gênica dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163 e CD204 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos

A diferenciação dos monócitos oriundos do sangue periférico humano em macrófagos foi confirmada pela expressão gênica de CD68, CD80, CD163 e CD204 em nível de mRNA. O CD68 é expresso em células de linhagem mieloide, especificamente em monócitos e macrófagos. Já o CD80 é um marcador de M1; em contraste, CD163 e CD204 são marcadores específicos de M2 (DING et al., 2012; JAGUIN et al., 2013). Sendo assim, as médias de expressão relativa de cada gene mencionado foram calculadas através do método  $2^{-\Delta Ct}$  para todos os grupos experimentais após a realização da PCR em tempo real. Os dados obtidos estão representados na Tabela 17 e ilustrados na Figura 29.

Tabela 17 - Médias de abundância relativa de mRNA dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163 e CD204 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos.

Grupos experimentais	Abundância relativa de mRNA			
	CD68	CD80	CD163	CD204
Monócitos (controle)	5,02277	0,00170	0,10800	0,00512
Monócitos + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	4,97073	0,00258	0,07467	0,00472
Monócitos + LPS (controle M1)	3,67303	0,01228	0,01533	0,00228
Monócitos + LPS + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	3,04917	0,00983	0,00967	0,00117
Monócitos + <i>Candida albicans</i>	1,77420	0,01257	0,18900	0,00720
Monócitos + <i>Candida albicans</i> + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	1,61535	0,01658	0,18950	0,00142
Monócitos + PMA + M-CSF (controle M2)	2,06833	0,00009	0,01767	0,01979

Nota: A abundância relativa de mRNA foi calculada através do método  $2^{-\Delta Ct}$ , sendo utilizado como controle endógeno o gene GAPDH. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

Mediante a análise da expressão de CD68, foi possível comprovar a origem mieloide em todos os grupos avaliados (Figura 29A). Primeiramente, diferiram-se significativamente do grupo controle (apenas monócitos) os seguintes grupos: “monócitos + *Candida albicans*” ( $P = 0,0212$ ); “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P = 0,0071$ ); e “monócitos + PMA + M-CSF” ( $P = 0,0111$ ). Nessas comparações estatisticamente significativas, o grupo controle exibiu uma maior expressão de CD68. Similarmente, o grupo “monócitos + laser” também diferiu-se significativamente dos grupos “monócitos + *Candida albicans*” ( $P = 0,0252$ ); “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P = 0,0086$ ); e “monócitos + PMA + M-CSF” ( $P = 0,0136$ ), apresentando um maior nível de expressão de CD68. Não foram encontradas outras diferenças estatisticamente significativas referentes ao CD68.

Em relação à expressão de CD80, a presença de M1 pôde ser identificada em todos os grupos experimentais. Todavia, destaca-se que no grupo “monócitos + PMA + M-CSF”, a expressão de CD80 foi bastante inexpressiva (média de abundância relativa de mRNA igual a  $0,00009 \pm 0,0000481$ ) (Figura 29B). Este grupo experimental [monócitos + PMA + M-CSF (controle M2)] obteve diferença estatisticamente significativa dos seguintes grupos: “monócitos + LPS” (controle M1) ( $P = 0,0047$ ); “monócitos + LPS + laser” ( $P = 0,0090$ ); “monócitos + *Candida albicans*” ( $P = 0,0150$ ); e “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P = 0,0150$ ). Diferença significativa entre o grupo “monócitos” (controle) e o grupo “monócitos + LPS” (controle M1) também foi encontrada ( $P = 0,0422$ ), com o grupo contendo LPS expressando mais CD80.

Interessantemente, na abordagem relacionada ao gene CD163 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados ( $P = 0,1428$ ) (Figura 29C). No entanto, foi possível detectar a expressão desse gene em todos os grupos experimentais, sugerindo a presença de M2. Deste modo, outro marcador de superfície de M2, o gene CD204, foi investigado. Assim como esperado, o grupo “monócitos + PMA + M-CSF” (controle M2) foi o que exibiu a maior expressão de CD204, diferindo-se significativamente dos grupos “monócitos + LPS + laser” ( $P = 0,0011$ ) e “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P = 0,0058$ ) (Figura 29D). Como não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos “monócitos + LPS”, “monócitos + *Candida albicans*” e o grupo “monócitos + PMA + M-CSF” (controle M2), é possível indicar que o laser agiu como um fator significativo na distinção entre esses grupos e o controle M2, uma vez que as suas contrapartes irradiadas apresentaram diferenças significativas em relação ao controle M2 ( $P < 0,01$ ), expressando menos CD204. Além disso, o grupo “monócitos + LPS + laser” também diferiu-se significativamente dos grupos “monócitos” (controle) ( $P < 0,0422$ ) e “monócitos + laser” ( $P < 0,0354$ ), mostrando uma menor expressão de CD204.

Por conseguinte, a partir da análise da expressão gênica desses marcadores de superfície de macrófagos (CD68, CD80, CD163 e CD204) foi possível comprovar que as células estudadas realmente eram de linhagem mielóide e identificar uma população mista (M1 e M2) em todos os grupos avaliados, no entanto, com proporções distintas dependendo do estímulo empregado. Sendo assim, é possível sugerir que diante à estímulos específicos ocorrerá a predominância de uma população M1 ou M2. A fim de caracterizar a população de macrófagos presentes nas amostras, a abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, e da enzima SOD1 foi avaliada.

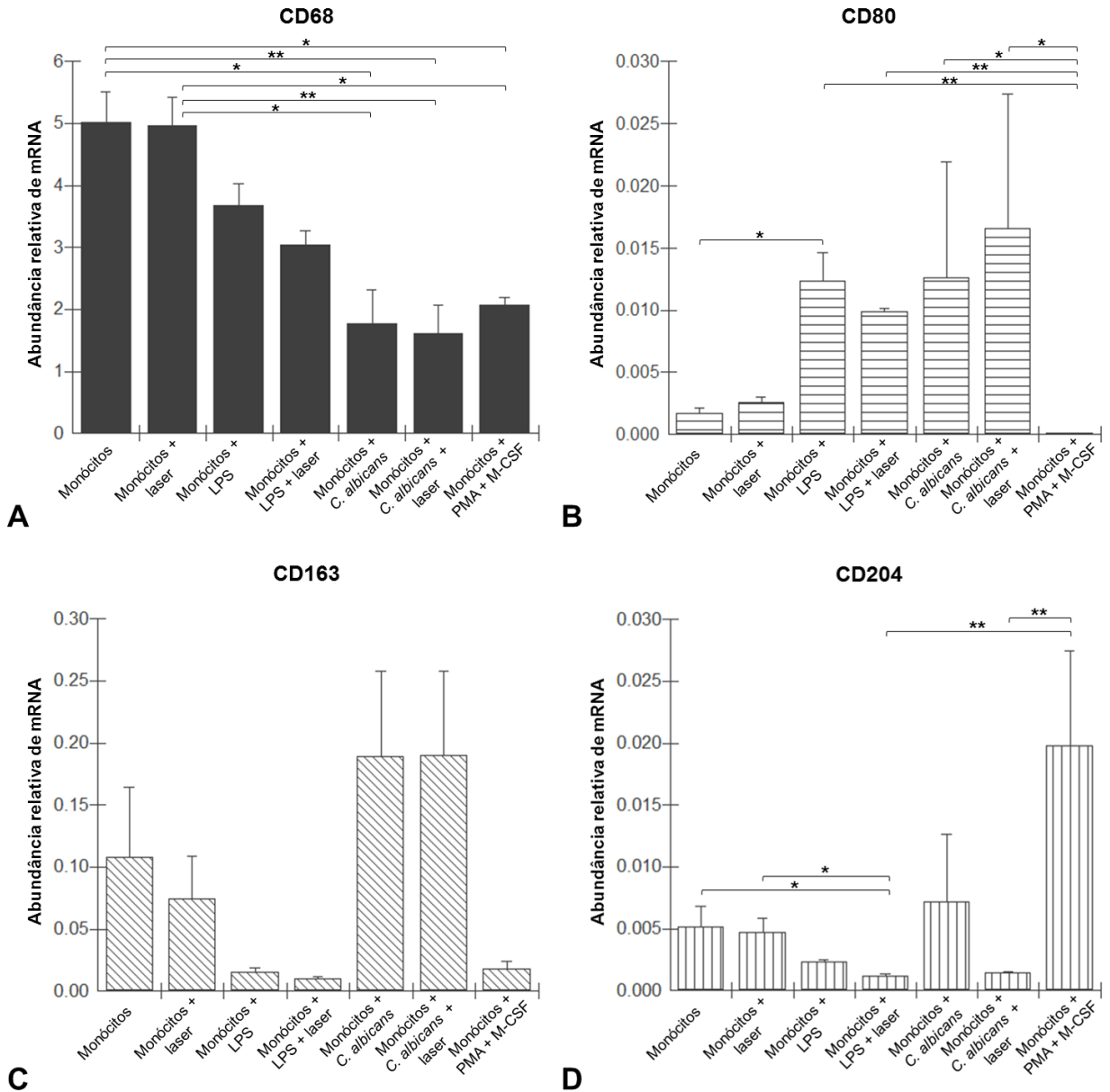


Figura 29 - Abundância relativa de mRNA dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163 e CD204 em macrófagos derivados de monócitos humanos após 72 horas de isolamento do sangue periférico, tratamentos e incubação. Os dados (média ± EPM) foram determinados por PCR em tempo real e a abundância relativa de mRNA foi calculada através do método  $2^{-\Delta Ct}$ . GAPDH foi utilizado como controle endógeno. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  de acordo com o Kruskal-Wallis e pós-teste de Newman-Keuls ao nível de significância de 5%.

Fonte: Da autora.

### 5.4.3 Abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-10, e da enzima SOD1 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos

As citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  têm sido associadas a M1; distintamente, IL-10 associa-se a M2. Já SOD1 relaciona-se com a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, característica de M1 (DULUC et al., 2007; RÖSZER, 2015). Sendo assim, o perfil funcional desencadeado por diferentes estímulos em macrófagos derivados de monócitos humanos foi investigado através da análise de expressão de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, e da enzima SOD1. Os dados obtidos estão representados na Tabela 18 e ilustrados na Figura 30.

Tabela 18 - Médias de abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, e da enzima SOD1 em macrófagos derivados de monócitos humanos sob diferentes estímulos.

Grupos experimentais	Abundância relativa de mRNA			
	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-10	SOD1
Monócitos (controle)	0,00175	0,11000	0,00863	0,21667
Monócitos + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	0,00169	0,27000	0,00940	0,23333
Monócitos + LPS (controle M1)	0,27740	0,25667	0,01007	0,19668
Monócitos + LPS + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	0,54114	0,30333	0,01520	0,12667
Monócitos + <i>Candida albicans</i>	2,76342	0,26500	0,25095	0,13500
Monócitos + <i>Candida albicans</i> + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , $400\text{J}/\text{cm}^2$ )	3,14531	0,33000	0,39530	0,17000
Monócitos + PMA + M-CSF (controle M2)	0,00502	0,15000	0,00313	0,23333

Nota: A abundância relativa de mRNA foi calculada através do método  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , sendo utilizado como controle endógeno o gene GAPDH. ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

A citocina IL-6 exibiu maior expressão nos grupos que receberam LPS (“monócitos + LPS” e “monócitos + LPS + laser”) e, principalmente, nos grupos que receberam *Candida albicans* (“monócitos + *Candida albicans*” e “monócitos + *Candida albicans* + laser”) (Figura 30A). Comparativamente ao grupo controle (apenas monócitos), os seguintes grupos diferiram significativamente: “monócitos + LPS + laser” ( $P = 0,0354$ ); “monócitos + *Candida albicans*” ( $P = 0,0086$ ); e “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P = 0,0086$ ). O grupo “Monócitos + laser” também apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado aos grupos “monócitos + *Candida albicans*” ( $P = 0,0212$ ); e “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P = 0,0212$ ). Além disso, esses 2 últimos grupos diferiram-se do controle M2 (monócitos + PMA + M-CSF) ( $P = 0,0179$  para ambos).

Avaliando-se TNF- $\alpha$ , foi possível observar que todos os grupos experimentais o expressaram (Figura 30B). Nesta análise, o grupo “monócitos + laser” se destacou,

apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos controle (apenas monócitos) ( $P = 0,0302$ ) e “monócitos + PMA + M-CSF” (controle M2) ( $P = 0,0246$ ), e sugerindo que o laser foi capaz de aumentar a expressão de TNF- $\alpha$ . Adicionalmente, o grupo “monócitos + LPS + laser” também diferiu-se significativamente do controle M2 ( $P = 0,0090$ ).

Notavelmente, a expressão de IL-10 foi maior nos grupos contendo *Candida albicans* (“monócitos + *Candida albicans*” e “monócitos + *Candida albicans* + laser”) e bastante discreta nos demais grupos (Figura 30C). Vale destacar, que maiores níveis de expressão de IL-6 foram observados nesses grupos, sugerindo a predominância do perfil funcional de M1. Tanto o grupo “monócitos + *Candida albicans*” quanto o grupo “monócitos + *Candida albicans* + laser” diferiram-se significativamente dos grupos controle (apenas monócitos) ( $P = 0,0410$  para ambos) e “monócitos + PMA + M-CSF” (controle M2) ( $P = 0,0058$  para ambos). Finalmente, a SOD1 não apresentou diferenças significativas entre os grupos ( $P = 0,3925$ ) (Figura 30D).

Portanto, a abundância relativa de mRNA da citocina IL-6 nos macrófagos estudados indicou um perfil funcional de M1 para os grupos “monócitos + LPS”, “monócitos + LPS + laser”, “monócitos + *Candida albicans*” e “monócitos + *Candida albicans* + laser”. TNF- $\alpha$  mostrou-se expressa em todos os grupos, porém, interessante, destacou uma diferença significativa entre os grupos “monócitos” e “monócitos + laser”. Já IL-10 nos mostrou uma alta expressão nos grupos contendo *Candida albicans*, porém, com predomínio de IL-6.

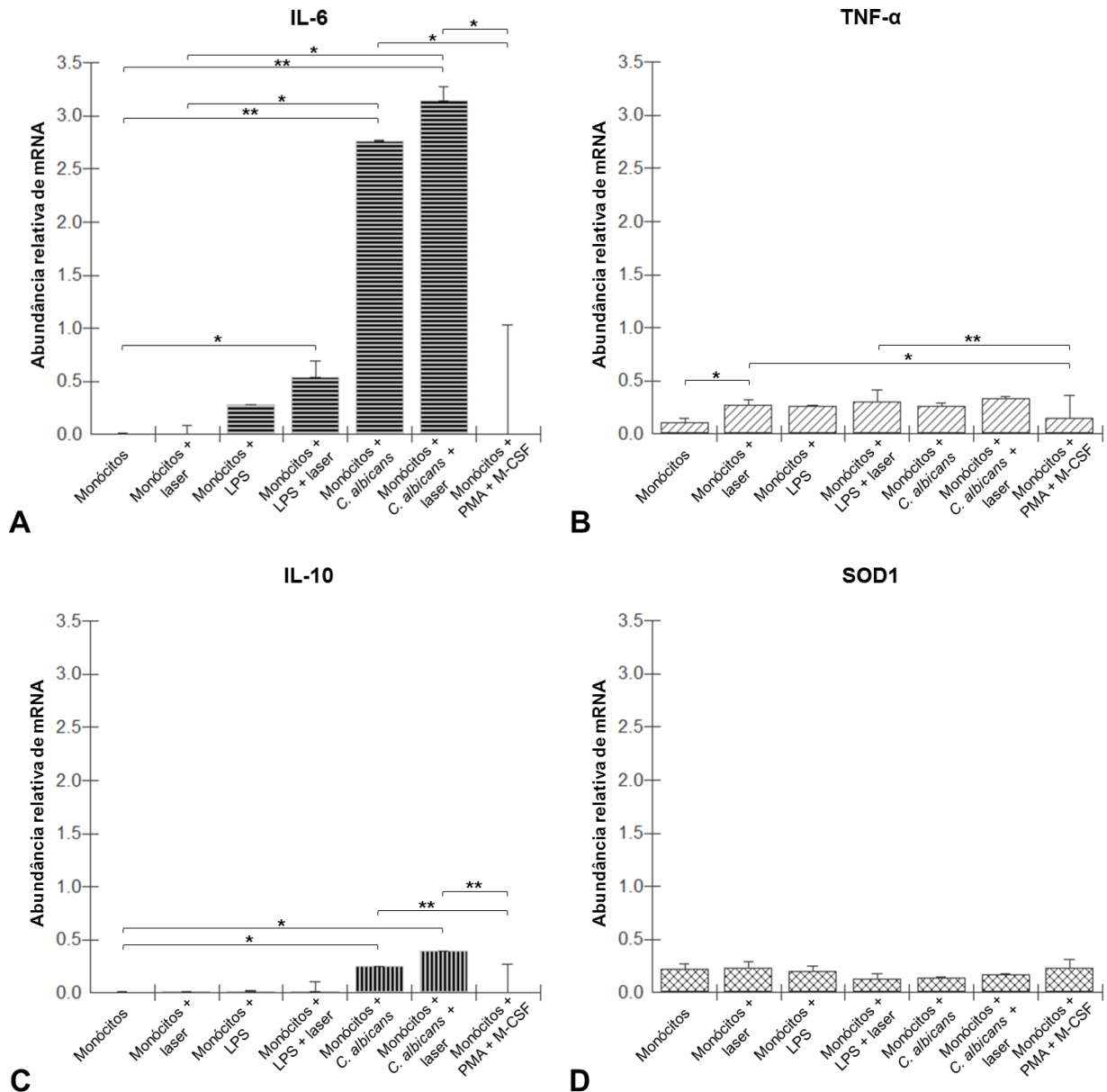


Figura 30 - Abundância relativa de mRNA das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, e da enzima SOD1 em macrófagos derivados de monócitos humanos após 72 horas de isolamento do sangue periférico, tratamentos e incubação. Os dados (média  $\pm$  EPM) foram determinados por PCR em tempo real e a abundância relativa de mRNA foi calculada através do método  $2^{-\Delta C_t}$ . GAPDH foi utilizado como controle endógeno. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  de acordo com o Kruskal-Wallis e pós-teste de Newman-Keuls ao nível de significância de 5%.

Fonte: Da autora.

#### 5.4.4 Determinação do perfil funcional

Através da análise do perfil de expressão dos genes que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre os grupos experimentais avaliados, determinou-se o perfil funcional predominante dos grupos em questão. Estes perfis funcionais estão relatados na Tabela 19, na qual a intensidade de expressão de cada gene foi informada

relativamente ao grupo controle (apenas monócitos). Para informações explanatórias, vide DISCUSSÃO.

Tabela 19 - Expressão gênica de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 e determinação do perfil funcional predominante.

Grupos	CD68	CD80	CD163	CD204	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-10	SOD1	Perfil (M0, M1 ou M2)
Monócitos (controle)	+	baixa	+	baixa	baixa	baixa	baixa	+	M0
Monócitos + laser	+	baixa	+	baixa	baixa	alta	baixa	+	M0 $\rightarrow$ M1*
Monócitos + LPS (controle M1)	+	alta	+	baixa	alta	alta	baixa	+	M1
Monócitos + LPS + laser	+	alta	+	baixa	alta	alta	baixa	+	M1*
Monócitos + <i>Candida albicans</i>	+	alta	+	baixa	alta	alta	alta *predomínio de IL-6	+	M1
Monócitos + <i>Candida albicans</i> + laser	+	alta	+	baixa	alta	alta	alta *predomínio de IL-6	+	M1
Monócitos + PMA + M-CSF (controle M2)	+	baixa	+	alta	baixa	baixa	baixa	+	M2

(+) Presença de expressão gênica, porém, sem significância qualitativa e/ou estatística na determinação do perfil funcional dos macrófagos.

\*Exibiu um aumento significativo na produção de NO<sub>2</sub> (vide RESULTADOS - reação de Griess), o que também relaciona-se ao perfil funcional de M1.

Fonte: Da autora.

## 5.5 Mensuração da produção de nitrito (NO<sub>2</sub>) durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos

### 5.5.1 Curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>)

Após a plotagem da curva padrão da concentração de NaNO<sub>2</sub> ( $\mu$ M) versus a sua densidade óptica (570nm), calculou-se uma linha de tendência para a mesma (Figura 31). Quanto mais esta linha coincide com os valores obtidos, mais fiéis são os resultados das leituras ópticas. Elucidativamente, quando a linha de tendência tem o valor igual a 1, a linha coincide exatamente com os valores plotados. Sendo assim, uma ótima linha de tendência foi calculada ( $R^2 = 0,9963$ ) e a equação obtida foi a seguinte:  $y = 0,0046x + 0,0344$ .

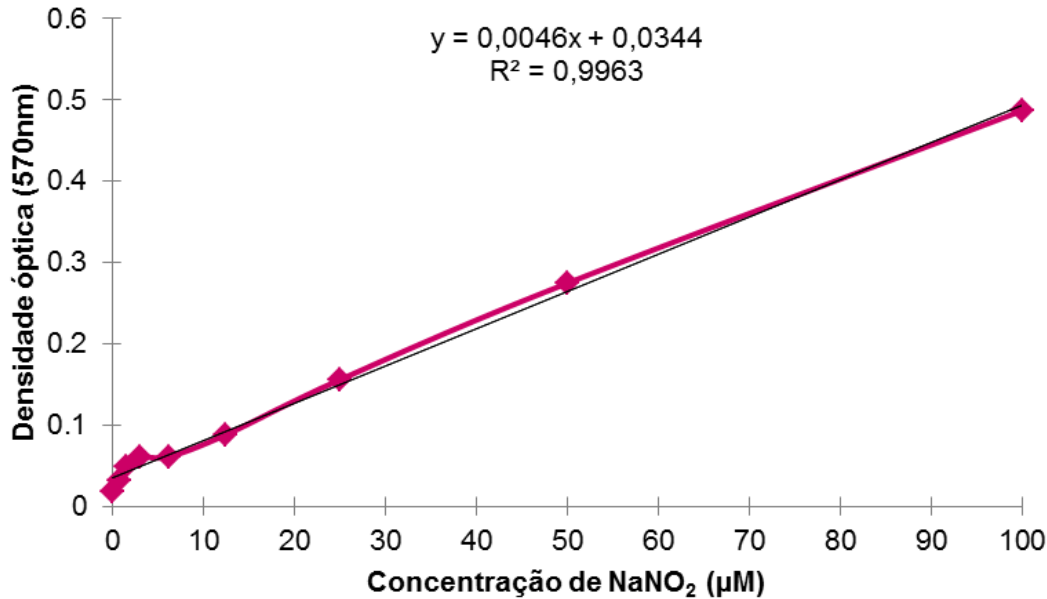


Figura 31 - Curva padrão de amostras pré-determinadas de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>).  
Fonte: Da autora.

### 5.5.2 Concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) produzido pelos diferentes grupos experimentais

Através da reação de Griess foi possível mensurar a produção de NO<sub>2</sub> por cada grupo delineado. As médias expressas em µM da concentração de NO<sub>2</sub> foram calculadas a partir da curva padrão de NaNO<sub>2</sub> determinada e estão apresentadas na Tabela 20. A figura 32 representa graficamente os dados obtidos neste experimento. Vale destacar que as concentrações de NO<sub>2</sub> relatadas são referentes ao sobrenadante dos grupos experimentais submetidos à 72 horas de incubação e tratamentos distintos.

Sendo assim, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre grupos que não foram irradiados e grupos irradiados [“monócitos” versus “monócitos + laser” ( $P < 0,05$ ) e “monócitos + LPS” versus “monócitos + LPS + laser” ( $P < 0,01$ )], exibindo uma maior produção de NO<sub>2</sub> mediada pela PBM. Porém, nas comparações realizadas entre os grupos contendo *Candida albicans* (“monócitos + *Candida albicans*” versus “monócitos + *Candida albicans* + laser”) e os grupos “monócitos + PMA” versus “monócitos + PMA + laser”, esta modulação significativa da PBM não foi observada.

Assim como esperado, o grupo controle M2 (“monócitos + PMA + M-CSF”) foi o que apresentou uma menor produção de NO<sub>2</sub>, diferindo-se significativamente dos seguintes grupos: “monócitos + laser” ( $P < 0,01$ ); “monócitos + LPS + laser” ( $P < 0,01$ ); “monócitos + *Candida albicans*” ( $P < 0,05$ ); e “monócitos + *Candida albicans* + laser” ( $P < 0,01$ ). Em

contraste ao grupo controle M2, destacou-se o grupo “monócitos + LPS + laser”, exibindo a maior produção de NO<sub>2</sub> comparativamente aos demais grupos.

Portanto, com base nos resultados obtidos através da reação de Griess, observou-se que a PBM, operando no comprimento de onda de 660nm e na densidade de energia de 400J/cm<sup>2</sup>, foi capaz de estimular significativamente a produção de NO<sub>2</sub> pelas células mieloides estudadas, mais especificamente nos grupos “monócitos + laser” ( $P < 0,05$ ) e “monócitos + LPS + laser” ( $P < 0,01$ ). Similarmente como foi verificado no ensaio de quimioluminescência, onde grupos irradiados que receberam LPS (1µg/mL) apresentaram uma maior produção de ROS intracelulares e extracelulares do que os grupos que não o receberam, neste experimento, o grupo irradiado contendo LPS (100ng/mL) também exibiu uma maior produção de NO<sub>2</sub>.

Tabela 20 - Médias expressas em µM da concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) produzido pelos diferentes grupos experimentais durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos (após 72 horas de isolamento das células do sangue periférico humano, tratamentos e incubação).

Grupos experimentais	Concentração de NO <sub>2</sub> em µM (médias)
Monócitos (controle)	3,71
Monócitos + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , 400J/cm <sup>2</sup> )	6,43
Monócitos + LPS (controle M1)	3,60
Monócitos + LPS + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , 400J/cm <sup>2</sup> )	7,73
Monócitos + <i>Candida albicans</i>	4,80
Monócitos + <i>Candida albicans</i> + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , 400J/cm <sup>2</sup> )	5,13
Monócitos + PMA	3,82
Monócitos + PMA + laser ( $\lambda = 660\text{nm}$ , 400J/cm <sup>2</sup> )	4,15
Monócitos + PMA + M-CSF (controle M2)	1,76

Nota: As médias das concentrações de nitrito (NO<sub>2</sub>) foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>). ( $\lambda$ ) Comprimento de onda.

Fonte: Da autora.

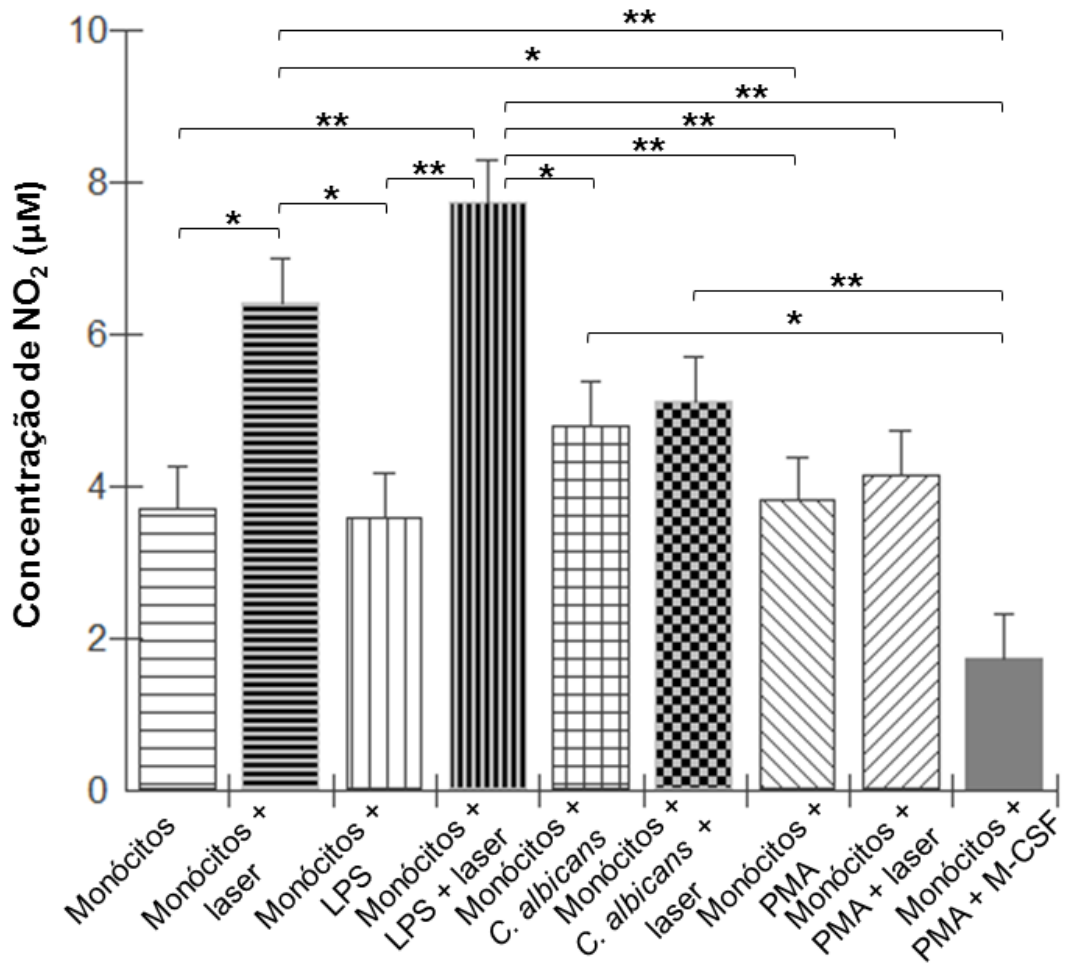


Figura 32 - Concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>) produzido pelos diferentes grupos experimentais durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos (após 72 horas de isolamento das células do sangue periférico humano, tratamentos e incubação). \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  de acordo com a análise de variância e pós-teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Fonte: Da autora.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou elucidar os efeitos da PBM sobre monócitos humanos *in vitro*, inicialmente investigando o melhor comprimento de onda (660nm ou 780nm) e a densidade de energia (200, 400 ou 600J/cm<sup>2</sup>) mais efetiva na geração de ROS intracelulares e extracelulares, e na atividade microbicida dessas células contra *Candida albicans*. Após identificar os melhores parâmetros da PBM (660nm e 400J/cm<sup>2</sup>) a serem empregados nos monócitos, pesquisou-se se os mesmos causariam algum dano à viabilidade celular nos dias subsequentes à irradiação laser. Então, constatando que a PBM não afetou negativamente a sobrevivência dos monócitos, estes foram colocados em cultura por 72 horas, a fim de promover a diferenciação em macrófagos mediante estímulos relacionados a M1 e M2 (LPS, *Candida albicans* e M-CSF) e averiguar se a PBM também influenciaria na polarização dos macrófagos. Sendo assim, a expressão gênica em nível de mRNA de CD68, CD80, CD163, CD204, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e SOD1 foi avaliada, bem como, a atividade funcional referente à produção de NO<sub>2</sub>.

Em relação aos efeitos da PBM sobre células/ tecidos irradiados, progressos significativos foram feitos nos últimos anos na elucidação de moléculas fotorreceptoras e de vias de sinalização (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Sabe-se que, primeiramente, ocorre a absorção da luz laser por cromóforos, como o citocromo c oxidase na mitocôndria e o flavocitocromo b558 na NADPH oxidase dos fagócitos (RADA; LETO, 2008; HAMBLIN, 2017). Após isto, observa-se um aumento na produção de ATP, uma breve “explosão” na geração de ROS, aumento na formação de NO e modulação dos níveis de cálcio; os efeitos finais da PBM incluem a ativação de uma ampla gama de fatores de transcrição, resultando em uma maior proliferação celular e síntese proteica (HAMBLIN, 2017).

A geração de ROS por fagócitos possui papéis importantes na imunidade inata e na sinalização celular (DALE; BOXER; LILES, 2008). Sendo assim, a PBM tem emergido como uma terapia promissora na modulação de células do sistema imune frente a condições patológicas (CHEN et al., 2014; BURGER et al., 2015). Callaghan et al. (1996) relataram que a PBM (660nm; 12mW; 2,9 e 8,6J/cm<sup>2</sup>) foi capaz de aumentar a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por uma linhagem celular de monócitos humanos (U-937, ATCC; células oriundas de 1 homem de 37 anos com linfoma histiocítico). Similarmente, no presente trabalho, constatou-se que a PBM (660nm; 40mW; 400J/cm<sup>2</sup>) induziu um aumento significativo na geração de ROS

intracelulares e extracelulares por monócitos recém isolados do sangue periférico de homens saudáveis.

As densidades de energia investigadas em nosso estudo (200, 400 e 600J/cm<sup>2</sup>) foram delineadas a partir de um trabalho recentemente publicado, onde a PBM foi aplicada a neutrófilos de sangue periférico humano e sondas fluorescentes específicas para OH• e ânion hipoclorito (ClO<sup>-</sup>) [3'-p-(aminophenyl) fluorescein (APF) e 3'-p-(hydroxyphenyl) fluorescein (HPF)] detectaram uma maior produção de ROS mediante a densidade de energia de 480J/cm<sup>2</sup> (CERDEIRA et al., 2016). Neste trabalho, o comprimento de onda de 660nm apresentou uma superioridade significativa em relação ao de 780nm (CERDEIRA et al., 2016). Nossos resultados se aproximam aos de Cerdeira et al. (2016), destacando o comprimento de onda de 660nm e a densidade de energia de 400J/cm<sup>2</sup> como os parâmetros mais efetivos na geração de ROS intracelulares e extracelulares por monócitos humanos. Por conseguinte, sugere-se que o comprimento de onda de 660nm é mais absorvido pelas moléculas fotorreceptoras dos monócitos do que o de 780nm.

Pal et al. (2007) afirmam que os efeitos estimulatórios da PBM na geração de ROS são dose-dependentes, sendo a densidade de potência, a energia total e o tempo de exposição os parâmetros determinantes. Em acordância, também observamos a dose-dependência da PBM na produção de ROS, uma vez que os monócitos irradiados aumentaram significativamente a geração de ROS mediante a densidade de energia de 200J/cm<sup>2</sup> (ou seja, tempo de exposição igual a 200 segundos), contudo, ao empregar a densidade de energia de 400J/cm<sup>2</sup> (400 segundos) uma produção de ROS ainda superior foi observada. Já a densidade de energia de 600J/cm<sup>2</sup> (600 segundos) não exibiu um aumento significativo na produção de ROS comparativamente a 400J/cm<sup>2</sup>, sugerindo que uma superdosagem de energia pode inibir e/ou diminuir os efeitos da PBM (HUANG et al., 2009; HUANG et al., 2011).

Adicionalmente, em nosso estudo foi observado que monócitos “primados” com LPS, ao serem submetidos à PBM, produziram mais ROS do que os monócitos irradiados que não receberam LPS. Elucidativamente, o LPS é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas; sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células do sistema imune (TAKASHIBA et al., 1999; NGKELO et al., 2012; TUCUREANU et al., 2018). Deste modo, o LPS é conhecido como um potente ativador de monócitos e macrófagos, a partir de sua ligação com receptores semelhantes a *Toll* do tipo 4 (TLR4) localizados na membrana celular, ou com a proteína ligante de LPS (LBD - *lipopolysaccharide binding protein*), ou ainda, com a proteína mieloide diferenciadora 2 (MD-2) e a CD14, as quais podem ser encontradas na

forma solúvel na circulação sanguínea ou ancoradas à membrana celular (SHIMAZU et al., 1999; AKIRA; TAKEDA, 2004; TUCUREANU et al., 2018). Esta ativação induz a produção de ROS, NO e citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15 e TGF- $\beta$  (SWEET; HUME, 1996; SOLOMON et al., 1998; ROSSOL et al., 2011), além de desencadear diversas vias de sinalização, como MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), AP-1 (*activator protein 1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*) IRF3 (*interferon-regulatory factor 3*) e, especialmente, a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Logo, o LPS atuou como um coestímulo à PBM na produção de ROS pelos monócitos humanos.

Além disso, confirmamos que a produção de ROS pelos monócitos humanos é realmente dependente da NADPH oxidase e não apenas das mitocôndrias, uma vez que a quantidade de oxidantes gerados pelas células foi reduzida significativamente com o uso do DPI (inibidor consagrado da NADPH oxidase) (ELLIS; MAYER; JONES, 1988). Resultado semelhante foi relatado por Cerdeira et al. (2016) abordando a PBM sobre neutrófilos humanos.

Outro efeito da PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) observado nos monócitos estudados, foi o aumento significativo da atividade microbicida dos mesmos contra o fungo *Candida albicans*, após 60 minutos da realização da irradiação laser. Hemvani, Chitnis e Bhagwanani (2005), utilizando o laser He-Ne (632,8nm; 3mW; e tempo de irradiação de 5 minutos), verificaram que a PBM também aumentou a atividade microbicida de monócitos humanos *in vitro* contra o *Mycobacterium fortuitum*; este resultado foi encontrado após 48 horas da irradiação e incubação dos monócitos juntamente com a bactéria.

Os monócitos e os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune a entrarem em contato com a *Candida albicans* em casos de infecções patogênicas (HALDER et al., 2017). As mananas, manoproteínas,  $\beta$ -glucanas e glicolipídeos presentes na superfície deste fungo, ou então, as opsoninas que podem revestir o micro-organismo, são reconhecidas pelas lectinas e TLRs dos fagócitos (NETEA et al., 2004a). Os principais TLRs que reconhecem a *Candida albicans* são do tipo 2 e 4 (TLR2 e TLR4), os quais estão envolvidos na indução da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ ) pelo hospedeiro (NETEA et al., 2004b). Além disso, tais polissacarídeos presentes na superfície do fungo se comportam como PAMPs e são capazes de ativar o *burst* oxidativo mediante a fagocitose, resultando na produção de ROS responsáveis tanto pela morte quanto pela inibição do crescimento da *Candida albicans* através da quebra de DNA do fungo (FARAH et al., 2009). O NO também pode ser produzido pela iNOS mediante a oxidação da L-arginina, contribuindo para a morte

do fungo (FARAH et al., 2009). Deste modo, induzindo uma maior produção de oxidantes, a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) colaborou significativamente na ação fungicida imediata dos monócitos humanos contra a *Candida albicans*.

Recentemente, foi descrito que outra ação precoce dos monócitos humanos frente a *Candida albicans* é a formação de armadilhas de DNA extracelular para restringir a disseminação do fungo (HALDER et al., 2017). Após cerca de 2 a 4 horas de contato com o fungo, os monócitos descondensam o seu próprio DNA nuclear e o libera na forma de armadilhas extracelulares [chamadas armadilhas extracelulares monocíticas (MoETs)], as quais cobrem e imobilizam leveduras e hifas de *Candida albicans* (HALDER et al., 2017). Essas armadilhas contêm elastase, MPO, histona citrulinada e lactoferrina, as quais, em conjunto, possuem atividade anti-fúngica para impedir a disseminação da *Candida albicans* (HALDER et al., 2017). A formação de MoETs também foram relatadas em resposta a *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* (WEBSTER, 2010). Interessantemente, o LPS e o PMA não são capazes de induzir MoETs (HALDER et al., 2017).

Além dos monócitos, os neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos também são capazes de formar armadilhas extracelulares contra micro-organismos (URBAN et al., 2006; GOLDMANN; MEDINA, 2013; LIU et al., 2014). As MoETs diferem-se das armadilhas extracelulares de macrófagos (METs) pelo fato de que a liberação de DNA em monócitos humanos não pode ser desencadeada pela inibidora da síntese de colesterol, a sinvastatina, o que ocorre em macrófagos (CHOW et al., 2010). Sendo assim, por representarem um importante mecanismo na atividade microbicida de fagócitos e por terem sido descobertas recentemente, as armadilhas extracelulares devem ser melhor estudadas. Atualmente, inexistem trabalhos publicados abordando se a PBM influenciaria de alguma maneira na formação de MoETs e METs (por exemplo, se ela aceleraria a formação, ou então, desencadearia, ou contribuiria na ação das armadilhas extracelulares), portanto, sugere-se esta investigação.

Diante ao exposto até aqui, são notáveis os efeitos benéficos da PBM, exercendo funções estimulatórias e biomoduladoras sem causar danos à viabilidade das células irradiadas (SILVA et al., 2016). De fato, a literal baixa potência (5 a 500mW) da PBM tem sido empregada com segurança para tratar várias condições médicas, sem induzir qualquer tipo de lesão, especialmente por não ser suficientemente alta para produzir um aumento significativo de temperatura (SPITLER et al., 2015). Sendo assim, não só podemos esperar a falta de efeitos nocivos da luz de baixa potência, mas também a estimulação da produção de ATP,

restabelecimento do potencial de membrana, aumento do metabolismo e proliferação celular, ajudando a manter a viabilidade das células (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

Callaghan et al. (1996), utilizando um laser de diodo GaAlAs (660nm; 12mW; 2,9 e 8,6J/cm<sup>2</sup>), verificaram que a PBM não alterou a viabilidade da linhagem celular U-937 de monócitos humanos após 24 horas da realização da irradiação. Já Silva et al. (2016), investigaram os efeitos do laser GaAlAs na linhagem celular RAW 264.7 (macrófagos murinos), operando nos comprimentos de onda de 660nm e 808nm, com diferentes potências (30, 50 e 100mW) e tempos de exposição (10, 30 e 60 segundos); eles também verificaram que a PBM não alterou a viabilidade dos macrófagos murinos após 24 horas da irradiações realizadas com todas as doses delineadas. No presente trabalho, também foi observado que a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) não gerou danos à sobrevivência dos monócitos isolados do sangue periférico humano, tanto no tempo de 24 horas quanto no tempo de 48 horas após a irradiação laser, não trazendo prejuízos à cultura celular. Vale ressaltar que após a diferenciação dos monócitos irradiados em macrófagos, danos ao cultivo dos macrófagos também não foram observados através do microscópio óptico invertido.

A diferenciação dos monócitos em macrófagos está associada com a expressão de receptores de membrana específicos para citocinas (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Os monócitos permanecem por menos de 24 horas na medula óssea, vão para a corrente sanguínea e circulam por todo corpo; após atravessarem as paredes dos capilares e alcançarem os tecidos, eles se transformam em macrófagos (SIEWEKE; ALLEN, 2013). Este processo de diferenciação envolve muitas mudanças, como: aumento do tamanho da célula em 5 a 10 vezes do seu tamanho original; alteração morfológica; as organelas aumentam tanto em número quanto em complexidade; aumento da capacidade fagocítica, dentre outras (SIEWEKE; ALLEN, 2013; DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Realmente, esta mudança morfológica dos monócitos no processo de diferenciação foi observada no presente estudo *in vitro*. Ao isolar os monócitos do sangue periférico humano, eles apresentaram uma morfologia arredondada, no entanto, com o passar do tempo de incubação e contato com diferentes estímulos, as células tornaram-se alongadas, fusiformes e, por vezes, estrelárias, apresentando um aumento de tamanho (DING et al., 2012; JAGUIN et al., 2013).

Interessantemente, pudemos observar que o grupo contendo monócitos irradiados (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) sem a adição de outro estímulo, apresentou a mudança morfológica das células mais rapidamente do que o grupo contendo apenas monócitos que não receberam a irradiação; neste grupo as células permaneceram arredondadas durante as 72 horas de experimento. Esta observação sugere que a PBM, nos parâmetros empregados (660nm;

400J/cm<sup>2</sup>), acelerou o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos. Na verdade, a PBM é conhecida por aumentar a atividade mitocondrial e induzir a progressão do ciclo celular com síntese e liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, além da ativação de vias de sinalização (YIN et al., 2017; HAMBLIN, 2017); este fato pode explicar o que foi visualizado em nosso estudo.

Sendo assim, os monócitos possuem plasticidade eficaz para se diferenciarem em macrófagos, respondendo a estímulos em seu microambiente residente e apresentando perfis funcionais distintos (LABONTE; TRAMPONT; HAHN, 2014). O perfil de M1 caracteriza-se pela produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ ), baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias (como a IL-10), forte atividade microbicida, alta geração de ROS e RNS e promoção da resposta imune Th1 (SICA; MANTOVANI, 2014; LABONTE; TRAMPONT; HAHN, 2014). Em contraste, o perfil de M2 particulariza-se pela produção de altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, remodelação e regeneração de tecidos, promoção de tumor e manifestação da resposta imune Th2 (MANTOVANI et al., 2004; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Além disso, M2 é subdividido em M2a (estimulados pela IL-4 e IL-13 e produzem CCL24, CCL22, CCL17 e CCL18 que são reconhecidos por CCR3, CCR4 e CCR8, promovendo o recrutamento de eosinófilos, basófilos e células Th2); M2b [resultado da ativação por imunocomplexos e agonistas de TLR (como o LPS - TLR4) e produzem CCL1, que recruta células T regulatórias (Tregs)]; M2c (polarização induzida pela IL-10, produzindo CCL16 e CCL18, os quais recrutam eosinófilos e células T naïve, respectivamente); e, finalmente, M2d (se acumulam no microambiente tumoral e apresentam alta produção de IL-10 e de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)] (MANTOVANI et al., 2004; DULUC et al., 2009).

Em suma, LPS, IFN- $\gamma$  e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) polarizam os macrófagos para o perfil de M1, expressando o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), o marcador CD68 e as moléculas coestimuladoras CD80 e CD86; enquanto, parasitas, imunocomplexos, células em apoptose, M-CSF, IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- $\beta$  podem polarizar os macrófagos para o perfil de M2, sendo identificados por várias moléculas de superfície, incluindo dectina-1, receptores de manose (MRC1/CD206), CD163, *scavenger* receptor A (CD204), CCR2, CXCR1 e CXCR2 (DING et al., 2012; JAGUIN et al., 2013; LABONTE; TRAMPONT; HAHN, 2014). Por conseguinte, no presente estudo, os perfis de M1 e de M2 nos diferentes grupos experimentais foram investigados através da expressão gênica dos marcadores de superfície CD68, CD80, CD163

e CD204, além das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e da enzima SOD1 para avaliar a atividade funcional dos macrófagos.

O CD68 é um tipo de proteína transmembrana do tipo I altamente glicosilada; sua função exata ainda é incerta, porém, papéis no processamento de antígenos e na atuação como um *scavenger* receptor têm sido propostos (HOLNESS; SIMMONS, 1993). Em termos de expressão, o CD68 é restrito às células de linhagem mieloide, especificamente monócitos e macrófagos (HUME, 2011). Deste modo, confirmamos a origem mieloide das células estudadas em todos os grupos experimentais.

Já o CD80, também conhecido como B7-1, é uma proteína encontrada na membrana de células dendríticas, células B ativadas e macrófagos com perfil de M1, fornecendo um sinal coestimulador para a ativação de células T; ele é o ligante para duas outras diferentes proteínas sobre a superfície das células T: CD28 e CTLA-4 (PEACH et al., 1995; STAMPER et al., 2001). Distintamente, CD163 e CD204 têm sido utilizados para identificar macrófagos com o perfil de M2 (DING et al., 2012). O CD163 é uma proteína altamente expressa na membrana dos macrófagos, sendo pertencente à família dos receptores *scavenger* ricos em cisteína (SRCR - *scavenger receptors cystein-rich*); sua expressão é induzida pela IL-6, IL-10 e glucocorticoides (GRAVERSEN; MADSEN; MOESTRUP, 2002). A função do CD163 é mediar a endocitose do complexo hemoglobina (Hb) - haptoglobina (Hp), possuindo efeito de desintoxicação ao remover a Hb do plasma e representando uma importante via de absorção de ferro pelos macrófagos (GRAVERSEN; MADSEN; MOESTRUP, 2002). Esta ligação funcional do CD163 com a Hp apresenta propriedades anti-inflamatórias, devido aos metabólitos de *heme* e a indução de sinalização celular para a secreção de citocinas (MOESTRUP; MOLLER, 2004). Adicionalmente, o CD204 é um receptor transmembrana expresso em células dendríticas e macrófagos, desempenhando papéis no metabolismo lipídico, na aterogênese, na adesão celular, na fagocitose e na defesa do hospedeiro (JIM et al., 2014). O CD204 é capaz de se ligar e internalizar lipoproteínas, colágeno, sílica,  $\beta$ -amilóide, amianto, glucanas, LPS, ácido lipoteicoico, proteínas de choque térmico, células apoptóticas, citomegalovírus, dentre outros ligantes (JIM et al., 2014).

Em acórdância com a literatura, o presente trabalho mostrou que o LPS e o M-CSF estimularam os monócitos humanos a se diferenciarem em um perfil predominante de M1 (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>alta</sup>/ CD204<sup>baixa</sup>) e de M2 (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>baixa</sup>/ CD204<sup>alta</sup>), respectivamente, quando comparados com os monócitos que não receberam nenhum estímulo (controle), os quais exibiram um perfil de M0 (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>baixa</sup>/ CD204<sup>baixa</sup>) (DING et al., 2012; RAGGI et al., 2017). Os monócitos que entraram em contato com o fungo *Candida albicans* também

exibiram um perfil predominante de M1 (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>alta</sup>/ CD204<sup>baixa</sup>). Interessantemente, a PBM não foi capaz de alterar o padrão de expressão dos marcadores de superfície dos macrófagos referentes aos grupos irradiados, por exemplo, o grupo irradiado estimulado pelo LPS continuou expressando o mesmo perfil de sua contraparte não irradiada (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>alta</sup>/ CD204<sup>baixa</sup>); igualmente ocorreu no grupo irradiado contendo *Candida albicans* (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>alta</sup>/ CD204<sup>baixa</sup>).

Apesar do grupo apenas com monócitos irradiados apresentar o mesmo padrão de expressão dos marcadores de superfície de sua contraparte não irradiada (controle) (CD68<sup>+</sup>/ CD80<sup>baixa</sup>/ CD204<sup>baixa</sup>), ele exibiu um significativo aumento na expressão de TNF- $\alpha$  ( $P = 0,0302$ ), citocina pró-inflamatória relacionada com a resposta imune Th1, sugerindo uma modulação da PBM na expressão de citocinas relacionadas ao perfil de M1. Chen et al. (2014), utilizando um laser de GaAlAs (660nm; 1 e 2J/cm<sup>2</sup>), também encontraram um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  pelos monócitos humanos irradiados da linhagem celular THP-1 (ATCC; células oriundas de um menino de 1 ano com leucemia monocítica aguda). Os autores concluíram o seguinte: a PBM foi capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas relacionadas à resposta imune Th1 (TNF- $\alpha$ , CCL2 e CXCL10) pelos monócitos irradiados, além de induzir a acetilação das histonas H3 e H4 e trimetilação de H3K4 na área promotora do gene TNF- $\alpha$ , sugerindo que a PBM também atua na regulação epigenética das células do sistema imune (CHEN et al., 2014).

Deste modo, a transformação do perfil de M0 (macrófagos não estimulados/ não polarizados) para um perfil de M1 ou de M2 é paralela à secreção de distintas citocinas e quimiocinas (RAGGI et al., 2017). No presente estudo, observou-se nos grupos contendo os “agentes agressores” LPS e *Candida albicans* os seguintes padrões de expressão de citocinas (IL-6<sup>alta</sup>/ TNF- $\alpha$ <sup>alta</sup>/ IL-10<sup>baixa</sup>) e (IL-6<sup>alta</sup>/ TNF- $\alpha$ <sup>alta</sup>/ IL-10<sup>alta</sup>, porém, com predomínio de IL-6), respectivamente, reforçando o perfil funcional de M1. Novamente, as contrapartes irradiadas destes grupos não apresentaram mudanças significativas no padrão de expressão. Já nos grupos sem os “agentes agressores”, baixa expressão de IL-6 e IL-10 foi observada.

Curiosamente, altos níveis de expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 têm sido relacionados tanto ao perfil de M1 quanto ao de M2 (RAGGI et al., 2017). Assim, alguns estudos destacam a IL-10 como uma marcadora de M2 (EDWARDS et al., 2006; MARTINEZ; GORDON, 2014), enquanto outros demonstram que M1 são importantes produtores de IL-10 (JAGUIN et al., 2013; TARIQUE et al., 2015; DERLINDATI et al., 2015; RAGGI et al., 2017). Além disso, é importante mencionar que os macrófagos possuem uma notável plasticidade funcional, exemplificada pela capacidade de mudar rapidamente e

reversivelmente os seus estados de ativação *in vitro* em resposta a mudanças de estímulos no microambiente residente, independentemente da sua polarização inicial de M1 ou de M2 (STOUT et al., 2005; EDWARDS et al., 2006; DAVIS et al., 2013; MARTINEZ; GORDON, 2014). O desequilíbrio da polarização M1/ M2, a repolarização de macrófagos e uma população mista de fenótipos M1 e M2 já foram descritos em muitas condições patológicas, como no câncer, em desordens inflamatórias e autoimunes e infecções crônicas (ZEYDA et al., 2007; KHALLOU-LASCHET et al., 2010; SICA; MANTOVANI, 2012; MARTINEZ; GORDON, 2014).

Na verdade, em resposta ao estresse oxidativo causado pelo aumento da geração de ROS, pode haver um aumento na expressão de genes ou ativação de várias vias de sinalização intracelular, a fim da manutenção da homeostase (LIU et al., 2005). É relatado que ROS também podem ser liberadas por diferentes tipos de células em resposta à estimulação com IL-1 e TNF- $\alpha$ , ativando o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (SCHRECK; BAEUERLE, 1991). Sendo assim, ROS atuam como segundo mensageiros para as citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  ativarem NF- $\kappa$ B (SCHRECK; BAEUERLE, 1991), o qual é bem conhecido por ser um fator de transcrição pró-inflamatório (HAMBLIN, 2017). Chen et al. (2011) afirmaram que a PBM (810nm; 3J/cm<sup>2</sup>) foi capaz de ativar a via do NF- $\kappa$ B em fibroblastos murinos através da produção de ROS por ela induzida. Explanatoriamente, a ativação da “via clássica” do NF- $\kappa$ B pela IL-1, pelo TNF- $\alpha$ , ou pelos TLRs e receptores de antígenos, está envolvida na ativação dos genes que codificam IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-33, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-4, além dos genes que codificam diversas quimiocinas, fatores pró-angionênicos, moléculas de adesão, como a ICAM-1, proteínas antiapoptóticas e enzimas indutíveis, como a iNOS (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Deste modo, novamente sugerimos a modulação da PBM na indução de agentes pró-inflamatórios relacionados ao perfil funcional de M1, uma vez que constatamos um aumento significativo tanto na produção de ROS quanto na expressão de TNF- $\alpha$ . Enfatizando o perfil funcional de M1, também observamos que a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) aumentou a produção de NO<sub>2</sub> pelos monócitos/ macrófagos, mais especificamente nos grupos referentes a monócitos irradiados ( $P < 0,05$ ) e monócitos irradiados contendo LPS ( $P < 0,01$ ). Lindgard et al. (2007) estudando o efeito da PBM (634nm; 35,7W/cm<sup>2</sup>; tempo de exposição de 5 minutos) na produção de NO por monócitos humanos isolados de sangue periférico, observaram um aumento significativo de 97% na produção de NO pelos monócitos irradiados comparativamente aos monócitos não irradiados; os autores mensuraram esta produção após 20 minutos da irradiação laser. A fim de comparação, no presente estudo, foi encontrado um

aumento significativo de 73,3% na produção de NO<sub>2</sub> pelo grupo de monócitos irradiados em relação ao controle, e de 114,7% pelo grupo de monócitos irradiados contendo LPS comparativamente à sua contraparte não irradiada. Reforçando a indução promovida pela PBM na produção de NO por monócitos/ macrófagos, Silva et al. (2016), através da reação de Griess, também relatou que a PBM (660nm; 64J/cm<sup>2</sup>) aumentou a produção de NO por macrófagos murinos irradiados da linhagem RAW 264.7.

Portanto, o presente trabalho apresenta resultados importantes na elucidação dos efeitos da PBM, nos parâmetros empregados (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>), sobre os monócitos humanos *in vitro*, a qual promoveu um aumento na produção de ROS e NO<sub>2</sub>, intensificação da atividade microbicida contra *Candida albicans* e aumento na expressão da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  pelas células estudadas. Ressalta-se que na literatura atualmente disponível, inexistem trabalhos abordando o papel da PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) na diferenciação de monócitos oriundos de sangue periférico humano em macrófagos; a maioria dos estudos onde há a aplicação da PBM em monócitos, foi realizada com linhagens celulares estabelecidas, caracterizando a resposta imune de apenas 1 indivíduo específico, o que não ocorre em nosso trabalho. Vislumbramos em um futuro próximo, a reprodução desses resultados em monócitos humanos *in vivo*, colaborando no tratamento de candidoses orais, por exemplo.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir (Figura 33):

- a) comparando os comprimentos de onda de 660nm e 780nm e as densidades de energia de 200, 400 e 600J/cm<sup>2</sup> em relação a efetividade na produção de ROS e na atividade microbica contra *Candida albicans* pelos monócitos humanos, observa-se que os melhores parâmetros da PBM a serem empregados nos monócitos humanos são equivalentes a 660nm e 400J/cm<sup>2</sup>;
- b) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) aumentou significativamente a produção de ROS intracelulares e extracelulares pelos monócitos humanos irradiados;
- c) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) intensificou significativamente a atividade microbica dos monócitos humanos contra *Candida albicans*, mais especificamente após 60 minutos da realização da irradiação laser;
- d) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) não causou danos à viabilidade celular dos monócitos nos dias subsequentes à irradiação laser;
- e) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) acelerou a mudança na morfologia celular durante o processo de diferenciação dos monócitos em macrófagos;
- f) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) não alterou a polarização de M1 para M2;
- g) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) aumentou a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  pelos monócitos humanos irradiados, aproximando-os de uma resposta imune Th1;
- h) a PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) aumentou significativamente a produção de NO<sub>2</sub> pelos monócitos irradiados durante o processo de diferenciação em macrófagos;
- i) os efeitos da PBM (660nm; 400J/cm<sup>2</sup>) na produção de ROS intracelulares e extracelulares e NO<sub>2</sub> são intensificados na presença do LPS;

- j) combinando os resultados obtidos (aumento na geração de ROS e  $\text{NO}_2$ , intensificação da atividade microbica contra *Candida albicans* e aumento da expressão de  $\text{TNF-}\alpha$ ), observa-se uma modulação da PBM na indução de agentes pró-inflamatórios relacionados ao perfil funcional de M1;
- k) a PBM ( $660\text{nm}$ ;  $400\text{J}/\text{cm}^2$ ) reserva um aparente potencial para atuar como uma aliada do sistema imune contra doenças infecciosas, como candidoses orais, por exemplo; porém, estudos *in vivo* são necessários.

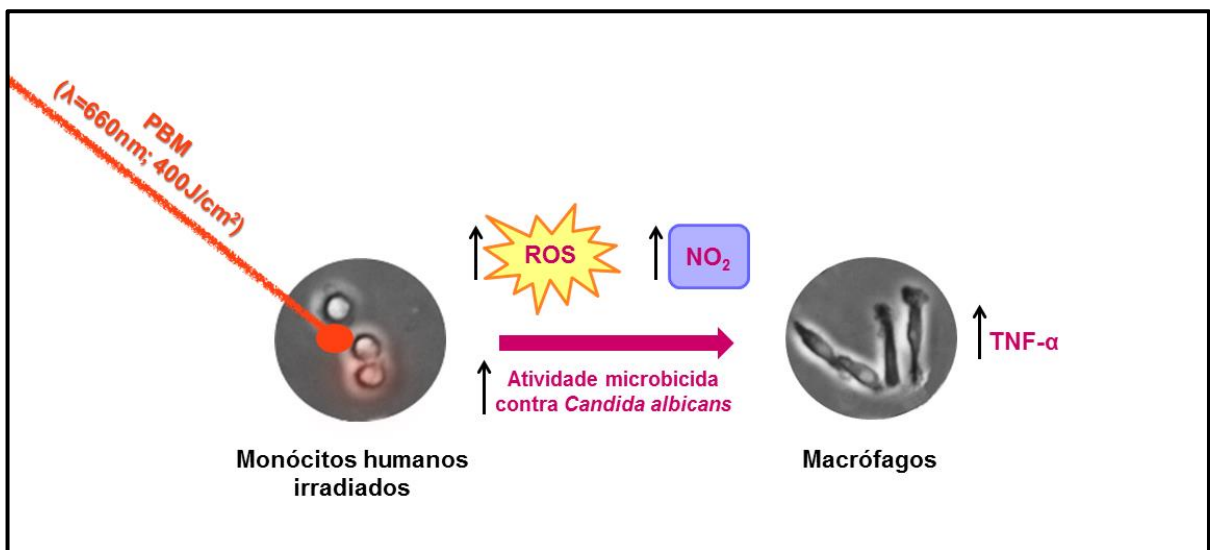


Figura 33 - Principais conclusões.  
Fonte: Da autora.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABDULJABBAR, T. et al. Efficacy of surgical laser therapy in the management of oral pigmented lesions: A systematic review. **J Photochem Photobiol B**, v. 15, n. 173, p. 353-359, Jun. 2017.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul. 2004.
- AKIYAMA, Y. et al. Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. **J Clin Invest**, v. 72, n. 3, p. 1093-1105, Sep. 1983.
- ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 237-249, Jan. 2012.
- ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomed Laser Surg**, v. 33, n. 4, p. 183-184, Apr. 2015.
- ANDRADE, F. S. S. D.; CLARK, R. M. O.; FERREIRA, M. L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Rev Col Bras**, v. 41, n. 2, p. 129-133, Jan. 2014.
- ARANY, P. R. Photobiomodulation: poised from the fringes. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 9, p. 507-509, Sep. 2012.
- BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v. 73, n. 3, p. 599-601, Mar. 1984.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M.; ITO, K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. **Eur Respir J**, v. 25, n. 3, p. 552-563, Mar. 2005.
- BJORDAL, J. M. et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. **Support Care Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1069-1077, Aug. 2011.
- BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 305-315, Mar. 2010.
- BREITBART, H.; LEVINSHAL, T.; COHEN, N.; FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). **J Photochem Photobiol B**, v. 34, n. 2-3, p. 117-21, Jul. 1996.
- BUCHAIM, D. V. et al. Efficacy of Laser Photobiomodulation on Morphological and Functional Repair of the Facial Nerve. **Photomed Laser Surg**, May. 2017. doi: 10.1089/pho.2016.4204.

- BURGER, E. et al. Low-level laser therapy to the mouse femur enhances the fungicidal response of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003541, Feb. 2015.
- CALLAGHAN, G. A. et al. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in the haemopoietic cell line U937. **Lasers Surg Med**, v. 19, n. 2, p. 201-206, 1996.
- CASBON, A. J. et al. Effects of IFN- $\gamma$  on intracellular trafficking and activity of macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b558. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 4, p. 869-882, Oct. 2012.
- CERDEIRA, C. D. et al. Low-level laser therapy stimulates the oxidative burst in human neutrophils and increases their fungicidal capacity. **J Biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1180-1188, Dec. 2016.
- CHEN, A. C. et al. Low-level laser therapy activates NF- $\kappa$ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22453, Jul. 2011.
- CHEN, C. H. et al. Effects of low-level laser therapy on M1-related cytokine expression in monocytes via histone modification. **Mediators Inflamm**, Feb. 2014. doi: 10.1155/2014/625048.
- CHOW, O. A. et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 5, p. 445-454, Nov. 2010.
- CIRCU, M. L. et al. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 8, p. 1190-1198, Oct. 2009.
- CONDINO NETO, A. et al. Effect of therapy with recombinant human interferon-g on the release of nitric oxide by neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease. **J Interferon Cytokine Res**, v. 16, n. 1, p. 357-364, May. 1996.
- DAHLGREN, C.; KARLSSON, A.; BYLUND, J. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. **Methods Mol Biol**, v. 412, p. 349-363, 2007.
- DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, Aug. 2008.
- DAMANTE, C. A. **Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos**. 2003. 92f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.
- DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00264, Jun. 2013.
- DE CARLI, M. L. et al. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. **J Oral Pathol Med**, v. 45, n. 2, p. 141-147, Feb. 2016.

DE CASTRO, J. L.; PINHEIRO, A. L.; WERNECK, C. E.; SOARES, C. P. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. **Photomed laser Surg**, v. 23, n. 6, p. 586-589, Dec. 2005.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v. 22, n. 3, p. 348-364, May. 2016.

DERLINDATI, E. et al. Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119751, Mar. 2015.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 7. ed., Ed. Blucher, 2011.

DING, J. et al. Tumor associated macrophage × cancer cell hybrids may acquire cancer stem cell properties in breast cancer. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41942, Jul. 2012.

DULUC, D et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4319-4330, Dec. 2007.

DULUC, D. et al. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. **Int J Cancer**, v. 125, n. 2, p. 367-373, Jul. 2009.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Front Immunol**, v. 5, n. 1, p. 1-12, Oct. 2014.

DYKE, K.V. Soluble and insoluble activators of neutrophil chemiluminescence. Jesaitis, A.J.; Dratz, E.A. (Ed). In: **The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes**. Montana: Big Sky, 1991.

EDWARDS, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1298-1307, Dec. 2006.

EINSTEIN, A. The Quantum Theory of Radiation. **Physikalische Zeitschrift**, v. 18, n. 121, p. 1-15, 1917.

EL-BENNA, J. et al. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. **Exp Mol Med**, v. 41, n. 4, p. 217-225, Apr. 2009.

EL-BENNA, J. et al. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin Immunopathol**, v. 30, n. 3, p. 279-289, Jul. 2008.

ELIGINI, S. et al. Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 7, p. 1464, Jul. 2013.

- ELLIS, J. A.; MAYER, S. J.; JONES, O. T. G. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. **Biochem J**, v. 251, p. 887-891, May. 1988.
- ESLAMIPOUR, F; MOTAMEDIAN, S. R.; BAGHERI, F. Ibuprofen and Low-level Laser Therapy for Pain Control during Fixed Orthodontic Therapy: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials and Meta-analysis. **J Contemp Dent Pract**, v. 18, n. 6, p. 527-533, Jun. 2017.
- FAIRWEATHERA, D.; CIHAKOVAB, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **J Autoimmun**, v. 33, n. 3-4, p. 222-230, Nov. 2009.
- FARAH, C. S. et al. Gene targeting demonstrates that inducible nitric oxide synthase is not essential for resistance to oral candidiasis in mice, or for killing of *Candida albicans* by macrophages in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 1, p. 83-88, Feb. 2009.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Experimental Designs Pacakge (Portuguese)**. R package version 1.1.2. 2013.
- FIDGOR, C. G. et al. Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. **Blood**, v. 60, n. 1, p. 46-53, Jul. 1982.
- FRANÇA, C. N. et al. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 131, n. 12, p. 1215-1224, Jun. 2017.
- FRIEDMAN, H. et al. A possible explanation of laser induced stimulation and damage of cell cultures. **J Photochem Photobiol B**, v. 11, n. 1, p. 87-91, Oct. 1991.
- GEISZT, M. et al. Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. **FASEB J**, v. 17, n. 11, p. 1502-1504, Aug. 2003.
- GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.
- GOLDMANN, O.; MEDINA, E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. **Front Immunol**, v. 3, n. 1, p. 420, Jan. 2013.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 1, p. 593-604, May. 2010.
- GRAVERSEN, J. H.; MADSEN, M.; MOESTRUP, S. K. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 4, p. 309-314. Apr. 2002.
- GREEN, J. N.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M.B. Analysis of neutrophil bactericidal activity. **Methods Mol Biol**, v. 412, p. 319-332, 2007.
- GREEN, L. C. et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-138, Oct. 1982.

- GUTKNECHT, N.; FRANZEN, R. O laser: função, interação e segurança. In: GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C. P. **A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica**. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 2004, p. 25-60.
- HALDER, L. D. et al. Factor H Binds to Extracellular DNA Traps Released from Human Blood Monocytes in Response to *Candida albicans*. **Front Immunol**, v. 7, p. 1-14, Jan. 2017.
- HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophys**, v. 4, n. 3, 337-361, May. 2017.
- HANIFFA, M.; BIGLEY, V.; COLLIN, M. Human mononuclear phagocyte system reunited. **Semin Cell Dev Biol**, v. 41, p. 59-69, May. 2015.
- HEIDARI, M. et al. Effect of laser photobiomodulation on wound healing and postoperative pain following free gingival graft: A split-mouth triple-blind randomized controlled clinical trial. **J Photochem Photobiol B**, v. 172, p. 109-114, Jul. 2017.
- HEMVANI, N.; CHITNIS, D. S.; BHAGWANANI, N. S. Helium-neon and nitrogen laser irradiation accelerates the phagocytic activity of human monocytes. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 6, p. 571-574, Dec. 2005.
- HOLNESS, C. L.; SIMMONS, D. L. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. **Blood**, v. 81, n. 6, p. 1607-1613, Mar. 1993.
- HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p. 358-383, Sep. 2009.
- HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose Response**, v. 9, n. 4, p. 602-618, Sep. 2011.
- HULTEN, L. M.; HOLMSTROM, M.; SOUSSI, B. Harmful singlet oxygen can be helpful. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 11, p. 1203-1207, 1999.
- HUME, D. A. Applications of myeloid-specific promoters in transgenic mice support in vivo imaging and functional genomics but do not support the concept of distinct macrophage and dendritic cell lineages or roles in immunity. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 4, p. 525-538, Apr. 2011.
- JAGUIN, M. et al. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. **Cell Immunol**, v. 281, n. 1, p. 51-61, Jan. 2013.
- JESAITIS, A.J. et al. **The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes**. A.J., Dratz E.A. (Ed) Montana: Big Sky, 1991.
- JIM, L. et al. Scavenger Receptor-A (CD204): A Two-Edged Sword in Health and Disease. **Crit Rev Immunol**, v. 34, n. 3, p. 241-261, 2014.
- KALYANARAMAN, B.; HARD, M.; ZIELONKA, J. A Critical Review of Methodologies to Detect Reactive Oxygen and Nitrogen Species Stimulated by NADPH Oxidase Enzymes: Implications in Pesticide Toxicity. **Curr Pharmacol Rep**, v. 2, n. 4, p. 193-201, Aug. 2016.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power lasers therapy. **IEEE J Quantum Elect**, v. 23, n. 10, p. 1703-1719, 1987.

KARU, T. I.; ANDREICHUK, T.; RYABYKH, T. Changes in oxidative metabolism of murine spleen following laser and superluminous diode (660-950 nm) irradiation: effects of cellular composition and radiation parameters. **Lasers Surg Med**, v. 13, n. 4, p. 453-62, 1993.

KARU, T. I.; KALENDO, G. S.; LETOKHOV, V. S.; LOBKO, V. V. Bioestimulation of HeLa cells by low intensity visible light. II. Stimulation of DNA e RNA synthesis in a wide spectral range. **Nuovo Cimento**, v. 1, n. 1, p. 309-318, 1984.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, May. 1989.

KHALLOU-LASCHET, J. et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8852, Jan. 2010.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 5, p. 598-625, May. 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins, Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LABONTE, A. C.; TRAMPONT, A. C.; HAHN, Y. S. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. **Mol Cells**, v. 37, n. 4, p. 275-285, Apr. 2014.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 3, p. 181-189, Mar. 2004.

LEY, K. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-689, Sep. 2007.

LI, C.; LEVIN, M.; KAPLAN, D. L. Bioelectric modulation of macrophage polarization. **Sci Rep**, v. 12, n. 6, p. 1-12, Feb. 2016.

LINDGARD, A. et al. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. **Lasers Med Sci**, v. 22, n. 1, p. 30-36, Mar. 2007.

LIONGUE, C.; JOHN, L. B.; WARD, A. Origins of adaptive immunity. **Crit Rev Immunol**, v. 31, n. 1, p. 61-71, 2011.

LIU, H. et al. Redox-dependent transcriptional regulation. **Circ Res**, v. 97, n. 10, p. 967-974, Nov. 2005.

LIU, P. et al. *Escherichia coli* and *Candida albicans* induced macrophage extracellular trap-like structures with limited microbicidal activity. **PLoS One**, 25;v. 9, n. 2, p. e90042, Feb. 2014.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.
- LUBART, R. et al. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. **Lasers Surg Med**, v. 21, n. 5, p. 493-9, 1997.
- MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, n. 4736, p. 493-494, Aug. 1960.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec. 2004.
- MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec. 2004.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, n.1, p. 13, Mar. 2014.
- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n. 1, p. 451-483, 2009.
- MENEGUZZO, D. T. **Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana**. 2007. 134f. Dissertação (Mestrado em Dentística) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MISERENDINO, L. J.; PICK, R. **Lasers in dentistry**. Carol Stream, Quintessence Publishing, 1995, 341p.
- MOESTRUP, S. K.; MOLLER, H. J. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. **Ann Med**, v. 36, n. 5, p. 347-354, 2004.
- MOSKVIN, S. V. Low-Level Laser Therapy in Russia: History, Science and Practice. **J Lasers Med Sci**, v. 8, n.2, p. 56-65, Mar. 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, Dec. 1983.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-969, Dec. 2008.
- MULLER, W. A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 323-344, 2011.
- MUNAWARA, U. et al. Cytokines regulate complement receptor immunoglobulin expression and phagocytosis of *Candida albicans* in human macrophages: A control point in anti-microbial immunity. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 4050, Jun. 2017.

- NATHAN, C. F.; ROOT, R. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **J Exp Med**, v. 146, n. 6, p. 1648-1662, Dec. 1977.
- NAUSEEF, W. M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 277-291, Oct. 2004.
- NAUSEEF, W. M. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 2, p. 757-767, Feb. 2014.
- NETEA, M. G. et al. Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 9, p. 672-676, Sep. 2004a.
- NETEA, M. G. et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 6, p. 3712-3718, Mar. 2004b.
- NGKELO, A. et al. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G $\alpha$  dependent PI-3 kinase signalling. **J Inflamm (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 1, Jan. 2012.
- NISHINAKA, D. A. et al. Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 413, n. 1, p. 75-79, Sep. 2011.
- NORRIS, D. A. et al. Isolation of functional subsets of human peripheral blood monocytes. **J Immunol**, v. 123, n. 1, p. 166-172, Jul. 1979.
- OTSUNI, M. A. et al. Modulation of the activity of the NADPH oxidase system by reactive oxygen species: influence of catalase. **Radiat Prot Dosimetry**, v. 143, n. 2-4, p. 166-71, Feb. 2011.
- OTTOLINI, B. et al. Evidence of convergent evolution in humans and macaques supports an adaptive role for copy number variation of the  $\beta$ -defensin-2 gene. **Genome Biol Evol**, v. 6, n. 11, p. 3025-3038, Oct. 2014.
- PAL, G. et al. Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes. **J Photochem Photobiol B**, v. 86, n. 3, p. 252-261, Mar. 2007.
- PEACH, R. J. et al. Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. **J Biol Chem**, v. 270, n. 36, p. 21181-21187, Sep. 1995.
- PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- Phagocytes. Disponível em: <<http://www.leukos.us>> Acesso em: 28 Jun. 2016.
- PICK, E. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. **Small GTPases**, Mar. 2014. doi: 10.4161/sgtp.27952.

PRICE, M. et al. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. **Photochem Photobiol**, v. 85, n. 5, p. 1177-1181, Sep. 2009.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

RACHECK, L. I. et al. Troglitazone, but not rosiglitazone, damage mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunctions and cell death in human hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 240, p. 348-354, 2009.

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. **Contrib Microbiol**, v. 15, p. 164-87, 2008.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, Nov. 2002.

RAGGI, F. et al. Regulation of Human Macrophage M1–M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. **Front Immunol**, Sep. 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01097.

RÁJECKÝ, M.; LOJEK, A.; CÍZ, M. Differentiating between intra- and extracellular chemiluminescence in diluted whole-blood samples. **Int J Lab Hematol**, v. 34, n. 2, p. 136-142, Apr. 2012.

RIBEIRO, M. S.; ZEZZEL, D. M. Laser de baixa intensidade. In: GUTKNECHT, N.; EDUARDO, C. P. **A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica**. São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 2004, p. 217-40.

ROJAS, J. M. et al. Phospholipase D from *Loxosceles laeta* Spider Venom Induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- $\alpha$ , and CCL2/MCP-1 Production in Human Skin Fibroblasts and Stimulates Monocytes Migration. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 4, p. E125, Apr. 2017.

ROSSOL, M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Crit Rev Immunol**, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011.

RÖSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators Inflamm**, May. 2015. doi: 10.1155/2015/816460.

SANTOS, G. B. **Ação do nitróxido de tempol sobre a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase (Nox2) em neutrófilos**. 2016. 97f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

SCHRECK, R.; BAEUERLE, P. A. A role for oxygen radicals as second messengers. **Trends Cell Biol**, v. 1, n. 2-3, p. 39-42, Aug. 1991.

SEGAL, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 4, p. 604-618, Oct. 2008.

SHAO, Y. et al. Lysophospholipids and Their Receptors Serve as Conditional DAMPs and DAMP Receptors in Tissue Oxidative and Inflammatory Injury. **Antioxid Redox Signal**, Apr. 2017. doi: 10.1089/ars.2017.7069.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v. 189, n. 11, p. 1777-1782, Jun. 1999.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest**, v. 122, n. 3, p. 787-795, Mar. 2012.

SIEWEKE, M. H.; ALLEN, J. E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. **Science**, v. 342, n. 6161, p. 1242974, Nov. 2013.

SILVA, I. H. et al. Increase in the nitric oxide release without changes in cell viability of macrophages after laser therapy with 660 and 808 nm lasers. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 9, p. 1855-1862, Dec. 2016.

SILVA, T. C. **Estudo in vivo dos efeitos biomoduladores de um laser em baixa intensidade no fator de crescimento endotelial vascular**. 2007. 154f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

SMITH, K. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Ther**, v. 3, p. 19-24, 1991.

SOBANKO, J. F.; ALSTER, T. S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. **Dermatol surg**, v. 34, n. 8, p. 991-1000, Aug. 2008.

SOLMAZ, H.; ULGEN, Y.; GULSOY, M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 32, n. 4, p. 903-910, May. 2017.

SOLOMON, K. R. et al. Heterotrimeric G proteins physically associated with the lipopolysaccharide receptor CD14 modulate both in vivo and in vitro responses to lipopolysaccharide. **J Clin Invest**, v. 102, n. 11, p. 2019-2027, Dec. 1998.

SPERANDIO, F. F. **Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOR e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermoide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade**. 2012. 115f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SPERANDIO, F. F. et al. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. **J Biophotonics**, v. 8, n. 10, p. 795-803, Oct. 2015.

SPERANDIO, F. F. et al. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. **J Biophotonics**, v. 6, n. 10, p. 839-84, Oct. 2013.

- SPITLER, R. et al. Combination of low level light therapy and nitrosyl-cobinamide accelerates wound healing. **J Biomed Opt**, v. 20, n. 5, p. 051022, May. 2015.
- STAMPER, C. C. et al. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 608-611, Mar. 2001.
- STASIA, M. J. CYBA encoding p22(phox), the cytochrome b558 alpha polypeptide: gene structure, expression, role and physiopathology. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 27-35, Jul. 2016.
- STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **J Immunol**, v. 175, n. 1, p. 342-349, Jul. 2005.
- SUTTON, S. **Measurement of Microbial Cells by Optical Density**. 2011. Disponível em: <[http://www.microbiologynetwork.com/content/JVT\\_2011\\_v17n1\\_Measurement-of-Microbial-Cells-by-Optical-Density.pdf](http://www.microbiologynetwork.com/content/JVT_2011_v17n1_Measurement-of-Microbial-Cells-by-Optical-Density.pdf)> Acesso em: 07 Mar. 2017.
- SWEET, M. J.; HUME, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 60, n. 1, p. 8-26, Jul. 1996.
- TAGHAVI, M. et al. Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. **Eur J Pharmacol**, v. 5, n. 808, p. 8-13, Aug. 2017.
- TAKASHIBA, S. et al. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB. **Infect Immun**, v. 67, n. 11, p. 5573-5578, Nov. 1999.
- TARIQUE, A. A. et al. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 53, n. 5, p. 676-688, Nov. 2015.
- TINGUELY, C.; SCHALLER, M.; NYDEGGER, U. E. Mononuclear cells ingest E. coli opsonized by investigational intravenous immunoglobulin preparations in the absence of complement more efficiently than polymorphonuclear phagocytes. **Transfus Apher Sci**, v. 25, n. 1, p. 43-50, Aug. 2001.
- TRAJANO, L. A. S. N. et al. Low-level infrared laser modulates muscle repair and chromosome stabilization genes in myoblasts. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 6, p. 1161-1167, Aug. 2016.
- TUCUREANU, M. M. et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of Gi-protein inhibitor. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 63-76, Dec. 2017.
- URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 4, p. 668-676, Apr. 2006.
- VAJJHALA, P. R. et al. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. **Mol Immunol**, v. 86, p. 23-37, Jun. 2017.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. 1-11, Jun. 2002.

WEBSTER, S. J. et al. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. **J Immunol**, v. 185, n. 5, p. 2968-2979, Sep. 2010.

YAMASAKI, R. et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. **J Exp Med**, v. 211, n. 8, p. 1533-1549, Jul. 2014.

YILDIRIMTURK, S. et al. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Healing of Bone Defects in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: A Histological and Morphometric Evaluation. **J Cosmet Laser Ther**, Jun. 2017. doi: 10.1080/14764172.2017.1341048.

YIN, K. et al. Low-Level Laser Effect on Proliferation, Migration, and Antiapoptosis of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Dev**, v. 26, n. 10, p. 762-775, May. 2017.

ZEYDA, M. et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 9, p. 1420-1428, Sep. 2007.

## ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITOS DA LASERTERAPIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS

**Pesquisador:** Felipe Fornias Sperandio

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 60350316.5.0000.5142

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.980.248

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Mestrado que visa avaliar os efeitos da laserterapia na diferenciação de monócitos a macrófagos, a fim de controlar e manipular a polarização e a resposta dos mesmos, relacionando os resultados obtidos com possíveis novas aplicações terapêuticas por meio de cultura de células humanas extraídas a partir de coleta de sangue.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Geral:** "Elucidar os efeitos da laserterapia (LT) na diferenciação de monócitos a macrófagos, bem como na estimulação de uma resposta imune específica (pró ou anti-inflamatória)."

**Objetivos Específicos:** "Avaliar a viabilidade de monócitos frente à LT; quantificar as populações de macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos alternativamente ativados (M2) induzidas pela LT; mensurar a produção de ERO por monócitos e macrófagos após a efetuação da LT; avaliar se a atividade microbicida destas células foi influenciada pela LT; e relacionar os resultados obtidos com possíveis novas aplicações terapêuticas da LT."

Os objetivos são claros, bem definidos, coerentes com a propositura geral do projeto e exequíveis.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos/desconfortos bem como as medidas minimizadoras foram bem avaliados e descritos no

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-000

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3299-1318

**Fax:** (35)3299-1318

**E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



Continuação do Parecer: 1.980.248

projeto.

Os benefícios superam os riscos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

a. Metodologia da pesquisa: está adequada aos objetivos do projeto, é atualizada e promove baixo risco aos voluntários.

b. Referencial teórico da pesquisa – está atualizado e é suficiente para aquilo que se propõe.

c. Cronograma de execução da pesquisa – Presente e adequado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

a. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Presente e adequado.

b. Termo de Assentimento (TA) – Não se aplica.

c. Termo de Assentimento Esclarecido (TAE) – Não se aplica.

d. Termo de Compromisso para Utilização de Dados e Prontuários (TCUD) – Não se aplica.

e. Termo de Anuência Institucional (TAI) – Presente e adequado.

f. Folha de rosto - Presente e adequada.

g. Projeto de pesquisa completo e detalhado - Presente e adequado.

h. Cronograma - Presente e adequado.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomenda-se a aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado do CEP acata o parecer do relator.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_788832.pdf	13/02/2017 11:11:53		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CORRIGIDO2_EFEITOS_DA_LASERTERAPIA_MONOCITOS.docx	13/02/2017 11:10:30	Felipe Fornias Sperandio	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_ANUENCIA.pdf	13/02/2017 11:06:47	Felipe Fornias Sperandio	Aceito

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-000

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3299-1318

**Fax:** (35)3299-1318

**E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



Continuação do Parecer: 1.980.248

Cronograma	CRONOGRAMA_CORRIGIDO.docx	13/02/2017 11:05:33	Felipe Fornias Sperandio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	15/11/2016 21:01:49	Felipe Fornias Sperandio	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoCEP.pdf	26/09/2016 12:09:38	Felipe Fornias Sperandio	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ALFENAS, 23 de Março de 2017

---

**Assinado por:**  
**Marcela Filié Haddad**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

**Bairro:** centro

**CEP:** 37.130-000

**UF:** MG

**Município:** ALFENAS

**Telefone:** (35)3299-1318

**Fax:** (35)3299-1318

**E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

## APÊNDICE A – TERMO DE ANUÊNCIA INSTITUCIONAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



### TERMO DE ANUÊNCIA INSTITUCIONAL

(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

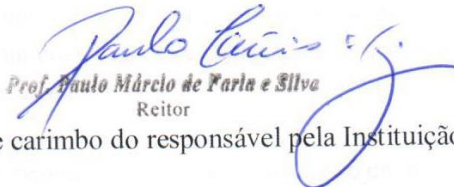
Aceito que a pesquisadora **Mayara Santos de Castro** (discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - mestrado), sob responsabilidade e orientação do pesquisador principal **Felipe Fornias Sperandio**, da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, desenvolva a pesquisa intitulada **EFEITOS DA LASERTERAPIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS**.

Ciente dos objetivos e da metodologia da pesquisa acima citada, concedo a anuência para o seu desenvolvimento, desde que me sejam assegurados os requisitos abaixo:

- O cumprimento das determinações éticas da Resolução nº466/2012 CNS/CONEP.
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa.
- Não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação dessa pesquisa.
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.

Alfenas/MG  
Local

08 de fevereiro de 2017.  
Data

  
 Prof. Paulo Márcio de Faria e Silva  
 Reitor

Assinatura e carimbo do responsável pela Instituição

## APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, da pesquisa intitulada: **EFEITOS DA LASERTERAPIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS**, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento.

Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador(a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

**TÍTULO DA PESQUISA:** EFEITOS DA LASERTERAPIA NA DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS.

**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Felipe Fornias Sperandio.

**ENDEREÇO:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Cep: 37130-000, Minas Gerais, Brasil.

**TELEFONE:** (35) 3299-1301.

**PESQUISADORES PARTICIPANTES:** Mayara Santos de Castro.

**OBJETIVOS:** A presente pesquisa visa compreender os efeitos da laserterapia (LT) na transformação de monócitos em macrófagos, uma das principais células de defesa de nosso organismo.

**JUSTIFICATIVA:** Atualmente, estudos sobre os efeitos da LT em células do sistema imune, principalmente em monócitos e macrófagos, são escassos e frequentemente controversos. Tem sido sugerido que a LT possui uma excelente capacidade em controlar a resposta imunológica, portanto, compreender e ser capaz de induzir respostas imunes específicas mostra-se importante na potencialização da defesa de nosso organismo contra micro-organismos e no tratamento de doenças.

**PROCEDIMENTOS DO ESTUDO:** Esta pesquisa será realizada no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), através da cultura de células (monócitos) que serão tratadas com o laser. Os monócitos serão obtidos através da coleta de sangue da veia braquial do voluntário que consentir participar livremente e esclarecidamente desta pesquisa. Esta etapa será efetuada por profissional capacitado no Laboratório Central de Análises Clínicas (LACEN) da UNIFAL-MG e o volume total de sangue coletado de cada indivíduo será de 50 mL. O sangue doado será utilizado apenas para os experimentos determinados e não será estocado, portanto, o material biológico que sobrar ou que não for utilizado nos experimentos será descartado conforme a legislação sanitária.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Os riscos desta pesquisa limitam-se aos atos da coleta de sangue do voluntário e da manipulação do mesmo. Em relação à coleta, dor, coloração arroxeadada e outros desconfortos locais podem ocorrer, bem como, mais raramente, desmaio, quebra da agulha e infecções no local da punção. Relacionado à manipulação do sangue, destaca-se o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas não relatadas/ocultadas pelo voluntário da pesquisa. Sendo assim, cuidados serão tomados para minimizar esses riscos, como: coleta de sangue cuidadosa com agulhas de qualidade, técnicas de redução de estresse no momento da punção se necessárias, entrevista prévia detalhada e uso de equipamentos de proteção individual.

**BENEFÍCIOS:** A obtenção de células diretamente do sangue humano possui menor custo do que a aquisição de células comercializadas. Assim, o voluntário que consentir em participar desta pesquisa, doando 50 mL de sangue, estará colaborando para o desenvolvimento

científico, bem como, para a compreensão das aplicações terapêuticas da LT mediante o sistema imune.

**CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE:** Não haverá nenhum gasto com a sua participação, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento pela sua participação.

**CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA:** O voluntário que participar desta pesquisa não será identificado, tendo o anonimato e a privacidade quanto aos dados confidenciais assegurados.

Assinatura do Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que li as informações contidas nesse documento e fui devidamente informado(a) pelos pesquisadores – Felipe Fornias Sperandio e Mayara Santos de Castro – dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa.

Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Poderei consultar o pesquisador responsável (acima identificado) ou o CEPUNIFAL-MG, com endereço na UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Cep: 37130-000, Minas Gerais, Brasil, Fone: (35) 3299-1318, no e-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br, sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

LOCAL E DATA: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(Nome por extenso)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura)

NOME E ASSINATURA DO SUJEITO OU RESPONSÁVEL (se menor de 21 anos):