

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Maria Gabriela Rolim Silveira Sá

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS POR QUERATINÓCITOS HaCaT ESTIMULADOS POR
CITOCINAS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Belo Horizonte

2022

Maria Gabriela Rolim Silveira Sá

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS POR QUERATINÓCITOS HaCaT ESTIMULADOS POR
CITOCINAS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas, Área Temática: Estomatologia.

Linha de Pesquisa: Biologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto

Belo Horizonte

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

S111e Sá, Maria Gabriela Rolim Silveira
Efeito da fotobiomodulação na expressão de citocinas inflamatórias por queratinócitos HaCaT estimulados por citocinas de monócitos do sangue periférico humano / Maria Gabriela Rolim Silveira Sá. Belo Horizonte, 2022.
61 f. : il.

Orientadora: Giovanna Ribeiro Souto
Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Terapia com luz de baixa intensidade. 2. Cicatrização. 3. Agentes antineoplásicos. 4. Leucócitos. 5. Monócitos. 6. Citocinas. 7. Queratinócitos. 8. Mucosa bucal. 9. Inflamação. 10. Lasers em odontologia. I. Souto, Giovanna Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.311.2

Maria Gabriela Rolim Silveira Sá

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS POR QUERATINÓCITOS HaCaT ESTIMULADOS POR
CITOCINAS DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas – Área Temática: Estomatologia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Profa. Dra. Ivana Márcia Alves Diniz – UFMG
- 2- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas
- 3- Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 25 de março de 2022

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto
Orientadora

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

AGRADECIMENTOS

E assim, mais uma jornada acadêmica se encerra. Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por me conduzir sempre no Seu caminho.

Aos meus pais, Tereza e Adilson, que possibilitaram mais uma realização em minha vida. A minha irmã Esther, e as minhas irmãs de coração, Ana Paula e Luísa, por serem sempre o meu porto seguro.

A Profa. Dra. Giovanna, pela orientação, dedicação, confiança, e por me estimular a ir além do que eu poderia imaginar.

Ao Prof. Dr. Celso, pelo apoio, disponibilidade e atenção ao meu trabalho.

Aos meus colegas do Mestrado. Essa conquista é nossa!

Ao corpo docente do Mestrado Acadêmico em Clínicas Odontológicas e pela PUC Minas, pela oportunidade e conhecimento ofertado.

Às funcionárias da secretaria de Pós-graduação em Odontologia pela disponibilidade, auxílio e gentileza com que sempre me atenderam.

Que o caminho continue, e que eu possa continuar trilhando em busca de mais conhecimento.

RESUMO

A terapia de fotobiomodulação é utilizada frequentemente para estimular o organismo no reparo tecidual e proliferação celular, mas os efeitos em citocinas inflamatórias ainda precisam ser melhor investigados. O objetivo do estudo é avaliar os efeitos do laser de comprimento de onda vermelho (660 nm), infravermelho (880 nm) e associação de ambos na modulação de citocinas inflamatórias produzidas por queratinócitos HaCaT desafiados por citocinas de monócitos humanos estimulados por Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Células no sangue humano periférico (PBMC) de três doadores foram isolados e estimulados por LPS durante uma hora. Após três horas do estímulo, com incubação em meio sem LPS, o sobrenadante foi coletado, medido e utilizado para estimular as células HaCaT. As células HaCaT foram expostas duas vezes ao laser de diodo (InGaAlP, 20 mW, 0.71 W/cm², 0.028 cm²), na densidade 5 J/cm², 18 horas e 1 hora antes do desafio com as citocinas. Em seguida, o sobrenadante contendo citocinas de monócitos foi adicionado no meio de cultivo das células HaCaT. Após 2 horas a concentração de citocinas foi avaliada e o sobrenadante substituído. Após quatro horas, sobrenadante foi novamente avaliado nos grupos expostos e não expostos ao laser e a concentração das citocinas IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 foi mensurada através do CBA Multiplex assay e comparada entre os grupos. A viabilidade celular foi realizada por meio do teste com MTT, comparando os grupos experimentais expostos à irradiação, com os grupos controle não expostos à irradiação. Os dados mostraram que a densidade de energia de 5 J/cm² e o estímulo com citocinas não afetaram a viabilidade celular das células HaCaT. O laser infravermelho aumentou a produção de IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 pelas células HaCaT (P <0.05) em relação ao grupo controle, aumentou a produção de IFN- α 2, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18 e IL-23 em relação às células estimuladas pela associação do laser vermelho e infravermelho (P <0.05) e a produção de IFN- γ 23 em relação ao laser vermelho (P <0.05). O efeito do laser vermelho nas células HaCaT foi notado apenas com aumento da expressão da citocina IFN- α 2 em relação controle (P <0.05). O laser vermelho, infravermelho e os dois simultaneamente aplicados na densidade de energia de 5 J/cm², em dois momentos, parece apresentar capacidade de modulação inflamatória sobre as células HaCaT desafiadas por citocinas de monócitos humanos.

Palavras-chave: Terapia de baixo nível de energia. Células HaCaT. Leucócitos. Monócitos. Citocinas.

ABSTRACT

Photobiomodulation therapy is frequently used to stimulate technical and cellular repair, but the effects on inflammatory cytokines still need to be further investigated. The aim of the study is to evaluate the effects of red wavelength laser (660 nm), infrared (880 nm) and the association of both on the modulation of inflammatory cytokines produced by HaCaT keratinocytes challenged by cytokines of human monocytes stimulated by LPS. Cells in human peripheral blood (PBMC) from three donors were isolated and stimulated by LPS for one hour. After three hours of incubation in medium without LPS, the supernatant was collected, measured, and used to stimulate HaCaT cells. HaCaT cells were exposed twice to diode laser (InGaAlP, 20 mW, 0.71 W/cm², 0.028 cm²), at 5 J/cm² density, 18h and 1h before challenge with cytokines. Then, the supernatant containing monocyte cytokines was added to the HaCaT cell culture medium. After two hours the cytokine concentration was assessed, and the supernatant replaced. After four hours, the supernatant was again evaluated in the groups exposed and not exposed to the laser and the concentration of cytokines IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12p70, IL-17A, IL-23 and IL-33 were measured using the CBA Multiplex assay and compared between groups. Cell viability was performed using the MTT test, comparing the experimental groups exposed to irradiation with the control groups not exposed to irradiation. The data showed that the energy density of 5J/cm² and stimulation with cytokines did not affect the cell viability of HaCaT cells. The infrared laser increased the production of IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23 and IL-33 by HaCat cells ($P < 0.05$) in relation to the control group, increased the production of IFN- α 2, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-18 and IL-23 in relation to stimulated cells by the association of the red laser and infrared ($P < 0.05$) and the production of IFN- γ and IL-23 in relation to the red laser ($P < 0.05$). The effect of red laser on HaCaT cells was noted only with increased expression of IFN- α 2 cytokine compared to control ($P < 0.05$). The red, infrared and the two lasers simultaneously applied at an energy density of 5 J/cm² seem to have the ability to modulate inflammation on HaCaT cells challenged by human monocyte cytokines.

Keywords: Low-level light Therapy. HaCaT cells. Leukocytes. Mononuclear. Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Graus Celsius
Células NK	Células <i>natural killer</i>
cit C	Citocromo C oxidase
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
IL-	Interleucina
INF-	Interferon
InGaAlP	Fosforeto de Índio-Gálio-Alumínio
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
mg/ml	Miligramas por mililitro
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Metil tetrazol formazan
mW	Miliwatt
NF-κB	Fator nuclear kappa B
Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
PBMC	Células no sangue humano periférico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
ROS	Espécies reativas de oxigênio

TFBM	Terapia de fotobiomodulação
Th1	Citocinas pró-inflamatórias
Th2	Citocinas anti-inflamatórias
TNF-	Fator de necrose tumoral
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Efeitos biológicos da terapia de fotobiomodulação (TFBM).....	19
1.1.1	<i>Mecanismo de ação</i>.....	20
1.1.2	<i>Efeito sobre as citocinas</i>.....	22
1.2	Estímulo inflamatório: Lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Escherichia coli</i>.....	26
1.3	Efeito da luz laser no reparo de feridas em modelos <i>in vitro</i>	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas	59

1 INTRODUÇÃO

O laser de baixa potência tem sido amplamente utilizado em várias modalidades terapêuticas, visando estimular a cicatrização e regeneração tecidual. Este processo tem sido denominado terapia com laser/luz em baixa potência (do inglês, *low level light/laser therapy* – LLLT), sendo o termo atualmente empregado o de terapia por fotobiomodulação (TFBM) (do inglês, *photobiomodulation therapy* - PBMT) (ENGEL; KHAN; ARANY, 2016).

A TFBM utiliza baixas doses de radiação com comprimento de onda visível no vermelho ou próximo ao infravermelho, sendo não-ionizante e não-térmica, para promover efeitos terapêuticos. Diversos estudos demonstram resultados promissores no uso da TFBM nos campos da medicina, odontologia e fisioterapia, estimulando a cicatrização ou regeneração dos tecidos, analgesia e a diminuição da inflamação (ENGEL; KHAN; ARANY, 2016). Freitas e Hamblin (2016) afirmaram que a TFBM tem ação anti-inflamatória, e, quando há ausência da inflamação, o laser de baixa potência pode auxiliar na remodelação do tecido e mediar função celular, através de indução de mediadores pró-inflamatórios. Assim, a TFBM pode alterar os níveis de diversas citocinas e mediadores inflamatórios.

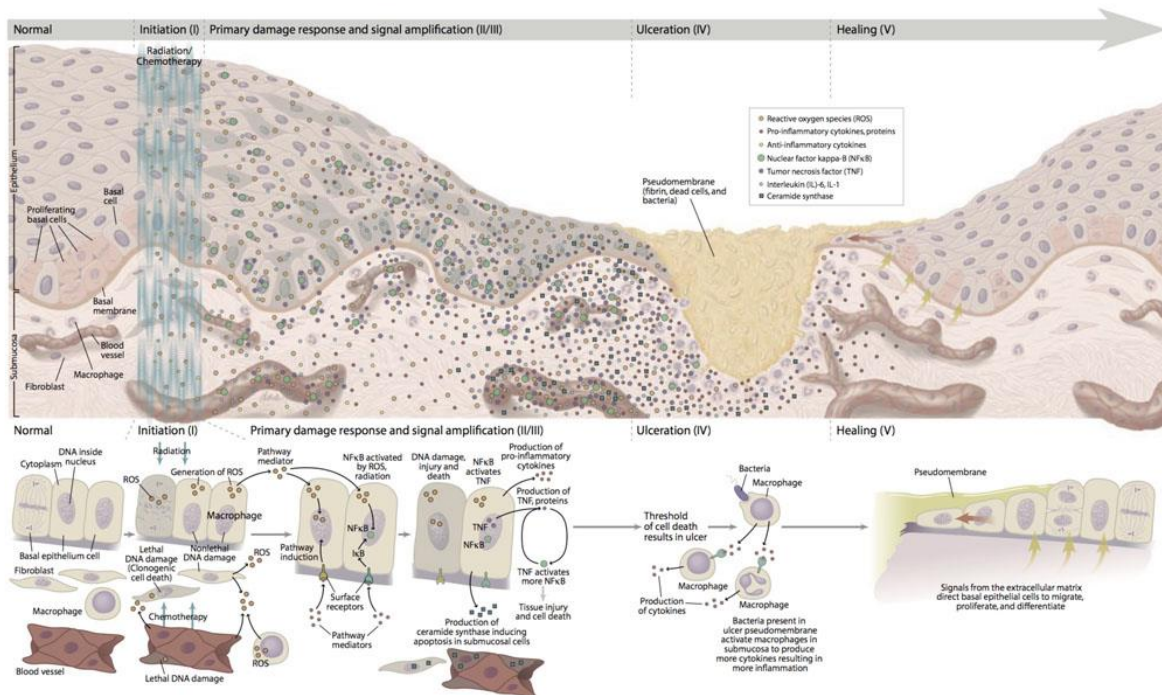
Apesar de muitos estudos já tenham sido realizados, os mecanismos celulares responsáveis pela transdução de sinais, a partir da irradiação do laser sobre as células e tecidos, ainda não são claramente esclarecidos (CHEN *et al.*, 2011). O conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares, contextos biológicos envolvidos e a dose relacionada a cada aplicação ainda é escasso (ARANY, 2012). Vários parâmetros podem afetar os efeitos da TFBM, como o comprimento de onda a ser utilizado, a distância da ponteira do laser à área que será irradiada, a fluência, o tempo de aplicação, a pulsação e a polarização da luz (ENGEL; KHAN; ARANY, 2016; GAO; XING, 2009). Desta forma, dependendo da variação desses parâmetros, podem ocorrer efeitos estimulatórios ou inibitórios.

O aumento da expressão de citocinas inflamatórias na cavidade oral tem sido relacionado com a etiopatogênese da mucosite oral, inflamação da mucosa bucal causada por quimioterapia e/ou radioterapia, que pode evoluir para úlceras dolorosas e predispor o paciente a infecções secundárias, comprometer sua qualidade de vida e o curso do tratamento (EDUARDO *et al.*, 2015). A mucosite oral pode se manifestar em 20% a 40% dos pacientes que recebem quimioterapia convencional, em 80% dos

pacientes que recebem altas doses de quimioterapia durante o condicionamento para o transplante de células tronco hematopoiéticas, e na maioria dos pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço (LALLA *et al.*, 2014).

O modelo de Sonis descreve a patogênese da mucosite em cinco fases: iniciação - dano direto ao DNA, com formação de espécies reativas de oxigênio; resposta a danos primários - fatores de transcrição são ativados, levando a produção de citocinas e enzimas pró-inflamatórias; amplificação de sinais - aumento da produção de citocinas e amplificação da sinalização, resultando em apoptose e lesão tecidual; ulceração - erosões clinicamente evidentes, presença de bactérias e secreções adicionais de citocinas pró-inflamatórias; e cicatrização - a cura fisiológica (CINAUSERO *et al.*, 2017; WONG, 2014).

Figura 1: Patologia da mucosite



Fonte: Cinausero *et al.* (2017)

Um estudo *in vitro* mostrou que citocinas inflamatórias estão associadas com a diminuição da migração de fibroblastos gengivais. No entanto, observou-se que o laser, no comprimento de onda de 780 nm e dose de energia de 0,5 J/cm² é capaz de promover migração e proliferação de fibroblastos mesmo em contato com citocinas inflamatórias (BASSO *et al.*, 2016).

A TFBM possui propriedades que aceleram a reparação tecidual e provocam certo grau de analgesia (CASTRO *et al.*, 2013). O efeito TFBM na expressão de citocinas pró-inflamatórias também foi avaliado e mostra efeito biomodulador benéfico no controle da expressão de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à mucosite (BASSO *et al.*, 2016). Apesar dos potenciais resultados, a TFBM eficiente depende do uso de parâmetros apropriados, e isso ainda está sob investigação (ABRAMOFF *et al.*, 2008; MIGNON *et al.*, 2017). Adicionalmente, tem sido preconizado o uso de dois comprimentos de onda simultaneamente para tratamento de distúrbios temporomandibulares (SOUSA *et al.*, 2019) e psoríase (ABLON, 2010), mas ainda não é encontrado na literatura quais são os efeitos de combinar dois comprimentos de onda para tratamento de lesões de mucosite oral. Assim, o desenvolvimento de estudos *in vitro*, com o objetivo de um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese dessas lesões, bem como dos efeitos terapêuticos da TFBM, torna-se indispensável (SPERANDIO *et al.*, 2015).

Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito da fotobiomodulação na expressão de mediadores inflamatórios por queratinócitos humanos (HaCaT) estimuladas por citocinas produzidas por monócitos do sangue periférico humanos desafiados por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli.*, utilizando o sistema de cultivo *in vitro*. Além disso, foi avaliada a irradiação com os dois comprimentos de onda, 660 nm - vermelho e 808 nm - próximo ao infravermelho, aplicados isoladamente e simultaneamente.

1.1 Efeitos biológicos da terapia de fotobiomodulação (TFBM)

Estudos mostram que a TFBM possui propriedades que aceleram a reparação tecidual e provocam certo grau de analgesia (CASTRO *et al.*, 2013). O seu uso vem sendo muito promissor em especialidades médicas e odontológicas, com aplicação direta do laser sobre a mucosa oral (ANSCHAU *et al.*, 2019; RUPEL *et al.*, 2018). Apesar dos potenciais resultados, a TFBM eficiente depende do uso de parâmetros apropriados, e isso ainda está sob investigação (ABRAMOFF *et al.*, 2008; MIGNON *et al.*, 2017).

Experimentos *in vitro* e ensaios pré-clínicos indicam que fatores como tempo de irradiação e densidade de potência aplicada, podem induzir efeitos estimulatórios ou inibitórios pela TFBM (GULSOY *et al.*, 2006; MIGNON *et al.*, 2017). Os efeitos de

bioestimulação, como aumento da proliferação, migração e adesão celular (GULSOY *et al.*, 2006), em estudos celulares *in vitro*, ocorrem na faixa de valores entre 1 J/cm² a 10 J/cm²; já os efeitos inibitórios tendem a ocorrer em valores acima de 25 J/cm² (TATA; WAYNANT, 2011). Além disso, estudos indicam que a irradiação de luz de 635 nm pode estimular um efeito anti-inflamatório, inibindo a produção de PGE2 e a expressão de mRNA de ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

1.1.1 Mecanismo de ação

A absorção de energia por diferentes moléculas do corpo depende do comprimento de onda na qual o tecido é irradiado. Os comprimentos de onda mais curtos (632 – 660 nm) demonstram depositar a maior parte de sua energia em camadas superficiais, enquanto comprimentos de onda mais longos (780 – 901 nm), penetram mais profundamente (SCHUBERT *et al.*, 2007). Uma reação fotobiológica corre através da absorção de luz, em determinados comprimentos de onda, por meio dos cromóforos presentes nas superfícies celulares, os fotorreceptores (KARU, 1999).

Os fotorreceptores absorvem determinados comprimentos de onda que atuam na cascata da cadeia respiratória, produzindo energia para uma maior proliferação celular e síntese proteica (CASTRO *et al.*, 2013). Inicialmente, através da absorção dos fótons, obtemos as reações primárias, que causam alterações na configuração molecular do fotorreceptor (GAO; XING, 2009). Em seguida, diversas alterações, chamadas reações secundárias, atuam nos sinais e funções celulares, manifestando-se em alterações no potencial de membrana mitocondrial, nas concentrações mitocondriais de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de íons cálcio (KARU, 2008).

A mitocôndria, organela responsável pelo ciclo de respiração celular, exerce diversas funções, interligando sinais entre a própria organela e o núcleo. Evidências sugerem que as mitocôndrias são sensíveis à radiação na região do comprimento de onda vermelho ou vermelho próximo (600 nm – 1000 nm) (KARU, 1989), podendo contribuir para os efeitos da TFBM. Estudos indicam a mitocôndria está envolvida nos mecanismos de respostas celulares que ocorrem devido a irradiação dos tecidos com a luz no comprimento de onda vermelho e infravermelho, além de ser fundamental no processo de fotorrecepção (ENGEL; KHAN; ARANY, 2016).

Várias evidências indicam que o Citocromo C oxidase (cit C), enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons, que os transfere para o oxigênio molecular, tem a função de fotorreceptor e transdutor de fotossinais, quando relacionado à absorção de luz vermelha e infravermelha. Estudos indicam que a TFBM aumenta a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular, aumentando o potencial de membrana mitocondrial, e os níveis de ATP, AMPc e ROS. Além disso, a TFBM parece aumentar, na cadeia de transferência de elétrons, a atividade dos complexos I, II, III, IV e succinato desidrogenase (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

O cit C é constituída de dois centros heme e dois centros de cobre, e é conhecido como complexo IV; indícios apontam que ele é o fotorreceptor primário, já que é possível observar um aumento de consumo de oxigênio durante a irradiação de luz de baixa potência, sendo que a maior parte deste consumo ocorre no interior da célula, no complexo IV. Outro fato que corrobora essa hipótese é a inibição do efeito positivo da TFBM pela azida de sódio, um inibidor da cit C (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Foi proposto que a TFBM aumenta o nível de óxido nítrico (NO) através da liberação dos complexos metálicos presentes na estrutura do cit C, ou pela regulação positiva de sua atividade como redutase de nitrito. A TFBM poderia atuar como fotodissociador do NO no cit C, revertendo a inibição mitocondrial da respiração celular, por sua ligação em excesso em NO. O NO é então fotodissociado de sua ligação nos centros de ferro e cobre do cit C, na qual compete com o oxigênio, reduzindo sua atividade enzimática. Essa cascata permite um influxo de oxigênio, retomada da respiração, e produção de ROS (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

A irradiação dos tecidos pelo comprimento de onda de luz vermelha causa uma excitação da cit C, aumentando a taxa de bombeamento de prótons de hidrogênio para o espaço interno mitocondrial. Parte da energia liberada é utilizada para gerar um gradiente de prótons, que será utilizado para a síntese de ATP. O aumento das ROS possibilita o desencadeamento de eventos celulares importantes. As reações secundárias formam vias de sinalização celulares, incluindo a comunicação intracelular da mitocôndria com o núcleo, influenciando em diversas atividades celulares (GAO; XING, 2009; SPERANDIO *et al.*, 2015; TATA; WAYNANT, 2011).

Além disso, vários tipos celulares podem ter sua capacidade de proliferação aumentada pela TFBM. Os queratinócitos mostraram uma maior proliferação após irradiação de luz no comprimento de 660 nm, além do aumento da expressão da

ciclina D1, maior rapidez na maturação de suas células, maior velocidade na sua migração aos locais de injúria, devido à maior expressão de proteínas p63, CK10 e CK14, envolvidas no processo de proliferação celular. Fibroblastos irradiados no comprimento de luz de 632,8 nm, também demonstraram um aumento de sua proliferação e viabilidade. Dessa forma, fica evidente o emprego da TFBM para otimização de cicatrização de feridas. Estudos também mostraram que células endoteliais irradiadas com luz no comprimento de 635 nm, proliferam em maior velocidade, apresentando uma menor concentração de VEGF, do que as não irradiadas; assim, pode-se sugerir que quando induzida por laser, a proliferação celular está relacionada com uma diminuição da concentração de VEGF (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

1.1.2 Efeito sobre as citocinas

As citocinas são mediadores que conduzem a resposta inflamatória nos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. A produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias, a partir da lesão existente, pode se manifestar sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas Th1 pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte. As citocinas Th2 podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Monócitos e macrófagos são os principais produtores de IL-1, especialmente a IL-1 β . A síntese de IL-1 pode ser induzida por TNF- α , IFN- α , β e γ , LPS, vírus e antígenos (VARELLA; FORTE, 2001). A IL-1 β produz inflamação sistêmica através da ativação da COX-2, com a formação de PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância-P, óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial. Tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os IFN- α e IFN- β (tipo 1) são produzidos por monócitos, macrófagos, células linfoblásticas, fibroblastos e células infectadas por vírus; sua principal função é limitar a propagação de infecções virais e das parasitoses. IFN- α atua degradando o mRNA-viral e inibindo a síntese

proteica, inibindo, assim, a replicação viral. Os IFN tipo1 são usados em tratamentos de doenças, em combinação a outras drogas; nas hepatites virais B e C o IFN- α -2b é usado como adjuvante no tratamento. O IFN- γ é produzido principalmente por células T, B e NK. É sinérgico ao IFN- α e IFN- β na atividade antiviral e antiparasitária, mas sua principal atividade é imunomoduladora, inibindo a proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Em monócitos e macrófagos induz a síntese de TNF- α por estas células (VARELLA; FORTE, 2001).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, sendo um dos mediadores mais precoces e potentes após procedimentos cirúrgicos, traumas ou durante infecções. O TNF- α provoca alterações metabólicas e hemodinâmicas importantes, ativa distalmente outras citocinas, ativa a coagulação, estimula a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE2, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanóides, e influencia a apoptose celular. As quimiocinas são pequenas proteínas responsáveis pela migração de leucócitos ao local lesionado ou infectado, e participam da transmissão sináptica. A quimiocina MCP-1/CCL2 é um potente quimiotático e ativador de monócitos, células-T, células NK e eosinófilos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A IL-6 é produzida por várias células, principalmente pelas células B, T e monócitos, e sua síntese é estimulada por IL-1, LPS e TNF. Ela é uma das principais mediadoras da fase aguda da inflamação, e possui ação importante na atração de eosinófilos para o local inflamado. A IL-6 também estimula a produção de ACTH pela hipófise, formando um “*feedback* negativo” entre o sistema imune e o eixo neuroendócrino. A IL-8 é produzida principalmente por monócitos, macrófagos, e em menor quantidade por queratinócitos e outros tipos celulares. É estimulada, geralmente, por IL-1, TNF- α e IFN- γ , e pode ser inibida por corticosteróides e ciclosporina A. Como a MCP, é uma quimiocina: aumenta a quimiotaxise e é fator quimiotático. A principal ação da IL-8 é o estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente os neutrófilos, aumenta a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, e ativa neutrófilos polimorfonucleares, aumentando o metabolismo oxidativo. São observadas altas concentrações na doença psoríase, o que pode explicar a paraceratose e a hiperkeratose que se manifesta, já que IL-8 estimula a divisão dos queratinócitos (VARELLA; FORTE, 2001).

A IL-10 inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias; aumenta a

proliferação de mastócitos, e impede a produção de IFN- γ pelas células NK. Sua produção é prejudicada por muitas citocinas, como IL-4, IL-13 e IFN- γ , e também pela sua própria autorregulação. Seus efeitos anti-inflamatórios podem ser aplicados clinicamente para prevenir a rejeição de transplantes, tratar doenças autoimunes mediadas por células-T, artrite reumatoide, psoríase e na sepse (OLIVEIRA *et al.*, 2011). O mRNA codificante da IL-18 e da IL-12 pode ser encontrado em macrófagos ativados. A IL-12 atua principalmente estimulando as células NK e aumentando a síntese de IFN- γ em linfócitos periféricos. A IL-18 também ativa células NK, leva a proliferação de linfócitos T, inibe a produção de IL-10, e aumenta a produção de IL-12, que, juntamente a ela, produz IFN- γ (VARELLA; FORTE, 2001).

A IL-17 é produzida principalmente por células T CD4+, e por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Ela é capaz de elevar a expressão de ICAM-1 em fibroblastos, epitélios, endotélios, estimula a secreção de IL-6, IL-8, GM-CSF, PGE2 por estas células, mantém a proliferação de progenitores hematopoéticos e sua maturação preferencial em neutrófilos (VARELLA; FORTE, 2001). A IL-23 é uma citocina pró-inflamatória, e ativa o espectro da Janus Kinase (JAK)/Transdutores e ativadores da transcrição (STAT), como JAK 2, STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4 e STAT 5 (COSTA, 2012). A IL-33 possui atividade pró-inflamatória, e estimula significadamente a secreção de IL-5 e IL-13 por células Th2 polarizadas. Ela é expressa principalmente em células epiteliais e endoteliais, e sua forma bioativa é liberada como resultado de necrose celular e estimula a inflamação através de ação autócrina e parácrina (MACEDO, KAKEHASI; ANDRADE, 2016).

Diversas citocinas e mediadores inflamatórios têm seus níveis alterados quando são irradiados com laser de baixa potência. Índícios apontam que, quando há uma inflamação presente, a TFBM exerce uma ação anti-inflamatória, mas quando ela não está presente, a irradiação induz mediadores pró-inflamatórios, que podem auxiliar na remodelação do tecido e na função celular (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Os macrófagos são células apresentadoras de antígenos e estão envolvidos na indução da resposta imunológica primária; a polarização do IFN- γ estimula os monócitos a elevar sua atividade fagocitária, antitumoral e supressão de alergias. Um estudo recente apontou que a TFBM, com a irradiação do laser no comprimento de onda de 660 nm, sendo dose-dependente, poderia causar a polarização de monócitos e influenciar a expressão de citocinas e quimiocinas ao nível de mRNA, com a expressão de proteínas (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

A TFBM também pode induzir a polarização do macrófago M1. Em estudo visando elucidar este efeito na produção de citocinas e quimiocinas relacionadas à M1 (MCP-1/CCL2, CXCL10 e TNF- α), os resultados indicaram que a irradiação com o laser aumentou significativamente a expressão desses mediadores. Após irradiação com o laser no comprimento de onda 660 nm e 808 nm, com dosagem entre 1-2 J/cm², observou-se um aumento da expressão de MCP-1/CCL-2, 24 horas após a irradiação. No entanto, com uma dosagem maior, 3 J/cm², dos dois comprimentos de onda, houve uma supressão da expressão de CCL-2. O TNF- α também demonstrou um aumento quando irradiado por 660 nm, mas foi diminuído com 808 nm. TNF- α e MCP-1 são um dos indicadores da polarização M1 induzida pela TFBM, sua utilização pode promover imunidade antiviral e antitumoral, mas pode não ser uma terapia favorável às alterações autoimunes (CHEN *et al.*, 2014).

Células injuriadas estimulam os leucócitos a liberar citocinas, causando a resposta inflamatória. Os macrófagos presentes na área ferida liberam diversas citocinas, como as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e o TNF- α . Como consequência, ocorre a expressão da ciclooxigenase 2, que consiste nas enzimas cox-1 e cox-2, consideradas pró-inflamatórias. As citocinas IL-6 e TNF- α estimulam a inflamação, ao interagir com seus respectivos receptores (SHAIKH-KADER *et al.*, 2021).

Um estudo avaliou o efeito da TFBM, com comprimento de onda em 660 nm e densidade de energia de 5 J/cm², na reação inflamatória em modelos de cultura de fibroblastos de pacientes diabéticos. Após 48 horas da irradiação com o laser, observou-se uma diminuição dos níveis da IL-6 em fibroblastos de diabéticos feridos, e uma diminuição de TNF- α nos grupos diabéticos, injuriados ou não, porém com uma baixa diferença significativa; além disso, a migração celular aumentou nos grupos feridos. Também foi observado uma diminuição inicial nos níveis de cox-2, mas se elevaram após 48 horas da irradiação, e a viabilidade celular foi otimizada após a irradiação nos grupos diabéticos feridos em 0 e 24 horas. A diminuição dos níveis de IL-6 em modelos de células diabéticas corrobora com os resultados de outros estudos do tema, assim, a TFBM com o comprimento de onda em 660 nm pode ser promissora para diminuir o estresse oxidativo (SHAIKH-KADER *et al.*, 2021).

Outro estudo utilizando a TFBM investigou o seu efeito anti-inflamatório nas células do ligamento periodontal humano, em um ambiente inflamatório. As células foram estimuladas com LPS de *Porphyromonas gingivalis* ou *Escherichia coli*, seguido de irradiação com laser com o comprimento de onda de 660 nm, a uma

densidade de energia de 8 J/cm². O desafio com o LPS induziu a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias. Quando irradiado com o laser, em avaliação após 24 horas, o mesmo inibiu consideravelmente a expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, em comparação com o grupo não irradiado (LEE *et al.*, 2018). Clinicamente este resultando é relevante, pois a TFBM demonstra poder auxiliar na diminuição da inflamação induzida por LPS, que pode estar presente na doença periodontal.

Silva *et al.* (2020) investigaram os efeitos da TFBM na expressão de IL-10 e nitritos, que são biomarcadores fundamentais na fisiopatologia da Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente (EM). Através de um ensaio clínico randomizado, não controlado, 14 indivíduos com o diagnóstico da doença e critérios pré-estabelecidos, foram randomizados para dois grupos, sendo o grupo 1 com TFBM realizado na região sublingual e o grupo 2, com a TFBM sobre a artéria radial. O laser de comprimento de onda de 808 nm e potência de saída de 100 mW por 360 segundos foi utilizado duas vezes por semana, totalizando 24 sessões. Após a realização do protocolo, os níveis séricos de IL-10 e nitritos foram avaliados. Após a TFBM, constatou-se que o laser modulou positivamente a expressão de IL-10, mas não causou efeito sobre os níveis de nitrito.

É evidente o papel modulador que a TFBM parece exercer em diversas citocinas. Desta forma, o presente estudo é relevante em buscar respostas mais esclarecedoras, que possam guiar a prática clínica.

1.2 Estímulo inflamatório: Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*

O LPS é capaz de induzir consideráveis respostas imunes em animais. Localizado em bactérias gram-negativas, em sua membrana externa, o LPS é uma macromolécula constituída por um elemento lipídico (lipídio A) e um elemento polissacarídeo. Alterações no efeito biológico ocorrem devido às variações no número, posição e comprimento dos grupos acil ou monossacarídeo no elemento lipídio A. Desta forma, LPS de diferentes espécies bacterianas podem acarretar diferentes tipos de respostas imunes (LEE *et al.*, 2018). No presente estudo, o LPS utilizado foi o da bactéria *Escherichia coli*.

O sistema imunológico dos animais identifica o LPS através de receptores proteicos transmembranares. A ligação do LPS a um desses receptores pode desencadear a ativação da cascata de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B),

e induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (LEE *et al.*, 2018).

1.3 Efeito da luz laser no reparo de feridas em modelos *in vitro*

As alterações celulares e biomoleculares, decorrentes da TFBM, possibilitam o aumento da proliferação celular, diminuição da inflamação, aceleração do processo de cicatrização e reparo tecidual (ENGEL; KHAN; ARANY, 2016; TATA; WAYNANT, 2011).

A terapia com laser em baixa potência sugere desempenhar efeitos biológicos distintos, dependendo das células que são irradiadas. A especificidade da resposta biológica final é determinada pela cascata de sinais secundários, após as reações que ocorrem ao nível primário da cadeia respiratória. Se o microambiente celular se encontra normalizado (ótimo) ou não patológico (próximo de ótimo), os efeitos da TFBM não serão tão evidentes. Entretanto, em células que possuem danos, estas respostas secundárias serão inibidas, desta forma, a TFBM possui efeitos mais significativos ao estimular as respostas celulares. Assim, a terapia com laser de baixa potência atua a fim de normalizar as funções celulares, e tem demonstrado ser uma promissora alternativa terapêutica em casos de reparação tecidual (ENGEL; KHAN; ARANY, 2016).

O modelo de ensaio de cicatrização de feridas é um método simples e bem estabelecido, que evidencia a capacidade de migração celular, após a criação de uma ferida *in vitro* (BASSO *et al.*, 2016). A cultura celular, utilizando queratinócitos e fibroblastos, é bastante utilizada para avaliar os efeitos bioestimuladores da TFBM, e seus mecanismos. Assim, é possível determinar protocolos ideais de utilização desta terapia, que devem ser testados em animais (BISSELL; RADISKY, 2001). Neste modelo, quando a irradiação com laser é realizada, se utiliza a cultura em condições de déficit nutricional, assim, este microambiente reduz a taxa de crescimento, resultado do estresse celular semelhante ao estresse *in vivo* (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001).

Avaliações com queratinócitos (HaCaT) mostrou que a TFBM é capaz de aumentar a produção de ATP em 2 horas, sendo que após 24 horas, há um aumento do metabolismo com um decréscimo dos seus níveis intracelulares. Foi observado

ainda que, a TFBM, acelerou o fechamento da ferida, induzindo a migração das células sem afetar sua proliferação (TRICARICO *et al.*, 2018).

Outro estudo também avaliou o efeito da TFBM em queratinócitos (HaCaT), utilizando o laser de InGaAsP, com comprimento de onda de 780 nm, 40 mW de potência, com doses distintas: 0.5, 1.5, 3, 5 e 7 J/cm². A irradiação foi realizada em três momentos distintos, com intervalos de 24 horas entre cada aplicação. Pode-se observar um aumento na proliferação e na contagem celular dos grupos que foram submetidos às doses mais baixas de irradiação (BASSO *et al.*, 2012).

Estudo avaliando o efeito da TFBM nos queratinócitos demonstrou que a luz do laser de 660 nm aumenta a produção de ROS quando aplicada antes ou após um estímulo oxidativo. Quando utilizado a luz do laser de 970 nm, resultados mostraram uma atividade antioxidante moderada, enquanto uma redução considerável nos níveis de ROS foi detectada em células expostas à luz do laser de 800 nm, ou à combinação dos três comprimentos de onda diferentes. Este resultado sugere que a utilização de múltiplos comprimentos de onda na TFBM pode representar uma terapêutica promissora a ser introduzida na clínica, atingindo tecidos de diferentes profundidades, e atuando para aumentar os níveis de ROS em neutrófilos, com o comprimento de luz de 660 nm, e reduzir o estresse oxidativo em queratinócitos através do comprimento de onda de 800 e 970 nm. Mais estudos são necessários, com modelos celulares e animais, para esclarecer a eficácia dessa abordagem (RUPEL *et al.*, 2018).

Estudos *in vitro* podem guiar futuras aplicações *in vivo*, mas não devem, isoladamente, ser utilizados como protocolos ou parâmetros para eles (SILVA *et al.*, 2010; FUSHIMI *et al.*, 2012). As células em cultura não apresentam um comportamento e respostas idênticos ao que seria no organismo, quando estão em um contexto sistêmico e tecidual complexo. Assim, o uso de um sistema de cultura celular controlado, que simule a relação tecidual existente no organismo humano é primordial, no intuito de compreender melhor os mecanismos de resposta celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da fotobiomodulação, utilizando comprimentos de onda vermelho, infravermelho aplicados isoladamente ou simultaneamente, na expressão de citocinas inflamatórias por queratinócitos humanos (HaCaT) estimuladas por citocinas produzidas por monócitos do sangue periférico humanos desafiados com LPS.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a viabilidade celular das células HaCaT ao serem estimuladas por citocinas de monócitos, associado ou não à exposição com laser por meio do ensaio MTT;
- b) avaliar expressão das citocinas IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 por monócitos do sangue periférico humano estimulados por LPS;
- c) avaliar expressão das citocinas IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 por células HaCaT estimuladas por citocinas de monócitos do sangue periférico humano;
- d) avaliar e comparar o efeito da fotobiomodulação utilizando a densidade de energia de 5 J/cm² com laser vermelho (660 nm), infravermelho (808 nm) e associação de ambos na expressão das citocinas IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 por células HaCaT estimuladas ou não por citocinas de monócitos do sangue periférico humano.


3 ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of photobiomodulation on inflammatory cytokine expression by monocyte cytokine-stimulated HaCaT keratinocytes: a preliminary study

Será submetido ao periódico **Journal of Biophotonics (Qualis A1)**.

Endereço eletrônico para acesso às normas do periódico:
<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/18640648>.

Effect of photobiomodulation on inflammatory cytokine expression by monocyte cytokine-stimulated HaCaT keratinocytes: a preliminary study

Maria Gabriela Rolim Silveira Sá^a | Celso Martins Queiroz Junior^b | Paulo Eduardo Alencar de Souza^a | Ivana Márcia Alves Diniz^c | Maria Clara Moreira Oliveira^a | Soraya de Mattos Camargo Grossmann^a | Giovanna Ribeiro Souto^{a*} 

^a Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^b Laboratory of Biology of Cellular Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Correspondence:

*Dra. Giovanna Ribeiro Souto, Department of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Av. Dom José Gaspar, 500, Building 46, Room 101, Eucharistic Heart. Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil. CEP: 30535-901.

Phone number: +55 31 3319-4414

FAX number: +55 31 3319-4415

E-mail: grsouto@pucminas.br

Abstract

Photobiomodulation therapy is often used to stimulate the organism in tissue repair, but the effects on inflammatory cytokines still need to be better investigated. The aim of the study is to evaluate the effects of red and infrared wavelength laser and the association of both on the modulation of inflammatory cytokines produced by HaCaT keratinocytes challenged by cytokines of human monocytes stimulated by lipopolysaccharide. HaCaT cells, previously exposed to the laser, were stimulated with the supernatant of liposaccharide-challenged peripheral blood cells. After 02 hours the supernatant was replaced and after 04 hours it was evaluated. The infrared laser increased the production of several inflammatory cytokines by HaCaT cells in relation to the control group, the group stimulated by the red laser and the group stimulated by both. Red laser, infrared and both appear to have the ability to modulate inflammation in HaCaT cells challenged by human monocyte cytokines.

KEYWORDS: Photobiomodulation, laser, monocytes, cytokines

1 | INTRODUCTION

Photobiomodulation therapy (PBM) uses low doses of radiation in the visible wavelength in the red or near infrared, to promote therapeutic effects [1], since its use demonstrates to have anti-inflammatory action, assist in tissue remodeling and mediate cell function, and may alter the levels of various cytokines and inflammatory mediators. Several cell types may have their proliferation capacity increased by PBM [2]. The increased expression of inflammatory cytokines in the oral cavity has been related to the etiopathogenesis of oral mucositis, inflammation of the oral mucosa caused by chemotherapy and/or radiotherapy, which can progress to painful ulcers and predispose the patient to secondary infections, compromising their quality of life. life and the course of cancer treatment [3]. There are protocols with specific guidelines for the prevention of oral mucositis using PBM, however, once installed, there is no established protocol for the treatment of oral mucositis, as its management is very variable [4].

In an evaluation with keratinocytes (HaCaT) it was observed that PBM is able to increase ATP production in 2 hours, and after 24 hours, there is an increase in metabolism with a decrease in its intracellular levels. It was also observed that PBM accelerated wound closure, inducing cell migration without affecting their proliferation [5]. In a different study, keratinocytes showed greater proliferation after irradiation of light at a length of 660 nm, faster maturation of their cells, and faster migration to the sites of injury. Fibroblasts irradiated at a light length of 632.8 nm also demonstrated an increase in their proliferation and viability [2]. Evaluating the effect of PBM on cytokines, human periodontal ligament cells were stimulated with LPS, followed by laser irradiation with a wavelength of 660 nm, at an energy density of 8 J/cm². The challenge with LPS induced the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines. When irradiated with the laser, it considerably inhibited the expression of the cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8, compared to the non-irradiated group [6].

Despite the potential results, efficient PBM depends on the use of appropriate parameters, and this is still under investigation [7-8]. The use of both wavelengths, simultaneously, to the treatment of temporomandibular disorders [9] and psoriasis [10] has been recommended, but in the literature no studies have been found that address the effects of combining red and infrared wavelengths for the treatment of ulcerations lesions such as oral mucositis. Most studies found in the literature mainly address the

Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The PBMCs were then plated at a cell density of 5×10^5 cells/well in 96-well U-bottom microplates. One day after plating, cells were challenged with LPS from *Escherichia coli* at a concentration of 5 mg/ml of medium for one hour. Cells were centrifuged, washed in PBS and incubated for 3 hours in new RPMI medium. The supernatant was collected to measure the production of cytokines by PBMCs and to be added to HaCaT cells, and the medium was conditioned with cytokines.

2.2 | Keratinocyte culture (HaCaT)

Commercially available human keratinocytes of the immortalized HaCaT lineage were thawed and cultured in Dulbecco's modified essential medium (DMEM). It was supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco/Invitrogen, Grand Island, USA), 1% penicillin, 1% streptomycin and 0.2% fungizone and incubated in a 95% humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Cells were seeded at a density of 1000 cells/well in 96-well microplates in duplicate.

2.3 | Photobiomodulation Therapy (TFBM)

PBM was performed with an Indium-Gallium-Aluminium Phosphide semiconductor diode laser device (DMC, São Carlos, Brazil), with a wavelength of red (660 nm) and infrared (808 nm) light, output power of 20mW and beam cross-sectional area (spot) of 0.028 cm² (0.6 mm diameter). The power density was 0.71 W/cm² and the energy density was 5 J/cm² (7s; 0.14J). Prior to its use, power stability was tested using an optical power meter (LaserCheck, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA). Irradiation on HaCaT lineage keratinocytes was performed by contact, in the center of each well of the plate, at two different times: 18 hours and 1 hour of stimulation with PBMC cytokines.

2.4 | Determination of the viability of HaCaT cells

After collecting the supernatant for cytokine analysis, HaCaT cells, plated in 96-well microplates, were incubated with methyl tetrazole formazan (MTT, 5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 20% (v/v) in DEMEN for another 3 hours at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, to evaluate

mitochondrial activity. The formazan precipitates were dissolved by adding 100 μ L of 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) overnight and, after homogenization, optical density was read at 570 nm on a microplate reader (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The experiments were performed with 3 cell donors in duplicate. Cells grown under ideal conditions were considered positive control. Data were expressed as percentage of viable cells compared to control (PBM only).

2.5 | Detection of cytokine concentration

Multiple cytokines (IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-18, IL-23 and IL-33) were measured simultaneously by flow cytometry using CBA. LEGENDplex™ 1 Human Inflammation Panel (13-plex) (Biolegend, San Jose, CA, USA) was applied following the manufacturer's instructions. Acquisition was performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Quantitative results were generated using the LEGENDplex™ data analysis program (<https://legendplex.qognit.com/user/login?next=home>).

2.6 | Statistical analysis

The experimental groups were named G1 to G7 (Table 1). Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify data distribution. In order to verify the existence of differences between the different treatments in cell viability, in the concentration of cytokines, the one-way ANOVA test with repetition was used, followed by the Tukey "post hoc" test for comparison between pairs, at a level of significance of 5%. Analyzes were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3 | RESULTS

The viability analysis of HaCaT keratinocytes stimulated by human monocyte cytokines associated with red laser, infrared or both, with an energy density of 5 J/cm² did not show significant changes in MTT viability (Figure 1).

After 3 hours of changing the culture medium containing bacterial LPS, totaling 4 hours after stimulation, the production of cytokines by peripheral blood mononuclear

cells (PBMC) was measured (Table 2). 100 μ L of PBMC supernatant was added to the HaCaT keratinocyte culture wells containing 100 μ L of medium and the cytokine concentration was measured after 2 hours of incubation (Supplementary material). The plated cells were washed twice with PBS and incubated again with culture medium. After 06 hours of stimulation with cytokines (four hours of incubation with new culture medium), the concentration of cytokines was measured again, and this measurement resulted from new productions (Table 2).

The effect of photobiomodulation on cytokine production by HaCaT keratinocytes not stimulated by human monocyte cytokines is shown in Figures 2 and 3. An increase in IL-8 production (Figure 2G) by HaCaT cells was observed when stimulated by infrared light or association of red and infrared light compared to the control group ($P < 0.05$). Photobiomodulation did not affect the production of other cytokines by HaCaT cells.

The effect of photobiomodulation on cytokine production by HaCaT keratinocytes stimulated by human monocyte cytokines is shown in figures 4 and 5. An increase in the production was observed of IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12p70 (Figure 4B-I) and IL-17A, IL-23 and IL-33 (Figure 5A-D) by HaCaT cells when stimulated by infrared light relative to control (cells stimulated by cytokines without laser) ($P < 0.05$). There was an increase in the production of IFN- α 2, IFN- γ , IL-6 and IL-8 (Figure 4B, C, F and G), and IL-17A, IL-18 and IL-23 (Figure 5A-C) by HaCaT cells when stimulated by infrared laser in relation to cells stimulated by the association of red and infrared laser ($P < 0.05$) and an increase in the production of IFN- γ (Figure 4C) and IL-23 (Figure 5C) by the cells HaCaT when stimulated by infrared laser in relation to cells stimulated by red laser ($P < 0.05$). The effect of red laser on HaCaT cells was noted only with increased expression of the IFN- α 2 cytokine (Figure 4B) in relation to the control group ($P < 0.05$).

4 | DISCUSSION

PBM has distinct biological effects and has been shown to be a promising therapeutic alternative in cases of tissue repair [1]. Keratinocytes are cells that play an important role in the repair and immune defense of the skin and mucous membranes through the secretion of growth factors, cytokines and chemokines [12]. In the present study, an in vitro model was used where keratinocytes were stimulated by cytokines

produced by human peripheral blood mononuclear cells. The objective was to evaluate the profile of cytokine expression by HaCaT keratinocytes after inflammatory stimulus and how PBM can affect the production of these cytokines. Several cytokines and inflammatory mediators have their levels altered when they are irradiated with low-level laser. However, there are few studies evaluating the effects of PBM on the expression of cytokines in keratinocytes. A review showed that the main cytokines and growth factors evaluated so far are IL-1 α , IL-8, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-6, HB-EGF, TGF- α , VEGF-A, IL-1 β , KGF. An increase in cytokine expression is observed in most studies, mainly after irradiation with red and infrared lasers at doses of 0.1 to 5.0 J/cm² [11].

In the present study, there was a significant increase in the production of pro-inflammatory cytokines (IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, IL-23 and IL-33), anti-inflammatory cytokine (IL-10) and MCP-1/CCL-2 chemokine by HaCaT cells irradiated with infrared wavelength laser compared to non-irradiated cells under the same inflammatory conditions. It is possible to suggest that low-dose infrared laser has a stimulatory effect on pro-inflammatory cytokines in human keratinocytes, corroborating other studies in the literature [13-14]. However, these results contradict the data obtained by Baroni et al. [15], who observed an inhibitory effect of low-dose infrared laser on pro-inflammatory cytokines (IL-8 and TNF- α) in *candida albicans* infected keratinocytes. These differences can be explained by the use of different experimental models. In the present study, keratinocytes were stimulated by cytokines produced by monocytes challenged with bacterial LPS, without direct contact with the microorganism.

The cytokine IL-33 is an inflammatory cytokine overexpressed in keratinocytes from patients with atopic dermatitis [16], as are IL-23, IL-17A [17] and IL-18 [18] that are produced by human keratinocytes under inflammatory conditions. To date, studies evaluating the effects of red and infrared lasers on these cytokines, especially on keratinocytes, have not been observed. In this study, it was observed that low-dose infrared laser stimulated the expression of these cytokines in comparison with the control group and with groups irradiated by red laser or a combination of both wavelengths. This can be considered a preliminary result and, thus, further studies are needed to better understand the effects of infrared laser also at high doses or on cytokine expression in in vivo models.

No effects of red laser irradiation were observed on keratinocytes under inflammatory conditions in most of the evaluated cytokines. There was only an increase in the expression of the cytokine IFN- α 2 by the cells irradiated by the red laser in relation to the non-irradiated control group. These results may suggest a smaller effect of the red laser when the target cell is keratinocytes, especially in inflammatory processes. IFN- α 2 were initially identified for their antiviral activity and can be expressed by keratinocytes, particularly in the basal layer, mainly in inflammatory processes. IFN- β levels have been expressed in keratinocytes after stimulation by ultraviolet light [19], but studies evaluating the effects of red light on IFN- α 2 have not yet been observed in the literature.

The combination of red and infrared wavelengths has been recommended for the treatment of temporomandibular disorders [9] and psoriasis [10], but no studies have been found that address the effects of associated irradiation for the treatment of ulcerated lesions such as oral mucositis. In the present study, there were no effects of the combination of both wavelengths in relation to the non-irradiated group on the expression of cytokines evaluated in keratinocytes under inflammatory conditions. However, a decrease in the expression of IFN- α 2, IFN- γ , IL-6 and IL-8 and IL-17A, IL-18 and IL-23 was observed in the group in which irradiation was performed using both wavelengths wave compared to infrared laser. These results suggest that the red laser appears to play a modulating role in the stimulatory effects observed by infrared laser irradiation.

Finally, evaluating the effect of PBM on cytokine production by HaCaT keratinocytes not stimulated by human monocyte cytokines, that is, without suffering or under homeostasis conditions, an increase in IL-8 production by HaCaT cells was observed when irradiated by infrared light or in association of red and infrared light, when compared with the control group. IL-8 is produced mainly by monocytes, macrophages, and to a lesser extent by keratinocytes. It has a chemotactic effect, its main action being to stimulate the migration of cells of the immune system. It also stimulates the division of keratinocytes [20]. Considering that there was an increase in IL-8 production by unstimulated HaCaT cells, we can assume that, even under homeostasis conditions, PBM demonstrates a stimulatory effect on a given cytokine. However, further investigations are needed to assess the consequences of this stimulation in a living organism.

The cellular viability of HaCaT keratinocytes stimulated by human monocyte cytokines did not change when irradiated with red or infrared laser or both simultaneously, with an energy density of 5 J/cm². It is possible to interpret that this is a safe energy density, which does not alter cell viability in keratinocyte culture cultured *in vitro* under inflammatory stimuli.

The use of PBM should be carefully evaluated, and the choice of wavelength to be used should not be made only based on the depth of tissue penetration, but rather, evaluating the biological activity exerted on the irradiated cells [21]. Research indicates that, when inflammation is present, PBM exerts an anti-inflammatory action, but when it is not present, irradiation induces pro-inflammatory mediators, which can assist in tissue remodeling and cellular function [2]. On the other hand, studies suggest that the pro-inflammatory or anti-inflammatory stimulus caused by PBM may be affected by the stimulated cell line, dose and wavelength used [11]. The results of the present work demonstrate that the infrared wavelength (880 nm), with an energy density of 5 J/cm², has the ability to positively modulate inflammatory cytokines produced by HaCaT keratinocytes, challenged by human monocyte cytokines produced from a stimulus with LPS. More studies *in vitro*, and later, *in vivo*, are needed to further clarify the effect of infrared laser on increasing cytokine production, and whether this positive stimulation could modulate the inflammatory process, bringing beneficial effects to the patient.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Giovanna Ribeiro Souto ^{ID} <https://orcid.org/0000-0003-3617-8794>

REFERENCES

- [1] KW Engel, I Khan, PR Arany. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. *J Biophotonics* **2016**, 9, 1148. doi: 10.1002/jbio.201600025.
- [2] LF de Freitas, MR Hamblin. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* **2016**, 22, 7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
- [3] FP Eduardo, LM Bezinelli, DL de Carvalho, RM Lopes, JF Fernandes, M Brumatti, CS Vince, AM de Azambuja, C Vogel, N Hamerschlak, L Correa. Oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: Clinical outcomes in a context of specialized oral care using low-level laser therapy. *Pediatr Transplant* **2015**, 19, 316. doi: 10.1111/petr.12440.
- [4] Y Zadik, PR Arany, ER Fregnani, P Bossi, HS Antunes, RJ Bensadoun, LA Gueiros, A Majorana, RG Nair, V Ranna, WJE Tissing, A Vaddi, R Lubart, CA Migliorati, RV Lalla, KKF Cheng, S Elad, Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer* **2019**, 27, 3969. doi: 10.1007/s00520-019-04890-2.
- [5] PM Tricarico, L Zupin, G Ottaviani, S Pacor, F Jean-Louis, M Boniotto, S Crovella. Photobiomodulation therapy promotes in vitro wound healing in nicastrin KO HaCaT cells. *J Biophotonics* **2018**, 11, e201800174. doi: 10.1002/jbio.201800174.
- [6] JH Lee, MH Chiang, PH Chen, ML Ho, HE Lee, YH Wang. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study. *Lasers Med Sci* **2018**, 33, 469. doi: 10.1007/s10103-017-2376-6.
- [7] MM Abramoff, NN Lopes, LA Lopes, LL Dib, A Guilherme, EM Caran, AD Barreto, ML Lee, AS Petrilli. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg* **2008**, 26, 393. doi: 10.1089/pho.2007.2144.
- [8] C Mignon, NE Uzunbajakava, B Raafs, NV Botchkareva, DJ Tobin. Photobiomodulation of human dermal fibroblasts in vitro: decisive role of

- cell culture conditions and treatment protocols on experimental outcome. *Scientific Reports*, **2017**, 7, 2797. doi: 10.1038/s41598-017-02802-0
- [9] DFM Sousa, MLL Gonçalves, F Politti, RDP Lovisetto, KPS Fernandes, SK Bussadori, RA Mesquita-Ferrari. Photobiomodulation with simultaneous use of red and infrared light emitting diodes in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled and double-blind clinical trial. *Medicine (Baltimore)*. **2019**, 98, e14391. doi: 10.1097/MD.00000000000014391.
- [10] G Ablon. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomed Laser Surg* **2010**, 28, 141. doi: 10.1089/pho.2009.2484.
- [11] PT de Abreu, JÁ de Arruda, RA Mesquita, LG Abreu, IM Diniz, TA Silva. Photobiomodulation effects on keratinocytes cultured in vitro: a critical review. *Lasers Med Sci* **2019**, 34, 1725. doi: 10.1007/s10103-019-02813-5.
- [12] I Colombo, E Sangiovanni, R Maggio, C Mattozzi, S Zava, Y Corbett, M Fumagalli, C Carlino, PA Corsetto, D Scaccabarozzi, S Calvieri, A Gismondi, D Taramelli, M Dell'Agli. HaCaT cells as a reliable in vitro differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediators Inflamm* **2017**, 2017, 7435621. doi: 10.1155/2017/7435621.
- [13] Y Qin, X Qin, P Xu, Y Zhi, W Xia, Y Dang, J Gu, X Ye. Potential role of S100A8 in skin rejuvenation with the 1064-nm Q-switched Nd: YAG laser. *Lasers Med Sci* **2018**, 33, 581. doi: 10.1007/s10103-017-2416-2.
- [14] A De Filippis, B Perfetto, LP Guerrera, G Oliviero, A Baroni. Q-switched 1064 nm Nd-Yag nanosecond laser effects on skin barrier function and on molecular rejuvenation markers in keratinocyte-fibroblasts interaction. *Lasers Med Sci* **2019**, 34, 595. doi: 10.1007/s10103-018-2635-1.
- [15] A Baroni, A De Filippis, G Oliviero, A Fusco, B Perfetto, E Buommino, G Donnarumma. Effect of 1064-nm Q-switched Nd: YAG laser on invasiveness and innate immune response in keratinocytes infected with *Candida albicans*. *Lasers Med Sci* **2018**, 33, 941. doi: 10.1007/s10103-017-2407-3.
- [16] Y Imai. Interleukin-33 in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* **2019**, 96, 2. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.08.006.
- [17] B Ehst, Z Wang, J Leitenberger, D McClanahan, R De La Torre, E Sawka, AG Ortega-Loayza, J Strunck, T Greiling, E Simpson, Y Liu. Synergistic induction of

- IL-23 by TNF α , IL-17A, and EGF in keratinocytes. *Cytokine*. **2021**, 138, 155357. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155357.
- [18] M Wittmann, A Macdonald, J Renne. IL-18 and skin inflammation. *Autoimmun Rev* **2009**, 9, 45. doi: 10.1016/j.autrev.2009.03.003.
- [19] J Jiang, LCTsoi, AC Billi, NL Ward, PW Harms, C Zeng, E Maverakis, JM Kahlenberg, JE Gudjonsson. Cytokinocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight* **2020**, 5, e142067. doi: 10.1172/jci.insight.142067.
- [20] PPV Varella, WCN Forte. Citocinas: revisão. *Rev Bras Alerg Immunopatol* **2001**, 24, 146.
- [21] K Rupel, L Zupin, A Colliva, A Kamada, A Poropat, G Ottaviani, M Gobbo, L Fanfoni, R Gratton, M Santoro, R Di Lenarda, M Biasotto, S Zacchigna. Photobiomodulation at multiple wavelengths differentially modulates oxidative stress in vitro and in vivo. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 2018, 6510159. doi: 10.1155/2018/6510159.

TABLES**TABLE 1** Experimental groups

G1	Supernatant from unstimulated HaCaT cells
G2	Supernatant from LPS-stimulated PBMC cells
G3	Supernatant of HaCaT cells stimulated by red laser, infrared and both
G4	Supernatant from cytokine-stimulated HaCaT cells
G5	Supernatant of HaCaT cells stimulated by cytokines and red laser
G6	Supernatant of HaCaT cells stimulated by cytokines and infrared laser
G7	Supernatant of HaCaT cells stimulated by cytokines and red and infrared laser

TABLE 2 Mean concentration (standard deviation) of cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by bacterial LPS and cytokine production by cells of the HaCaT lineage after 6 hours of contact with cytokines

	Production of cytokines by PBMCs after 4 hours of stimulation with LPS	Cytokine production by HaCat cells stimulated by PBMC cytokines
Cytokines	Concentration in pg/ml (\pmDP)	Concentration in pg/ml (\pmDP) after 6 hours of contact with PBMC supernatant*
IL-1β	464,4 (\pm 215,1)	9,60 (\pm 12,73)
IFN-α2	2,47 (\pm 0,96)	0,24 (\pm 0,03)
IFN-γ	16,3 (\pm 10,13)	0,3433 (\pm 0,25)
TNF-α	3330 (\pm 1854)	5,09 (\pm 7,35)
MCP-1	1481 (\pm 676,9)	19,74 (\pm 8,36)
IL-6	14116 (\pm 3367)	79,88 (\pm 75,57)
IL-8	63715 (\pm 14874)	688 (\pm 531,1)
IL-10	204,3 (\pm 105,7)	0,41 (\pm 0,38)
IL-12p70	0,71 (\pm 0,29)	0,21 (\pm 0,11)
IL-17A	0,58 (\pm 0,48)	0,12 (\pm 0,04)
IL-18	13,3 (\pm 5,28)	1,05 (\pm 0,91)
IL-23	61,66 (\pm 37,27)	0,37 (\pm 0,22)
IL-33	0,83 (\pm ,042)	0,19 (\pm 0,08)

* The concentration was obtained in the culture medium added after removing the first supernatant (2 hours).

FIGURES

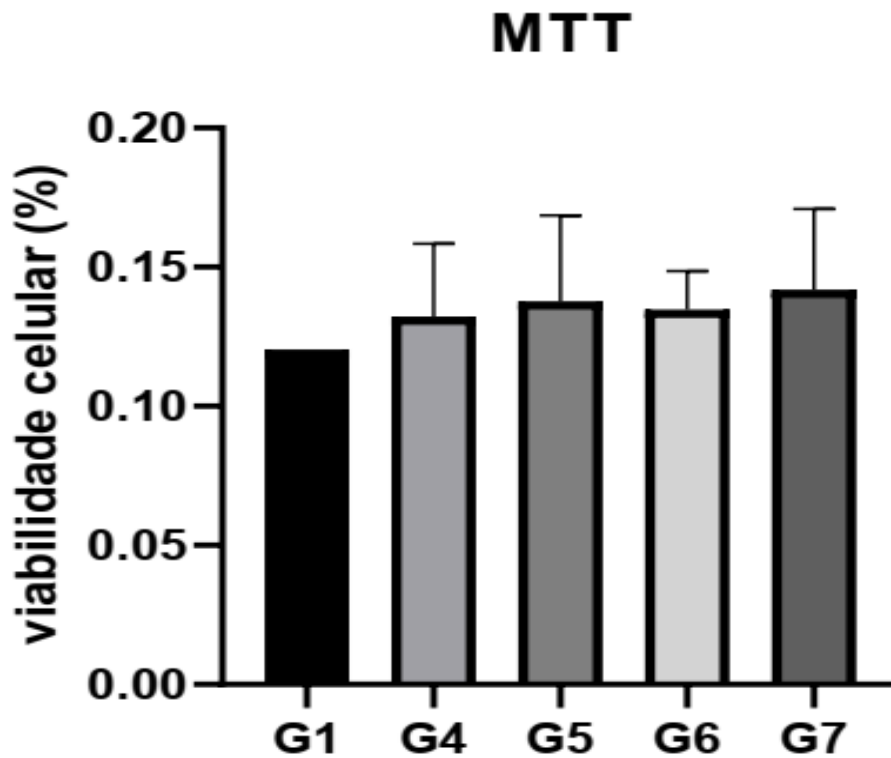


FIGURE 1 Evaluation of the viability of HaCaT cells through the MTT method after stimulation with cytokines (G4), cytokines and red laser (G5), cytokines and infrared laser (G6), cytokines and red laser associated with infrared laser (G7) in relation to the control (G1) without stimulation. The experiments were performed in biological triplicate and experimental duplicate. Error bars indicate standard error of the mean

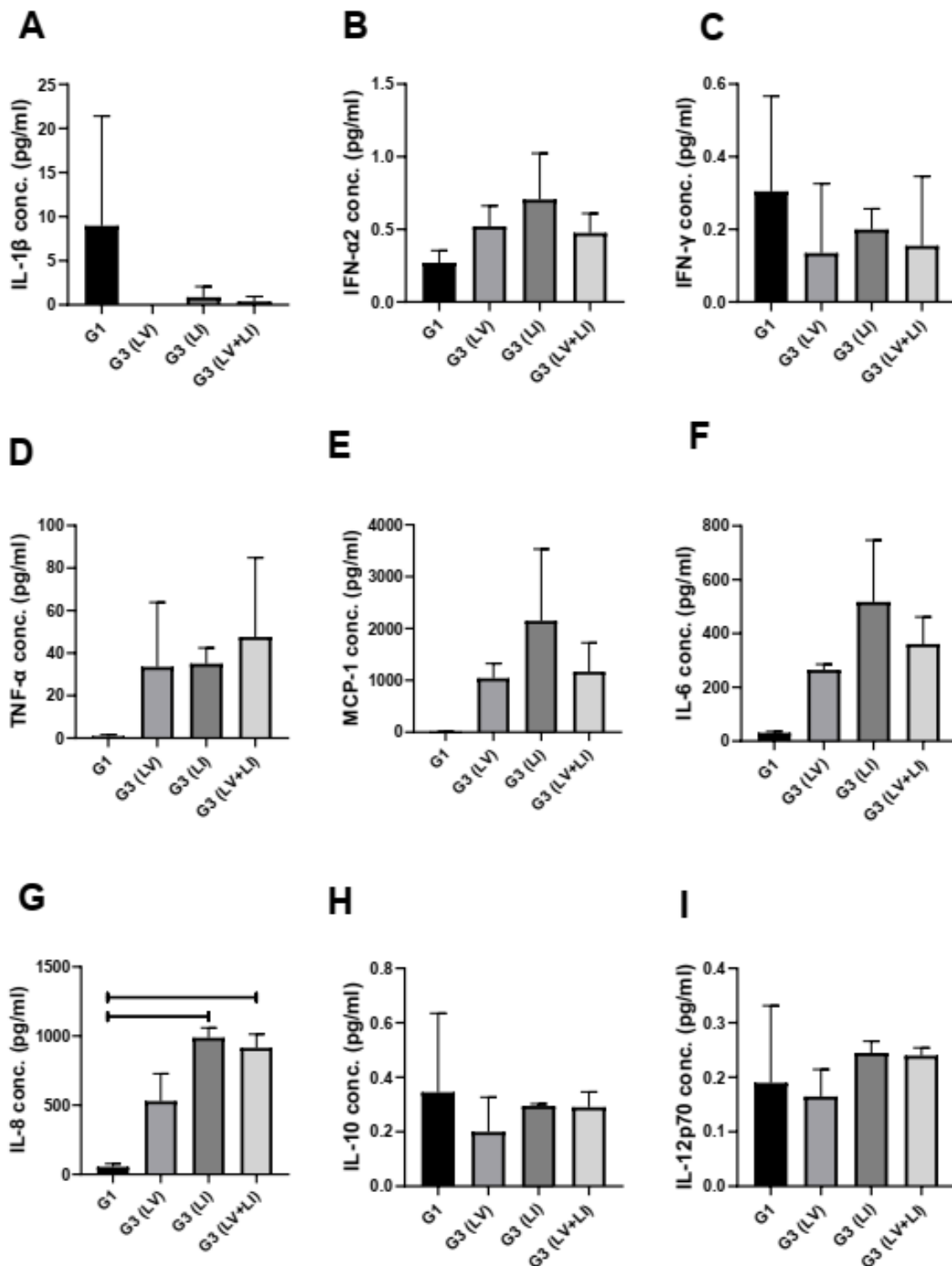


FIGURE 2 Comparison of the production of cytokines IL-1 β (A), IFN- α 2 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D), MCP-1 (E), IL-6 (F), IL-8 (G), IL-10 (H) and IL-12p70 (I) in experimental control groups G1 (HaCaT without stimulus), G3 (LV) - HaCaT cells stimulated with red laser, G3 (LI) -infrared laser and G3 (LV+LI) -application of red and infrared laser after 06 hours of incubation with culture medium

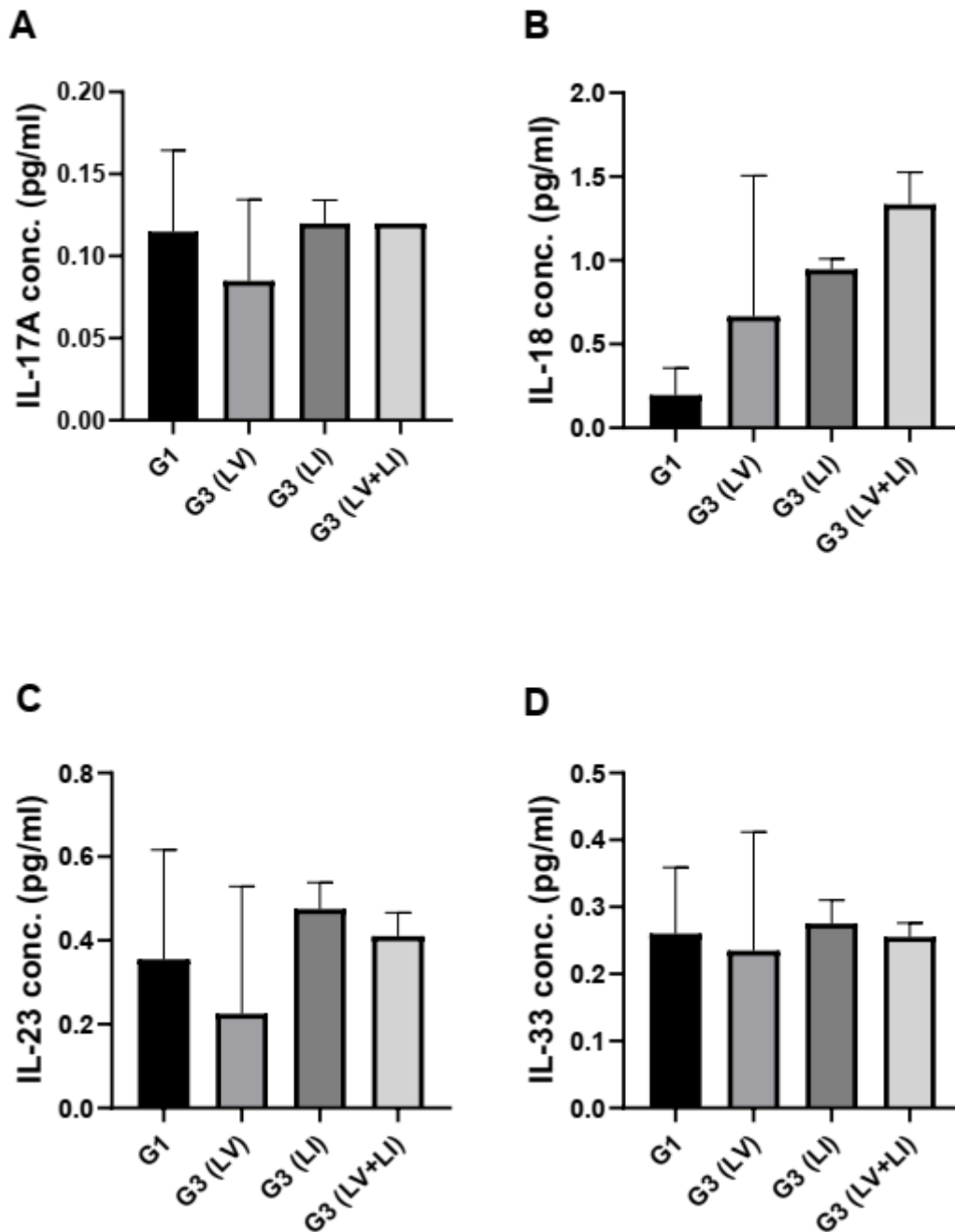


FIGURE 3 Comparison of the production of cytokines IL-17A (A), IL-18 (B), IL-23 (C) and IL-33 (D) in experimental control groups G1 (HaCaT without stimulus), G3 (LV) - HaCaT cells stimulated with red laser, G3 (LI) -infrared laser and G3 (LV+LI) - application of red and infrared laser after 06 hours of incubation with culture medium

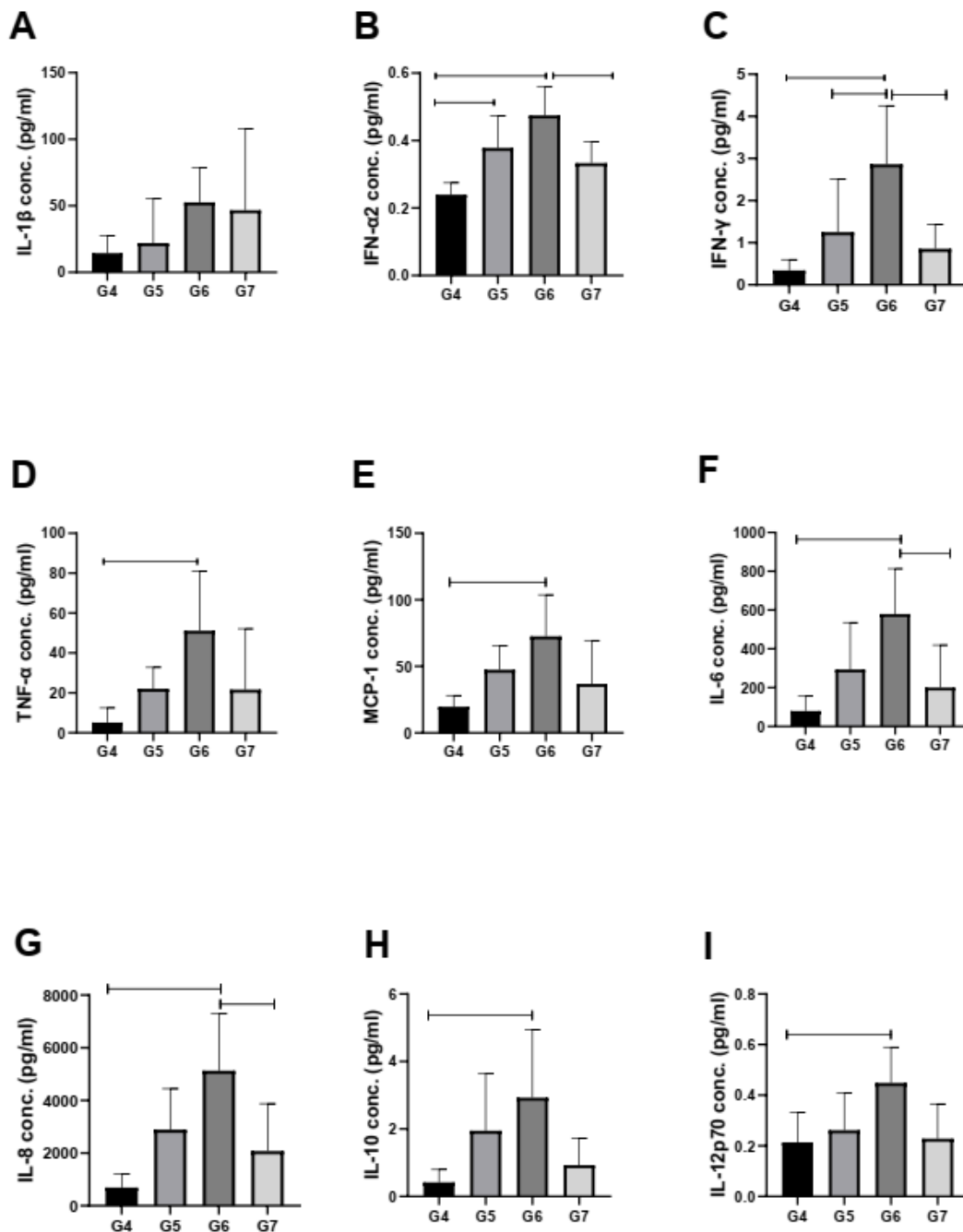


FIGURE 4 Comparison of the production of cytokines IL-1 β (A), IFN- α 2 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D), MCP-1 (E), IL-6 (F), IL-8 (G), IL-10 (H) and IL-12p70 (I) after 06 hours of incubation with culture medium containing cytokines produced by PBMC in the control experimental groups and previously treated with laser. Groups G4 (control - HaCaT without laser), G5 (HaCaT cells stimulated with red laser), G6 (HaCaT cells stimulated with infrared laser) and G7 (HaCaT cells stimulated with red and infrared laser)

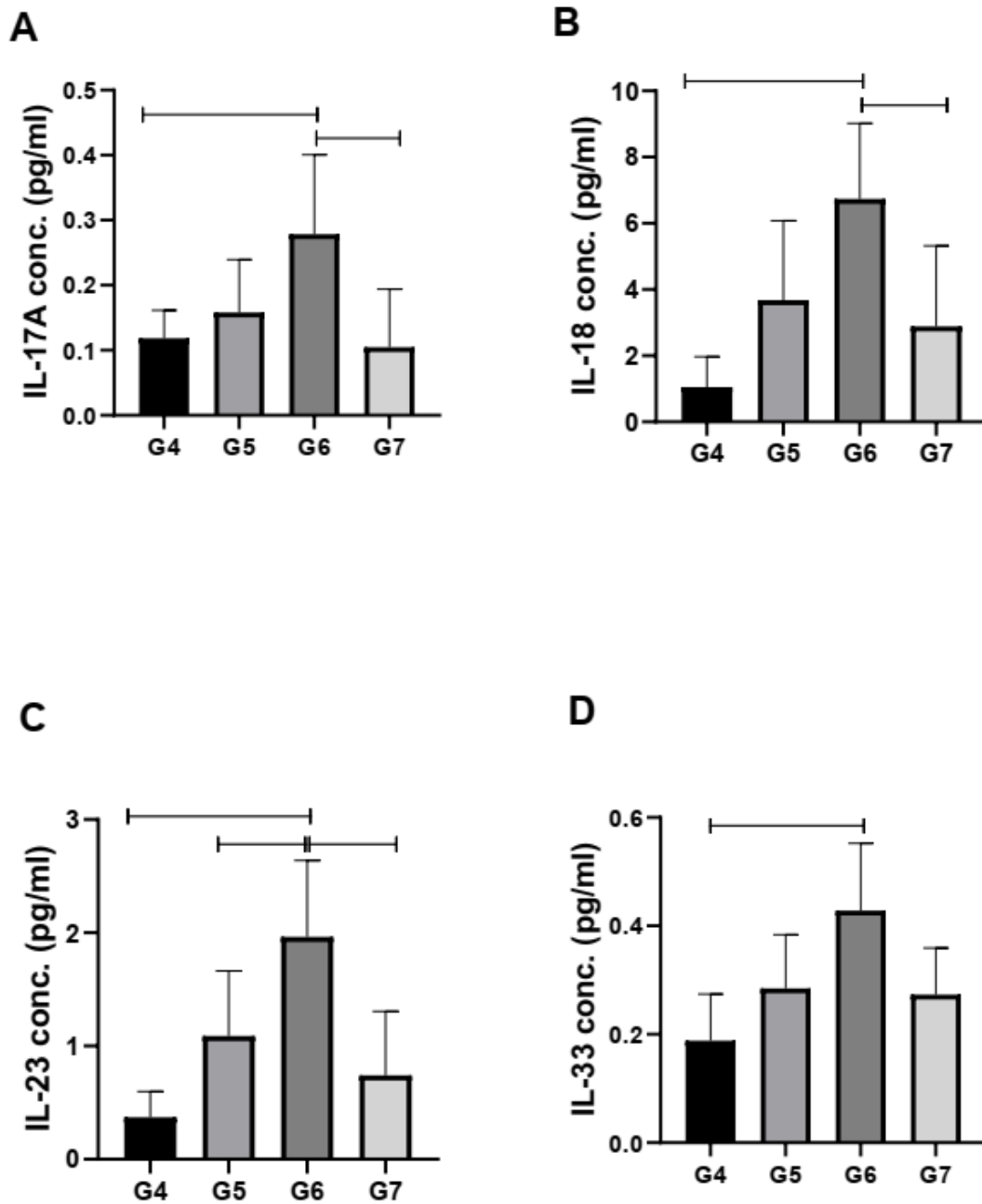


FIGURE 5 Comparison of IL-17A (A), IL-18 (B), IL-23 (C) and IL-33 (D) cytokine production after 6 hours of incubation with culture medium containing cytokines produced by PBMC in the control experimental groups and previously treated with laser. Groups G4 (control - HaCaT without laser), G5 (HaCaT cells stimulated with red laser), G6 (HaCaT cells stimulated with infrared laser) and G7 (HaCaT cells stimulated with red and infrared laser)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios experimentais não mostraram efeito da TFBM utilizando os comprimentos de onda vermelho, infravermelho ou associação de ambos em baixas doses de energia (5 J/cm²) na viabilidade celular de queratinócitos HaCaT sob condições inflamatórias.

Observou-se que houve produção de citocinas inflamatórias IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 por monócitos do sangue periférico humano quando estas células foram estimuladas por uma hora em contato com meio contendo LPS.

Observou-se que houve produção de citocinas inflamatórias IL-1 β , IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 por queratinócitos da linhagem HaCat quando estas células foram estimuladas por duas horas em contato com meio contendo citocinas de monócitos do sangue periférico humano.

Em condições de homeostase, observou-se um aumento na produção de IL-8 pelas células HaCaT quando irradiadas pela luz infravermelha (808 nm) ou na associação de luz vermelha (660 nm) e infravermelha (808 nm), quando comparado com o grupo controle.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o comprimento de onda infravermelho (880 nm), com densidade de energia de 5 J/cm², estimula a expressão de citocinas IFN- α 2, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70, IL-17A, IL-23 e IL-33 produzidas por queratinócitos HaCaT sob condições inflamatórias. Além disso, a TFBM utilizando laser vermelho (660 nm), densidade de 5 J/cm², também estimulou a expressão de IFN- α 2 pelos queratinócitos. No entanto, outras citocinas avaliadas não foram moduladas.

Não se observou efeitos da TFBM utilizando a combinação de ambos os comprimentos de onda, quando comparado ao grupo não irradiado, na expressão das citocinas pelos queratinócitos sob condições inflamatórias. No entanto, observou-se uma inibição da expressão de IFN- α 2, IFN- γ , IL-6 e IL-8 e IL-17A, IL-18 e IL-23 neste grupo em comparação ao laser infravermelho, sugerindo que o laser vermelho tenha papel inibidor dos efeitos estimulatórios observados pela irradiação com o laser infravermelho.

REFERÊNCIAS

- ABLON, G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.1, p. 141-146, Feb. 2010. doi: 10.1089/pho.2009.2484.
- ABRAMOFF, M.M.F. *et al.* Low-level laser therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.26, n.4, p. 393-400, Aug. 2008. doi: 10.1089/pho.2007.2144.
- ALMEIDA-LOPES, L. *et al.* Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.29, n.2, p. 179-184, 2001. doi: 10.1002/lsm.1107.
- ANSCHAU, F. *et al.* Efficacy of low-level laser for treatment of cancer oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in Medical Science**, v.34, n.6, p. 1053-1062, Aug. 2019. doi: 10.1007/s10103-019-02722-7.
- ARANY, P.R. Photobiomodulation: poised from the fringes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.30, n.9, p. 507-509, Sept. 2012. doi: 10.1089/pho.2012.9884.
- BASSO, F.G. *et al.* In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **International Journal of Dentistry**, v.2012, p. 719452, 2012. doi: 10.1155/2012/719452.
- BASSO, F.G. *et al.* Proliferation, migration, and expression of oral-mucosal-healing-related genes by oral fibroblasts receiving low-level laser therapy after inflammatory cytokines challenge. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.48, n.10, p. 1006-1014, Dec. 2016. doi: 10.1002/lsm.22553.
- BISSELL, M.J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nature Reviews Cancer**, v.1, n.1, p. 46-54, Oct. 2001. doi: 10.1038/35094059.
- CASTRO, J.F.L. *et al.* Low-level laser in prevention and treatment of oral mucositis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.31, n.12, p. 613-618, Dec. 2013. doi: 10.1089/pho.2012.3327.
- CHEN, A.C.H. *et al.* Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PloS One**, v.6, n.7, p. e22453, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0022453.
- CHEN, C.H. *et al.* Effects of low-level laser therapy on M1-related cytokine expression in monocytes via histone modification. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 625048, 2014. doi: 10.1155/2014/625048.

CINAUSERO, M. *et al.* New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, p. 354, June 2017. doi: 10.3389/fphar.2017.00354.

COSTA, V.S. **Associação do gene IL23A com a proteção ao diabetes mellitus tipo 1 autoimune**. 2012. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

EDUARDO, F.P. *et al.* Oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: Clinical outcomes in a context of specialized oral care using low-level laser therapy. **Pediatric Transplantation**, v.19, n.3, p. 316-325, May 2015; doi: 10.1111/petr.12440.

ENGEL, K.W.; KHAN, I.; ARANY, P.R. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. **Journal of Biophotonics**, v.9, n.11-12, p. 1148-1156, Dec. 2016. doi: 10.1002/jbio.201600025.

FREITAS, L.F.; HAMBLIN, M.R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics: a Publication of the IEEE Lasers and Electro-optics Society**, v.22, n.3, p. 7000417, 2016. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.

FUSHIMI, T. *et al.* Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 20, n. 2, p. 226-235, 2012.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **Journal of Biomedical Science**, v.16, n.1, p. 4, 2009. doi: 10.1186/1423-0127-16-4.

GULSOY, M. *et al.* The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.82, n.3, p. 199-202, Mar. 2006. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.

KARU, T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.3, n.4, p. 638-640, Aug. 1989. doi: 10.1016/1011-1344(89)80088-0.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.49, n.1, p. 1-17, Mar. 1999. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X.

KARU, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v.84, n.5, p. 1091-1099, Oct. 2008. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x.

LALLA, R.V. *et al.* MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer** v.120, n.10, p. 1453-1461, May 2014. doi: 10.1002/cncr.28592.

LEE, J.H. *et al.* Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v.33, n.3, p. 469-477, Apr. 2018. doi: 10.1007/s10103-017-2376-6.

MACEDO, R.B.V.; KAKEHASI, A.M.; ANDRADE, M.V.M. Ação da IL33 na artrite reumatoide: contribuição para a fisiopatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.56, n.5, p. 451-457, Sept./Oct. 2016. doi: 10.1016/j.rbr.2016.01.006.

MIGNON, C. *et al.* Photobiomodulation of human dermal fibroblasts in vitro: decisive role of cell culture conditions and treatment protocols on experimental outcome. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p. 2797, June 2017. doi: 10.1038/s41598-017-02802-0

OLIVEIRA, C.M.B. *et al.* Citocinas e dor: revisão. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n.2, p. 260-265, mar./abr. 2011.

RUPEL, K. *et al.* Photobiomodulation at multiple wavelengths differentially modulates oxidative stress in vitro and in vivo. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2018, p. 6510159, Nov. 2018. doi: 10.1155/2018/6510159.

SCHUBERT, M.M. *et al.* A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Supportive Care in Cancer: official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v.15, n.10, p. 1145-1154, Oct. 2007. doi: 10.1007/s00520-007-0238-7.

SHAIKH-KADER, A. *et al.* Levels of cyclooxygenase 2, interleukin-6, and tumour necrosis factor α in fibroblast cell culture models after photobiomodulation at 660 nm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2021, n.6667812, p. 1-13, 2021. doi: 10.1155/2021/6667812.

SILVA, J.P. *et al.* Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.1, p. 17-21, Feb. 2010. doi: 10.1089/pho.2008.2372.

SILVA, T. *et al.* Effects of photobiomodulation on interleukin-10 and nitrites in individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis - Randomized clinical trial. **PLoS One**, v.15, n.4, p. e0230551, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0230551.

SOUSA, D.F.M. *et al.* Photobiomodulation with simultaneous use of red and infrared light emitting diodes in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled and double-blind clinical trial. **Medicine**, v.98, n.6, p. e14391, 2019. doi: 10.1097/MD.00000000000014391.

SPERANDIO, F.F. *et al.* Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. **Journal of Biophotonics**, v.8, n.10, p. 795-803, Oct. 2015. doi: 10.1002/jbio.201400064.

TATA, D.B.; WAYNANT, R.W. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical applications. **Laser & Photonics Review**, v.5, n.1, p. 1-12, Jan. 2011. doi: 10.1002/lpor.200900032.

TRICARICO, P.M. *et al.* Photobiomodulation therapy promotes in vitro wound healing in nicastrin KO HaCaT cells. **Journal of Biophotonics**, v.11, n.12, p. e201800174, Dec. 2018. doi: 10.1002/jbio.201800174.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.24, n.4, p. 146-154, 2001.

WONG, H.M. Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. **The Scientific World Journal**, v.2014, p. 581795, Jan. 2014. doi: 10.1155/2014/581795.

ANEXO A - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito do laser de baixa intensidade na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados por bactérias orais

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 96696318.8.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.167.923

Apresentação do Projeto:

Diversos estudos têm mostrado efeitos significativos do laser de baixa intensidade (LBI) no tratamento de processos inflamatórios pós-operatórios na mucosa oral, úlceras traumáticas e mucosite oral induzida por tratamento oncológico. Embora o LBI apresente capacidade de estimulação da proliferação celular e reparo tecidual, ainda são escassos os estudos avaliando seus efeitos na modulação da inflamação, especialmente na produção de citocinas por células imunocompetentes. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do LBI com diferentes comprimentos de onda na viabilidade celular e na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados in vitro por bactérias da microbiota oral. Para isso, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de 12 indivíduos saudáveis serão expostas ao LBI de 660nm ou 808nm, em diferentes densidades de energia e avaliadas quanto à viabilidade celular. Serão incluídos no estudo indivíduos estudantes com idade entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos e não fumantes. Esta emenda ao projeto de pesquisa, já aprovado, se justifica pela necessidade de alterar a metodologia, pelo acréscimo de estimulações com outras duas espécies da microbiota oral, além do Streptococcus mutans: Lactobacillus e Porphyromonas gingivalis.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade de diferentes comprimentos de onda na viabilidade

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228

Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



Continuação do Parecer: 3.167.923

celular e a produção de citocinas por monócitos humanos estimuladas ou não por bactérias da microbiota oral.

Objetivos Secundários:

- Determinar e comparar a citotoxicidade do laser de baixa intensidade de 660 e 808 nm em diferentes densidades de energia, em células mononucleares de sangue periférico humano.
- Quantificar os monócitos produtores das citocinas IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF-alfa após exposição ao laser de baixa intensidade de 660 ou 808nm e estimulação com bactérias da microbiota oral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: É possível que durante a coleta de sangue o indivíduo sinta pequeno desconforto. Posteriormente, é possível que ocorra um hematoma na área, o que é minimizado por meio de compressão com dedo no local.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos indivíduos participantes. Os resultados obtidos e analisados em conjunto poderão contribuir para conhecimento sobre os mecanismos de ação celular e molecular do laser de baixa intensidade no tratamento da mucosite e outras inflamações da mucosa oral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e viável. Projeto está bem escrito, claro e completo e não apresenta impedimentos de natureza ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_129904	14/02/2019		Aceito

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228

Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



Continuação do Parecer: 3.167.923

Básicas do Projeto	_E1.pdf	21:12:47		Aceito
Outros	Alteracoes_no_texto_projeto.pdf	09/02/2019 19:14:44	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa_LBI_fev_2019.pdf	09/02/2019 18:42:17	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LBI_fev_2019.pdf	09/02/2019 18:42:00	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoLBI.pdf	21/08/2018 18:23:42	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 25 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br