

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

Paula Frota Angheben Mendoza

**EFEITO DO LASER INFRAVERMELHO EM MONÓCITOS HUMANOS
ESTIMULADOS COM *Porphyromonas gingivalis***

Belo Horizonte

2020

Paula Frota Angheben Mendoza

**EFEITO DO LASER INFRAVERMELHO EM MONÓCITOS HUMANOS
ESTIMULADOS COM *Porphyromonas gingivalis***

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.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto

Belo Horizonte

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

M539e Mendoza, Paula Frota Angheben
 Efeito do laser infravermelho em monócitos humanos estimulados com
Porphyromonas gingivalis / Paula Frota Angheben Mendoza. Belo Horizonte,
2020.
 69 f. : il.

 Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza
 Coorientadora: Giovanna Ribeiro Souto
 Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia

 1. Fotobiomodulação. 2. Monócitos. 3. *Porphyromonas gingivalis*. 4.
Doença periodontal - Prevenção. 5. Lasers em odontologia. 6. Citocinas. 7.
Mucosa bucal - Doenças. 8. Boca - Câncer - Quimioterapia. I. Souza, Paulo
Eduardo Alencar de. II. Souto, Giovanna Ribeiro. III. Pontifícia Universidade
Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV.
Título.

CDU: 616.311.2

Ficha catalográfica elaborada por Fernanda Paim Brito - CRB 6/2999

Paula Frota Angheben Mendoza

**EFEITO DO LASER INFRAVERMELHO EM MONÓCITOS HUMANOS
ESTIMULADOS COM *Porphyromonas gingivalis***

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. Paula Rocha Moreira – UFMG
- 2- Profa. Dra. Soraya de Mattos Camargo Grossmann Almeida – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 04 de março de 2020

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

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

*Ao meu esposo Rodrigo...
por ter estado ao meu lado, segurando minhas mãos, secando minhas lágrimas e,
principalmente, por ter acreditado em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza pela orientação, entendimento e apoio incondicional durante essa jornada. Não posso deixar de sentir gratidão pelo exemplo de profissional e ser humano que encontrei na pessoa do meu orientador. Soube me guiar com gentileza, entendeu minhas falhas e incentivou meus sucessos. Um digno exemplo de mestre para mim e para todos que tem a benesse de com ele conviver.

À Profa. Giovanna Ribeiro Souto pela co-orientação e participação fundamental na concepção deste projeto, execussão dos experimentos e revisão cuidadosa do trabalho escrito.

À Dra. Lis Ribeiro do Vale Antonelli, por abrir as portas de seu laboratório e disponibilizar recursos humanos e materiais imprescindíveis à realização deste trabalho.

À Dra. Luara Isabela dos Santos pela disponibilidade e contínuas horas de dedicação na execução de toda a parte experimental.

Aos professor Luiz de Macêdo Farias e Paula Prazeres Magalhães e à doutoranda Natália Rocha Guimarães, do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do ICB/UFMG, pelo cultivo das bactérias.

À Dra. Ivana Márcia Alves Diniz, pela parceria na linha de pesquisa estudando efeitos celulares e moleculares da fotobiomodulação e pela disponibilização do equipamento de laser adaptado à realização de experimentos *in vitro*.

Aos doadores voluntários que forneceram amostras de sangue para realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisa René-Rachou da FIOCRUZ Minas, em especial à Plataforma de Citometria, pela parceria e suporte na realização das etapas laboratorias deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

A Profa. Maria Antônia Zancanaro de Figueiredo, chefe do Departamento de Estomatologia da PUCRS, por ter sido a primeira a me fazer entender que sem a Estomatologia minha formação nunca estaria completa e me despertar esse amor. Agradeço a ela por ter acreditado em mim desde o início e por ser torcida constante.

À colega Luana Farnese, por ter trilhado com maestria esse caminho primeiro e aberto possibilidades para que outros pudessem frutificar seu estudo.

Aos colegas de jornada Joaquim Neto, Lilian Barros, Breno Amaral e Maria Inês Mantuani, por terem dividido seu tempo, suas histórias, experiências e o amor pela

estomatologia. A colega Vanessa Diniz por ter sido porto seguro nos momentos de fraqueza, amizade constante e por seu olhar amoroso.

À toda equipe de professores, funcionários e alunos que passaram pelas disciplinas de Estomatologia da PUC Minas nesses dois anos meu muito obrigada! Pela troca de experiências, pelos ensinamentos, receptividade e por me permitirem crescer como pessoa e profissional na companhia de vocês.

Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós Graduação em Odontologia da PUC Minas, Silvania e Angélica, meu muito obrigada e abraço fraterno! Foram ouvido, ombro amigo, apoio constante e profissionalismo incomparáveis, parte desse título é delas!

Por fim, minha eterna gratidão à minha família. Sem vocês eu não poderia sonhar meus sonhos mais audaciosos. São, e sempre serão, meu esteio, meu porto seguro, minha base e minha maior torcida em cada etapa vencida, em cada dificuldade enfrentada e a solidez que eu preciso para sempre seguir em frente, crescendo, aperfeiçoando, melhorando, estudando e me tornando cada dia mais próxima da profissional que almejo ser.

RESUMO

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) tem sido amplamente usada no tratamento da mucosite oral induzida por tratamento oncológico. São escassos os estudos sobre os efeitos da fotobiomodulação com laser infravermelho (LIV) na modulação da inflamação, especialmente na produção de citocinas por células imunocompetentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do LIV na viabilidade celular e na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados *in vitro* com *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Para isso, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de 10 indivíduos saudáveis foram expostas ao laser de diodo (PInGaAl; 808 nm; 20 mW; 0.71 W/cm²; 0,028 cm²), em diferentes densidades de energia e avaliadas quanto à viabilidade celular. Posteriormente, as CMSP foram expostas a densidades de energia de 5 ou 60J/cm² do LIV e estimuladas com Pg. Após cultura de curta duração, as células foram submetidas a reações de imunofluorescência para avaliação da expressão de interleucina (IL) IL-1α, IL-6, IL-8, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF) por subpopulações de monócitos fenotipicamente identificados pelos marcadores CD14 e CD16, por meio de citometria de fluxo. A análise fenotípica dos monócitos mostrou que a exposição ao LIV na densidade de 60 J/cm² aumentou significativamente a frequência de monócitos não-clássicos estimulados com Pg. Análise de citocinas mostrou que LIV na densidade de energia de 5J/cm² reduziu significativamente as frequências de monócitos totais e monócitos intermediários expressando IL-6 e as frequências de monócitos intermediários expressando TNF, mas apenas nas células não estimuladas com Pg. Por outro lado, densidade de energia de 60J/cm² aumentou significativamente as frequências de monócitos não clássicos expressando IL-6, quando estimulados com Pg. Conclui-se que o LIV possui maior efeito sobre monócitos não estimulados por produtos bacterianos e que seus efeitos na modulação da expressão de citocinas dependem de baixa densidade de energia.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Laser infravermelho. Monócitos. Citocinas. *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Photobiomodulation therapy (PBMT) has been widely used in the treatment of oral mucositis induced by cancer treatment. There are few studies on the effects of photobiomodulation with infrared laser (IRL) in the modulation of inflammation, especially in the production of cytokines by immunocompetent cells. The aim of this study was to evaluate the effect of IRL on cell viability and cytokine production by human monocytes stimulated in vitro with *Porphyromonas gingivalis* (Pg). For this propose, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 healthy individuals were exposed to a diode laser (PInGaAl; 808 nm; 20 mW; 0.71 W/cm²; 0.028 cm²), in different energy densities and evaluated for cell viability. Subsequently, PBMCs were exposed to energy densities of 5 or 60 J/cm² from IRL and stimulated with Pg. After short-term culture, cells were subjected to immunofluorescence reactions to evaluate the expression of interleukin (IL) IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor (TNF) by monocyte subpopulations phenotypically identified by the CD14 and CD16 markers, using flow cytometry. Phenotypic analysis of monocytes showed that exposure to IRL at 60 J/cm² significantly increased the frequency of non-classical monocytes in Pg-stimulated group. Cytokine analysis showed that IRL at 5 J/cm² significantly reduced the frequencies of total monocytes and intermediate monocytes expressing IL-6 and the frequencies of intermediate monocytes expressing TNF, but only in cells not stimulated with Pg. Therefore, at the energy density of 60 J/cm², IRL significantly increased the frequencies of non-classical monocytes expressing IL-6, when stimulated with Pg. In conclusion, IRL has higher effect on monocytes not stimulated by bacterial products and that its effects on the modulation of cytokine expression depend on low energy density.

Keywords: Photobiomodulation. Infrared laser. Monocytes. Cytokines. *Porphyromonas gingivalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GAAIAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
He-Ne	Hélio-Neônio
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LEDs	Luz Emitida por Diodo
LFTBI	Laser Fototerapia em baixa Intensidade
LILT / LLLT	<i>Low Intensity Level Treatment / Low Level Laser Therapy</i>
LIV	Laser Infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeos
MASCC/ISOO	Associação Multinacional para Suporte aos Cuidados em Câncer da Sociedade Internacional de Oncologia Oral
MHC-II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
MIF	Mediana de Intensidade de Fluorescência
MMP1	Metaloproteinase de Matriz-1
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MTT	Metil Tetrazol
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PInGAAI	Fosforeto de Índio-Gálio-Alumínio
REDOX	Oxi-Redução
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TFBM	Terapia de Fotobiomodulação
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Inflamação	20
1.2 Terapia de fotobiomodulação	21
1.3 TFBM no tratamento da mucosite oral	23
1.4 Efeito da TFBM na atividade de células imunocompetentes.....	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas.....	67

1 INTRODUÇÃO

A terapia de fotobiomodulação (TFBM) tem sido largamente utilizada devido aos efeitos significativos observados no tratamento de mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia usadas no tratamento do câncer (JADAUD; BENSADOUN, 2012; OTON-LEITE *et al.*, 2015). Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na TFBM nos diferentes processos patológicos ainda não foram completamente elucidados, mas estudos mostraram efeitos na estimulação da cicatrização tecidual, regeneração, respostas imunes, além da inibição da inflamação, dor e de repostas imunes exacerbadas (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Atualmente, a TFBM inclui uma grande variedade de fontes de luz como luz emitida por diodo (LEDs), espectro de luz vermelha visível e infravermelha não visível, em baixas doses de potência (ZADIK *et al.*, 2019).

O Grupo de Estudos de Mucosite da Associação Multinacional para Suporte aos Cuidados em Câncer da Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) publicou um guia prático baseado em evidência clínica para tratamento de mucosite oral incluindo uma seção sobre terapia de luz laser. Neste guia prático recomenda-se o uso de luz de comprimento de onda vermelho (632.8nm ou 650nm), potência de 40mW e dose de 2J/cm² para prevenir e tratar mucosite oral. No guia prático da MASCC/ISOO outros comprimentos de onda não foram incluídos devido às insuficientes evidências em ensaios clínicos randomizados (MIGLIORATI *et al.*, 2013; ZADIK *et al.*, 2019).

No entanto, um estudo avaliando a TFBM usada de modo profilático (antes do surgimento das lesões) e terapêutico (após o surgimento das lesões) no tratamento de mucosite oral desenvolvida durante o tratamento de leucemia linfoblástica aguda não encontrou diferença significativa na redução das lesões comparando luz vermelha (660nm) e luz infravermelha (830nm) (DE CASTRO *et al.*, 2013). Adicionalmente, outro estudo mostrou que a associação de luz vermelha e infravermelha no tratamento da mucosite oral reduziu a ocorrência de lesões em grau mais avançado e a necessidade de prescrição de analgésicos em comparação com uso apenas de luz vermelha (SOARES *et al.*, 2018).

Estudos *in vitro* sugerem que a combinação de comprimentos de onda é mais eficiente para induzir a proliferação de fibroblastos (HAUBNER *et al.*, 2012). A luz infravermelha age na membrana celular mudando os mecanismos de transporte, tal como a bomba de sódio e potássio (KIM; CALDERHEAD, 2011; KARU, 1999) e, conseqüentemente, reduz a dor (LOPATINA *et al.*, 2012). A luz infravermelha (808nm) também reduz mediadores inflamatórios, como interleucina (IL)-1 e IL-6 (ALVES *et al.*, 2013). No entanto, são escassos

os estudos da literatura avaliando o efeito da luz infravermelha na modulação da expressão de mediadores imunoinflamatórios.

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da TFBM com luz laser infravermelho na produção de citocinas por subpopulações de monócitos humanos estimulados *in vitro* com *Porphyromonas gingivalis*.

1.1 Inflamação

A inflamação é um processo complexo desencadeado em resposta a um estímulo agressor e é caracterizada pelo extravasamento de plasma e leucócitos, os quais secretam diversos mediadores inflamatórios responsáveis pela ocorrência das alterações teciduais e clínicas (WEISS, 2008). Na mucosite oral associada ao tratamento oncológico observa-se o desenvolvimento de inflamação com presença de úlceras dolorosas e difusas na cavidade oral e trato gastrointestinal; nas áreas ulceradas, bactérias da microbiota oral colonizam o tecido conjuntivo e seus produtos estimulam células teciduais e do infiltrado inflamatório a aumentar a secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, contribuindo para o aumento da inflamação e da destruição tecidual (SONIS *et al.*, 2004). É amplamente aceito que os microrganismos têm papel fundamental em processos inflamatórios; alterações no microambiente bacteriano ocorridas em decorrência de quimio e radioterapia, tanto no ambiente intestinal como oral, levam a uma perda de equilíbrio entre as bactérias que compõem o microambiente. A presença de mucosite ulcerativa coincide com a presença de bactérias associadas à doença periodontal, particularmente *P. gingivalis*. A presença da *P. gingivalis* pode inibir o fechamento das úlceras em modelos *in vitro* (LAHEJI; SOET, 2014).

Apesar de a literatura ter descrito que a TFBM apresenta capacidade de estimulação da proliferação celular e do reparo tecidual, ainda são escassos os estudos avaliando seus efeitos na modulação da inflamação, especialmente na produção de citocinas por células imunocompetentes (SONIS *et al.*, 2004).

Os processos inflamatórios podem atrasar o reparo tecidual e o fechamento de feridas, impedindo a progressão normal da cicatrização. Radicais livres produzidos nesse processo danificam o tecido alterando seus constituintes. Para que uma alternativa terapêutica seja considerada eficaz ela deve acelerar o processo de cicatrização através da capacidade de modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e promover a angiogênese. A TFBM tem mostrado capacidade de aumentar o metabolismo celular, resultando em maior proliferação celular e prevenção de morte celular (WAGNER *et al.*, 2016).

1.2 Terapia de fotobiomodulação

A TFBM consiste na aplicação de luz com comprimento de onda nas regiões do vermelho ou infravermelho (600nm a 1100nm), com potências que variam de 1mW a 1000mW e densidades de energia que não causam aquecimento celular (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; HAMBLIN; SOUSA; AGRAWAL, 2017; HUANG; CHEN; CARROLL, 2009; HUANG *et al.*, 2011). A luz laser tem propriedades únicas. São elas: comprimento de onda único, propriedade de viajar em uma única direção sem que ocorra divergência (colimação) e coerência. A combinação dessas propriedades permite ao laser que penetre a superfície da pele sem que ocorram efeitos invasivos ou que haja transferência térmica perceptível. Os efeitos do laser podem ser considerados primários, secundários ou terciários. Os primários são aqueles em que o feixe de luz atinge as mitocôndrias e membranas celulares e a energia é absorvida e transformada em energia cinética. Durante os efeitos secundários ocorre a amplificação dos sinais recebidos na primeira fase, ou seja, são a resposta aos efeitos primários. Nos efeitos terciários são os que ocorrem a distância do local irradiado, de forma sistêmica (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007).

A fotoestimulação de células e tecidos tem como objetivo a modulação de processos inflamatório e cicatricial, alívio de dor, melhora na atividade vascular, aumento da atividade metabólica, estímulo à formação de tecido fibroso e promoção de regeneração tecidual (HAMBLIN; NELSON; STRAHAN, 2018). Os efeitos são baseados na capacidade de modular diversos processos metabólicos, através da conversão da energia da luz do laser em processos bioquímicos e fotofísicos, que transformam a luz do laser em energia útil para as células. O laser é absorvido pelas cromosferas na cadeia respiratória das mitocôndrias, com um aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP), que resulta em aumento da proliferação celular e síntese proteica, estimulando o reparo tecidual. (OTON-LEITE *et al.*, 2015; SUAN *et al.*, 2014).

A TFBM envolve aplicações de luz coerente de baixa intensidade (USUMEZ *et al.*, 2014). Atualmente é amplamente aceito que a luz não coerente dos LEDs se comporta da mesma forma que os lasers de luz coerente (lasers cirúrgicos) para a maioria dos usos em saúde sem, contudo, possuir efeito térmico perceptível, mas sim fotoquímico (HAMBLIN, 2018; HUANG; CHEN; CARROLL, 2009). Sendo assim, a luz absorvida é capaz de causar alterações químicas, como ocorre no processo de fotossíntese nas plantas (HUANG *et al.*, 2011).

O laser interage com os tecidos vivos por meio de processos de absorção, espalhamento e transmissão, porém somente a luz absorvida terá o efeito clínico desejado (CAVALCANTI *et al.*, 2011). A absorção da luz depende da quantidade e qualidade do cromóforo presente no tecido e do comprimento de onda empregado durante aplicação do laser (YOSHIYASU, 2001). Somente os processos de espalhamento e absorção são dependentes do comprimento de onda. A profundidade de penetração do laser nos tecidos, depende do comprimento de onda da luz absorvida (MORIYMA, 2006). O espalhamento diminui com o aumento do comprimento de onda, favorecendo o uso dos espectros infravermelhos (JOBSIS, 1977).

O efeito biológico pode provocar alteração da atividade celular dependendo do estado fisiológico da célula (KARU, 1989). Os diferentes efeitos, excitatórios ou inibitórios, dos comprimentos de onda vermelhos e infravermelhos podem ser explicados pelo fato de que diferentes cromóforos absorvem distintos comprimentos de onda em diferentes estágios de oxi-redução (redox), além dos comprimentos de onda afetarem diferentes pontos na cadeia respiratória (KARU, 1999). Diversos parâmetros do laser podem alterar a biologia tecidual, incluindo o comprimento de onda (nanômetros), potência (miliwatts), quantidade de energia entregue aos tecidos (joules), tempo (segundos) e a densidade de energia entregue ao tecido (Joules/cm²) (MIGLIORATI *et al.*, 2013). Apesar dos mecanismos de ação dos lasers vermelho e infravermelho ainda não serem claramente compreendidos, já existe um consenso de que as mitocôndrias possuem os principais cromóforos responsáveis pela absorção dessa energia, que é convertida em energia química e promove estímulo celular (HAMBLIN; SOUSA; AGRAWAL, 2017).

Nas mitocôndrias, moléculas da citocromo c-oxidase possuem picos de absorção de energia dos fótons nos espectros vermelho e infravermelho (HAMBLIN; DEMINOVA-RICE, 2007). O estímulo mitocondrial ocorrido na TFBM aumenta a atividade da citocromo c-oxidase, a síntese de DNA e proteínas, além da produção de ATP, de espécies reativas de oxigênio (ROS), peróxido de hidrogênio e superóxido dismutase (HAMBLIN; SOUSA; AGRAWAL, 2017). O aumento do ROS na célula leva a um quadro de estresse oxidativo, ativando fatores de transcrição como NF-κB, que, por sua vez, ativam vias de expressão gênica levando a um aumento da síntese proteica. Esse processo aumenta a proliferação celular, neovascularização e a síntese colágena, levando consequentemente à melhora nos processos cicatriciais, diminuição de edema, dor e inflamação (HAMBLIN; SOUSA; AGRAWAL, 2017).

Segundo Karu (1987) com o aumento da dose do laser, os cromóforos podem ser danificados e o resultado seria o declínio do efeito da TFBM. O aumento contínuo da dose empregada levaria a destruição dos cromóforos, inibição do metabolismo celular e consequentemente morte celular.

O laser terapêutico possui baixa potência e é também denominado laser clínico ou não-cirúrgico, laser não-ablativo, laser frio, soft laser, LILT (Low Intensity Level Treatment), LLLT (Low Level Laser Therapy) ou traduzindo LFTBI (laser fototerapia em baixa intensidade). Este laser é caracterizado por fornecer densidade de energia que não ultrapassa o limiar de sobrevivência da célula (BRUGNERA JÚNIOR; VIEIRA, 1998). Os lasers terapêuticos mais comumente empregados são o He-Ne e o diodo (ou LED). O Helium-Neon foi o primeiro laser gasoso desenvolvido e o primeiro a emitir, de forma contínua, raios com dois comprimentos de onda: 632,8 nm (vermelho) e 543,5 nm (verde). Já o laser diodo, é um chip semiconductor que funciona como um diodo elétrico, com comprimento de onda variando entre 620 nm e 1500 nm nos espectros vermelho e infravermelho, que são determinados pelo tipo de material semiconductor utilizado (BRUGNERA JÚNIOR; VIEIRA, 1998; GARCEZ; RIBEIRO; NUNEZ, 2012).

A TFBM tem sido largamente utilizada no tratamento de mucosite oral. De acordo com Lalla, Sonis e Peterson (2008), especula-se que a TFBM pode ter potencial para redução nas espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas pró-inflamatórias, fatores que contribuem para a patogenicidade da mucosite oral. No entanto, este mecanismo ainda não foi completamente esclarecido.

1.3 TFBM no tratamento da mucosite oral

Estudos apontam que o uso da TFBM pode ter efeitos bioestimulatórios, analgésicos, antiexudativos, anti-hemorrágicos, anti-inflamatórios, anti-neurálgicos, antiespasmódicos e vasodilatadores. Efeitos positivos em pacientes portadores de Paralisia de Bell e casos de dores articulares têm sido relatados (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007). Importantes resultados da TFBM são encontrados também nos quadros de mucosite induzidos por quimio e radioterapias, osteonecrose dos maxilares induzidas pelo uso de bisfosfonatos, manejo do líquen plano oral e abreviamento do quadro clínico do herpes simples (WAGNER *et al.*, 2016).

Úlceras orais são queixas comuns na prática clínica e podem gerar quadros de dor severa. Estratégias que acelerem o fechamento dessas úlceras e reduzam a dor são importantes aspectos a serem considerados na busca de um protocolo para tratar essas condições. O

fechamento de lesões é um processo dinâmico regulado por uma série de sinalizações complexas e estímulos a diferentes fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (WAGNER *et al.*, 2016).

Em relação à mucosite oral, esta se desenvolve após duas semanas do início da quimioterapia com eritema que progride para a ulceração na mucosa. As ulcerações são cobertas por pseudomembrana esbranquiçada e costumam regredir em torno de 2 a 4 semanas (LALLA; SONIS; PETERSON, 2008). Dependendo da sua gravidade, pode ser fator de modificações no planejamento do tratamento médico. Pacientes que não conseguem se alimentar por via oral passam a ter nutrição por via parenteral, o que pode impactar a sobrevivência deste, devido ao risco de infecção local ou sistêmica (BJORDAL *et al.*, 2011).

A mucosite induzida por quimioterápico progride em cinco fases: iniciação, resposta ao dano primário, amplificação do sinal, ulceração e cicatrização (SONIS, 2004). Na iniciação, danos no DNA resultam em morte ou injúria das células e espécies reativas de oxigênio geram danos em estruturas não-DNA. Na segunda fase, danos na mucosa estimulam apoptose e produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6, o que leva a maior injúria na mucosa, amplificando os efeitos originais da radioterapia e quimioterapia. TNF ativa NF- κ B, levando a mais morte celular. A indução de enzimas também é observada, como as metaloproteinases (MMP) 1 e 3, que causam destruição do colágeno da matriz subepitelial e da membrana basal, respectivamente. Sequencialmente, a perda da integridade da mucosa resulta em lesão dolorosa com propensão à infecção. Produtos de parede celular bacteriana estimulam a infiltração de células mononucleares que produzem e liberam mais mediadores inflamatórios. Na fase final, após o fim da terapia quimioterápica, ocorre a auto resolução da mucosite pela proliferação de células epiteliais e recomposição da microbiota local. Este é regulado pelo grau e tipo de tratamento (quimioterápico ou radioterápico), dose e tempo da terapia (SONIS, 2004). Essas cinco fases propostas por Sonis (2004) não ocorrem de forma distinta e se sobrepõe no tempo, podendo diversas fases ocorrerem ao mesmo tempo. A mucosite resulta de uma série de eventos biológicos complexos combinados com os fatores do hospedeiro, como sexo, idade, peso, comorbidades, estilo de vida e microambiente bacteriano (LAHEIJ; SOET, 2014).

A radiação ionizante e a quimioterapia induzem expressão de uma série de genes, resultando em danos celulares. Estudos com células em cultura mostraram rápida expressão de genes relacionados à produção de ROS, que por sua vez ativam diversas vias de sinalização nas células da mucosa. Provavelmente, a radiação ionizante incidente nos genes causa um efeito dominó, ativando outros genes. Acredita-se que o aumento da expressão do

NF- κ B seja importante para a secreção de citocinas, expressão de moléculas de adesão celular, de proteínas da fase aguda e de genes de resposta mediante estresse. Tudo isso provoca a perda de renovação das células epiteliais, atrofia, apoptose e, conseqüentemente, formação de úlceras. Além disso, infecção causada por bactérias da microbiota oral pode amplificar este processo (SONIS, 2002).

Estudos corroboram que a mucosite resulta de uma série de eventos inflamatórios, envolvendo produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, metaloproteinases de matriz e fatores de crescimento epidérmico (EGF), fibroblástico (FGF) e de endotélio vascular (VEGF) (OTON-LEITE *et al.*, 2015). Em mucosite induzida em ratos, observou-se um aumento significativo de mieloperoxidase e IL-1 β no quarto dia de indução e aumento da expressão de TNF no primeiro dia, quando comparados com animais controles. No entanto, quando células imortalizadas de ratos foram cultivadas na presença de quimioterápico, observou-se apenas o aumento significativo de TNF (HAMOUDA *et al.*, 2017).

Análise dos níveis de NF- κ B realizada em estudo de Curra *et al.* (2015) revelaram que, tanto nos grupos de controle como nos grupos terapêuticos, foram encontrados os mesmos padrões de expressão de proteínas. NF- κ B aumentou dos dias 5 a 10 do estudo e regrediu do dia 10 ao dia 15. Ao final do estudo foi possível concluir que o uso da TFBM melhorou clinicamente a mucosite oral em modelo animal através da ativação no NF- κ B tanto se usada de forma preventiva, quanto terapêutica (CURRA *et al.*, 2015).

Estudo prospectivo com pacientes que receberam transplante de células-tronco hematopoiéticas investigou a relação entre as ulcerações orais e microrganismos e mostrou que a *P. gingivalis* tem interferência importante nas lesões de mucosite oral (LAHEIJ *et al.*, 2012). Na cavidade oral, bactérias envolvidas no processo da doença periodontal podem influenciar a cicatrização de lesões ulceradas, levando a um importante agravamento dos quadros de mucosite oral, uma vez que a microflora oral é um fator modulador da mucosite, através da colonização das lesões ulceradas. Nos quadros periodontais o balanço entre a microflora e os processos inflamatórios em sítios subgengivais é abalado, causando danos aos tecidos de suportes dentários. Os quadros inflamatórios próprios da doença periodontal levam a um aumento no fluido crevicular, o que promove um ambiente favorável para bactérias proteolíticas com a *P. gingivalis*. O efeito proteolítico produz um aumento no pH local, diminuindo os potenciais de oxi-redução o que leva a um maior crescimento bacteriano de espécies anaeróbias (LAHEIJ; SOET, 2014).

P. gingivalis é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica, sem mobilidade e assacarolítica. É comum em pacientes com doença periodontal crônica e encontrada somente

em pequeno número de pacientes sem acometimento periodontal. Tem a habilidade de invadir os tecidos orais, onde se replica de forma intracelular, dessa forma ficando protegida da resposta do sistema imune do paciente. A presença de *P. gingivalis* tem sido amplamente associada com quadros de mucosite ulcerativa. Por ser gram-negativa sua parede celular é rica em LPS. A presença de LPS ativa receptores celulares ligados a resposta imunológica do hospedeiro e estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (LAHEIJ; SOET, 2014).

A associação da *P. gingivalis* com *Cândida spp.* em quadros de mucosite oral podem levar a um atraso na cicatrização das úlceras e atraso na migração celular maior do que a presença destes microorganismos de forma isolada. Um dos papéis fundamentais da microbiota oral residente é prevenir a colonização por agentes patológicos exógenos. É possível que a citotoxicidade das terapias antineoplásicas altere o balanço ecológico da microbiota oral, geralmente levando a um ambiente anaeróbico, favorecendo a presença e crescimento da *P. gingivalis* (HAVERMAN *et al.*, 2017).

Uma revisão sistemática com meta-análise, incluindo 1144 pacientes, mostrou que a aplicação profilática de TFBM reduz significativamente o risco, a intensidade e a duração da mucosite grave e a ocorrência de dor intensa em pacientes em tratamento de câncer ou submetidos a transplante de medula óssea (OBEROI *et al.*, 2014). Adicionalmente, a TFBM quando aplicada de forma extraoral, no comprimento de onda de 830 nm (infravermelho), gera melhora significativa em pacientes com mucosite. Este fato se deve ao maior poder de penetração dos raios infravermelhos quando comparado aos raios vermelhos (MORAES *et al.*, 2009).

Um estudo duplo-cego avaliou a combinação da TFBM com laser vermelho e infravermelho (660 nm e 808 nm) para tratamento de mucosite em 42 pacientes submetidos a quimioterapia e radioterapia. Um grupo recebeu densidade de energia 300 J/cm^2 de ambos os lasers de 660 nm e 808 nm e o outro grupo a mesma densidade de energia, mas apenas do laser de 660 nm. Os resultados mostraram que a combinação de luz vermelha e infravermelha em doses altas (300 J/cm^2) reduziu o grau de mucosite e a prescrição de analgésicos (SOARES *et al.*, 2018).

Estudo clínico randomizado duplo-cego com 123 pacientes em tratamento quimioterápico também mostrou que terapia com laser de diodo infravermelho (830 nm) e densidade de energia de $4,5 \text{ J/cm}^2$ reduziu significativamente a dor, após sete dias de aplicações (AMADORI *et al.*, 2016).

Não existe terapia completamente efetiva para a mucosite, pois os mecanismos envolvidos em sua patogênese ainda não são totalmente conhecidos. Os principais alvos das

terapias utilizadas são a redução de citocinas pró-inflamatórias, diminuição de ROS, supressão da via NF- κ B, estimulação da proliferação de queratinócitos por meio da indução de fatores de crescimento, estimulação da angiogênese e inibição de apoptose (SONIS, 2004). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do laser nos mecanismos moleculares envolvidos nesses processos.

1.4 Efeito da TFBM na atividade de células imunocompetentes

Alguns estudos mostraram efeitos da TFBM nas características fenotípicas e funcionais de células imunocompetentes e que esses efeitos dependem do comprimento de onda do laser e da densidade de energia fornecida. Gulsoy *et al.* (2006) observaram que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) apresentaram aumento da proliferação após tratamento com laser de He-Ne, no comprimento de onda de 632,8 nm, com densidade de energia de 2,5 J/cm². Houreld, Sekhejane e Abrahamse (2010) mostraram que o laser de 830 nm a 5 J/cm², aplicado em fibroblastos de pele humana de pacientes diabéticos, reduziu a expressão gênica e a síntese proteica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF, confirmando os efeitos biomoduladores da TFBM no processo inflamatório.

Um estudo utilizando cultura de células de paciente com leucemia aguda mostrou que estimulação com doses de energia de 5, 10 ou 20 J/cm², por mais de uma vez, aumentou significativamente a proliferação celular. Nos resultados deste estudo, os pesquisadores concordam que a resposta celular ao estímulo do laser, depende da dose e da frequência de radiação (DASTANPOUR; BEITOLLAHI; SABER, 2015).

Fibroblastos obtidos de fragmentos de mucosa durante exodontia em pacientes saudáveis foram mantidos em cultura, com adição de TNF, IL- β , IL-6 e IL-8, por 24 horas. Em seguida, foram expostos ao laser de diodo de 780 nm, com doses de energia entre 0,5 a 3 J/cm², em intervalos de 24 horas, durante três dias. Aplicação de laser aumentou a migração e a proliferação de fibroblastos. Embora a estimulação prévia com citocinas tenha reduzido a expressão de fatores de crescimento, a exposição ao laser aumentou a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator de crescimento epidérmico nas células estimuladas com TNF, e reduziu a expressão de EGF e do fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF₂) naquelas estimuladas com IL-8. Altas concentrações de citocinas inflamatórias afetaram a atividade dos fibroblastos resultando no atraso do fechamento da ferida em ensaio de cicatrização de feridas. Entretanto, a TFBM com 0,5 J/cm² promoveu aceleração da

migração dos fibroblastos, em ensaios de migração *transwell*, e proliferação celular nos fibroblastos expostos à citocinas inflamatórias (BASSO *et al.*, 2015).

Em culturas de fibroblastos cutâneos e embrionários, a irradiação com laser de baixa potência foi capaz de aumentar a produção de DNA, colágeno e pró-colágeno, aumentando a taxa de proliferação e migração celular. A irradiação com laser de GaAlAs de 830 nm em fibroblastos humanos de ligamento periodontal inibiu significativamente a produção de PGE₂ e IL-1 β , um efeito que pode ser responsável pela redução da dor durante o tratamento ortodôntico (KREISLER *et al.*, 2003).

Amostras de sangue periférico foram irradiadas nos comprimentos de onda 405, 589 ou 780 nm, nas densidades de 36, 54, 72 ou 90 J/cm², com potência de 30 mW/cm². Usando analisador de hematologia computadorizado observou-se um aumento no número de linfócitos na dose de 72 J/cm² e comprimento de onda de 589 nm, que foi confirmado por citometria de fluxo. A irradiação das amostras mostrou significativo aumento de linfócitos T CD45⁺ e células *Natural Killer* (NK) CD16⁺CD56⁺. As frequências de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e de linfócitos B CD19⁺ não foram afetadas (AL MUSAWI *et al.*, 2017).

Macrófagos ativados por interferon-gama e lipopolissacarídeos (LPS) e estimulados por selante de resina foram expostos ao laser infravermelho (780 nm, 70 mW, spot size 4.0 mm², 3 J/cm², for 1.5 segundos) e avaliados quanto a secreção de citocinas e enzimas, por meio da técnica de ELISA. Observou-se que o laser diminuía a expressão de TNF pelos macrófagos, mas não afetava o nível de secreção de metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1) (SOUSA *et al.* 2009).

Células mononucleares do baço de roedores foram isoladas e cultivadas 12 horas após a realização de incisão cirúrgica e aplicação de luz laser de 780 nm, potência de 20 mW, densidade de energia de 10 J/cm², em única dose, no baço. O estudo mostrou não haver diferença na expressão de IL-6 e TNF entre os grupos laser e controle (FUKUDA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos diversos estudos têm identificado subpopulações distintas de monócitos humanos, caracterizadas pela expressão dos marcadores CD14 e CD16, e seus papéis em diferentes processos imuno-inflamatórios (ANTONELLI *et al.*, 2014; THALER *et al.*, 2016; ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻) possuem alta capacidade de fagocitose, são rapidamente recrutados para sítios inflamatórios, exibem perfil de citocinas pró-inflamatório e correspondem a cerca de 85 a 90% dos monócitos circulantes (PATEL *et al.*, 2017; THALER *et al.*, 2016; ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Monócitos não-clássicos (CD14^{low}CD16⁺) apresentam perfil anti-inflamatório,

realizam fagocitose mediada pelo receptor FcR e interagem mais facilmente, por meio de moléculas de adesão, aos vasos de sítios inflamatórios *in vivo*, motivo pelo qual recebem também a denominação de monócitos “patrulhadores” (THALER *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2011). Já os monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺) possuem alta expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e exibem perfil molecular transitório entre os monócitos clássicos e não-clássicos (WONG *et al.*, 2011). Embora as três subpopulações de monócitos tenham sido estudadas em algumas doenças infecciosas, o perfil fenotípico-funcional de cada uma delas ainda não foi totalmente compreendido e seus papéis na mucosite oral é ainda desconhecido.

Ainda são escassos os estudos que avaliam os efeitos *in vitro* da TFBM utilizando laser infravermelho nas células imunocompetentes. Até o presente momento, não é claro o efeito da luz infravermelha na produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico, principalmente quando estimuladas com produtos de bactérias orais, condição que ocorre frequentemente nas lesões ulceradas da mucosite oral.

As hipóteses testadas nesse estudo foram: o laser infravermelho é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias ou aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por monócitos humanos estimulados com produtos de bactérias da microbiota oral; diferentes densidades de energia do laser apresentam efeitos diferentes na produção de citocinas; laser infravermelho afeta de modo distinto diferentes subpopulações de monócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da luz laser infravermelha (808nm) na viabilidade celular e na produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) humano estimuladas com *P. gingivalis*.

2.2 Objetivos específicos

- a) determinar a curva de citotoxicidade do laser de 808nm com diferentes densidades de energia em CMSP humanas;
- b) avaliar e comparar o efeito do laser de 808nm, em diferentes densidades de energia, na produção das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF por subpopulações de monócitos;
- c) avaliar e comparar o efeito do laser de 808nm, em diferentes densidades de energia, na produção das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF por subpopulações de monócitos estimuladas com *P. gingivalis*.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Ao término desta investigação, foi possível elaborar a proposta de artigo “Efeito do laser de diodo infravermelho na expressão de citocinas por subpopulações de monócitos humanos estimuladas com *Porphyromonas gingivalis*”, que será encaminhada para publicação no periódico **Archives of Oral Biology** (Qualis A1).

Normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico:
<https://www.elsevier.com/journals/archives-of-oral-biology/0003-9969/guide-for-authors>

Efeito do laser de diodo infravermelho na expressão de citocinas por subpopulações de monócitos humanos estimuladas com *Porphyromonas gingivalis*

Paula Frota Angheben Mendoza^a, Luara Isabela dos Santos^b, Lis Ribeiro do Vale Antonelli^b, Natália Rocha Guimarães^c, Paula Prazeres Magalhães^c, Luiz de Macêdo Farias^c, Martinho Campolina Rebello Horta^a, Ivana Márcia Alves Diniz^d, Giovanna Ribeiro Souto^a, Paulo Eduardo Alencar Souza^a.

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

^b Laboratory of Biology and Immunology of Infectious and Parasitic Diseases, René Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^d Graduate Program in Dentistry, Dentistry School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author: Paulo Eduardo Alencar Souza.

Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Avenida Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101, Coração Eucarístico. Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil. CEP: 30535-901.

Phone number: +55 31 3319-4414

Telefax number: +55 31 3319-4415

Email: pauloalencar@pucminas.br

ABSTRACT

Objective: Photobiomodulation therapy has been widely used in the treatment of oral mucositis induced by cancer treatment and other inflammatory conditions of the mouth. The objective of this work was to evaluate the effect of infrared laser (IRL) on cell viability and cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis* (Pg).

Design: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 10 healthy individuals were exposed to diode laser (PInGaAl; 808nm; 20mW; 0.71W/cm²; 0.028cm²), at different energy densities and evaluated for cell viability. Subsequently, PBMCs were exposed to LIV at energy densities of 5 or 60J/cm² and stimulated with Pg. After 9 hours of incubation, immunostaining and flow cytometry were performed to evaluate the expression of IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF by monocyte subpopulations phenotypically identified by the CD14 and CD16 markers.

Results: Exposure to IRL at 60J/cm² significantly increased the frequency of non-classical monocytes. Cytokine analysis showed that IRL at an energy density of 5J/cm² significantly reduced the frequencies of total monocytes and intermediate monocytes expressing IL-6 and the frequencies of intermediate monocytes expressing TNF, but only in cells not stimulated with Pg. On the other hand, energy density of 60J/cm² significantly increased the frequencies of non-classical monocytes expressing IL-6, when stimulated with Pg.

Conclusion: IRL has a greater effect on monocytes not stimulated by bacterial products and that their effects on modulation of cytokine expression depend on low energy density.

Keywords: Photobiomodulation. Infrared laser. Monocytes. Cytokines. *Porphyromonas gingivalis*.

INTRODUCTION

Photobiomodulation therapy (PBMT) has been widely used due to the significant effects observed in the treatment of oral mucositis induced by chemotherapy and radiotherapy used in the treatment of cancer (JADAUD; BENSADOUN, 2012; OTON-LEITE *et al.*, 2015). The molecular and cellular mechanisms involved in TFBM in different pathological processes have not yet been fully elucidated, but studies have shown effects on the stimulation of tissue healing, regeneration, immune responses, in addition to inhibition of inflammation, pain and exacerbated immune responses (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Currently, PBMT includes a wide variety of light sources such as diode-emitted light (LEDs), visible red and non-visible infrared light spectrum, at low power doses (ZADIK *et al.*, 2019).

Several studies have shown effects of PBMT with light on the red or infrared wavelength in the prevention and treatment of oral mucositis induced by antineoplastic treatment (OBEROI *et al.*, 2014). Castro *et al.* (2013) demonstrated that there are no differences between the use of red (660 nm) or infrared (830 nm) light in a prophylactic or therapeutic way to reduce oral mucositis lesions induced by chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. Another study showed benefits of the association of red and infrared light in reducing the occurrence of lesions of oral mucositis to more advanced degrees and the need for prescription painkillers compared to the use of red light alone (SOARES *et al.*, 2018).

Some studies have shown effects of PBMT on the phenotypic and functional characteristics of immunocompetent cells and that these effects depend on the wavelength of the laser and the density of energy supplied. Houreld, Sekhejane and Abrahamse (2010) showed that the 830nm laser at 5J/cm², applied to human skin fibroblasts in diabetic patients, reduced gene expression and protein synthesis of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF. Laser irradiation of 830 nm GaAlAs in human periodontal ligament fibroblasts significantly inhibited the production of PGE₂ and IL-1 β (KREISLER *et al.*, 2003). Exposure of macrophages activated by gamma interferon and lipopolysaccharides (LPS) to infrared laser (780 nm) reduced the expression of TNF (SOUSA *et al.*, 2009). In J774 macrophages stimulated with interferon-gamma and LPS, exposure to the 660 or 780 nm laser reduced the expression of TNF and iNOS (FERNANDES *et al.*, 2015). Infrared light (808nm) also reduces inflammatory mediators associated with the sensation of pain, such as interleukin (IL) -1 and IL-6 (ALVES *et al.*, 2013). However, studies in the literature evaluating the effect of infrared light on the modulation of the expression of immuno-inflammatory mediators are still scarce.

In oral mucositis associated with cancer treatment, there is the development of inflammation with the presence of painful and diffuse ulcers in the oral cavity and gastrointestinal tract (SONIS *et al.*, 2004). In the ulcerated areas, bacteria from the oral microbiota colonize the connective tissue and their products stimulate tissue and inflammatory infiltrate cells to increase the secretion of cytokines and other inflammatory mediators, contributing to increased recruitment of mononuclear cells and tissue destruction (SONIS *et al.*, 2004). In addition, a study showed a relationship between the colonization of *P. gingivalis* and the severity of oral mucositis lesions in bone marrow transplant patients (LAHEIJ *et al.*, 2012).

Considering that PBMT is capable of modulating immunoinflammatory processes in the oral mucosa, the aim of this study was to evaluate the effect of infrared laser (IRL) on cell viability and cytokine production by human monocytes stimulated *in vitro* with *Porphyromonas gingivalis*.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples and ethical aspects

Ten healthy individuals aged 25 to 49 years (mean 36.6 years), non-smokers, were included in the present study. The exclusion criteria were: individuals with immunosuppression, systemic infectious disease, chronic alcoholics, autoimmune disease, chronic inflammatory diseases or who were undergoing treatment with antibiotic, immunosuppressive or anti-inflammatory drugs, chemotherapy or antineoplastic drugs, in the last 30 days. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Minas Gerais (CAAE: 96696318.8.0000.5137).

Twenty milliliters of blood were collected from each individual in heparinized tubes (Becton Dickinson Vacutainer®, USA) and this volume was diluted in phosphate-saline buffer (PBS) in a 1:1 ratio. The diluted blood was applied over Ficoll-Paque (GE Healthcare) and the tubes centrifuged at 20°C, for 40 minutes at 200g, to form the density gradient. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected, washed with PBS and resuspended in complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich) medium (RPMI plus 10% fetal bovine serum (SFB) (Gibco)). Cell aliquots were added to the Tripa blue (0.4%) in a 1:1 ratio for counting on a Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen) device. PBMCs were plated at a density of 1×10^6 cells/well in 96-well U-bottom plates.

Diode laser

Semiconductor diode laser of Indium-Gallium-Aluminum (PInGaAl) (DMC, São Carlos, SP, Brazil) was used, with a wavelength of 808nm (infrared), output power of the device 20mW, area of beam cross-section (spot) of 0.028cm^2 (0.6mm in diameter), without additional filter. The power density was 0.71 W/cm^2 . To determine the cytotoxicity curve, energy densities ranging from 5 to 100 J/cm^2 were used. For flow cytometry experiments, energy densities of 5 J/cm^2 (7s) or 60 J/cm^2 (84s) and energies of 0.14J or 1.68J, respectively, were used. Continuous contact photoactivation mode was used and a single application was made to the cells with the tip of the equipment in contact with the bottom center of each well of the 96-well U-bottom plate, using an opaque silicone device to isolate the area and standardize the application. Before its use, the laser equipment was submitted to a power stability test, using an optical power meter (LaserCheck, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA).

Bacteria preparation

Porphyromonas gingivalis (ATCC 25611) was grown on Brain Heart Infusion Agar, supplemented with 0.5% yeast extract, 0.1% porcine hemin and 0.1% menadione, pH 7.2, enriched with 5% sheep blood (BHIA-S/E). After incubation in an anaerobic chamber with an atmosphere of 85% N_2 , 5% CO_2 and 10% H_2 at 37°C , for 72 hours, the colonies were transferred to tubes containing saline, homogenized and quantified in a spectrophotometer (Ultrospec 10 Cell Density Meter, Biochrom, Cambridge, UK), in OD of 1, at a wavelength of 600 nm. The bacteria were washed with PBS and inactivated by heating at 100°C for 30 minutes. Then, they were kept at -80°C for use in the experiments.

Diode laser cytotoxicity assay for PBMCs

To assess the cytotoxicity of the diode laser, 1×10^5 PBMCs from five donors were plated with RPMI in 96-well plate wells, “U” bottom, and kept in an oven at 37°C , 5% CO_2 , overnight. The cell pellets were exposed to the 808 nm laser, at energy densities of 5, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 J/cm^2 . Then, the cells were resuspended and kept in an oven at 37°C , 5% CO_2 , for 8 hours. Cell viability was assessed by the methyl tetrazole assay (MTT). Methyl tetrazole formazan (MTT, 5mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added, in a final concentration of 20% (v/v) in RPMI, and the cells incubated for another 3 hours 37°C , 5% CO_2 . To dissolve formazan precipitates, 100 μL of 10% (w/v) solution of sodium Dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added and the cells incubated at

37°C overnight. Then, a wavelength reading of 570nm was performed on a plate reader (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The experiments were carried out in triplicate and the data were expressed as mean absorbance.

PBMC stimulation with diode laser and *P. gingivalis*

Based on the results of the viability of PBMCs and the energy densities used in clinical protocols for prevention and treatment of oral mucositis (OBEROI *et al.*, 2014) the energy densities of 5J/cm² and 60 J/cm² were defined for evaluation of the effect of diode laser on the production of cytokines by human monocytes. About 1x10⁶ PBMCs per well of a 96-well U-bottom plate were irradiated with an 808 nm diode laser and kept in an oven at 37°C, 5% CO₂, for 9 hours.

To evaluate the effect of the laser on cells stimulated with bacteria from the oral microbiota, PBMCs were irradiated with an 808nm diode laser, at energy densities of 5 and 60J/cm², and incubated for 1 hour in an oven at 37°C, 5% CO₂. Then, the cells were incubated with *P. gingivalis*, in the proportion of MOI (multiplicity of infection) of 0.1CFU:1PBMC, for another 8 hours. Six hours before the end of the incubation, in all experimental groups, Brefeldin A (1 µg/mL) (eBioscience, San Diego, CA, USA) was added.

Thus, six experimental groups were obtained: Control (RPMI medium), 5J (808 nm diode laser, 5 J/cm²), 60J (808nm diode laser, 60 J/cm²), Pg (*P.gingivalis*), 5J + Pg and 60J + Pg.

Immunofluorescence reactions and flow cytometry

The protocol for immunostaining was performed based on the one described by Souza *et al.* (2007), with some modifications. For quantification of viable cells, PBMCs were washed with PBS, by means of centrifugation, and incubated with Zombie Aqua® (BioLegend, USA) for 15 minutes at room temperature. Then, the cells were washed with PBS 2% serum bovine albumin (BSA) and incubated for 30 minutes, at room temperature, with anti-CD14 antibodies (FITC, M5E2 clone, BioLegend) and CD16 (APC-Cy7, 3G8 clone, BioLegend), diluted in 0.015 M PBS, pH 7.4, containing 0.01% azide and 0.2% BSA. The cells were washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature. Then, for intracytoplasmic labeling, the cells were permeabilized with PBS containing 0.5% saponin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 minutes and incubated with anti-IL-1α monoclonal antibodies (PE, clone 364-3B3-14, Biolegend), IL-6 (APC, MQ2-13A5 clone, Biolegend), IL-8 (PerCP-Cy5, BH0814 clone, Biolegend), IL-10

(PE, JES3-19F1 clone, Biolegend), TNF (PE-Cy7, clone MAb11, BioLegend), for 30 minutes at room temperature. After washing with PBS, the cells were analyzed in an LSRFortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA), with the acquisition of 150,000 events per tube.

FlowJo X software (Tree Star Inc., USA) was used for cytometric analyzes. Based on the location in the granularity versus CD14 graph, total monocyte populations (CD14⁺) were selected. Considering these cells, in the graphic CD14 versus CD16 the subpopulations of classic monocytes (CD14⁺CD16⁻), intermediates (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14^{low}CD16⁺) were selected. The percentages of monocytes from each phenotypically identified subpopulation were determined. Percentages of viable cells and percentages of cells producing cytokines IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF were also quantified and the median fluorescence intensity (MFI) of these cytokines within the population of total monocytes (CD14⁺) and within each selected monocyte subpopulation.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify the data distribution. Friedman's tests, followed by Dunn's "post hoc" test or ANOVA a criterion with repetition, followed by Tukey's "post hoc" test, were used to check for differences between treatments in terms of cell viability, cell frequencies producers of cytokines and MFI of cytokines, with a significance level of 5%. The analyzes were performed using the GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

Analyzes of cellular viability of PBMC showed that exposure to doses from 5 to 100 J/cm² of the 808 nm diode laser did not cause significant changes in mitochondrial activity by the MTT test (Figure 1).

Analysis of the viability of CD14⁺ monocytes after the different treatments showed no significant differences and mean viable cells above 88% (Figure 2B). Cytometric analyzes of the frequencies of monocyte subpopulations after exposure to diode laser and bacteria showed that stimulation with *P. gingivalis* increased the frequencies of classic monocytes (Figure 2C) and reduced those of intermediate monocytes (Figure 2D) in the total monocyte population. Laser exposure did not significantly affect the frequencies of these subpopulations when compared to the respective controls. Although stimulation with *P. gingivalis* did not significantly affect the frequencies of non-classical monocytes, laser exposure at a density of

60 J/cm² and stimulation with bacteria increased the frequencies of non-classical monocytes (Figure 2E).

Analysis of cytokine production showed that laser exposure at an energy density of 5 J/cm² significantly reduced the frequencies of cells expressing IL-6 in the CD14⁺ monocyte population (Figure 3C) and in the intermediate monocyte subpopulation (Figure 5C). In the subpopulation of intermediate monocytes, laser at 5 J/cm² also significantly reduced the median fluorescence intensity (MFI) of IL-6 (Figure 5D).

In the total monocyte population (CD14⁺), stimulation with *P. gingivalis* significantly increased the frequencies of producer cells and the MFI of the cytokines IL-1 α , IL-8 and IL-10 (Figure 3A, B, E, F, G and H).

Considering the classic monocytes stimulated with *P. gingivalis*, only cells exposed to laser at densities of 5 J/cm² and 60 J/cm² showed a significant increase in IL-6 MFI compared to the control (medium) (Figure 4D).

Exposure to energy density of 5J/cm² of the laser was able to reverse the increase in the frequency of cells expressing IL-1 α in the subpopulation of intermediate monocytes (Figure 5A) stimulated with *P. gingivalis* in relation to the control (medium). Still in the subpopulation of intermediate monocytes, only the groups stimulated with *P. gingivalis* and exposed to laser energy densities of 5 J/cm² or 60 J/cm² showed a significant increase in the frequencies of IL-8⁺ cells in relation to the control (medium) (Figure 5E).

In the subpopulation of non-classical monocytes stimulated with *P. gingivalis*, laser exposure at an energy density of 60 J/cm² significantly increased the frequencies of cells expressing IL-6 (Figure 6C). Comparing the laser energy densities in the subpopulation of non-classical monocytes stimulated with *P. gingivalis*, the frequencies of cells expressing IL-6 were higher in the group exposed to 60 J/cm² than in the group exposed to 5 J/cm² (Figure 6C). Still considering the subpopulation of non-classical monocytes, although stimulation with *P. gingivalis* did not significantly affect the frequencies of TNF⁺ cells in relation to the control (medium), exposure of these cells to energy densities of 5 J/cm² or 60 J/cm² significantly reduced the frequencies of TNF⁺ cells (Figure 6I). In addition, exposure to laser at 5 J/cm² also reduced TNF MFI (Figure 6J).

DISCUSSION

Oral mucositis is a debilitating complication of radiotherapy and chemotherapy for the treatment of cancer and is mainly associated with severe pain, increased consumption of opioid drugs, need for parenteral nutrition and increased risk of bacteremia (MARTINS *et al.*,

2019). Photobiomodulation therapy (PBMT) has been widely used in the treatment of oral mucositis, especially at the red wavelength (LALLA *et al.*, 2014). However, the evidence found in the literature that supports the use of infrared wavelength in the treatment of mucositis is still scarce (LALLA *et al.*, 2014; ZADIK *et al.*, 2019). Infrared radiation is electromagnetic radiation with a wavelength between 760 nm and 100.000 nm. Evidence suggests that infrared radiation may result in photobiomodulation and photostimulation effects, particularly benefiting neural stimulation, wound healing, and cancer treatment (TSAI *et al.*, 2017).

The present study evaluated the effects of PBMT with a wavelength of 808 nm, at doses of 5 J/cm² and 60 J/cm², on cytokine expression by different subpopulations of human PBMCs stimulated by *P. gingivalis*. It was observed that the infrared laser at a dose of 60 J/cm² was able to significantly increase the frequency of non-classical monocytes stimulated by *P. gingivalis* and the percentage of these monocytes that express IL-6. On the other hand, there was a decrease in TNF expression by non-classical monocytes stimulated with *P. gingivalis* and irradiated with doses of 5 and 60J/cm².

A prospective observational study evaluated the levels of 13 cytokines present in the saliva of patients undergoing cancer treatment and undergoing chemotherapy. It was observed that only the levels of cytokines TNF, IL-1 β and IL-6 increased significantly after the third week of treatment with chemotherapy and were associated with the onset of more severe oral mucositis (BOSSI *et al.*, 2016). The study suggests that the identification of these cytokines as biomarkers of oral mucositis can assist in planning appropriate supportive therapies for these patients (BOSSI *et al.*, 2016). In the present study, the expression of TNF, IL-1 α , IL-6, IL-8 and IL-10 was investigated by subpopulations of monocytes stimulated or not by *P. gingivalis*. Inhibitory effects on the expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF by total and intermediate monocytes not stimulated with *P. gingivalis* were observed after irradiation with infrared laser at a dose of 5 J/cm². These findings suggest that at low doses, the infrared laser has the effect of inhibiting the inflammation mediators released by subpopulations of monocytes before the appearance of mucositis lesions.

Chemotherapy-induced mucositis begins with DNA damage leading to cell death or injury. These damages stimulate apoptosis and the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF and IL-6, which leads to greater injury and loss of mucosal integrity. The lesions become painful and prone to infection. Bacterial cell wall products stimulate the infiltration of mononuclear cells that produce and release more inflammatory mediators. In the final phase, after the end of chemotherapy, mucositis self-resolves due to the proliferation of epithelial

cells and the recomposition of the local microbiota (SONIS, 2004). *P. gingivalis* is a microbial species that has a direct relationship with the severity of oral mucositis (LAHEIJ *et al.*, 2012; LAHEIJ *et al.*, 2014). Prospective study with patients who received hematopoietic stem cell transplantation showed the relationship between oral ulcerations and microorganisms and that *P. gingivalis* has an important interference in oral mucositis lesions (LAHEIJ *et al.*, 2012). In the present study, high doses of energy (60 J/cm^2) led to a significant increase in non-classical monocytes expressing IL-6, stimulated by *P. gingivalis*. From these in vitro results it would be possible to hypothesize that the infrared laser has a pro-inflammatory effect, increasing IL-6, when used in high doses (60 J/cm^2) on ulcerated lesions and infected by *P. gingivalis*. However, the balance between the various cytokines released in the inflammatory microenvironment is what determines the course of the lesion.

Monocytes are cells that circulate in the blood a few days before migrating to the tissues and develop into different types of macrophages. In recent years, several studies have identified three distinct subpopulations of human monocytes: classic ($\text{CD14}^+\text{CD16}^-$), with high phagocytosis capacity, rapid recruitment to inflammatory sites and pro-inflammatory cytokine profile; non-classic ($\text{CD14}^{\text{low}}\text{CD16}^+$), with an anti-inflammatory profile and the ability to “patrol” the tissues; and intermediates ($\text{CD14}^+\text{CD16}^+$), with high expression of molecules of the main class II histocompatibility complex (MHC-II) and transient molecular profile between classic and non-classic monocytes (ANTONELLI *et al.*, 2014; THALER *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2011; ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Although the three subpopulations of monocytes have been studied in some infectious diseases, the phenotypic-functional profile of each of them has not yet been fully understood and their roles in oral mucositis are still unknown. In the present study, there was no effect of infrared laser on the expression of cytokines by classical monocytes stimulated or not by *P. gingivalis*.

In the experimental model used in the present study, monocyte subpopulations were incubated with *P. gingivalis* after one hour of irradiation with infrared laser, following the same experimental model used in another study by our group of researchers (ABREU *et al.*, 2019). Abreu *et al.* (2019) showed that laser light at a wavelength of 660 nm at energy densities of 5 or 60 J/cm^2 was not able to significantly affect the expression of any of the cytokines evaluated by the present study in the subpopulations of monocytes not stimulated with *P. gingivalis*. On the other hand, in cells stimulated with *P. gingivalis*, red light at an energy density of 60 J/cm^2 increased the frequencies of total, classic and intermediate monocytes expressing IL- 1β and reduced the frequencies of classic TNF^+ monocytes

(ABREU *et al.*, 2019). These data show quite different effects of the diode laser at different wavelengths on human monocytes.

Other studies have evaluated the expression of inflammatory mediators at different experimental times. Sousa *et al.* (2009) evaluated the expression of inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after 4 and 24 hours of irradiation with infrared laser. The reduction of IL-6 by M1 macrophages was observed after 24 hours of irradiation. In addition, the same group of researchers has also demonstrated that the infrared laser, after 24 hours, reduces the expression of the gene and the production of IL-6 and TNF proteins by J774 macrophages activated by LPS + INF- γ (FERNANDES *et al.*, 2015). In samples of the skeletal muscle of rats after injury, after 12 hours of PBMT with infrared laser at doses of 1, 3, 6 and 9J, a reduction in edema and levels of cytokines TNF, IL-1 β , IL-6 and IL -10 (RAMOS *et al.*, 2018). These findings may suggest that the effects of infrared laser irradiation on cells subsequently stimulated by *P. gingivalis* take longer to be observed than when stimulated with red laser (ABREU *et al.*, 2019) and thus, studies evaluating a longer period incubation after irradiation should be performed. A better understanding of the biological implications of infrared radiation may help to improve therapeutic effectiveness or develop new methods of PBM using infrared wavelength.

It is concluded that LIV has a greater effect on monocytes not stimulated by bacterial products and that its effects on the modulation of cytokine expression depend on low energy density.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) [finance code 001], Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant number CDS APQ 03601-16], Brazil; Fundo de Incentivo à Pesquisa da PUC Minas (FIP PUC Minas) [grant number 2018 1114-1S], Brazil. LRVA is a CNPq fellow. PFA, LIS and NRG are Capes fellows. MCRH is a FAPEMIG fellow [grant number CDS-PPM-00653-16].

Declarations of interest: none.

Acknowledgements

The authors are grateful to the volunteers for their participation in the study.

REFERENCES

1. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, de Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R116.
2. Antonelli LRV, Leoratti FM, Costa PA, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, Pereira DB, Teixeira-Carvalho A, Golenbock D, Gonçalves R, Gazzinelli RT. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *Plos Pathogens.* 2014 Sep;10(9):e1004393.
3. Abreu, LFM. Avaliação do efeito do laser de diodo na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados com *porphyromonas gingivalis*. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) – Departamento de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
4. Bossi P, Bergamini C, Miceli R, Cova A, Orlandi E, Resteghini C, Locati L, Alfieri S, Imbimbo M, Granata R, Mariani L, Iacovelli NA, Huber V, Cavallo A, Licitra L, Rivoltini L. Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016 Dec 1;96(5):959-966. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2016.08.047.
5. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DM. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017 Apr 26;12(4):e0176460. DOI: 10.1371/journal.pone.0176460.
6. Castro JF, Abreu EG, Correia AV, da Mota Vasconcelos Brasil C, da Cruz Perez DE, de Paula Ramos Pedrosa F. Low-level laser in prevention and treatment of oral mucositis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Photomed Laser Surg.* 2013 Dec;31(12):613-8. DOI: 10.1089/pho.2012.3327.
7. De Freitas, LF; Hamblin, MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 2016 May/Jun; 22(3). DOI: 10.1109/JSTQE.2016.2561201
8. Fernandes KP, Souza NH, Mesquita-Ferrari RA, Silva F, Rocha LA, Alves AN, Sousa KB, Bussadori SK, Hamblin MR, Nunes FD. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Dec;153:344-51. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.015.
9. Houreld, NN; Sekhejane, PR; Abrahamse, H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2010 Aug;42(6):494-502.
10. Jadaud E, Bensadoun R. Low-level laser therapy: a standard of supportive care for cancer therapy-induced oral mucositis in head and neck cancer patients? *Laser Ther.* 2012;21(4):297–303.

11. Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaussen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003;30:353–358.
12. Laheij AM, de Soet JJ. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014 Jun;8(2):180-7.
13. Laheij AM, Soet JJ, Von dem Borne PA, Kuijper EJ, Kraneveld EA, Loveren CV, Raber-Durlacher JE. Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer*. 2012;20:3231–3240. DOI: 10.1007/s00520-012-1463-2
14. Lalla RV, Saunders DP, Peterson DE. Chemotherapy or radiation-induced oral mucositis. *Dent Clin North Am*. 2014 Apr;58(2):341-9. DOI: 10.1016/j.cden.2013.12.005
15. Martins AFL, Nogueira TE, Morais MO, Oton-Leite AF, Valadares MC, Batista AC, Freitas NMA, Leles CR, Mendonça EF. Effect of photobiomodulation on the severity of oral mucositis and molecular changes in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy: a study protocol for a cost-effectiveness randomized clinical trial. *Trials*. 2019 Feb 1;20(1):97. DOI: 10.1186/s13063-019-3196-8.
16. Oberoi S, Zamperlini-Netto G, Beyene J, Treister NS, Sung L . Effect of prophylactic low level laser therapy on oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 2014;9(9), p.e107418.
17. Oton-Leite AF, Silva GB, Morais MO, Silva TA, Leles CR, Valadares MC, Pinezi JC, Batista AC, Mendonça EF. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers Surg Med*. 2015 Apr;47(4):296-305. DOI: 10.1002/lsm.22349. Epub 2015 Mar 30.
18. Patel AA, Zhang Ym Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, Bigley V, Flavell RA, Gilroy DW, Asquith B, Macallan D, Yona S. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med*. 2017 Jun;214(7):1913–1923. DOI: 10.1084/jem.20170355
19. Ramos L, Marcos RL, Torres-Silva R, Pallota RC, Magacho T, Mafra FFP, Macedo MM, Carvalho RLP, Bjordal JM, Lopes-Martins RAB. Characterization of Skeletal Muscle Strain Lesion Induced by Stretching in Rats: Effects of Laser Photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 2018 Sep;36(9):460-467. DOI: 10.1089/pho.2018.4473.
20. Soares RG, Farias LC, da Silva Menezes AS, de Oliveira E Silva CS, Tabosa ATL, Chagas PVF, Santiago L, Santos SHS, de Paula AMB, Guimarães ALS. Treatment of mucositis with combined 660- and 808-nm-wavelength low-level laser therapy reduced mucositis grade, pain, and use of analgesics: a parallel, single-blind, two-arm controlled study. *Lasers Med Sci*. 2018 Nov;33(8):1813-1819. DOI: 10.1007/s10103-018-2549-y.
21. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(4):277–284

22. Sonis ST1, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer*. 2004 May 1;100(9 Suppl):1995-2025.
23. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg*. 2009 Feb;27(1):37-42.
24. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1886-94.
25. Thaler B, Hohensinner PJ, Krychtiuk KA, Matzneller P, Koller L, Brekalo M, Maurer G, Huber K, Zeitlinger M, Jilma B, Wojta J, Speidl WS. Differential in vivo activation of monocyte subsets during lowgrade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Sci Rep*. 2016 Jul;22(6):30162. DOI: 10.1038/srep30162
26. Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2017 May;170:197-207. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014.
27. Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, Kourilsky P, Wong S-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16–e31. DOI: 10.1182/blood-2010-12-326355
28. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Bensadoun RJ, Gueiros LA, Majorana A, Nair RG, Ranna V, Tissing WJE, Vaddi A, Lubart R, Migliorati CA, Lalla RV, Cheng KKF, Elad S; 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 Oct;27(10):3969-3983. DOI: 10.1007/s00520-019-04890-2.
29. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584-92.
30. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zambala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct;116(16):74-80.

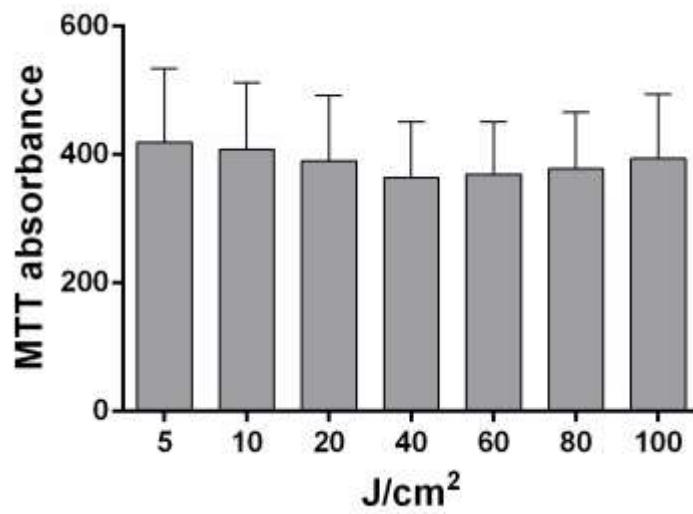
Figures

Figure 1 – Viability of PBMCs assessed by the MTT method after 9 hours of exposition to different PBMT energy densities. Results are expressed as MTT absorbance. Data from 5 donors are shown. Experiments were performed in triplicate. Error bars indicate standard error of the mean (SEM).

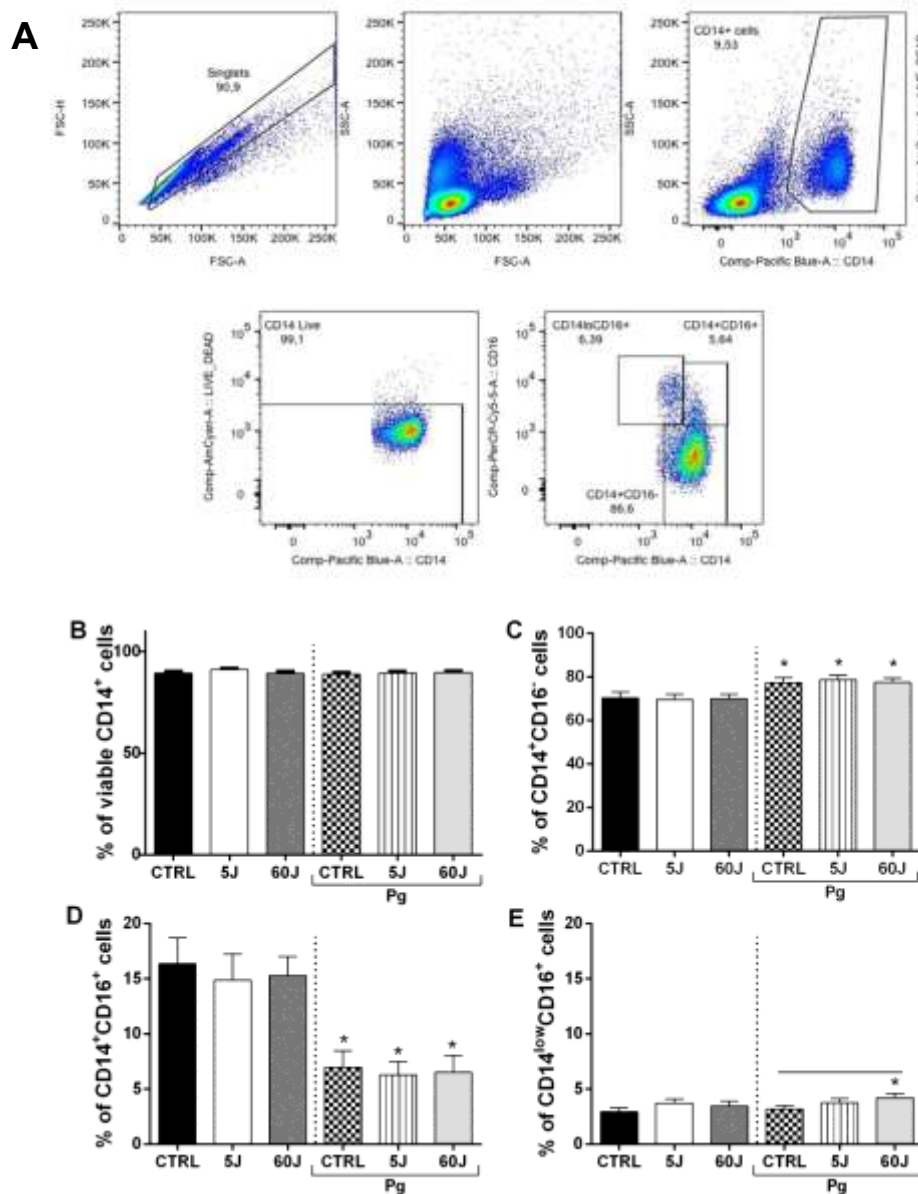


Figure 2 - Representative dot plot graphs showing the selection of phenotypically identified monocyte subpopulations (A). The effect of PBMT and *P. gingivalis* (Pg) stimulation on the viability of CD14⁺ monocytes (B), and frequencies of classical monocytes (CD14⁺CD16⁻) (C), intermediate monocytes (CD14⁺CD16⁺) (D), and non-classical monocytes (CD14^{low}CD16⁺) (E). PBMC were exposed to PBMT at energy densities of 5J/cm² (5J) or 60J/cm² (60J) and stimulated or not with Pg. Total incubation time 9 hours. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control group (CTRL) without Pg stimulation (ANOVA one-way with repeated measurements) and connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (t test).

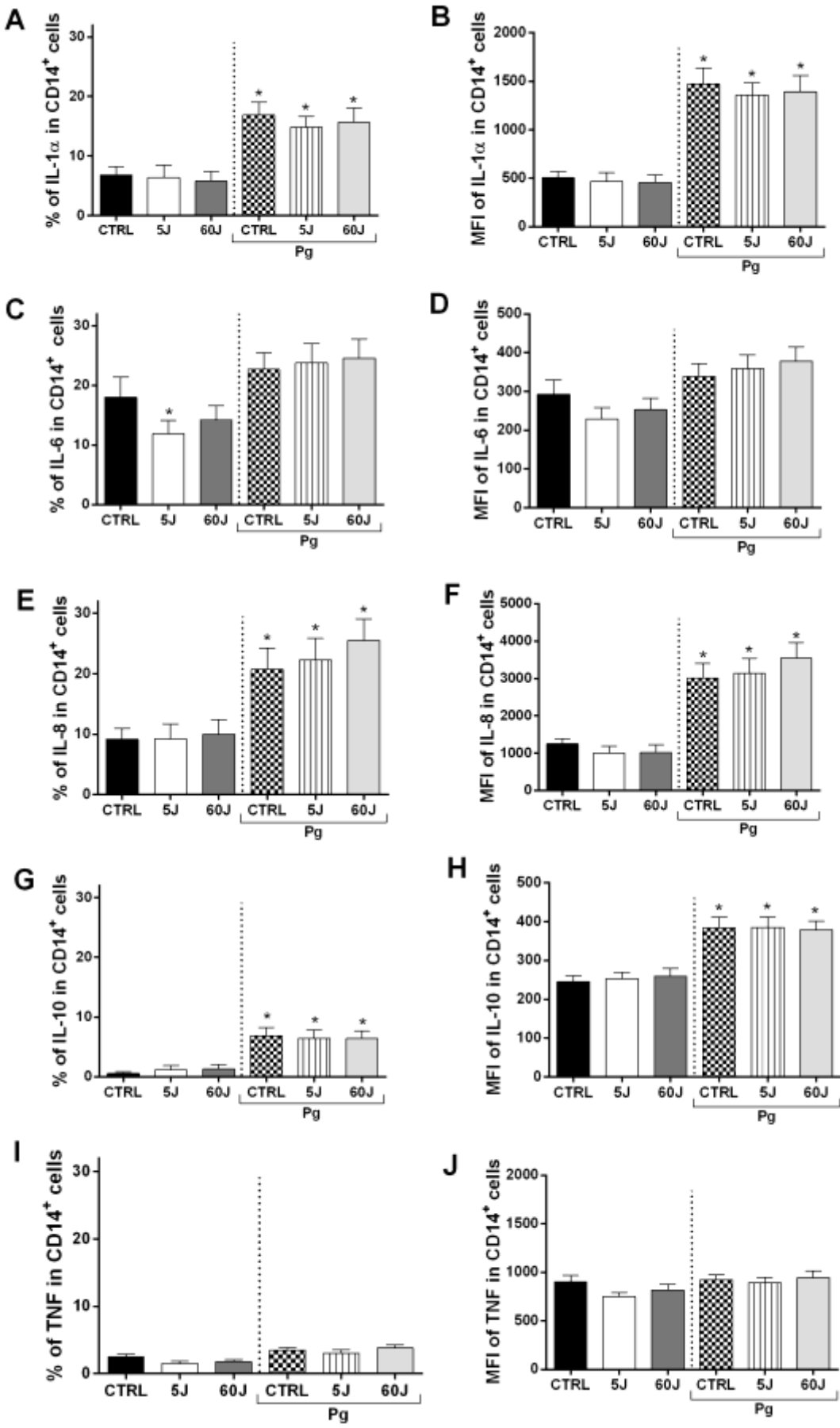


Figure 3 - The effect of PBMT and *P. gingivalis* (Pg) stimulation on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD14⁺ monocytes. PBMC were exposed to PBMT at energy densities of 5J/cm² (5J) or 60J/cm² (60J) and stimulated or not with Pg. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control group (CTRL) without Pg stimulation (Friedman or ANOVA one-way with repeated measurements) and connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (Wilcoxon or t test).

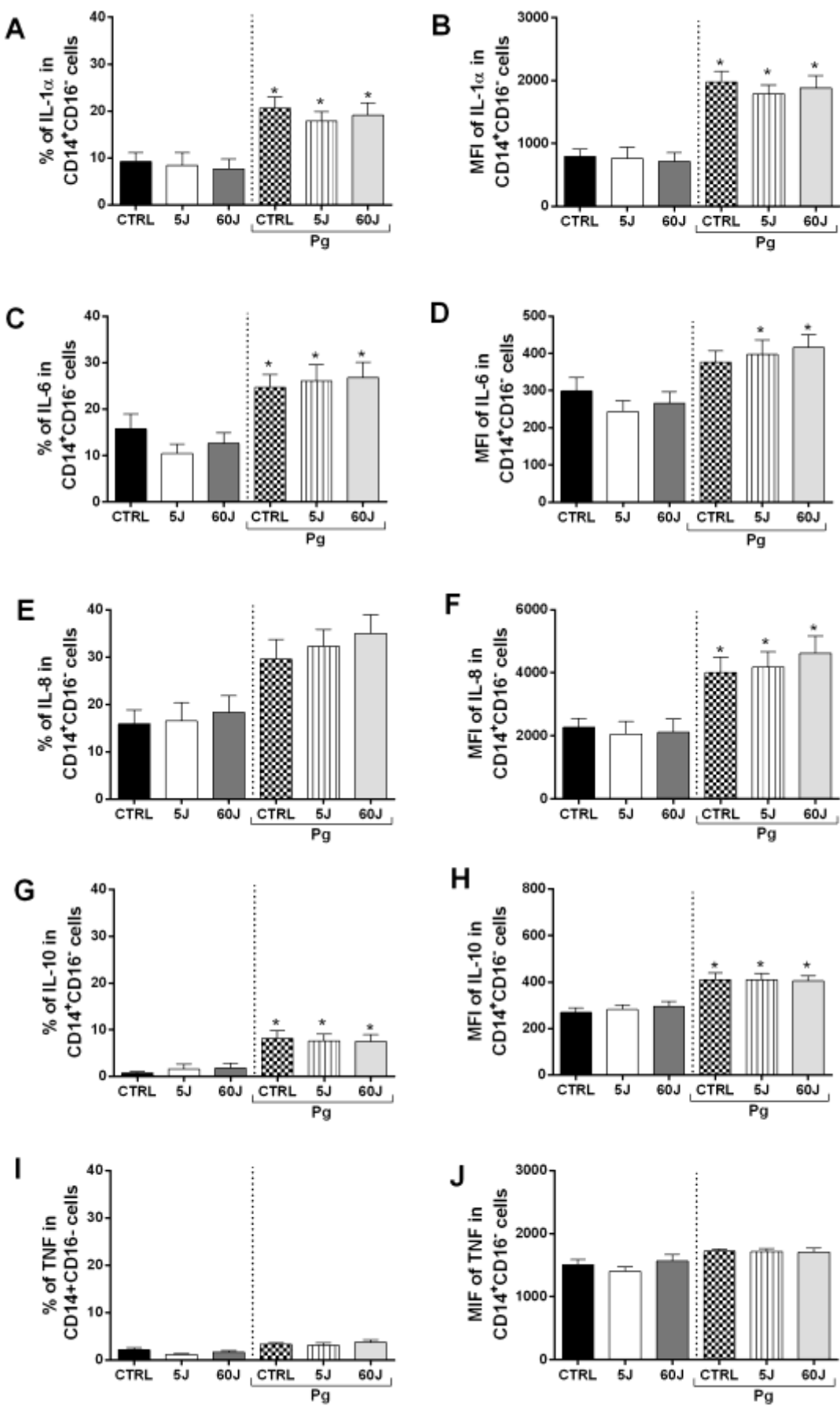


Figure 4 - The effect of PBMT and *P. gingivalis* (Pg) stimulation on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in the classical monocyte subpopulation (CD14⁺CD16⁻). PBMC were exposed to PBMT at energy densities of 5J/cm² (5J) or 60J/cm² (60J) and stimulated or not with Pg. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control group (CTRL) without Pg stimulation (Friedman or ANOVA one-way with repeated measurements) and connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (Wilcoxon or t test).

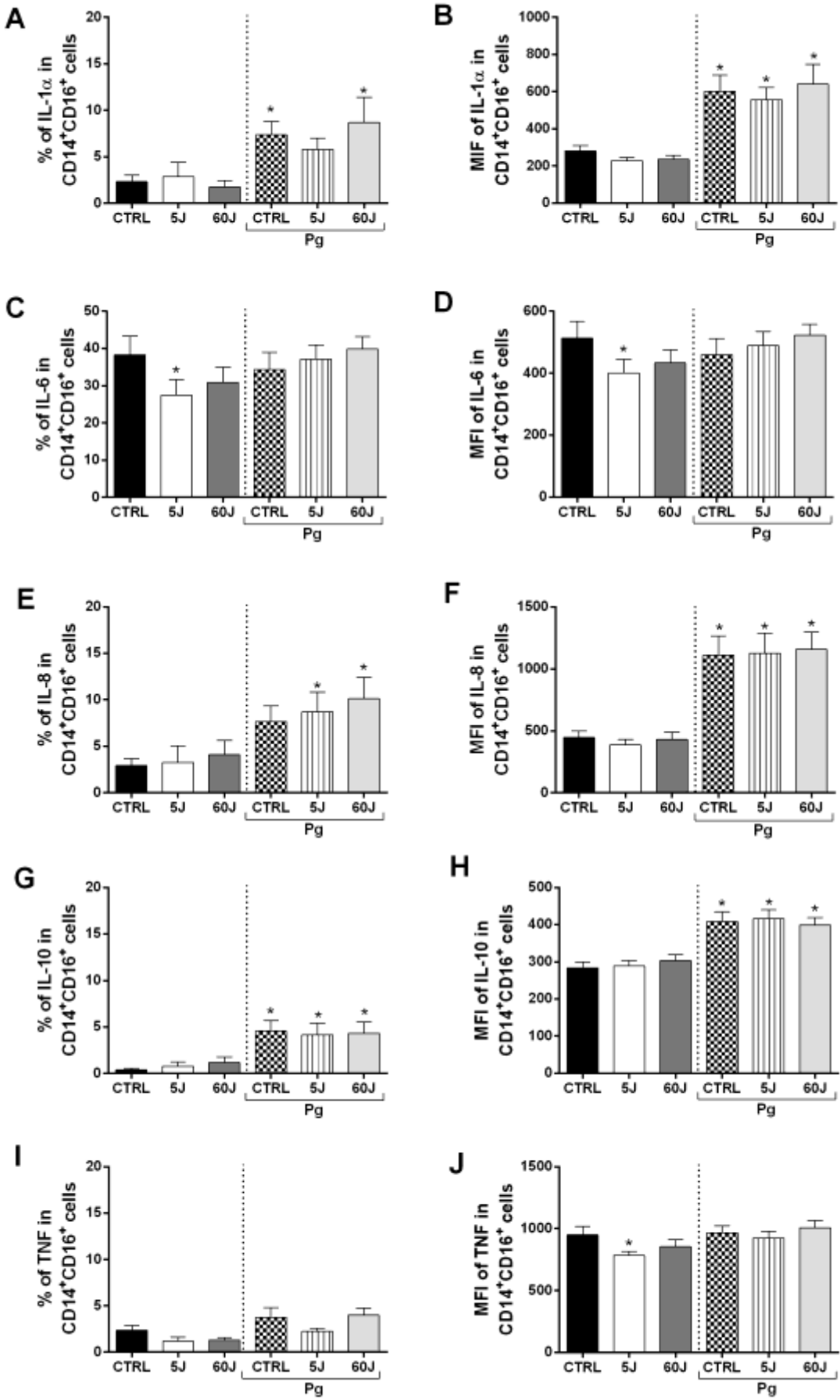


Figure 5 - The effect of PBMT and *P. gingivalis* (Pg) stimulation on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in the intermediate monocyte subpopulation (CD14⁺CD16⁺). PBMC were exposed to PBMT at energy densities of 5J/cm² (5J) or 60J/cm² (60J) and stimulated or not with Pg. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control group (CTRL) without Pg stimulation (Friedman or ANOVA one-way with repeated measurements) and connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (Wilcoxon or t test).

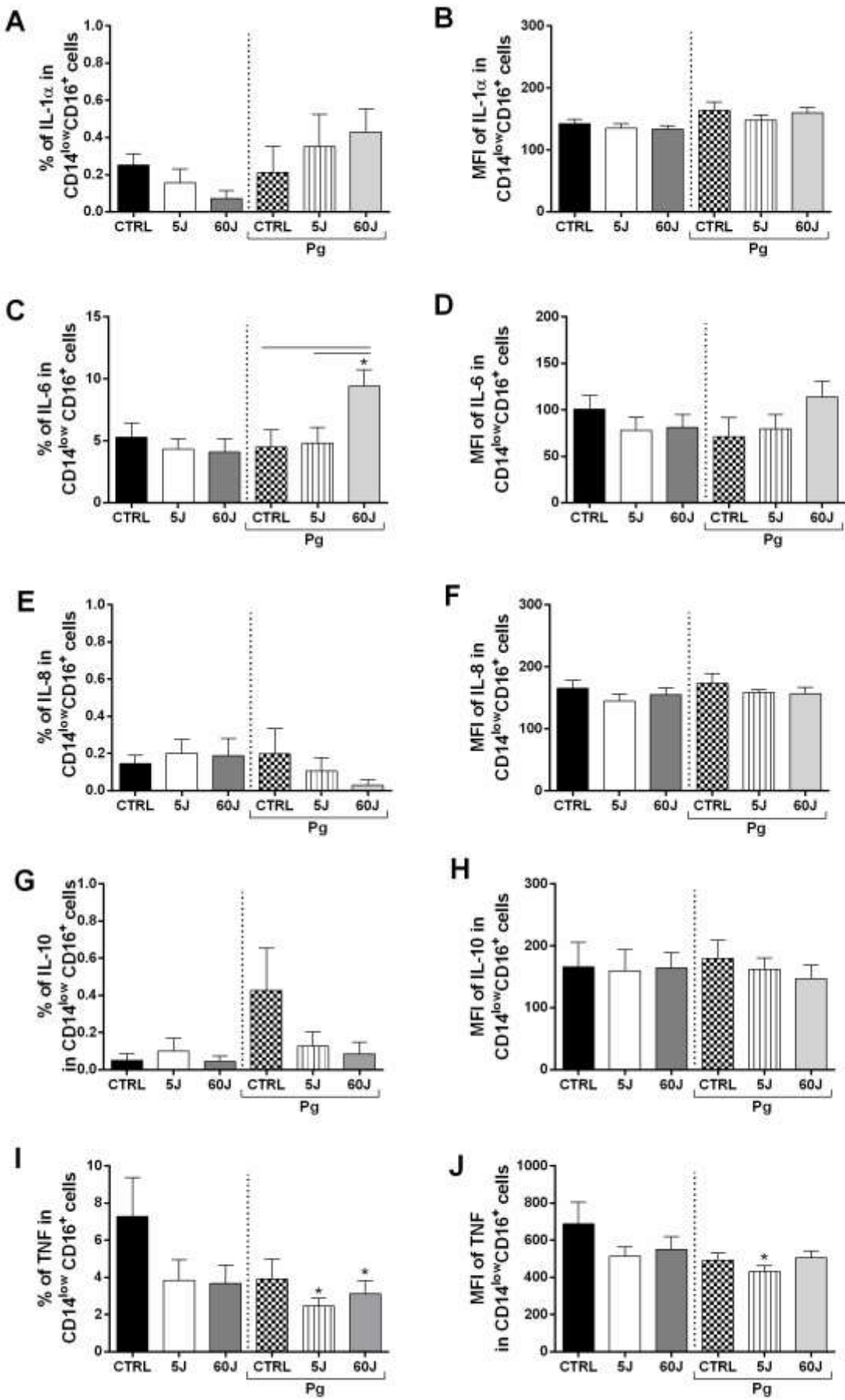


Figure 6 - The effect of PBMT and *P. gingivalis* (Pg) stimulation on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in the non-classical monocyte subpopulation (CD14^{low}CD16⁺). PBMC were exposed to PBMT at energy densities of 5J/cm² (5J) or 60J/cm² (60J) and stimulated or not with Pg. Error bars indicate standard error of the mean (SEM). Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the control group (CTRL) without Pg stimulation (Friedman or ANOVA one-way with repeated measurements) and connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the experimental groups (Wilcoxon or t test).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do trabalho mostram que a luz infravermelha (808 nm) do laser de diodo apresenta menor capacidade de afetar a expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias por monócitos humanos estimulados com *P. gingivalis*, quando comparada a luz de comprimento de onda de 660 nm. Entretanto, em baixa densidade de energia (5 J/cm²), a luz infravermelha foi capaz de reduzir a expressão de IL-6 e TNF, duas importantes citocinas pró-inflamatórias, nos monócitos *ex vivo*, ou seja, não estimulados por produtos bacterianos. Com base nesses dados, é possível sugerir que o laser infravermelho tenha melhor atuação na inibição da inflamação mediada por monócitos/macrófagos antes do surgimento das lesões ulceradas da mucosite. O efeito do laser infravermelho na inibição da dor em pacientes com lesões de mucosite ulceradas pode ser devido à sua atuação em outros tipos celulares ou na inibição de outras vias moleculares de controle do processo inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI, K.M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, v.27, n.1, p. 237-249, Jan. 2012
- AL MUSAWI, M.S. *et al.* Effects of low-level laser irradiation on human blood lymphocytes in vitro. **Lasers in Medical Science**, v.32, n.2, p. 405-411, Feb. 2017.
- ALVES, A.C. *et al.* Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v.15, n.5, p. R116, 2013.
- AMADORI, F. *et al.* Low-level laser therapy for treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in childhood: a randomized double-blind controlled study. **Lasers in Medical Science**, v.31, n.6, p. 1231-1236, Aug. 2016.
- ANTONELLI, L.R.V. *et al.* The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute Plasmodium vivax malaria. **Plos Pathogens**, v.10, p. e1004393, 2014.
- BASSO, F.G. *et al.* Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level laser therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.91, n.4, p. 952-956, July/Aug. 2015.
- 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. **Supportive Care in Cancer**, v.19, n.8, p. 1069-1077, Aug. 2011.
- BRUGNERA JÚNIOR, A.P.; VIEIRA, A.L.B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.
- CAVALCANTI, T.M. *et al.* Knowledge of the physical properties and interaction of laser with biological tissue in dentistry. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n.5, p. 955-960, Sept./Oct. 2011.
- CURRA, M. *et al.* Photobiomodulation reduces oral mucositis by modulating NF- κ B. **Journal of Biomedical Optics**, v.20, n.12, p. 125008, 2015.
- DASTANPOUR, S.; BEITOLLAHI, J.M.; SABER, K. The effect of low-level laser therapy on human leukemic cells. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v.6, n.2, p. 74-79, 2015.
- DE CASTRO *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.
- DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M.R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v.22, n.3, May/June, 2016.

FUKUDA, T.Y. *et al.* Single session to infrared low level diode laser on TNF-alpha and IL-6 cytokines release by mononuclear spleen cells in mice: a pilot study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.42, n.6, p. 584-588, Aug. 2010.

GARCEZ, A.S.; RIBEIRO, M.S.; NÚÑEZ, S.C. **Laser de baixa potência** – Princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012. 259 p.

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.

HAMBLIN, M.R.; DEMINOVA-RICE, T.N. Cellular chromophores and signaling in low level light therapy. **Proceedings of the SPIE**, v.6428, p. 642802-14, 2007.

HAMBLIN, M. R.; NELSON, S.T.; STRAHAN, J.R. Photobiomodulation and cancer: what is the truth? **Photomedicine and Laser Surgery**, v.36, n.5, p. 241-245, May 2018.

HAMBLIN, M.R.; SOUZA, M.V.P.; AGRAWAL, T. **Handbook of low level laser therapy**. New York: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd, UK, 2017.

HAMOUDA, N. *et al.* Apoptosis, dysbiosis and expression of inflammatory cytokines are sequential events in the development of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.121, n.3, p. 159-168, Sept. 2017.

HAUBNER, F. *et al.* Wound healing after radiation therapy: review of the literature. **Radiation Oncology**, v.7, p. 162, 2012.

HAVERMAN, T.M. *et al.* Candida and Porphyromonas gingivalis: the effect on wound closure in vitro. **Journal of Oral Microbiology**, v.14, n.9, p. 1328266, June 2017.

HAWKINS, D., ABRAHAMSE, H. Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, n.3, p.159-169, 2007.

HOURELD, N.N.; SEKHEJANE, P.R.; ABRAHAMSE, H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.42, n.6, p. 494-502, Aug. 2010.

HUANG, Y.Y.; CHEN, A.C.; CARROLL, J.D. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v.7, n.4, p. 358-383, 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, 2011.

JADAUD, E.; BENSADOUN, R. Low-level laser therapy: a standard of supportive care for cancer therapy-induced oral mucositis in head and neck cancer patients? **Laser Therapy**, v.21, n.4, p. 297-303, 2012.

JOBSIS, J.J. Noninvasive, Infrared Monitoring of Cerebral and Myocardial Oxygen Sufficiency and Circulatory Parameters. **Science**, v.198, n.4323, p. 1264-1267, 1977.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v.QE-23, n.10, p. 1703-1719, Oct. 1987.

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

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v.49, n.1, p. 1-17, 1999.

KIM, W.S., CALDERHEAD, R.G. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? **Laser Therapy**, v.20, n.3, p. 205-215, 2011.

KREISLER, M. *et al.* Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, p. 353-358, 2003.

LAHEIJ, A.M. *et al.* Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Supportive Care in Cancer**, v.20, p. 3231-3240, 2012.

LAHEIJ, A.M.; DE SOET, J.J. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v.8, n.2, p. 180-187, June 2014.

LALLA, R.V.; SONIS, S.T.; PETERSON, D.E. Management of oral mucositis in patients who have cancer. **Dental Clinics of North America**, v.52, n.1, p. 61-77, Jan. 2008.

LOPATINA, E.V. *et al.* Modulation of signal transducing function of neuronal membrane Na⁺,K⁺-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. **Medicinal Chemistry**, v.8, n.1, p. 33-39, Dec. 2012.

MIGLIORATI, C. *et al.* Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v.21, n.1, p. 333-41, Jan. 2013.

MORAES, J.J.C. *et al.* The effect of low level laser therapy in different wavelengths in the treatment of oral mucositis-proposal for extra-oral implementation. **Laser Physics**, v.19, n.9, p. 1912-1919, 2009.

MORIYAMA, L.T. **Ablação de resinas compostas com laser de Er: YAG sob diferentes fluxos de água**. 2006. 85f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

OBEROI, S. *et al.* Effect of prophylactic low level laser therapy on oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v.9, n.9, p. e107418, 2014.

OTON-LEITE, A.F. *et al.* Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.47, n.4, p. 296-305, Apr. 2015.

PATEL, A.A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v.214, n.7, p. 1913-1923, June 2017.

SOARES, R.G. *et al.* Treatment of mucositis with combined 660- and 808-nm-wavelength low-level laser therapy reduced mucositis grade, pain, and use of analgesics: a parallel, single-blind, two-arm controlled study. **Lasers in Medical Sciences**, v.33, n.8, p. 1813-1819, Nov. 2018.

SONIS, S.T. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: an Official Publication of the American Association of Oral Biologists**, v.13, n.5, p. 380-389, 2002.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.4, p. 277-284, 2004.

SONIS, S.T. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v.100, Suppl.9, p. 1995-2025, 2004.

SOUSA L.R.; CAVALCANTI, B.N.; MARQUES, M.M. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.27, n.1, p. 37-42, Feb. 2009.

SUAN, L.P. *et al.* Light-based therapy on wound healing: a review. **Laser Physics**, v.24, p. 083001, 2014.

THALER, B. *et al.* Differential in vivo activation of monocyte subsets during lowgrade inflammation through experimental endotoxemia in humans. **Scientific Reports**, v.22, n.6, p. 30162, July 2016.

USUMEZ, A. *et al.* Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. **Lasers in Medical Sciences**, v.29, n.6, p. 1807-1813, Nov. 2014.

WAGNER, V.P. *et al.* Photobiomodulation regulates cytokine release and new blood vessel formation during oral wound healing in rats. **Lasers in Medical Sciences**, published online: 11 february 2016. DOI: 10.1007/s10103-016-1904-0.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, p. 427, July 2008.

WONG, K.L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v.118, n.5, p. e16-e3, 2011.

YOSHIYASU, R.Y.A. **Um estudo in vitro sobre os efeitos da irradiação pelo laser de Er: YAG combinado com a terapia com flúor na resistência ácida do esmalte de dentes submetidos a aparelho ortodôntico fixo.** 2001. 83f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ZADIK, Y. *et al.* 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**, v.27, n.10, p. 3969-3983, Oct. 2019.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v.116, n.16, p. e74-e80, Oct. 2010.

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.propg@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.propg@pucminas.br