

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA

**EFEITO DO LASER DE As-Ga-Al EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE
ONDA SOBRE A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E A VIABILIDADE
CELULAR DE MACRÓFAGOS EM CULTURA**

Recife, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA

**EFEITO DO LASER DE As-Ga-Al EM DIFERENTES COMPRIMENTOS
DE ONDA SOBRE A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E A
VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS EM CULTURA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Orientador: Prof. Jair Carneiro Leão, PhD

Co-orientadora: Profa. Dra. Wylla Tatiana F. Silva

Recife, 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e	Silva, Igor Henrique Moraes. Efeito do laser de As-Ga-Al em diferentes comprimentos de onda sobre a liberação de óxido nítrico e a viabilidade celular de macrófagos em cultura / Igor Henrique Moraes Silva. – Recife: O Autor, 2014. 84 f.: il.; gráf.; 30 cm. Orientador: Jair Carneiro Leão. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2014. Inclui referências e anexos. 1. Terapia a laser. 2. Óxido nítrico. 3. MTT. 4. Macrófagos. 5. Inflamação. I. Leão, Jair Carneiro (Orientador). II. Título. 617.6 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2015-033)
-------	---

ATA DA VIGÉSSIMAPRIMEIRA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Às 09(nove) horas do dia 15(quinze) do mês de julho do ano de 2014(dois mil e quatorze), reuniram-se em caráter de Solenidade Pública, a Comissão Examinadora para avaliar o trabalho do Doutorando **IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA**, candidato ao grau de Doutor em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada, os membros da banca Examinadora, composta pelos professores: Profa.Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, da Universidade Federal de Pernambuco, atuando como Presidente, Profa. Dra. EDILEINE DELLALIBERA, da Universidade de Pernambuco como primeiro examinador, Prof. Dr. RAUL MANHÃES DE CASTRO, da Universidade Federal de Pernambuco, como segundo examinador, Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS, da Universidade Federal de Pernambuco, como terceiro examinador, Profa. Dra. RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA, da Universidade Federal de Pernambuco, como quarto examinador. A sessão foi aberta pela Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, fez as apresentações e compôs a Banca Examinadora, agradeceu a presença de todos. Iniciando convidou o Doutorando **IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA**, sob a orientação do Prof. Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO, e Co-orientado pela Profa. Dra. WYLLA TATIANA FERREIRA SILVA, sendo comunicado que conforme consta das normas o candidato teria trinta minutos para exposição. O doutorando iniciou a apresentação do seu trabalho intitulado: **“EFEITO DO LASER As-Ga-AI EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA SOBRE A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E A VIABILIDADE CELULAR DE MACROFAGOS EM CULTURA”**. Concluída a apresentação, a Banca Examinadora compôs a mesa e foi dado início a arguição. Ao término das arguições os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram ao candidato os seguintes conceitos: Profa. Dra. EDILEINE DELLALIBERA, **(APROVADO)** Prof. Dr. RAUL MANHÃES DE CASTRO, **(APROVADO)** Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS, **(APROVADO)**, Profa. Dra. RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA, **(APROVADO)** Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, **(APROVADO)**, o candidato recebeu por unanimidade o conceito **(APROVADO)** é considerado, **(APROVADO)**, devendo o mesmo acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica o candidato, apto a receber o Grau de Doutor em Odontologia desde de que tenha cumprido as exigências estabelecidas de acordo com o Regimento Interno do curso, cabendo a Universidade Federal de Pernambuco através de sua Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, a presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Oziclere Sena de Araujo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo recém formado Doutor pela UFPE. **IGOR HENRIQUE MORAIS SILVA**.

Recife, 15 de julho de 2014.

Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO
(Presidente)

Profa. Dra. EDILEINE DELLALIBERA
(1º Examinador)

Doutorando:

Prof. Dr. RAUL MANHÃES DE CASTRO
(2º Examinador)

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS
(3º Examinador)

Profa. Dra. RENATA CIMOES JOVINO SILVEIRA
(4º Examinador)

*Dedico este trabalho aos meus pais, **José Bartolomeu da Silva e Luzineth Moraes Silva**, minha origem, minha vida, meus amores, meu tesouro.*

*A minha esposa, **Giselle Barbosa de Lira**, companheira de todos os momentos, minha amiga, minha conselheira, minha razão, meu amor, minha base.*

*A minha avó, **Letícia Siqueira Varejão** (in memoriam), minha maior e eterna saudade.*

Agradecimentos

A Deus por sempre me guiar para o caminho do bem.

Ao meu orientador, professor Jair Carneiro Leão, pelo acolhimento, amizade, carinho, conselhos, confiança além das mais importantes oportunidades de minha carreira profissional e acadêmica.

A professora Wylla Tatiana F. Silva pela atenção e grande contribuição neste trabalho.

Ao Professor Raul Manhães de Castro por, mais uma vez, disponibilizar a estrutura e estar sempre disponível como amigo e conselheiro.

A professora Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade.

Ao professor Luiz Alcino Gueiros pela amizade e parceria.

As colegas de Pós-Graduação, minhas amigas, Andreza Barkokebas, Déborah Daniela e Samantha Andrade pelo companheirismo.

A Sueli Senna pela disponibilidade e atenção.

Aos colegas de trabalho da policlínica Lessa de Andrade e UNINASSAU, acima de tudo, pela compreensão.

A todos os que fazem o grupo de Estomatologia da Universidade Federal de Pernambuco, em especial a dona Rita pelo carinho.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

“ ... Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Chaplin

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da laserterapia em diferentes parâmetros e comprimentos de onda, 660 e 808 nm, sobre a liberação de óxido nítrico (NO) e a viabilidade celular em células da linhagem RAW 264.7. **Metodologia:** A irradiação foi feita com o laser de As-Ga-Al, modo contínuo, comprimentos de onda 660 e 808 nm em diferentes densidades de energia (J/cm^2) e potência (W/cm^2). Para cada comprimento de onda foram utilizadas potências de 30, 50 e 100 mW com tempos de exposição de 10, 30 e 60 segundos. A liberação de NO foi mensurada utilizando-se a reação de Griess e a viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólio (MTT) à formazan. **Resultados:** Laserterapia promoveu alterações na liberação de NO e MTT apenas com o laser de 660 nm ($p < 0,05$) sendo o tempo de exposição e potência, respectivamente, mais influentes nos valores de cada um. Além disso, laserterapia promoveu aumento na liberação de NO ($p = 0,04$) sem alteração no valor de MTT ($p > 0,05$) quando se utilizou a densidade de energia $64 \text{ J}/\text{cm}^2$. **Conclusão:** Variações no tempo de exposição e potência são, respectivamente, mais influentes na liberação de NO e viabilidade celular apenas utilizando o laser de 660nm, bem como laserterapia promove aumento na liberação de óxido nítrico utilizando $64 \text{ J}/\text{cm}^2$ sem alteração da viabilidade celular no mesmo comprimento de onda quando variados os tempos de exposição e fixadas as potências.

Palavras chave: Terapia a Laser. Óxido Nítrico. MTT. Macrófagos. Inflamação.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of lasertherapy with different parameters and wavelengths on Nitric Oxide (NO) release and cell viability in the RAW 264.7 cell line. **Methodology:** Irradiation was performed with As-Ga-Al laser, continuous mode and wavelengths of 660 and 808 nm at different energy densities (J/cm^2) and power (W/cm^2). For each wavelength, power settings of 30, 50 and 100 mW with times of 10, 30 and 60 seconds were used. NO release was measured using Griess reaction and cell viability was evaluated by mitochondrial reduction of bromide 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to formazan. **Results:** The results showed that lasertherapy promoted changes in NO release and MTT, only at the wavelength of 660 nm, with the factors time and power, respectively, having the most influence on the value of each factor. In addition, lasertherapy promoted an increase in NO release without alteration in cell viability when the energy density of $64 \text{ J}/\text{cm}^2$ was used. **Conclusion:** Variations in exposure time and power were, respectively, more influential in the release of NO and cell viability only with the 660 nm laser and lasertherapy cause a increasing in the nitric oxide release without alteration in cell viability using $64 \text{ J}/\text{cm}^2$ the same wavelength.

Key words: Lasertherapy. Nitric Oxide. MTT. Macrophages. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

LBI – laserterapia de baixa intensidade

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

MTT - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difenil tetrazólio

T - tempo

S - segundos

P - potência

J- joule

W - watts

DP – densidade de potência

DE – densidade de energia

λ - comprimento de onda

PGE - prostaglandina

COX - cicloxygenase

IL - interleucina

MCP – proteína quimiotática para monócito

TNF – fator de necrose tumoral

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF – fator de crescimento transformador

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

DEMEM - meio Dulbecco modificado de Eagle

SFB – soro fetal bovino

CO₂ – dióxido de carbono

nm - nanômetro

cm² – centímetro quadrado

cm³ – centímetro cúbico

ml - mililitros

LPS - lipopolissacarídeo

μL - microlitro

μM - micromolar

h - hora

mg - miligrama

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadros 1A e 1B: Valores de potência, tempo de exposição, densidade de energia e densidade de potência utilizados nos diferentes grupos de estudo. A – Irradiação realizada com potência fixa e variação nos tempos de exposição; B – Irradiação realizada com os tempos de exposição fixos e variação das potências.

Figura 1: Confeção do anteparo com alginato em placa de cultura com 96 poços (A) e irradiação com laser de As-Ga-Al em diferentes comprimentos de onda (B) em contato com a parede inferior do poço (C).

Gráfico 1: Valores de NO em relação as diferentes densidades de energia utilizando os lasers de 660 e 808 nm.

Gráficos 2A e 2B: Valores de NO quando utilizados os lasers 660 e 808 nm em diferentes tempos de exposição fixadas as potências em 30 mW, 50 mW e 100 mW. A – laser de 660 nm; B – laser de 808 nm.

Gráfico 3: Valores de MTT em relação as diferentes densidades de potência, fixados os tempos de exposição em 10, 30 e 60 s, utilizando os lasers de 660 e 808 nm.

Gráficos 4A e 4B: Valores de MTT quando utilizados os lasers 660 e 808 nm em diferentes tempos de exposição fixadas as potências em 30 mW, 50 mW e 100 mW. A – laser de 660 nm; B – laser de 808 nm.

SUMÁRIO

1 Introdução	14
2 Metodologia	18
2.1 Cultura de células e desenho experimental	18
2.2 Irradiação com laser	20
2.3 Liberação de óxido nítrico	21
2.4 Viabilidade celular	22
2.5 Análise estatística	23
3 Resultados	24
3.2 Valores de NO	24
3.3 Valores de MTT	29
4 Discussão	34
5 Conclusão	43
Referências	44
Anexo I (author guidelines)	50
Anexo II (artigo para submissão)	65

1 Introdução

Entende-se por laserterapia de baixa intensidade (LBI) a utilização de baixas irradiâncias de luz capazes de influenciar o comportamento celular através da fotobiomodulação, estimulando ou inibindo o comportamento celular (MORIYAMA et al., 2009). Lasers terapêuticos apresentam potências entre 1 e 500 mW que não provocam efeitos térmicos e lesão celular, influenciando o comportamento das células através de efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos (KARU 1987; BAXTER, 1997).

Dentro do arsenal terapêutico médico-odontológico LBI apresenta efetividade no tratamento de diferentes enfermidades em decorrência do efeito anti-inflamatório, analgésico e bioestimulador (PINHEIRO et al., 2010). O efeito bioestimulador da LBI acelera o processo de cicatrização, pois promove o aumento da síntese de fibras colágenas e proliferação de fibroblastos (ALMEIDA LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002; FROZANFAR et al., 2013) através do estímulo a secreção de fatores de crescimento para estas células (RIBEIRO et al., 2004; ROCHA et al., 2006). Laserterapia possibilita uma cicatrização mais rápida e indolor através da liberação de β -endorfinas (HAGIWARA et al., 2008), redução de prostaglandinas (PGE-2) (MIZUTANI et al., 2004), redução da expressão da cicloxigenase 2 (COX-2) (SAKURAI et al., 2000) e do edema pela ação na microcirculação e ativação do sistema linfático (MENEGUZZO et al., 2013).

No reparo do tecido ósseo laserterapia possui efeito bioestimulador sobre a proliferação de osteoclastos (DÖTTBUDAK et al., 2000), estimula a produção de matriz e maturação do tecido ósseo por promover o aumento da

fosfatase alcalina, proteínas totais e dos níveis de cálcio em tecidos irradiados (GUZZARDELLA et al., 2002; UEDA, 2003) além de induzir angiogênese, possibilitando a formação de um osso mais vascularizado, de melhor qualidade e menos propenso a infecções (KHADRA et al., 2004). O efeito anti-inflamatório da LBI é promovido pela redução da fase aguda da resposta inflamatória (SAFAVI et al., 2008; PIRES et al., 2011) pela inibição da diferenciação de leucócitos, exudação celular e plasmática graças a diminuição na síntese e secreção de substâncias como IL-6, MCP-1, IL -10, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e óxido nítrico (NO) (ALBERTINI et al., 2008; BOSCHI et al., 2008; LIMA et al., 2011). Na diminuição de NO, a LBI altera o funcionamento da enzima NO sintase (NOS) (LIMA et al., 2013) além de estimular a produção de outros fatores envolvidos no processo de cura como o PDGF e o TGF- β (SAFAVI et al., 2008).

O NO é um gás solúvel permeável à membrana que desempenha diferentes funções biológicas em numerosos processos fisiológicos incluindo vasodilatação, neurotransmissão e inflamação (NATHAN, 1992; LOWENSTEIN, 2004). A produção de NO está associada à atividade de uma enzima denominada de NO sintase que pode ser encontrada sob 3 isoformas: NOS induzida (iNOS), NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (ALDERTON et al., 2001). Na inflamação o NO é um modulador inflamatório produzido a partir do aminoácido L-arginina pela atividade da enzima iNOS em uma reação equimolar com O₂, NADPH e produção de L-citrulina (SERVETTO et al., 2010). O NO produzido por macrófagos, em decorrência da atividade da enzima iNOS, funciona como uma molécula tumoricida e antimicrobiana *in vivo*

e *in vitro* (NATHAN, 1992; BOGDAN, 2001). Trata-se de uma molécula altamente tóxica para as células infectadas e os agentes patogênicos, pois ingressa nas células e inativa as proteínas que são importantes para a produção de energia, transdução de sinais e síntese dos ácidos nucleicos, provocando a morte celular (LANCASTER, 1992).

São inúmeros os estudos realizados sobre a influência da LBI na inflamação (BOSHI et al., 2008), porém os protocolos de tratamento envolvem enormes variações nos parâmetros utilizados tais como comprimento de onda, densidade de energia, densidade de potência, modo contínuo ou pulsado além do número de tratamentos que tornam difícil avaliar e definir o melhor parâmetro para a resposta desejada (TUNÉR, 2002). Além disso, a diversidade de metodologias bem como a avaliação predominantemente subjetiva de estudos pré-clínicos e semi-quantitativos sobre a utilização da LBI em diferentes trabalhos contribuiu para que muitos resultados não fossem considerados confiáveis (MORIYAMA et al., 2009).

Recentemente, modelos pré-clínicos quantitativos e confiáveis vêm sendo utilizados no estudo e determinação do papel da LBI em diferentes situações (MORIYAMA et al., 2005). Como exemplo destes, realiza-se a ativação de macrófagos *in vitro* por lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactéria gram-negativa, que simula uma resposta inflamatória através da síntese de uma variedade de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e NO (GAVISH et al., 2008). Desta forma, para continuar contribuindo com o estudo da influência da LBI sobre a resposta inflamatória, este trabalho se propôs a avaliar a influência da laserterapia em

diferentes parâmetros e comprimentos de onda, 660 e 808 nm, sobre a liberação de NO e a viabilidade celular de macrófagos em cultura.

2 Metodologia

2.1 Cultura de células e desenho experimental

Tratou-se de um estudo experimental que utilizou uma linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7), adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro-BCRJ, cultivados (5×10^6 células/5 ml) em garrafas de cultura (25 cm²; TPP, Biosystems, Cabral, PR, Brasil) com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à baixa concentração de glicose (Sigma-Aldrich, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), penicilina (100 U/ml) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil), em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil).

Para estudar os efeitos da LBI sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular, foram definidos um grupo controle, constituído de macrófagos não irradiados e ativados com LPS e dezoito grupos experimentais (quadro 1), também constituídos de macrófagos ativados com LPS, porém irradiados com laser de As-Ga-Al em diferentes comprimentos de onda (λ), utilizando diferentes potências (P) e tempos de exposição (T). A irradiação foi realizada ora fixando o tempo de exposição e variando a potência, ora fixando a potência e variando tempo de exposição conforme mostra o quadro 1. Doze poços com macrófagos foram irradiados por tratamento em experimentos independentes para cada grupo (n=12).

Quadro 1: Valores de potência, tempo de exposição, densidade de energia e densidade de potência utilizados nos diferentes grupos de estudo. A – Irradiação realizada com potência fixa e variação nos tempos de exposição; B – Irradiação realizada com os tempos de exposição fixos e variação das potências.

A)

VARIÁVEIS DE EXPOSIÇÃO					GRUPOS DE ESTUDO	VARIÁVEIS DE DESFECHO	
COMPRIMENTO DE ONDA	POTÊNCIA	TEMPO	DENSIDADE DE ENERGIA	DENSIDADE DE POTÊNCIA			
NA	NA	NA	NA	NA	Controle	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	VIABILIDADE CELULAR
660 nm	30 mW	10 s	11 j/cm ²	1,07	660/30/10		
		30 s	32 j/cm ²	1,78	660/30/30		
		60 s	64 j/cm ²	3,58	660/30/60		
	50 mW	10 s	18 j/cm ²	1,07	660/50/10		
		30 s	53 j/cm ²	1,78	660/50/30		
		60 s	107 j/cm ²	3,58	660/50/60		
	100 mW	10 s	36 j/cm ²	1,07	660/100/10		
		30 s	107 j/cm ²	1,78	660/100/30		
		60 s	214 j/cm ²	3,58	660/100/60		
808 nm	30 mW	10 s	11 j/cm ²	1,07	808/30/10		
		30 s	32 j/cm ²	1,78	808/30/30		
		60 s	64 j/cm ²	3,58	808/30/60		
	50 mW	10 s	18 j/cm ²	1,07	808/50/10		
		30 s	53 j/cm ²	1,78	808/50/30		
		60 s	107 j/cm ²	3,58	808/50/60		
	100 mW	10 s	36 j/cm ²	1,07	808/100/10		
		30 s	107 j/cm ²	1,78	808/100/30		
		60 s	214 j/cm ²	3,58	808/100/60		

B)

VARIÁVEIS DE EXPOSIÇÃO					GRUPOS DE ESTUDO	VARIÁVEIS DE DESFECHO	
COMPRIMENTO DE ONDA	POTÊNCIA	TEMPO	DENSIDADE DE ENERGIA	DENSIDADE DE POTÊNCIA			
NA	NA	NA	NA	NA	Controle	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	VIABILIDADE CELULAR
660 nm	10 s	30 mW	11	1,07	660/30/10		
		50 mW	18	1,07	660/30/30		
		100 mW	36	1,07	660/30/60		
	30 s	30 mW	32	1,78	660/50/10		
		50 mW	53	1,78	660/50/30		
		100 mW	107	1,78	660/50/60		
	60 s	30 mW	64	3,58	660/100/10		
		50 mW	107	3,58	660/100/30		
		100 mW	214	3,58	660/100/60		
808 nm	10 s	30 mW	11	1,07	808/30/10		
		50 mW	18	1,07	808/30/30		
		100 mW	36	1,07	808/30/60		
	30 s	30 mW	32	1,78	808/50/10		
		50 mW	53	1,78	808/50/30		
		100 mW	107	1,78	808/50/60		
	60 s	30 mW	64	3,58	808/100/10		
		50 mW	107	3,58	808/100/30		
		100 mW	214	3,58	808/100/60		

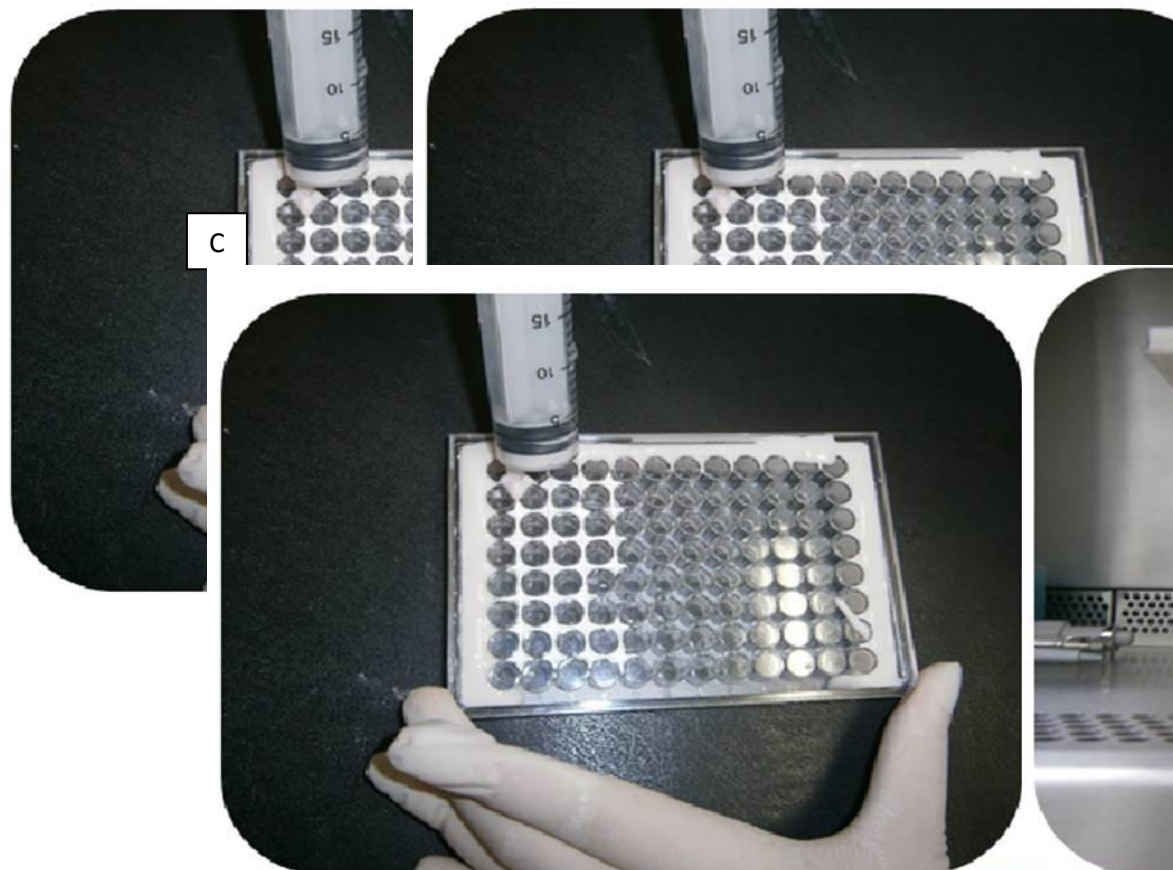
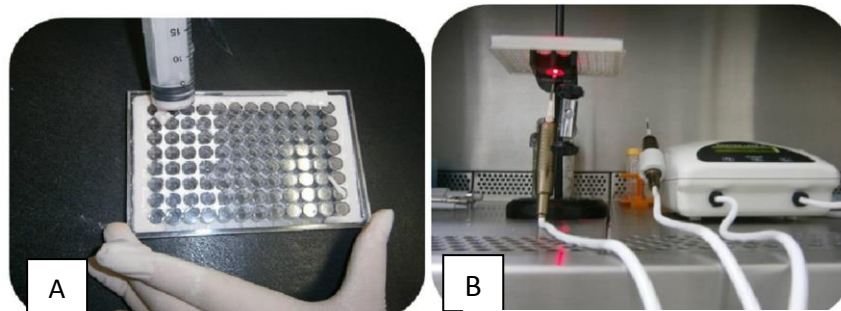
NA: não se aplica

Diâmetro do feixe fornecido pelo fabricante: 0,028cm²

2.2 Irradiação com laser

Previamente a irradiação, com o objetivo de impedir a passagem da luz para os poços vizinhos, um anteparo de alginato (Jeltrate®, Dentsply) foi confeccionado para cada placa a ser irradiada (figura 1). A manipulação do alginato foi feita seguindo as especificações do fabricante e toda preparação do anteparo foi realizada previamente à colocação das células nos poços pela parte inferior das placas. Nenhuma evidência de contaminação foi observada durante a realização do experimento.

Figura 1: Confeção do anteparo com alginato em placa de cultura com 96 poços (A) e irradiação com laser de As-Ga-Al em diferentes comprimentos de onda (B) em contato com a parede inferior do poço (C).



Uma
irradiação, m
placas de cu
(5×10^5 /100 μ l/
ativados atr

Escherichia coli O55:B5 (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) preparado em PBS (Phosphate Buffered Saline; Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Após a irradiação as células foram incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 h para mensuração da produção de óxido nítrico e da viabilidade celular.

A irradiação foi feita com um laser de As-Ga-Al (Photon Laser III, DMC®), modo contínuo, comprimento de onda 660 e 808 nm em diferentes tempos de exposição, potência, densidade de energia (DE) e densidade de potência (DP) em contato com a parede inferior dos poços conforme mostra a figura 1. A irradiação foi realizada 20 minutos após a colocação do LPS nos poços com avaliação prévia da potência através do aparelho Multifunction Optical Meter (modelo 1835C; Newport Corp., Irvine, CA, USA). Cada placa teve seus poços irradiados de forma única utilizando os parâmetros propostos em apenas um dos comprimentos de onda.

2.3 Liberação de óxido nítrico

A produção de NO foi avaliada pelo método de Griess (Ding et al, 1998), o qual se baseia na mensuração de NO através da determinação de nitrito acumulado durante o período de incubação das células em cultura. O nitrito, um produto estável e não volátil da oxidação do NO, age com reagente de Griess (mistura de sulfanilamida e naftiletilenodiamina, específico para nitrito) dando origem a um composto de cor, que pode ser avaliado contra uma curva padrão de referência por espectrofotometria. Após 24 h de incubação das células, o sobrenadante (50 µl) foi misturado com volume igual do reagente de

Griess (mistura de sulfanilamida a 1% e naftiletileno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%; Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Seguidos 10 min de reação à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada a 550 nm em leitor de microplacas (Spectrophotometer BEL Photonics 1105, Tecnal, SP, Brasil). A concentração de nitrito foi calculada a partir dos dados de uma curva padrão de nitrito de sódio e os resultados de produção de NO foram expressos em nmol de nitrito/ 5×10^5 células. Todas as amostras foram comparadas a um branco correspondente a DMEM incubado por 24 h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células.

2.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólio) (Mossman, 1993), o qual se baseia na mensuração da atividade das células vivas através da redução do MTT a cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais. O formazan é solubilizado e mensurado por espectrofotometria. Após 24 h de incubação, as células receberam 5 μ l de MTT (Sigma-Aldrich, SP, Brasil)/poço (0,5 mg/ml de PBS - Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e 50 μ l de DMEM (Sigma-Aldrich, SP, Brasil)/poço e foram incubadas por 2 h em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). A seguir, os cristais de formazan resultantes foram solubilizados pela adição de 50 μ l/poço de dodecil sulfato de sódio (SDS - Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Seguida 1h de solubilização à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada a 550 nm em leitor de microplacas. Os resultados de viabilidade celular foram expressos em absorbância de formazan por 5×10^5 células.

2.5 Análise estatística

As medidas de NO e MTT foram descritas por meio de médias e seus respectivos desvios padrões. A suposição de normalidade foi assumida sendo testadas pelo teste de Komogorov-Smirnov. Inicialmente os dados foram analisados pela técnica de análise fatorial com os fatores λ , potência e tempo a fim de testar a hipótese do efeito destes de forma isolada ou interagindo entre si sobre a liberação de NO e valores de MTT. Posteriormente as análises foram realizadas para os λ 660 e 808 nm nos diferentes parâmetros, de forma independente, fixando o tempo e variando a potência, assim como de forma inversa, fixando a potência e variando o tempo. Nesse caso foi utilizado para comparação das médias a Análise de Variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni. Quando a comparação foi entre os lasers, a comparação das médias foi pelo teste t-student para cada combinação de potência, tempo DE e DP. Na análise das DE e DP foi utilizada ANOVA com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística adotada foi de 5% ($p < 0,05$) e o software utilizado para a análise dos dados foi o STATA na versão 12.0.

3 Resultados

3.1 Resultados da análise fatorial sobre a influência dos fatores tempo, potência e comprimento de onda nos valores de NO e MTT.

A análise fatorial mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os valores de NO e MTT quando os fatores potência, tempo de exposição e comprimento de onda agem de forma isolada ou interagindo entre si. Em relação à liberação de NO, os resultados mostraram que só há diferença estatisticamente significativa quando existe interação da potência com o tempo ($p = 0,0012$) além da interação λ , potência e tempo ($p = 0,0116$). Para os valores de MTT, diferenças significantes estatisticamente foram encontradas não só pela ação isolada do λ ($p < 0,0001$), mas também pelas interações λ e potência ($p = 0,0146$), λ e tempo ($p = 0,0223$).

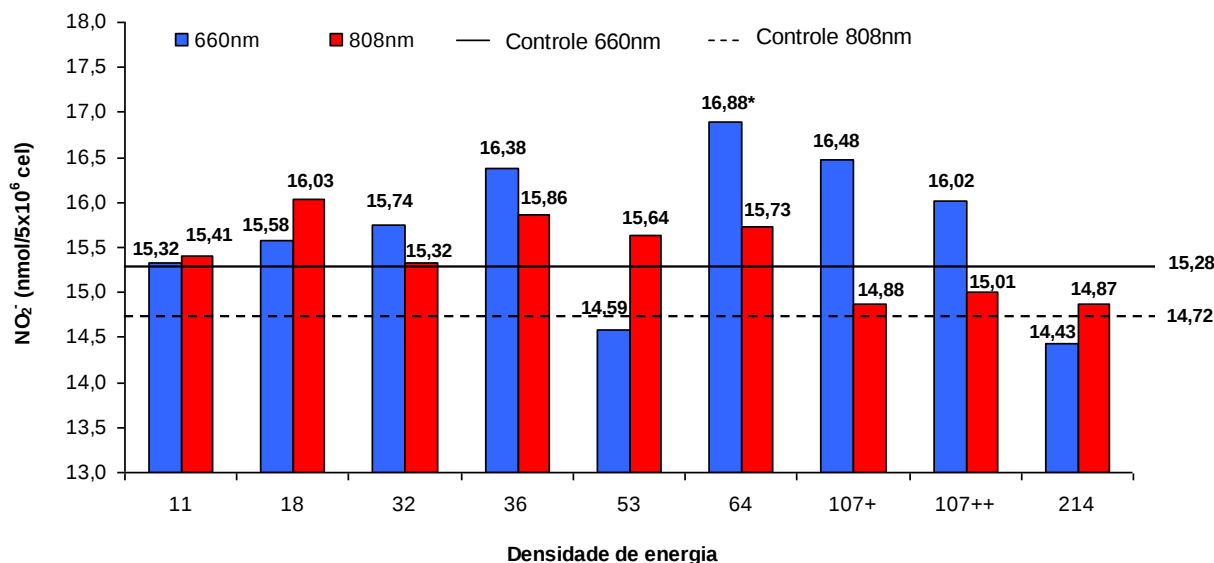
A partir dos resultados da análise fatorial, os valores de NO e MTT foram organizados em diferentes formas: em ordem crescente de densidade de energia, através das densidades de potência fixados os tempos de exposição, fixando a potência variando o tempo e fixando o tempo variando a potência. As duas últimas formas foram realizadas para analisar a influência do tempo e da potência sobre os valores de NO e MTT nos diferentes λ utilizados.

3.2 Valores de NO

3.2.1 Valores de NO utilizando os lasers de 660 e 808 nm em diferentes DE

Calculadas e colocadas em ordem crescente as densidades de energia para os diferentes parâmetros utilizados (quadros 1 e 2), observaram-se variações nos valores de NO nos dois comprimentos de onda (gráfico 1).

Gráfico 1: Valores de NO em relação as diferentes densidades de energia utilizando os lasers de 660 e 808 nm.



+ Densidade de energia calculada com base em uma potência de 50mW e tempo de 60s

++ Densidade de energia calculada com base em uma potência de 100mW e tempo de 30s

* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Em relação ao laser de 660 nm, a análise estatística mostrou diferenças significantes entre valores de NO nas diferentes DE ($p=0,001$), porém só houve diferença significativa em relação ao grupo controle quando foi utilizada a DE 64 j/cm^2 ($p=0,04$) promovendo um aumento no valor de NO. Quando comparados entre si, os valores de NO para o laser de 660 nm mostraram-se diferentes estatisticamente quando utilizadas as DE: 53 j/cm^2 e 64 j/cm^2 ($p=0,014$); 64 j/cm^2 e 214 j/cm^2 ($p=0,006$); 107^+ j/cm^2 e 214 j/cm^2 ($p=0,032$). A primeira comparação mostrou que existe um aumento significativo no valor de NO com o aumento da DE, embora não tenha havido diferença estatística

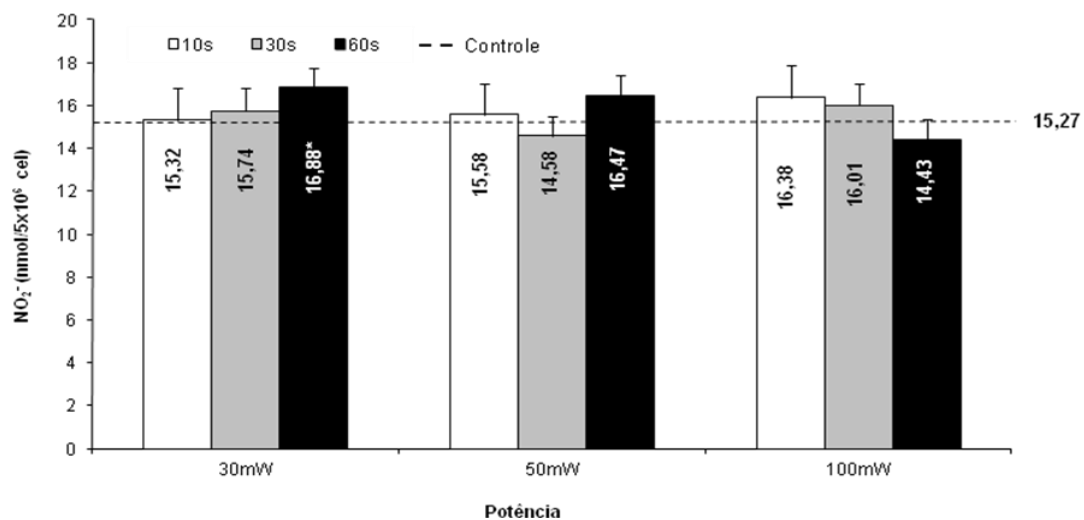
significante em relação ao grupo controle utilizando a DE 53j/cm². Nas duas últimas comparações ocorreu uma diminuição significativa no valor de NO com o aumento da DE, embora não tenha havido diferença estatística significativa em relação ao grupo controle utilizando as DE 214 e 107⁺ j/cm². Não foram encontradas diferenças significantes para os valores de NO com o uso do laser de 808 nm.

3.2.2 Análise do tempo sobre a liberação de NO utilizando os lasers de 660 e 808 nm

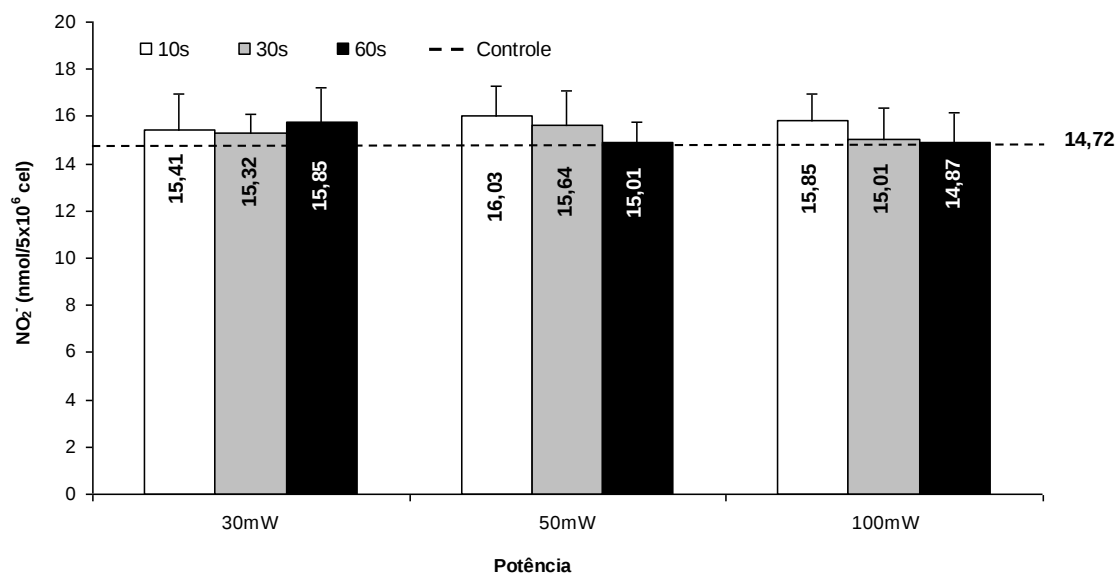
A análise do tempo sobre a liberação de óxido nítrico é ilustrada nos gráficos a seguir (gráficos 2A e 2B).

Gráficos 2A e 2B: Valores de NO quando utilizados os lasers 660 e 808 nm em diferentes tempos de exposição fixadas as potências em 30 mW, 50 mW e 100 mW. A – laser de 660 nm; B – laser de 808 nm.

A)



B)



* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas apenas no laser de 660 nm em todas as combinações de tempo quando fixadas as potências em 30 mW ($p=0,034$), 50 mW ($p=0,025$) e 100 mW ($p=0,017$), mas em relação ao grupo controle houve diferença significativa apenas no parâmetro 30 mW/60 s (64 j/cm^2) ($p=0,04$) promovendo um aumento no valor de NO. Quando comparados os valores de NO entre si, utilizando o laser de 660 nm com parâmetros 50 mW/30 s (53 j/cm^2) e 50 mW/60 s (107^+ j/cm^2), observou-se diferença significativa entre os mesmos ($p=0,019$) com o aumento do valor de NO na última DE, porém nenhum destes mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle. Diferença significativa ($p=0,02$) também foi observada na comparação entre os parâmetros 100 mW/10 s (36 j/cm^2) e 100 mW/60 s (214 j/cm^2) onde se observou uma diminuição nos valores de NO, porém nenhum destes parâmetros promoveu diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Quando comparados os valores de NO entre os dois comprimentos de onda, diferenças significantes foram encontradas quando se utilizou 30 mW/60 s (64 j/cm^2)($p=0,037$) e 50 mW/60 s (107^+ j/cm^2)($p=0,002$). Em ambos os comprimentos de onda a DE 64 j/cm^2 promoveu aumento no valor de NO, este mais acentuado no laser de 660 nm, porém somente neste último o aumento foi estatisticamente significante em relação ao grupo controle. Quando se utilizou a DE 107^+ j/cm^2 , houve aumento na liberação de NO quando utilizado o laser de 660 nm e uma diminuição com o laser de 808 nm, porém em nenhum dos lasers utilizados foram observadas diferenças significantes em relação ao grupo controle quanto aos valores de NO nesta DE.

3.2.3 Análise da potência sobre a liberação de NO utilizando os lasers de 660 e 808 nm

A análise da potência sobre a liberação de NO não mostrou diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle em nenhum dos lasers utilizados. Quando comparados os valores de NO entre os dois comprimentos de onda, diferenças significantes foram encontradas quando se utilizou 30 mW/60 s ($1,07 \text{ W/cm}^2$)($p=0,036$) e 50 mW/60 s ($1,78 \text{ W/cm}^2$)($p=0,002$). A primeira DP promoveu um aumento nos valores de NO, este mais acentuado no laser de 660 nm, porém nenhum destes valores foi significante em relação ao grupo controle. Já a DP $1,78 \text{ W/cm}^2$ promoveu um aumento na liberação de NO quando utilizado o laser de 660 nm e uma diminuição utilizando o laser de 808 nm, porém nenhum desses valores foi estatisticamente diferente quando comparados ao grupo controle.

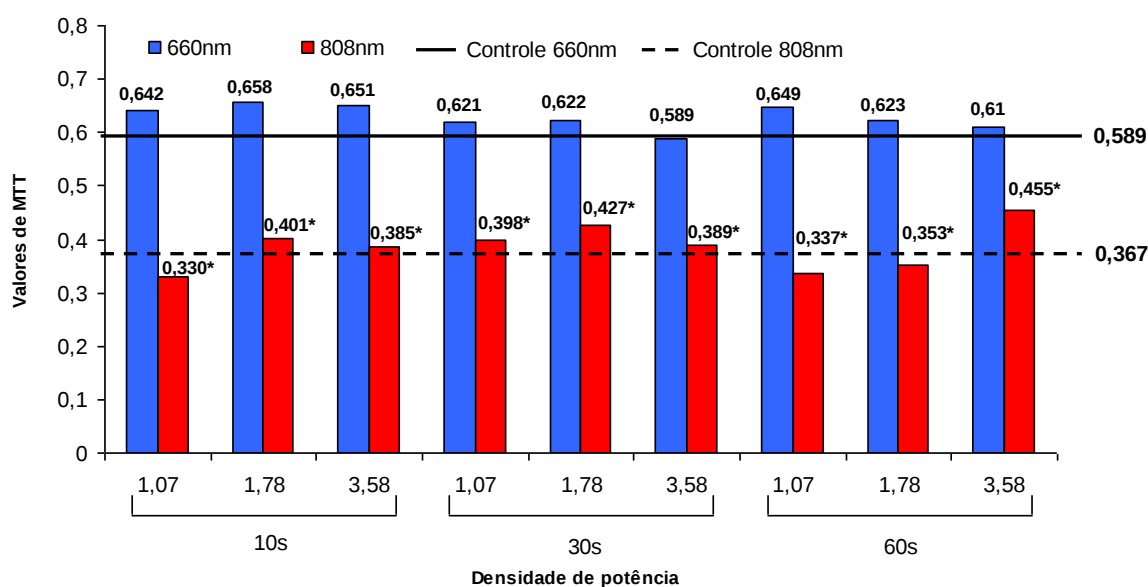
3.3 Valores de MTT

3.3.1 Valores de MTT utilizando os lasers de 660 e 808 nm em diferentes

DP

Calculadas as diferentes densidades de potência e fixando-se os tempos de exposição, observaram-se variações nos valores de MTT (gráfico 3) quando se utilizou os dois comprimentos de onda.

Gráfico 3: Valores de MTT em relação as diferentes densidades de potência, fixados os tempos de exposição em 10, 30 e 60 s, utilizando os lasers de 660 e 808 nm.



* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Diferenças estatisticamente significantes foram observadas apenas no laser de 660 nm em todas as combinações, fixando-se o tempo e variando as DP em 1,07 W/cm² ($p < 0,0001$); 1,78 W/cm² ($p < 0,0001$) e 3,57 W/cm² ($p < 0,0001$), quando comparadas ao grupo controle. Fixado o tempo em 10 segundos, houve diminuição no valor de MTT em relação ao grupo controle

($p < 0,0001$) utilizando $1,07 \text{ W/cm}^2$, porém nas DP potências de $1,78 \text{ W/cm}^2$ ($p < 0,0001$) e $3,57 \text{ W/cm}^2$ ($p < 0,0001$) houve aumento no valor de MTT. Utilizando 30 segundos há aumento nos valores de MTT em todas as DP, sendo este maior quando se utilizou $1,78 \text{ W/cm}^2$ ($p < 0,0001$) no laser de 660 nm. Com o tempo fixo em 60 segundos há aumento nos valores de MTT quando utilizados $3,57 \text{ W/cm}^2$ ($p < 0,0001$) e diminuição destes quando utilizados $1,07 \text{ W/cm}^2$ e $1,78 \text{ W/cm}^2$ ($p < 0,0001$).

3.3.2 Análise do tempo sobre valores de MTT utilizando os lasers de 660 e 808 nm

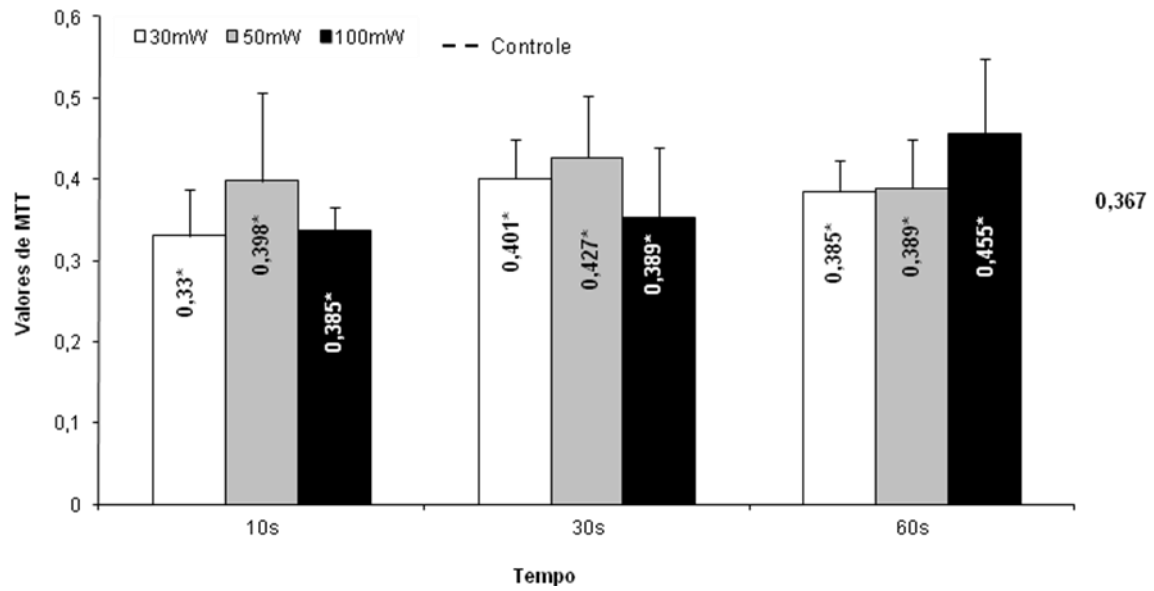
A análise do tempo sobre os valores de MTT promoveu diferença estatisticamente significante apenas no laser de 660 nm quando fixada a potência em 100 mW ($p = 0,011$), porém em relação ao grupo controle, diferença estatisticamente significante só foi observada quando foram utilizados 100 mW/60 s (214 J/cm^2) ($p = 0,012$) onde houve um aumento no valor de MTT.

3.3.3 Análise da potência sobre valores de MTT utilizando os lasers de 660 e 808nm

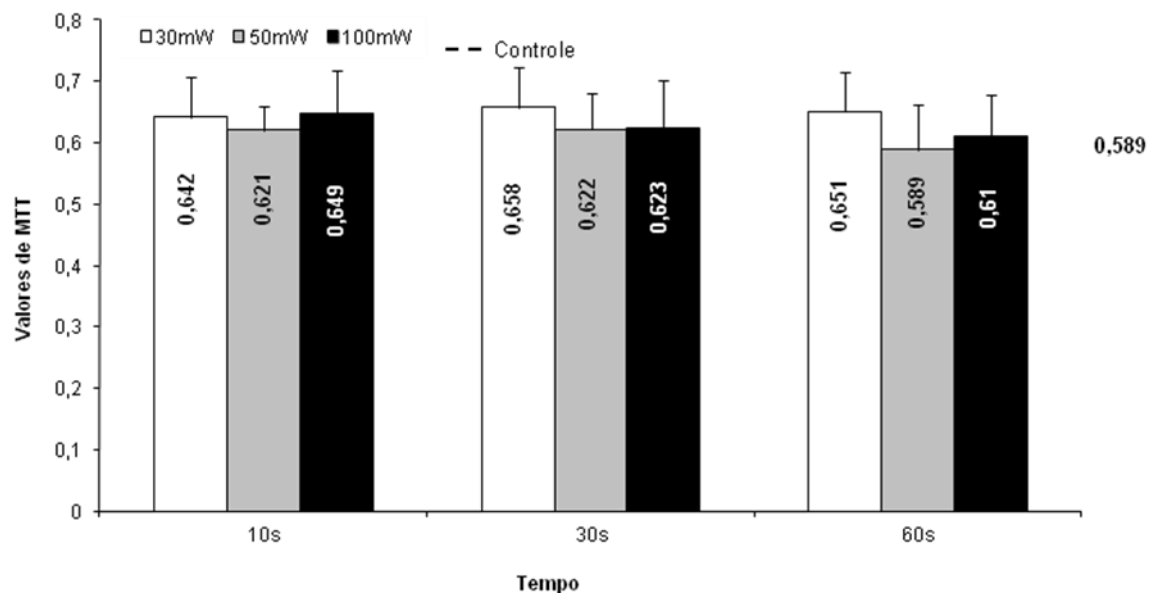
Diferentemente dos valores de NO, o fator potência mostrou ser mais influente sobre os valores de MTT em relação ao fator tempo (gráficos 4A e 4B).

Gráficos 4A e 4B: Valores de MTT quando utilizados os lasers 660 e 808 nm em diferentes tempos de exposição fixadas as potências em 30 mW, 50 mW e 100 mW. A – laser de 660 nm; B – laser de 808 nm. .

A)



B)



* Diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Para o laser de 660 nm, diferenças estatisticamente significantes foram observadas em todas as combinações fixando-se o tempo e variando as potências em 30 mW ($p<0,0001$), 50 mW ($p<0,0001$) e 100 mW ($p<0,0001$), inclusive quando comparadas ao grupo controle ($p<0,0001$). Fixado o tempo em 10 segundos, houve diminuição no valor de MTT em relação ao grupo controle ($p<0,0001$) utilizando 30 mW ($1,07\text{W}/\text{cm}^2$), porém nas potências de 50 mW ($18/\text{cm}^2$) ($p<0,0001$) e 100 mW ($3,57\text{W}/\text{cm}^2$) ($p<0,0001$) houve aumento no valor de MTT. Utilizando 30 segundos há aumento nos valores de MTT em todas as potências utilizadas, sendo este maior quando se utilizou 50 mW de potência no laser de 660 nm. Com o tempo fixo em 60 segundos há aumento nos valores de MTT quando utilizados 100 mW de potência e diminuição destes quando utilizados 30 mW e 50 mW. Comparados os valores de MTT entre si no λ 660 nm, observaram-se diferenças significativas entre os parâmetros: 30 mW/10 s ($1,07\text{ W}/\text{cm}^2$) e 50 mW/10 s ($1,78\text{ W}/\text{cm}^2$) ($p=0,0198$); 30 mW/10 s ($1,07\text{ W}/\text{cm}^2$) e 100 mW/10 s ($1,07\text{ W}/\text{cm}^2$) ($p=0,0393$); 30 mW/60 s ($3,58\text{ W}/\text{cm}^2$) e 100 mW/60 s ($3,58\text{ W}/\text{cm}^2$) ($p=0,004$) e 50 mW/60 s ($3,58\text{ W}/\text{cm}^2$) e 100 mW/60 s ($3,58\text{ W}/\text{cm}^2$) ($p=0,041$). Em todos os casos há um aumento nos valores de MTT quando se aumenta a potência do com o laser de 660 nm.

Não houve diferença estatística significativa quanto à análise da potência nos valores de MTT no laser de 808 nm em relação ao grupo controle, porém quando comparados os dois comprimentos de onda, houve diferença significativa em todos os parâmetros propostos ($p<0,0001$) permanecendo os

valores de MTT para com o laser de 808 nm sempre maiores em relação ao de 660 nm.

4 Discussão

O presente estudo avaliou o efeito da LBI sobre a liberação de óxido nítrico e a viabilidade celular de macrófagos quando expostos a diferentes densidades de energia e densidades de potência, utilizando um laser de diodo em diferentes comprimentos de onda. Os resultados mostraram que os fatores tempo, potência e comprimento de onda promoveram, de forma isolada ou interagindo entre si, alterações na liberação de NO e valores de MTT.

Ensaios de detecção da viabilidade e proliferação celular estão presentes em diferentes tipos de estudos que visam avaliar os possíveis efeitos tóxicos induzidos por drogas, produtos químicos e outras substâncias além de métodos ou diferentes equipamentos, lasers por exemplo, sobre diferentes tipos de células em cultura (HUANG et al., 2012). A análise dos valores de MTT no presente estudo demonstrou que a viabilidade celular foi exclusivamente influenciada pelo uso do laser de 660 nm. Este comportamento confirma os resultados da análise fatorial que demonstrou a capacidade do comprimento de onda promover alterações nos valores de MTT de forma isolada. Ainda corroborando com esta análise, explicam-se as diferenças estatísticas para os valores de MTT quando comparados os dois λ . Mesmo não apresentando diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, os valores de MTT para o laser de 808 nm não foram apenas diferentes, mas também sempre maiores em relação ao de 660nm.

A ação exclusiva do laser de 660 nm sobre os valores de MTT neste estudo pode ser explicada pelo espectro de ação. Espectro de ação é a taxa de

atividade fisiológica resultante do tipo de comprimento de onda da luz, mostrando quais comprimentos de onda são mais efetivos em uma reação química específica (SILVA GARCEZ et al., 2012). Acredita-se que o efeito fotobioestimulador do laser terapêutico, dependente do comprimento de onda utilizado, baseia-se na absorção da luz no intervalo do vermelho visível e infravermelho próximo (600 nm – 950 nm) promovendo a ativação de uma cascata de reações fotoquímicas nas células (NOVOSELOVA et al., 2006; SILVA GARCEZ et al., 2012). Desta maneira, os fótons são absorvidos por cromóforos dentro de diferentes estruturas celulares como mitocôndrias, núcleos e membrana celular, desencadeando respostas que podem influenciar na proliferação e na viabilidade celular (MORIYAMA et al., 2009). É possível que a utilização do laser de 808 nm não tenha influenciado a viabilidade celular pelo fato de este não ser um comprimento de onda capaz de desencadear o efeito fotobioestimulador nas células utilizadas neste experimento.

Além da ação isolada do comprimento de onda ter sido responsável por alterações na viabilidade celular, os fatores tempo e potência, interagindo cada um com os comprimentos de onda utilizados, também foram responsáveis por mudanças na viabilidade celular. Os resultados mostraram que a LBI utilizando o laser de 660 nm influenciou a viabilidade das células irradiadas, principalmente quando se promoveu a variação da potência e fixação dos tempos de exposição (gráficos 4A e 4B), pois neste caso foram detectadas alterações significantes estatisticamente em todas as combinações propostas em relação ao grupo controle.

A explicação para uma influência maior da potência nos valores de MTT pode ser dada pela definição e cálculo das DP nos diferentes parâmetros utilizados. Densidade de potência é a grandeza física que avalia a possibilidade de dano microtérmico aos tecidos irradiados e que representa a potência de saída de luz, por unidade de área irradiada (SILVA GARCEZ et al., 2012). O efeito fotobioestimulador desejado quando se realiza a LBI é influenciado pelo aumento excessivo de temperatura no tecido irradiado, desta maneira os valores de DP devem ser mantidos em limites seguros para que não haja dano ao tecido irradiado (SILVA GARCEZ et al., 2012).

No presente estudo os resultados mostraram que a fixação dos tempos e variação das potências promoveu ora aumento ora diminuição na viabilidade das células irradiadas quando o laser de 660 nm foi utilizado, porém a análise do gráfico 3 permite observar que, independentemente do valor de MTT, há um intervalo de valores de DP onde a viabilidade celular aumenta, a partir do parâmetro 50 mW/10 s ($1,78 \text{ W/cm}^2$), permanece maior em relação ao grupo controle em todas as DP utilizadas no tempo de 30 segundos ($1,07 \text{ W/cm}^2$; $1,78 \text{ W/cm}^2$ e $3,58 \text{ W/cm}^2$) até começar a cair e se apresentar menor em relação ao grupo controle quando utilizamos 60 segundos, já a partir dos 30 mW ($1,07 \text{ W/cm}^2$) neste tempo de exposição.

Este comportamento pode ser explicado pela lei de Arndt-Schulz, frequentemente relatada como um modelo adequado para descrever os efeitos dependentes nos parâmetros da luz (HUANG et al., 2009). O princípio desta lei postula que estímulos fracos aceleram ligeiramente a atividade vital e estímulos mais fortes aumentam, até que um pico é alcançado. Estímulos muito fortes

suprimem o efeito, aparecendo uma resposta negativa. No contexto da LBI, o estímulo pode ser o tempo de exposição ou a densidade de potência. Desta maneira se a irradiação é insuficiente, não haverá resposta porque um limite mínimo para alcançar os efeitos da LBI não foi alcançado. Se mais irradiação for realizada, então o limite mínimo será alcançado para observação do efeito bioestimulador. No entanto se a estimulação for muito maior do que o necessário, a estimulação desaparece e dá lugar à biossupressão (HUANG et al., 2009; SILVA GARCEZ et al., 2012). No intervalo onde as DP nos parâmetros utilizados promoveram aumento nos valores de MTT, laserterapia promoveu bioestimulação e favoreceu a proliferação celular, porém nas demais densidades de potência utilizadas houve biossupressão e diminuição da viabilidade das células irradiadas possivelmente pelo dano térmico causado às células em cultura.

A análise dos valores de NO demonstrou que a liberação de óxido nítrico também foi exclusivamente influenciada pelo uso do laser de 660 nm. Os resultados deste estudo foram semelhantes aos de Moriyama et al. (2005) que avaliaram a influencia da LBI em diferentes comprimentos de onda (635, 785, 808 e 905 nm) sobre a expressão de iNOS encontrando aumento desta somente quando o laser de 635 nm foi utilizado. Vários estudos demonstram que comprimentos de onda entre 600 e 700 nm correspondem ao espectro de ação onde a luz é absorvida por fotoreceptores da cadeia respiratória, estimulando-a e aumentando a síntese de diferentes substâncias, dentre elas o NO pelo estímulo a expressão da iNOS (KRONCKE et al., 1997; WILDEN, 1998; KARU, 2003; WAHL et al., 2003; ALBERTINI et al., 2004). Assim como

na viabilidade celular, mais uma vez o conceito de espectro de ação explica a influência apenas do laser de 660 nm sobre os valores de NO.

Diferentemente dos valores de MTT, a análise fatorial demonstrou que as interações (potência x tempo; potência x tempo x comprimento de onda) são capazes de promover alterações nos valores de NO. Estas interações explicam as variações nos valores de NO quando as células foram expostas a diferentes densidades de energia (gráfico 1), grandeza física que avalia a possibilidade de estimulação, inibição ou não manifestação dos efeitos da LBI. A densidade de energia representa a quantidade de energia por unidade de área entregue à matéria, tecido ou células em cultura, cujos valores variam em relação à potência e o tempo de exposição utilizados (SILVA GARCEZ et al., 2012). Há relatos na literatura em que o tempo de exposição é um fator relevante para a obtenção de bons resultados com a LBI (VAN BREUGEL, 1992; AZEVEDO et al., 2006). Os resultados deste estudo corroboram com esta afirmação, pois diferenças estatisticamente significantes foram encontradas em todas as combinações de tempo quando fixadas as potências em 30, 50 e 100 mW, comportamento bem mais evidente quando comparado à fixação do tempo e variação das potências, porém em relação ao grupo controle houve diferença significativa apenas no parâmetro 30 mW/60 s (64 j/cm^2) ($p=0,04$) onde foi observado um aumento no valor de NO.

LPS é considerado um dos mais bem caracterizados sinais ativadores de macrófagos (RAETZ et al., 1991). Na resposta inflamatória, a ativação de macrófagos por LPS resulta na liberação de grandes quantidades de NO e citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (WU et al. 2003). Quando grandes

quantidades de NO são produzidas na inflamação, parte é oxidada gerando trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) e parte reage com o ânion superóxido (O^{-2}), uma espécie reativa de oxigênio, formando peroxinitrito (ONOO^-), uma espécie reativa de nitrito (SIES, 2007, DÁVILA et al., 2011). Esta reação é 6 vezes mais rápida do que a reação entre o O^{-2} e a enzima superóxido desmutase (SOD), responsável pela diminuição de O^{-2} e por isso considerada um biomarcador inflamatório de ação antioxidante (SIES, 2007; SERVETTO et al., 2010). O aumento na quantidade desta espécie reativa de oxigênio e a presença de ONOO^- resulta em estresse oxidativo, caso a capacidade antioxidante das células seja ultrapassada, contribuindo desta forma na patogênese da inflamação e morte celular (DÁVILA et al., 2011).

Tem sido relatado que um dos principais fatores responsáveis pela indução da inflamação é a presença de células inflamatórias no tecido agredido devido a interação entre o tecido inflamado e leucócitos da circulação (ALBERTINI et al., 2008). Após o estímulo à inflamação, células endoteliais iniciam a expressão de moléculas de adesão que facilitam a migração de células inflamatórias em direção ao tecido inflamado (PIERCE et al., 1997; MADAM et al., 2003). Além disso mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PGE_2), tromboxanos (TX_2), leucotrienos (LTD_4), NO, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β e IL-10 são liberados por células vizinhas. Estes mediadores provocam vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento do número de células inflamatórias, monócitos e neutrófilos, no tecido agredido (SCHRODER et al., 2006).

TNF- α e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos, células epiteliais e fibroblastos durante a inflamação (MCINNES et al., 1996; SEBBAG et al., 1997) desempenhando numerosos efeitos biológicos como a indução da proliferação de células T, contribuição para proliferação de células B e síntese de imunoglobulinas além do aumento de neutrófilos e células natural killers (MCINNE et al., 2005). TNF- α e IL-1 β desempenham um papel importante no início da resposta inflamatória com o TNF- α ocupando o primeiro lugar na cascata de citocinas devido a sua capacidade de estimular a produção de outras citocinas como a própria IL-1 β , IL-6 e IL-10 além do NO (DRAPIER et al., 1988; CORRADIM et al., 1993; FELDMAN et al., 1996; BRENNAN et al., 1998; LIMA et al., 2011). A IL-6 tem sido associada a diversas doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide, pancreatite aguda, meningite viral e bacteriana assim como à doença de Alzheimer (GADIENT., 1999), sendo assim considerada uma citocina pró-inflamatória (FRODE et al., 2002). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que tem a liberação estimulada por IL-1 β e TNF- α , cuja função é de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) por monócitos e macrófagos prevenindo futuras injúrias teciduais (FRODE et al., 2002).

Grande parte dos trabalhos que tratam do efeito anti-inflamatório da LLLT discutem o efeito desta sobre a liberação de diferentes mediadores químicos envolvidos na inflamação, relatando um aumento ou diminuição dos mesmos bem como comprovando o efeito pró ou anti-inflamatório da LBI. Albertini et al. (2008) demonstraram que LBI, utilizando lasers de 660 e 694 nm com 7,5 j/cm², promove um efeito anti-inflamatório em virtude da diminuição na

expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . O efeito anti-inflamatório da LBI foi estudado por Lima et al. (2011), utilizando um laser de diodo com 660 nm, 30 mW de potência e 0,08 cm² de diametro do feixe, que observou um aumento na liberação de IL-10 e uma diminuição na liberação de TNF- α .

Lima et al. (2013) avaliaram o efeito anti-inflamatório da LBI, utilizando um laser de 660 nm e 7,5 j/cm². Seus resultados indicaram que o controle da inflamação ocorre pela capacidade da laserterapia diminuir os níveis de TNF- α e a expressão de iNOs além de estimular a liberação de IL-10. O efeito da laserterapia sobre diminuição na liberação de NO foi mostrado por Dávila et al. (2011), utilizando lasers de He-Ne (λ 632,8 nm e 5 mW) e Ga-As (λ 904 nm e 12 mW) por 1 e 47 segundos por sessão respectivamente, totalizando 9,5 j/cm² de energia em cada laser. Boshi et al. (2008) além de terem observado uma diminuição na liberação de IL-6, IL-10 e NO, afirma que o fenômeno de exsudação celular, migração de neutrófilos, tem estreita relação com os níveis de TNF- α e NO no tecido inflamado mostrando que o mecanismo anti-inflamatório da LBI está relacionado ao controle dos níveis destes mediadores inflamatórios e sugerindo a laserterapia como uma alternativa clínica ao tratamento farmacológico.

Apesar dos trabalhos anteriormente citados associarem o efeito anti-inflamatório da LBI ao aumento (IL-10) e/ou diminuição (IL-1 β , IL-6, TNF- α e NO) da liberação de alguns mediadores, os resultados deste estudo são totalmente contrários a estas conclusões, pois em relação ao óxido nítrico houve um aumento na sua liberação quando foi utilizada a densidade de energia 64 j/cm². A explicação para este comportamento pode ser dada pelo

valor da densidade de energia utilizada neste parâmetro. Altas quantidades de energia podem estimular a liberação de TNF- α (AIMBIRE et al., 2006) desencadeando a ativação e o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o NO. Além disso, LBI com finalidade terapêutica deve ser realizada com densidades de energia menores que 10 j/cm² (VLADIMIROV, 2004; NOVOSELOVA et al., 2006). Neste estudo a menor densidade de energia utilizada foi de 11 j/cm², onde foi observada uma diminuição no valor de NO com o laser de 660 nm, porém sem significância em relação ao grupo controle.

5 Conclusão

Sendo assim, baseando-se nos resultados apresentados, conclui-se que variações no tempo de exposição e potência são, respectivamente, mais influentes na liberação de NO e viabilidade celular apenas utilizando o laser de 660nm, bem como laserterapia promoveu aumento na liberação de óxido nítrico utilizando 64 j/cm^2 sem alteração da viabilidade celular no mesmo comprimento de onda quando variados os tempos de exposição e fixadas as potências.

Referências

- Aimbire, F.; Albertini, R.; Pacheco, M.T.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Leonardo, P.S.; Iversen, V.V.; Lopes-Martins, R.A.; Bjordal, J.M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg.** v. 24, n. 1, p. 33–37, 2006.
- Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.** v. 357, n. 3, p. 593-615, Aug. 2001.
- Albertini, R.; Aimbre, F. S. C.; Correa, F. I.; Ribeiro, W.; Cogo, J. C.; Antunes E.; Teixeira S. A.; De Nucci G.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Zangaro R. A.; Lopes-Martins, R. A. B. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J. Photochem. Photobiol.** v. 74, p. 101-107, 2004.
- Albertini, R.; Villa Verde, A.B.; Aimbre, F.; Bjordal, J.M.; Brugnera, A.J.; Mittmann, J.; Silva, J.A.J.; Costa, M.S. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy (LLLTL). **Photomed. Laser Surg.** V. 26, p. 19–24, 2008.
- Almeida Lopes, L; Rigau, J; Zangaro, R. A; Guidugli-Neto, J; Jaerger, M.M. Comparasion of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers surg Med.**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.
- Azevedo, L.H.; de Paula Eduardo, F.; Moreira, M.S.; de Paula Eduardo, C.; Marques, M.M. Influence of diferent Power densites of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. **Laser Med Sci.** v. 21, p. 86-89, 2006.
- Baxter, G. **Terapeutic lasers: Theory and practice.** London: Churchil Livingstone, 1997.
- Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol.** v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
- Boschi, E.S.; Leite, C.E.; Saciura, V.C.; Caberlon, E.; Lunardelli, A.; Bitencourt, S.; Melo, D.A.; Oliveira, J.R. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. **Lasers Surg Med.** v. 40, n.7, p. 500-508, Sep. 2008.
- Brennan, F.M.; Maini, R.N.; Feldmann, M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Springer Semin Immunopathol.** v. 20, p. 133–147, 1998.
- Corradin, S.B.; Fasel, N.; Buchmuller-Rouiller, Y.; Ransijn, A.; Smith, J.; Mauel, J. Induction of macrophage nitric oxide production by interferon-gamma and

tumor necrosis factor-alpha is enhanced by interleukin-10. **Eur J Immunol.** v. 23, p. 2045–2048, 1993.

Dávila, S.; Vignola, M. B.; Cremonezzi, D.; Simes, J. C.; Soriano, F.; Campana, V. R. Low level laser therapy on experimental myopathy. **Laser Therapy.** v. 20, n. 4, p. 287-292, 2011.

Ding, A.H.; Nathan, C.F.; Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol.** v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

Dörtbudak, O.; Haas, R.; Mallath-Pokorny, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Implants Res.** v. 11, n. 6, p. 540-545, 2000.

Drapier, J.C.; Wietzerbin, J.; Hibbs, J.B. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur J Immunol.** v. 18, p. 1587–1592, 1988.

Feldmann, M.; Brennan, F.; Maini, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu Rev Immunol.** v. 14, p. 397–440, 1996.

Frode, T.S.; Souza, G.E.P.; Calixto, J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine.** v. 17, p. 149–156, 2002.

Frozanfar, A.; Ramezani, M.; Rahpeyma, A.; Khajehahmadi, S.; Arbab, H. R. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. **Iran J Basic Med Sci.** v. 16, n. 10, p. 1071-1074, 2013.

Gadient, R.A.; Patterson, P.H. Leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. **Stem Cells.** v. 17, p. 127–137, 1999.

Gavish, L.; Perez, L. S.; Reissman, P. Irradiation With 780 nm Diode Laser Attenuates Inflammatory Cytokines but Upregulates Nitric Oxide in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages: Implications for the Prevention of Aneurysm Progression. **Lasers in Surgery and Medicine.** v. 40, p. 371–378, 2008.

Guzzardella, G. A.; Fini, M.; Torricelli, P.; Giavaresi, G.; Giardino, R. Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. **Lasers Med Sci.** v. 17, n. 3, p. 216-220, 2002.

Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Hasegawa, A.; Noguchi, T. Pre-Irradiation of blood by gallium aluminum arsenide (830 nm) low-level laser enhances peripheral

endogenous opioid analgesia in rats. **Anesth Analg.**, v. 107, n. 3, p. 1058-1063, Sep. 2008.

Huang, Y.-Y.; Chen, A.C.H.; Carrol, J.D.; Hamblim, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose response.** v. 7, p. 358-83, 2009.

Huang, T. H.; Lu, Y.C.; Kao, C.T. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. **Lasers Med Sci.** v. 27, p. 621–627, 2012.

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

Karu, T. **Low power laser therapy.** In Biomedics Photonics Handbook. Boca Raton, FL: CRC Press, Tennessee, 2003.

Khadra, M.; Kasem, N.; Haanaes, H.R.; Ellingsen, J.E.; Lyngstadaas, S.P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 97, n. 6, p. 693-700, Jun. 2004.

Kreisler, M; Christoffers, A.B; Al-Haj, H; Willershausen, B; d'Hoedt, B. Low level 809 nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 30, n. 5, p. 365-392, 2002.

Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? **Nitric Oxide.** v. 1, p. 107-120, 1997.

Lancaster, J. R., "Nitric oxide in cells". **American Scientist.** v. 80, p. 248-259, 1992.

Lima, F.M.; Villaverde, A.B.; Albertini, R.; Corrêa, J.C.; Carvalho, R.L.P.; Munin, E.; Araújo, T.; Silva, J.A.; Aimbire, F. Dual effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: action on anti- and pro-inflammatory cytokines. **Lasers Surg. Med.** V. 43, p. 410–420, 2011.

Lima, F.M.; Vitoretto L.; Coelho F.; Albertini, R.; Breithaupt-Faloppa, A.C.; Lima, W.T.; Aimbire, F. Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. **Lasers Med. Sci.** v. 28, n. 2, p. 551–564, 2013.

Lowenstein, C.J.; Padalko, E. iNOS (NOS2) at a glance. **J Cell Sci.** V. 117, n. 14. P. 2865–2867, 2004.

Madan, B.; Mandal, B.C.; Kumar, S.; Ghosh, B. *Canscora decussata* (Roxb.) Schult (Gentianaceae) inhibits LPSinduced expression of ICAM-1 and E-

selectin on endothelial cells and carrageenan-induced paw-edema in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 89, p. 211–216, 2003.

McInnes, I.B.; Al Mughales, J.; Field, M. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. **Nature Med.** v. 2, p. 175–182, 1996.

McInnes, I.B.; Liew, F.Y. Cytokine networks—towards new therapies for rheumatoid arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol.** v. 1, p. 31–39, 2005.

Meneguzzo, D.T; Lopes, L.A.; Pallota, R.; Soares-Ferreira, L.; Lopes-Martins, RÁ; Ribeiro, M.S. Prevention and treatment of mice paw edema by near-infrared low-level laser therapy on lymph nodes. **Lasers Med Sci.**, v. 28, p. 3, p. 973-980, 2013.

Mizutani, K; Musya, Y; Wakae, K; Kobayashi, T; Tobe, M; Taira, K; Harada, T. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.**, v. 22, n. 6, p. 537-539, Dec. 2004.

Moriyama, Y.; Moriyama, E. H.; Blackmore, K.; Akens, M. K.; Lilge, L. *In Vivo* Study of the Inflammatory Modulating Effects of Low-level Laser Therapy on iNOS Expression Using Bioluminescence Imaging **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 1351-1355, 2005.

Moriyama, Y.; Nguyen, J.; Akens, M.; Moriyama, E.; Lilge, L. In Vivo Effects of Low Level Laser Therapy on Inducible Nitric Oxide Synthase **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, p. 227–231, 2009.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **JIM.** v. 65, p. 55-63, 1983.

Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J.** v.6, n.12, p.3051-3064, Sep. 1992.

Novoselova, E. G.; Glushkova, O. V.; Cherenkov, D. A.; Chudnovsky, V. M.; Fesenko, E. E. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** v. 22, p. 33–38, 2006.

Pierce, J.W.; Schoenleber, R.; Jesmok, G.I. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. **J Biol Chem.** v. 34, p. 21096–21103, 1997.

Pinheiro, S.L.; Donegá, L.M.; Seabra, L.M.S.; Adabo, M.D.; Lopes. T.; Dias do Carmo, T.H.; Ribeiro, M.C.; Bertolini, P.F.R. Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. **Lasers Med Sci.** v. 25, p. 87–91, 2010.

Pires, D.; Xavier, M.; Araújo, T.; Silva Jr., J.A.; Aimbire F.; Albertini R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med. Sci.** v. 26, p. 85-95, 2011.

Raetz, C.R.; Ulevitch, R.J.; Wright, S.D.; Sibley, C.H.; Ding, A.; Nathan, C.F. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **Faseb j.** v. 5, p. 2652–2660, 1991.

Ribeiro, M.S; Da Silva, D de F; De Araujo, C.E; De Oliveira, S.F; Pelegrini, C.M; Zorn, T.M. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 22, n. 1, p. 59-66, 2004.

Rocha Jr, A.M; Andrade, L.C.F; Oliveira, R.G; Aarestrup, F.M; Farias, R.E. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An Bras Dermatol.**v. 81, n. 2, p. :150-156, 2006.

Sakurai, Y; Yamaguchi, M; Abiko, Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **Eur J Oral Sci.** v. 108, n. 1, p. 29-34, 2000.

Safavi, S.M; Kazemi, B; Esmaeili, M.; Fallah, A.; Modarresi, A.; Mir, M. Effects of low-level He–Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1b, TNF-a, IFNc, TGF-b, bFGF, and PDGF in rat's gingival. **Lasers Med. Sci.** v. 23, n. 3, p. 331– 335, 2008.

Schroder, A.K.; Von der Ohe, M.; Kolling, U. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. **Immunology.** v. 119, p. 317–327, 2006.

Sebbag, M.; Parry, S.L.; Brennan, F.M.; Feldmann, M. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumour necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: Possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Eur J Immunol.** v. 27, p. 624–632, 1997.

Servetto, N.; Cremonuzzi, D.; Simes, J.C; Moya, M.; Soriano, F.; Palma, J.A.; Campana, V.R. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. **Lasers Surg Med.** v. 42, n. 6, p. 577-583, Aug. 2010.

Sies, H. Biological redox systems and oxidative stress. **Cell Mol Life Sci.** v. 64, p. 2181–2188, 2007.

Silva Garcez, A.; Simões Ribeiro, M.; Núñez, S. C. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na Odontologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Tune'r , J.; Hode, L. **Laser therapy: Clinical practice and scientific background.** Sweden: Prima Books; 2002.

Ueda, Y.; Shimizu, N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. **J Clin Laser Med Surg.** v. 21, n. 5, p. 271-277, Oct. 2003.

van Breugel, H.H.; Bär, P.R. Power and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med.** v. 12, p. 528-537, 1992.

Vladimirov, Y. A, A. N.; Klebanov, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Review. Biochemistry.** v. 69, p. 81-90, 2004.

Wahl, S. M.; McCartney-Francis N.; Chan, R. Dionne J.; Ta, L.; Orenstein J. M. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? **Cells Tissues Organs.** v. 174, p. 2633, 2003.

Wilden, L.; Kartheim, R. Import of phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J. Clin. Laser Med. Surg.** v. 16, p. 159-165, 1998.

Wu, C-H.; Chen, T-L.; Chen, T-G.; Ho, W-P.; Chiu, W-T.; Chen, R-M. Nitric Oxide Modulates Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. **J Trauma.** v. 55, p. 540 –545, 2003.

Anexo I

Duplicate Publication and Scientific Fraud

Recently *Photochemistry and Photobiology* has seen an increasing number of submissions with extensive incidences of plagiarism. Therefore in cases of suspected scientific misconduct (fabrication or falsification of data, double publication, or plagiarism), the editor will attempt to clarify the matter with the authors. Should that fail to resolve the situation satisfactorily, the editorial office will contact the institution and/or funding body of the corresponding author to request that they initiate a formal investigation into possible scientific misconduct. *Photochemistry and Photobiology* will not consider publication of any papers by the offending authors for a period of 5 years. *Photochemistry and Photobiology* employs a plagiarism detection system on all submitted manuscripts which are screened against all previously published works. In that respect self-plagiarism could be a cause of rejection of submitted manuscripts when the authors cut and paste portions of earlier, particularly those concerning introduction, results and discussion sections

General Information

Photochemistry and Photobiology publishes peer-reviewed, original Research Articles, Rapid Communications, Research Notes, Technical Notes, Invited Perspective ("Highlight") Articles, Methods Papers and Invited Reviews.

Research Notes and **Technical Notes** should follow the outline of regular Research Articles (see below) but not exceed 4 printed journal pages.

Perspective Articles, **Review Articles** and **Methods Papers** are usually published only after agreement with the Editor. Contact the Editor-in-Chief, Jean Cadet (jean.cadet@cea.fr) if you wish to submit such a paper. The outline of these papers is less strict but the Abstract, Introduction, and Conclusion are obligatory parts.

Review Articles are published with Author portraits and bibliographies and will be complimentary given Free access.

Topics span from Photochemistry, Photophysics and Phototechnology to Photosensory and Circadian Biology, Photosynthesis, Bio- and Chemiluminescence, Photomedicine, Photoprotection, Environmental Photobiology UV Effects and Vision.

The Journal occasionally publishes **Special Issues** which focus attention on specific areas of current interest. Manuscripts for **Special Issues** are either invited by a Guest Editor or contributed; in both cases they are peer-reviewed.

The editorial policy of the Journal is to publish manuscripts of the highest quality, combining scientific rigor, clarity, and brevity with rapid publication. To this end, all manuscripts are carefully reviewed by at least two independent specialists in the field and every effort is made to provide useful editorial assistance to authors.

HUMAN AND ANIMAL SUBJECTS

Journal policy requires that “research reported in *Photochemistry and Photobiology* using human or animal subjects or any tissue derived there from or recombinant DNA, shall have been conducted in accord with accepted ethical and humane practices, and shall have been approved by the pertinent institutional and/or governmental oversight group(s).”

Author Guidelines

For additional assistance visit Author Services for journal authors, now available at <http://authorservices.wiley.com>.

Manuscripts should be written in clear, concise English. Non-native English speakers are encouraged to have their manuscript language-edited before submission. You may find further information at: http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp.

OVERVIEW and file types

Manuscripts for *Photochemistry and Photobiology* must be submitted via the Scholar One online submission system (<http://mc.manuscriptcentral.com/php>).

The **main text** and **tables** should be uploaded in the form of Microsoft Word or RTF (Rich Text Format) - files.

Figures and **Image files** must be uploaded separately from the text. Preferred formats are EPS or PDF for line art or combination images, TIFF for photographic images. See below for required resolutions. The written document and the figures will be merged into a single PDF file as part of the submission process.

A **Graphical Abstract** image and text should be uploaded as “Supplementary files for online purpose”. The graphical abstract is intended to incite further reading and to help identify which papers are most relevant to the reader; it should be kept simple and clear to be easily understood by a larger audience. The image should relate to, but does not have to be part of the paper. Recommended formats are JPEG, GIF, TIFF and EPS. A single image is preferred; avoid multiple panels. Avoid text in the image as much as possible, for any lettering or numbers use a large font. Colour is encouraged. A short, explicative text of not more than 100 words should be contained in a separate DOC-file.

Photochemistry and Photobiology urges authors to use the **manuscript template** available at: <http://mc.manuscriptcentral.com/php> as an easy tool to ensure that the manuscripts follow the journal format.

Double space manuscript, references list, tables and figure legends. **Include page numbers and line numbering**. Use italics for scientific names only. Boldface, italic, subscript and superscript word-processing commands should be retained.

Footnotes should be avoided. If necessary, use standard footnote symbols in the order †, ‡, §, ||, ¶. Footnote the title only to show (a) that some or all of the material was presented at a meeting (give name, dates, and location of meeting), or (b) dedication of the paper. Current address of an author can be given in a footnote to the author's name.

Every paper by two or more authors must have a footnote to one author's name: "*Corresponding author: e-mail address (name)" The superscript * is reserved to identify the corresponding author.

Assemble the manuscript with a separate **Title page**. Section headings are: **Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Appendix** if needed, and **Figure Captions**. The Results and Discussion sections may be combined. The section heading Conclusion is allowed but not required. Section headings are capitalized. Do not use paragraph numbering.

Most figures will be printed in one-column width (8.3 cm). To avoid delays in production please test the legibility of your figures by photocopying them to this size. Complex figures may be printed over two columns, i.e. ~16.5 cm width.

Manuscript Format

TITLE PAGE

Use upper case for the first letter of each word in the title. Prepositions with 4 or fewer letters should be lower case. Do not use abbreviations in the title.

Name all authors with their full first and last names, as they should appear in print., followed by their institutional affiliations. Do not include titles or degrees. If authors are not all at the same institution, use superscript Arabic numerals (1,2,3...etc.) to indicate each author's affiliation.

Asterisk (*) the name of the corresponding author and provide the e-mail address.

ABSTRACT

The Abstract should consist of a single paragraph without subheadings and no more than 200 words., The intent of the study as well as the experimental approach, results, and significance of findings should be described in a concise manner. Footnotes and undefined abbreviations should not be used. Citation of previous work is discouraged; if a citation must be used, the form should be: [Jones, A. (1990) Photochem Photobiol, **58**, 79–83].

The Abstract should give a clear understanding of the paper's content also when read as a stand-alone text.

INTRODUCTION

The Introduction should provide readers with the purpose of the study and a concise review of pertinent literature. An extensive review of the literature should not be presented.

Spell out abbreviations the first time they are used in the text. Abbreviation lists are not printed but can, if necessary, be added as "supporting material".

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures should be described concisely, but with sufficient detail to allow repetition by experienced researchers. Previously published procedures must be cited and any significant variations described. For specialty items and difficult to find commercial vendors please provide the manufacturer's name and location.

RESULTS

A concise description of the results should be given, referring to the figures and tables. Only essential figures and tables should be included; often one or two sentences can be used instead of a simple bar graph. The same data should not be presented in both a figure and a table.

Do not embed figures in the text. Figures should be uploaded separate from the text file. They may all be contained in one file.

Tables, Structures and Schemes should be included in the text file.

Number all illustrations, tables and references in the order they're first cited in the text. Use Arabic numerals for both figures and tables: Fig. 1, Table 1 etc. Indicate the desired location of illustrations and tables in the text in the following manner:

>Figure1<

>Table1<

>Scheme 1<

Use the "Système International d'Unités" (SI) for quantities and units. Non-standard units must be defined. All nomenclature should follow established rules.

DISCUSSION

The Results and Discussion sections can be combined, if the logical sequence of material is improved thereby.

The discussion should be concise and not include unfounded speculation. Do not repeat the results from the previous section.

ACKNOWLEDGEMENTS

Technical assistance, advice from colleagues, gifts and financial support are acknowledged following the Discussion section. Begin at left margin with "*Acknowledgments*"; text of acknowledgment section follows on same line.

Previously published work. If any of the work has been previously published, the reference must be given. It is the author's responsibility to obtain copyright approval and include the appropriate acknowledgements of the original work.

SUPPORTING MATERIAL

Material that is supplementary to the printed text of an article (eg video clips, extra images, tables, lists of abbreviations etc.) can be hosted online with the journal at the discretion of the Editor.

Authors are required to provide a legend (include with your figure legends) explaining the content of the supplementary file(s).

Specific author guidelines for submitting supporting material can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>

If supporting materials are to be posted online, please indicate in the text "(see Supporting Materials)".

Also include the following section in your manuscript before the references:

SUPPORTING MATERIALS

Table Sx and Figure Sx can be found at DOI: xxxx-xxxxxx.s1.

Authors may wish to submit supplementary materials for the intention of the reviewers and associate editors only (not to be posted on the web). In either case you will indicate the audience for whom the files are intended at the time of submission.

REFERENCES

For reference citations in text, use numbers in parentheses in the order of appearance. The references should be listed at the end of the paper, in numerical order. Each citation must have a distinct number (no multiple references). The names of all authors should be given; do not use "et al." in the list of references.

Submitted and in press articles can be included with the references if the journal is identified and complete title given. Provide the DOI number as soon as it is available.

Unpublished information should appear in the text only, as (J. Jones, unpublished data) or (J. Jones, personal communication).

Use the following format, including punctuation, for references (see Chem. Abstracts or Index Medicus for journal name abbreviations). Include both first and last page numbers.

Journal article:

1. Borkman, R. F., J. D. Tassin and S. Lerman (1981) The rates of photodestruction of tryptophan residues in human and bovine lens proteins. *Exp. Eye Res.* 32, 747–754.

Book:

2. Frolik, C.A. and J. A. Olsen (1984) Extraction, separation and chemical analysis of retinoids. In *Retinoids Vol. 1.* (Edited by M. B. Sporn, A. B. Roberts and D. S. Goodman), pp. 182–233. Academic Press, New York.

or

3. Turro, N. J. (1978) *Modern Molecular Photochemistry.* Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

Material Accessed at a Website:

FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004) Tattoos and Permanent Makeup. Available at: <http://www.crsan.fda.gov/~dms/cos-204.html>. Accessed on 1 June 2004.

Thesis or Dissertation:

Käß, H. P. S. (1995) Die Struktur des primären Donators P700 in Photosystem Untersuchungen mit Methoden der stationären und gepulsten Elektronenspinresonanz. Ph.D. thesis, Technische Universität Berlin.

Proceedings:

Kodera, Y. and H. Mino (1992) Pulsed EPR study of tyrosine-Z⁺ in photosystem II. In Research in Photosynthesis, Vol. II, (Edited by N. Murata), pp. 5.57–5.60. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Proceedings of the IXth International Congress on Photosynthesis, Nagoya, Japan, 30 August–4 September 1992.

In Press:

Dewar, M. S. J. and W. Thiel (1997) Ground states of molecules. J. Am. Chem. Soc. (In press, DOI: XXXXX.xxxxxx)

TABLES

Tables should be prepared in Word or imported from Excel and contained in the text file, placed after the references. To label tables, begin at left margin "Table 1." The caption follows immediately on the same line. Use the footnote symbols as described above, beginning with † on each table. If a table has more than six footnotes, double the symbols in sequence: ††, etc. Literature citations are given as in the text (a number in parentheses corresponding to the number in the Reference list).

SCHEMES AND STRUCTURES

All schemes and structures should be included in the text file. Refer to these as schemes and label either as Scheme 1, Scheme 2, etc or bold numbers 1, 2, etc. Structures will, in general, be printed up to 8.3 cm wide. Larger more complex drawings may be printed at up to 16.5 cm in width. All significant details, fonts, super- and subscripts should be clear at this size.

FIGURES

All figures must be uploaded separately from the text, with the figure number indicated.

Preferred formats are: EPS or PDF for line art or combination images, TIFF for photographic images. Office formats may be acceptable but the printed result cannot be guaranteed.

Acceptable resolutions: Line art or combination images should be saved at 600 dpi. The preferred width is 175 mm. Photographic images must have a resolution of 300 dpi at final size.

More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Color figures will be printed free of charge if determined scientifically necessary by the Editor. For printing of optional **color**, the Editorial Office will provide current costs. Color art should be in RGB mode.

Your online publication will contain all figures submitted in color even if not deemed scientifically necessary. If you want to take advantage of this feature, please make sure your figures are of acceptable quality if printed in color or black and white and that the legends are comprehensible in both cases.

Reproduction in the journal will be identical, except for size, to the figure supplied. Flaws cannot be corrected. Figures which in the Editor's opinion will not reproduce well will need to be replaced and could delay publication.

Keep the following points in mind when preparing figures:

Figure legends: Significant experimental details can be given, avoiding repetition of the text. Symbols and abbreviations in legends must agree with those in figures. Abbreviations must also agree with those in the text. Define error bars in figure legends.

Be consistent in the use of **font type and –size** within - and between figures. Arial, Times, Times New Roman and Helvetica are recommended fonts. **Lines** in graph axes and graphs should not be thinner than 0.5 pt.

The standard width for figures is 67–83 mm (one column). Letters, numbering and any symbols on a figure (including inserts) must be large enough to be clearly legible after the figure is reduced to 83 mm width. Authors are strongly encouraged to test the legibility of figures by photocopying them to this size. **A font size** of 10 is suitable for figures of up to 100 mm in width. An original figure size around 100 mm width is preferred. **Maximum length** for an illustration is 235 mm.

Fields filled with dots of varying density (as in many bar graphs) do not reproduce well; use black, white and grey scale colors and well-spaced dashed or solid lines at varying angles.

Do not box or frame graphs, data, schemes, or illustrations.

Use of a third dimension in figures that does not add information is discouraged.

Multi-panel figures: The labels a, b, c etc. must appear within each panel of the figure; use lower-case letters in a size that will be legible when the total figure is reduced in size for printing.

On photos, if black letters do not show up well, use white ones. Add symbols with press-on symbols and letters; handwritten or typed symbols are not acceptable.

Panels should be at same size, whenever possible. Font and font size must be consistent between panels. Arrange panels to minimize repetition of symbol legends and axes labels. Do not leave unnecessary space between panels.

FIGURE SETTINGS: SUMMARY

File	Resolution
------	------------

format			
Line drawings/ graphs	EPS, PDF	= 600 dpi	Lines = 0.5 pts; Font = 10 pts
Black-and white photographs	TIFF	= 300 dpi	
Color photographs	TIFF	= 300 dpi	CMOS
Combination figures	EPS, PDF	= 600 dpi	Lines = 0.5 pts; Font = 10 pts

Before submitting your artwork, perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated.

THE REVIEW PROCESS

Upon submission, the Editor-in-Chief will assign the manuscript to an Associate Editor (AE). The AE requests reviews from experts in the research area and ensures timely review.

Following receipt of the reviewers' reports, the AE makes a decision concerning the publication of the manuscript. A decision letter with copies of the reviewers' reports will be sent to the author. Appeals of AE decisions can be made to the Editor.

Accepted Manuscripts

ACCEPTED ARTICLES

By the "Accepted Article" publication service now used by *Photochemistry and Photobiology* **papers are published online as and when they are ready**, before copyediting and before their ultimate inclusion in a print or online issue. They are immediately given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked. This service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers – they will now appear online

within a few days after acceptance. Once the manuscript is proofread and corrected, the Early View article will be posted and the Accepted Article version removed.

PAGE PROOFS

Page proofs will be created by Wiley-Blackwell and available as PDF files to the corresponding authors about 3 weeks after the publication of the accepted article. Carefully check for errors and respond to all the points raised by the proofreader within the given time-limit.

EARLY VIEW

Early View articles are complete articles published online in advance of their publication in a printed issue. They have been proofread and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. **The appearance on Early View is considered as the publication date and the article will be citable as “published” according to this date.** This is the final version of the article and thus no changes can be made after online publication in Early View.

REPRINTS

A Reprint order form is emailed with the proofs of the manuscript.

AUTHOR SERVICES

Once an accepted article has been received at Wiley-Blackwell, authors may register for Author Services (<http://authorservices.wiley.com>) to **access their article PDF offprint** and enjoy the many other benefits the service offers. For instance, authors may check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. In addition, corresponding authors may enter their co-author's email addresses so that they, also, can receive alerts as the article travels through production and access the final PDF. **All authors**

may also each nominate up to 10 other people to receive free access to their article (i.e., specialists in the field who may be interested in reading/citing the article). Authors are eligible to claim a discount of 25% on all Wiley books. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com> for more details, including information on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

COPYRIGHT

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Anexo II

Increase in the nitric oxide (NO) release without changes in cell viability of macrophages after lasertherapy with 660 and 808 nm lasers.

Abstract

Objective: To evaluate the influence of lasertherapy with different parameters and wavelengths on NO release and cell viability. **Methodology:** Irradiation was performed with Ga-Al-As laser, continuous mode and wavelengths of 660 and 808 nm at different energy densities and power densities. For each wavelength, powers of 30, 50 and 100 mW and times of 10, 30 and 60 seconds were used. NO release was measured using Griess reaction and cell viability was evaluated by mitochondrial reduction of bromide 3-[4,5-dimethylthiazol-2-il]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to formazan. **Results:** Lasertherapy promoted changes in NO release and MTT value only at the wavelength of 660 nm ($p < 0,05$). Promoted an increase in the NO release and cell viability when the energy densities 64 ($p = 0,04$) and 214 J/cm² ($p = 0,012$), respectively, were used. **Conclusion:** LLLT with 660 nm laser promoted increase in the NO release without affecting cell viability when the energy density of 64 J/cm² was used.

Key words: lasertherapy, nitric oxide, NO, MTT, macrophages, inflammation.

Introduction

Lasertherapy or Low Level Laser Therapy (LLLT) consists of the use of low light irradiances capable of influencing cell behavior by means of photobiomodulation, either stimulating or inhibiting cell behavior (1). Within the medical-dental therapeutic arsenal, LLLT has been shown to be effective in the treatment of different diseases through its the anti-inflammatory, analgesic and tissue biostimulatory effects (2). LLLT accelerates the healing process, as it promotes an increase in collagen fiber synthesis and fibroblast proliferation (3, 4, 5) by stimulating the secretion of growth factors for these cells (6, 7).

In addition, the following are effects promoted by LLLT, enabling faster, efficient repair to occur with fewer painful symptoms due to the modulation of inflammation: the release of a endogenous opioids (8), reduction in prostaglandins (PGE-2) (9), reduction in cyclooxygenase 2 (COX-2) expression (9) and edema by the action on microcirculation and activation of the lymphatic system (10). LLLT produces an anti-inflammatory effect by inhibiting leukocyte differentiation, cell and plasma exudation, as well as a reduction in the secretion of substances such as IL-6, MCP-1, IL -10, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide (NO) (11, 12, 13). In the reduction of NO, LLLT changes the functioning of enzyme NO synthase (NOS) (14) in addition to stimulating the production of other factors involved in the cure process, such as PDGF and TGF- β (15).

NO is a soluble gas permeable to membrane, which performs different biologic functions in numerous physiological processes, including vasodilatation, neurotransmission and inflammation (16, 17). NO production is associated with NOS enzyme activity, which may be found in 3 isoforms: induced NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (18). In inflammation, NO is an inflammatory modulator produced from the amino acid L-arginine by iNOS enzyme activity in an equimolar reaction with O₂, NADPH and L-citrulline production (19). The NO produced by macrophages, as a result of iNOS enzyme activity functions as a tumoricidal and antimicrobial molecule both *in vivo* and *in vitro* (17,20). This is a highly toxic molecule to infected cells and pathogenic agents, as it enters into the cells and inactivates the proteins

that are important for energy production, transduction of signals and synthesis of nucleic acids, causing cell death (21).

Innumerable studies have been conducted about the influence of LLLT on inflammation (13), however, the treatment protocols involve enormous variations in the parameters used, making it difficult to evaluate the response attained (22). Furthermore, the diversity of methodologies and the predominantly subjective evaluation of pre-clinical and semi-qualitative studies about the use of LLLT in different studies, have contributed to the fact that many results have not been considered reliable (1). Quantitative and reliable pre-clinical models have been used in the study and determination of the role of LLLT in different situations (23). As an example of these, LLLT realizes the activation of macrophages *in vitro* by lipopolysaccharides (LPS) that simulate an inflammatory response by the synthesis of a variety of inflammatory mediators, such as cytokines, chemiokines and NO (24). Therefore, in order to continue contributing to the study of the influence of LLLT on the inflammatory response, the proposal in this study was to evaluate the influence of lasertherapy with different parameters and wavelengths 660 and 808 nm, on NO release and the cell viability of macrophages in culture.

Methodology

Cell Cultures and Study Groups

Cells from the RAW 264.7 cell line, mouse monocytes/macrophages were cultivated in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, SP, Brazil) supplemented with 1% penicillin and streptomycin (Sigma-Aldrich, SP, Brazil), in addition to 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma-Aldrich, SP, Brazil). The cells were subcultivated every two days and incubated in a CO₂ chamber at 5% and temperature of 37°C. Before irradiation with laser the cells were treated with RPMI-1640 medium and fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, SP, Brazil), and afterwards were transferred to 96-well culture plates (Biosystems, PR, Brazil) in a volume of 100 ul per well, promoting a cell density

of 10^6 cells/ml. After this, they were left to rest for 4 h in order to promote their adhesion to the bottom of the wells.

A strain of murine macrophages (RAW 264.7), acquired in Cell Bank of Rio de Janeiro-BCRJ, cultured (5×10^6 cells/5ml) in culture bottles (25 cm², TPP, Biosystems Cabral, PR, Brazil) with DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) to the low concentration of glucose (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Life Technologies do Brazil LTDA, São Paulo, SP, Brazil), penicillin (100 U/ml) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) and streptomycin (100 mg/ml) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) in a 37°C incubator with humidified atmosphere and 5% CO₂ (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil).

To study the effects of LLLT on the production of nitric oxide and cell viability, a control group consisting of non-irradiated macrophages and activated with LPS and eighteen experimental groups (chart 1), also consisting of macrophages activated with LPS were defined, but irradiated with Ga-Al-As diode laser at different wavelengths using different power and exposure times. Twelve wells were irradiated macrophages by treatment in independent experiments for each group (n=12).

Chart 1: Wavelengths, powers, irradiation times, energy densities and power densities used in the different study groups.

Wavelengths	Power	Irradiation time	Energy density	Power density	Study groups
-	-	-	-	-	Controle
660nm	30mW	10 s	11 j/cm ²	1,07W/cm ²	660/30/10
		30 s	32 j/cm ²	1,78 W/cm ²	660/30/30
		60 s	64 j/cm ²	3,58 W/cm ²	660/30/60
	50mW	10 s	18 j/cm ²	1,07 W/cm ²	660/50/10
		30 s	53 j/cm ²	1,78 W/cm ²	660/50/30
		60 s	107 j/cm ²	3,58 W/cm ²	660/50/60
	100mW	10 s	32 j/cm ²	1,07 W/cm ²	660/100/10
		30 s	107 j/cm ²	1,78 W/cm ²	660/100/30
		60 s	214 j/cm ²	3,58 W/cm ²	660/100/60
808nm	30mW	10 s	11 j/cm ²	1,07 W/cm ²	808/30/10
		30 s	32 j/cm ²	1,78 W/cm ²	808/30/30
		60 s	64 j/cm ²	3,58 W/cm ²	808/30/60
	50mW	10 s	18 j/cm ²	1,07 W/cm ²	808/50/10
		30 s	53 j/cm ²	1,78 W/cm ²	808/50/30
		60 s	107 j/cm ²	3,58 W/cm ²	808/50/60
	100mW	10 s	32 j/cm ²	1,07 W/cm ²	808/100/10
		30 s	107 j/cm ²	1,78 W/cm ²	808/100/30
		60 s	214 j/cm ²	3,58 W/cm ²	808/100/60

⁺ Spot laser: 0,028 cm²

Laser Irradiation

Before irradiation, to prevent the passage of light to the neighboring wells, a bulkhead alginate (Jeltrate®, Dentsply) was made for each plate to be irradiated. The handling of alginate was performed according to the manufacturer's specifications and the entire bulkhead preparation was performed prior to placing the cells in the wells from the bottom of the plates. No evidence of contamination was observed during the experiment.

Twelve hours before irradiation, macrophages were plated at a density of 1×10^6 /ml in culture plates (TPP Biosystems, Cabral, PR, Brazil) containing 96 wells (5×10^5 /100µl/well). Immediately before irradiation, macrophages were activated by the addition of 1 mg/ml of lipopolysaccharide (LPS) from

Escherichia coli O55: B5 (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) prepared in PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, SP, Brazil). After irradiation the cells were incubated at 37°C with humidified atmosphere and 5% CO₂ (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) for 24 h for measurement of nitric oxide production and cell viability.

Irradiation was performed with a Ga-Al-As diode laser (Photon Laser III, DMC®), continuous mode and wavelengths (λ) of 660 and 808 nm at different energy densities (ED) (J/cm²) and power densities (PD) (W/cm²). Laser irradiation was performed 20 minutes after placing LPS in the wells. For each power settings (P) of 30mW, 50mW and 100mW, the exposure times (T) of 10, 30 and 60 seconds (s) were used in the two wavelengths. Before irradiation, the P of the appliance was measured by means of a Multifunction Optical Meter (model 1835C; Newport Corp., Irvine, CA, USA). The wells of each plate were irradiated in one single way, using the parameters proposed at only one of the wavelengths available.

Nitric Oxide Release

NO production was assessed by the Griess method which is based on the measurement of NO by nitrite determination accumulated during the incubation period of the cells in culture. After 24 h incubation the cells, the supernatant (50 μ l) was mixed with an equal volume of Griess reagent (a mixture of 1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylene in 5% orthophosphoric acid; Sigma-Aldrich, GB, Brazil). Following 10 min of reaction at room temperature, the absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader (spectrophotometer BEL Photonics 1105, Tecnal, SP, Brazil). The concentration of nitrite was calculated from data of a standard curve of sodium nitrite and NO production results were expressed in nmol nitrite/5x10⁵ cells. All samples were compared to a blank corresponding to DMEM incubated for 24 h on plates of the same samples, but in the absence of cells.

Cell Viability

Cell viability was assessed by MTT method (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), which is based on measuring the activity of living cells through reduction of MTT to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases. The formazan is solubilized and measured by spectrophotometry. After 24 h of incubation, cells received 5 μ l MTT (Sigma - Aldrich, SP, Brazil)/well (0.5 mg/ml of PBS - Sigma - Aldrich, SP, Brazil) and 50 μ l of DMEM (Sigma - Aldrich, SP, Brazil)/well and incubated for 2 h in an oven at 37°C with humidified atmosphere and 5% CO₂ (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). Next, the resulting formazan crystals were solubilized by addition of 50 μ l/well of sodium dodecyl sulphate (SDS - Sigma-Aldrich, SP, Brazil). 1h after solubilization at room temperature, the absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader. The results were expressed as cell viability formazan absorbance per 5x10⁵ cells

Statistical Analysis

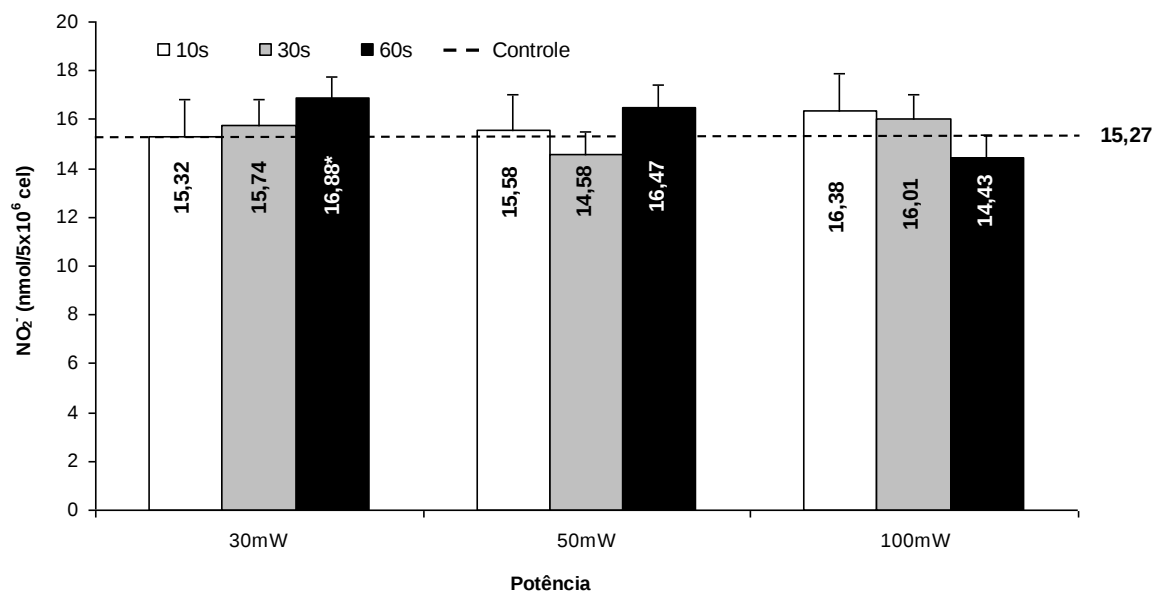
Analyses were performed for the λ 660 and 808 nm within the different parameters, in an independent manner, fixing P and varying T. In this case, the Analysis of Variance (ANOVA), with the Bonferroni post-test was used for comparison of the means. When the comparison was made between the lasers, the comparison of means was performed by the Student's-t test for each combination of P, T. The statistical significance adopted was 5% ($p < 0.05$) and the software program used for analysis of all the data was STATA version 12.0.

Results

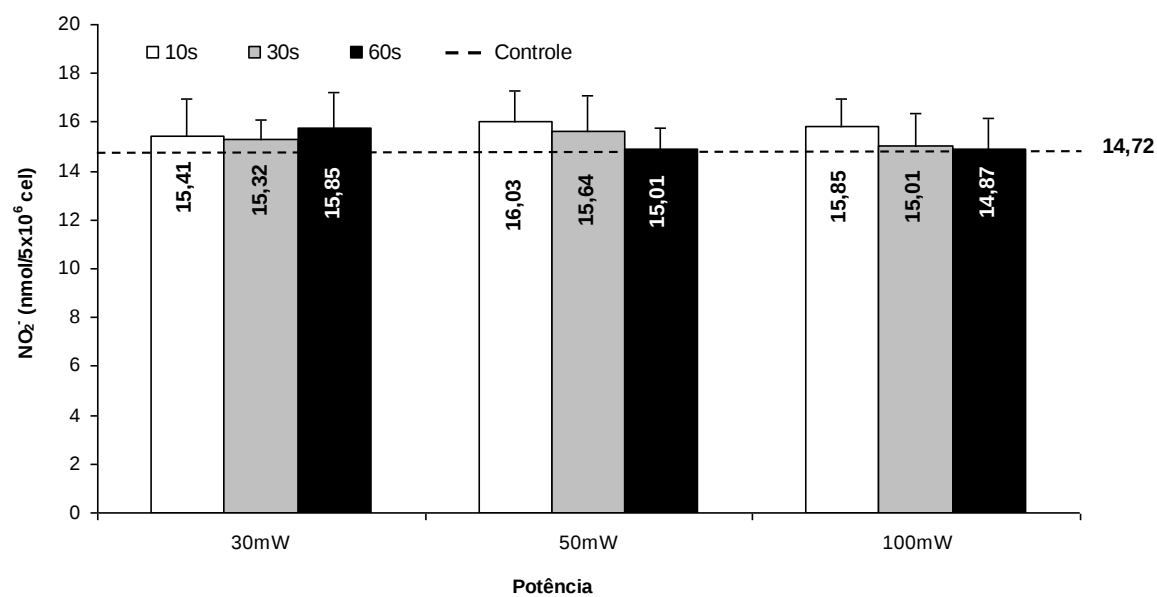
The NO values in the different parameters, fixed potential and varying exposure times, are available in graphs 1A and 1B.

Graphics 1A and 1B: Values of NO when used lasers 660 and 808 nm at different irradiation times fixed powers 30 mW, 50 mW and 100 mW. A – 660 nm laser; B – 808 nm laser.

A)



B)



* Statistical significant difference ($p < 0,05$)

Statistically significant differences were found only at λ 660 nm and in all the combinations of T when P was fixed at 30 mW ($p=0.034$), 50 mW ($p=0.025$) and 100 mW ($p=0.017$), but in comparison with the control group, there was significant difference only for the parameter 30 mW/60 s (64 j/cm^2 ; $3,58 \text{ W/cm}^2$) ($p=0.04$) promoting an increase in the NO value. When the NO values were compared among them, using λ 660 nm with the parameters 50 mW/30 s (53 j/cm^2 ; $1,78 \text{ W/cm}^2$) and 50 mW/60 s (107^+ j/cm^2 ; $3,58 \text{ W/cm}^2$), significant difference was observed between them ($p=0.019$) with an increase in the NO value at the latter ED, however, none of them showed significant difference in comparison with the control group. Significant difference ($p=0.02$) was also observed in the comparison between the parameters 100 mW/10 s (36 j/cm^2 ; $1,07 \text{ W/cm}^2$) and 100 mW/60 s (214 j/cm^2 ; $3,58 \text{ W/cm}^2$) in which a reduction in NO values was observed, however, none of these parameters promoted statistically significant difference in comparison with the control group.

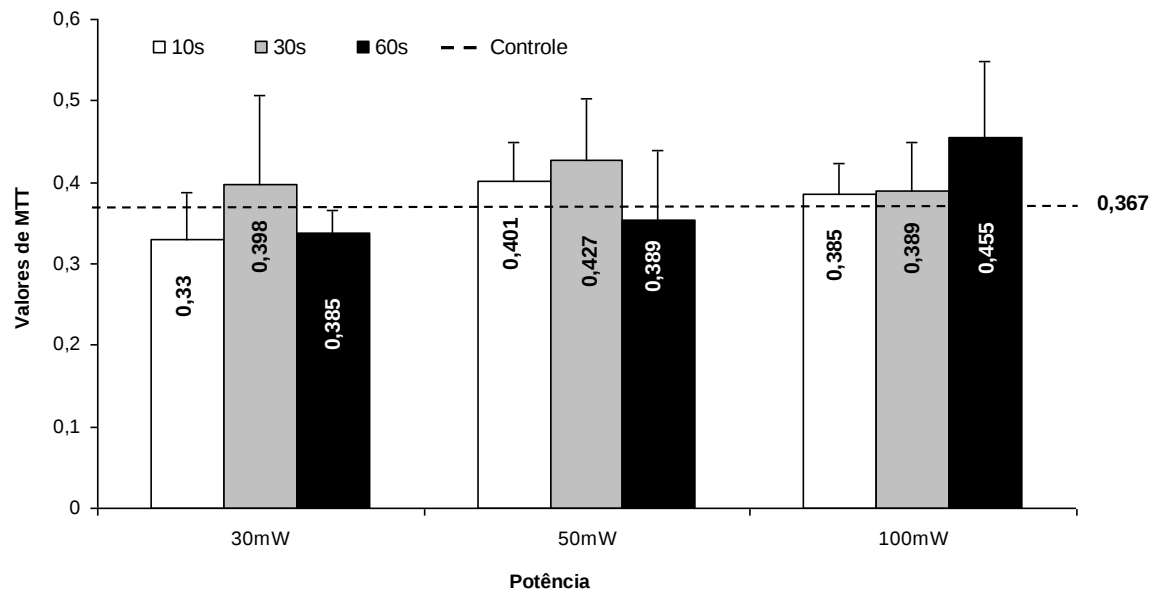
When the NO values were compared between the two λ , significant differences were found when 30 mW/60 s (64 j/cm^2 ; $3,58 \text{ W/cm}^2$) ($p=0.037$) and 50 mW/60 s (107^+ j/cm^2) ($p=0.002$) were used. At both of the λ , the ED 64 j/cm^2 promoted an increase in the NO value, and it was more accentuated at λ 660 nm, however, only at this latter λ was the increase statistically significant in comparison with the control group. When the ED 107^+ j/cm^2 was used, there was an increase in NO release when λ 660 nm was used, and a reduction when λ 808 nm was used, however, at neither of the two λ used were these values statistically different in comparison with the control group as regards the NO values at this ED.

MTT Values

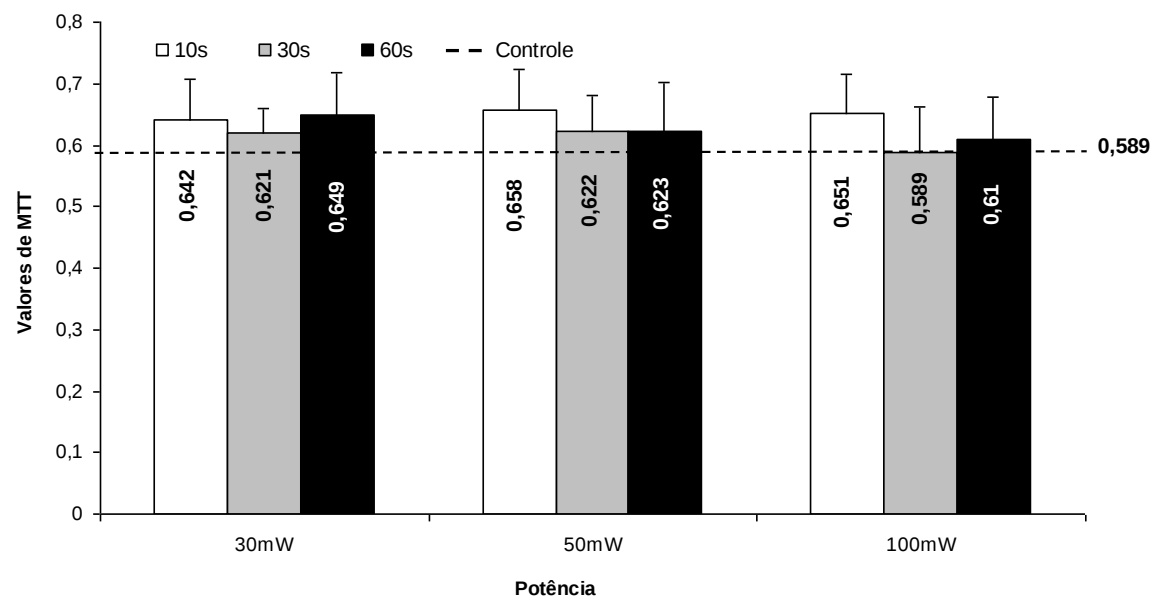
The MTT values in the different parameters, the potential fixed and varying exposure times, are available in graphs 2A and 2B.

Graphics 2A and 2B: Values of MTT when used lasers 660 and 808nm at different irradiation times fixed powers 30 mW, 50 mW and 100 mW. A – 660 nm laser; B – 808 nm laser.

A)



B)



* Statistical significant difference ($p < 0,05$)

The MTT values promoted statistically significant difference only at λ 660 nm when P was fixed at 100 mW ($p=0.011$), however, in comparison with the control group, statistically significant difference was only observed when 100 mW/60 s (214 J/cm^2) ($p=0.012$) was used, in which an increase in the MTT value was observed. There was no statistically significant difference between the MTT values when λ 808 nm was used.

Discussion

MTT is a calorimetric assay widely used at present for the evaluation of cell proliferation and viability, when cells are exposed to drugs, chemical products and different items of equipment, such as lasers, for example (25, 26). In the present study, the analysis of MTT values demonstrated that cell viability was only influenced by the use of laser at λ 660 nm. The exclusive action of λ 660 nm on the MTT values in this study by be explained by the spectrum of action. The spectrum of action is the physiological activity resulting from the type of λ of light, showing which of the λ are more effective in a specific chemical reaction (27). It is believed that the biostimulatory effect of laser therapy, depending on the λ used, is based on the absorption of light in the interval of the visible red and close infrared (600 nm – 950 nm) promoting the activation of a cascade of photochemical reactions in the cells (27, 28). Thus, the photons are absorbed by chromophores within the different cell structures, such as the mitochondria, cell nucleus and membrane, triggering responses that may influence the cell proliferation and viability (1). It is possible that the use of laser at λ 808nm did not influence cell viability due to the fact that it is not a λ capable of triggering the photobiostimulating effect on the cells used in this experiment.

The explanation for the increase in cell viability when cells were only exposed to a PD 3.58 W/cm^2 ($p<0,05$) can be given by law of Arndt-Schulz. The law of Arndt-Schulz, frequently related as an adequate model for describing the effects dependent on the light parameters (29). The principle of this law postulates that weak stimuli slightly accelerate the vital activity, and stronger stimuli increase it until a peak is reached. Very strong stimuli suppress the

effect, with a negative response appearing. Within the context of LLLT, the stimulus may be the irradiation T or PD. Thus, if the irradiation is insufficient, there will not be a response because a minimum limit for reaching the effects of LLLT was not reached. If more irradiation were performed, then the minimum limit would be reached for observation of the biostimulatory effect. However, if this stimulation were far greater than was necessary, the stimulation disappears and gives way to biosuppression (27, 29). The PD 3.58 W/cm^2 promoted an increase in the MTT values statistically significant compared to the control group, thus this PD may be the minimum limit responsible for the effect of LLLT on the increase in cell viability.

Analysis of the NO values demonstrated that its release was also exclusively influenced by the use of laser at λ 660 nm. The results were similar to those of Moriyama (23) who evaluated the influence of LLLT at different λ on iNOS expression, and found statistical difference, increase in iNOs expression in comparison with the non irradiated control group, only when the λ 635 nm was used. Various studies have demonstrated that λ between 600 and 700 nm corresponded to the spectrum of action where the light is absorbed by photoreceptors in the respiratory chain, stimulating the increase in synthesis of different substances, among them NO by stimulating the expression of iNOS (30, 31, 32, 33, 34). Thus, as in the cell viability, once again the concept of the spectrum of action explains the influence of only one of the λ used, on the release of NO.

The ED represents the quantity of energy per unit of area delivered to the material, tissue or cells in culture, whose values vary in relation to the P and the T of irradiation used (27). There are reports in the literature in which the T of irradiation is a relevant factor for obtaining good results with LLLT (35, 36). The results corroborate this affirmation, because statistically significant differences were found only at λ 660 nm and in all the combinations of T when P was fixed at 30, 50 and 100 mW, however, in comparison with the control group, there was significant difference only in the parameter 30 mW/60 s (64 J/cm^2)($p=0.04$) in which an increase in the NO value was observed.

LPS is considered one of the most well characterized macrophage activator signals (37). In the inflammatory response, the activation of macrophages by LPS results in the release of large quantities of NO and cytokines, such as the TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (38). When large quantities of NO are produced in inflammation, part of it is oxidized generating dinotrogen trioxide (N₂O₃), and part of it reacts with the superoxide anion (O⁻²), a reactive oxygen species, forming peroxynitrite (ONOO⁻), a reactive nitrite species (39, 40). This reaction is 6 times faster than the reaction between O⁻² and the enzyme superoxide dismutase (SOD), responsible for the reduction in O⁻² and therefore considered an inflammatory biomarker of antioxidant action (19, 39). The increase in the quantity of O⁻² and the presence of ONOO⁻ results in oxidative stress thereby contributing to the pathogenesis of inflammation and cell death (40).

A large portion of the studies that deal with the anti-inflammatory effect of LLLT have discussed its effect on the release of different chemical mediators involved in inflammation, reporting an increase or reduction in these, as well as proving the pro- or anti-inflammatory effect of LLLT. Albertini (11) demonstrated that LLLT, using a λ of 660 and 694 nm and 7.5 j/cm², promoted an anti-inflammatory effect, by virtue of the reduction in the expression of RNA_m for IL-1 β , IL-6 and TNF- α . The anti-inflammatory effect of LLLT was studied by Lima (12), using a diode laser at a λ of 660 nm, P of 30 mW and beam diameter of 0,08 cm², and observed an increase in IL-10 release and reduction in TNF- α release.

Lima (14) evaluated the anti-inflammatory effect of LLLT, using a laser of 660 nm and 7.5 j/ cm². Their results indicated that the control of inflammation occurs due to the capacity of lasertherapy to diminish the levels of TNF- α and expression of RNA_m for iNOs, in addition to stimulating the release of IL-10. The effect of lasertherapy on reducing NO release was shown by Dávila (40), using HeNe (λ 632.8 nm and 5 mW) and GaAs (λ 904 nm and 12 mW) lasers for 1 and 47 s per session, respectively, totaling 9.5 j/cm² of energy in each laser. Boshi (13) in addition to having observed a reduction in the release of IL-6, IL-10 and NO, affirmed that the phenomenon of cell exudation and neutrophil

migration has a close relationship with the levels of TNF- α and NO in the inflamed tissue, showing that the anti-inflammatory mechanism of LLLT is related to control of the levels of these inflammatory mediators and suggesting laser therapy as a clinical alternative to pharmacological treatment.

In spite of the above mentioned studies having associated the anti-inflammatory effect of LLLT to the increase (IL-10) and/or reduction in (IL-1 β , IL-6, TNF- α e NO) the release of some mediators, the results differed from these conclusions, because with regard to nitric oxide, there was an increase in its release with a reduction in cell viability when the ED 64 j/cm² was used. The explanation for this behavior may be given by the ED values used in this experiment. High quantities of energy may stimulate the release of TNF- α (53) triggering the activation of an increase in the release of pro-inflammatory cytokines, including NO. Moreover, LLLT for therapeutic purposes must be performed with ED lower than 10 j/cm² (28, 54). In this study the lowest ED used was 11 j/cm², in which a reduction in the NO value was observed with the laser of 660 nm, however, without significance in comparison with the control group.

Despite having shown an outcome contrary to the expected therapeutic effects of LLLT, increase in the NO value when the DE 64 j/cm² was used can not be interpreted as an detrimental effect of LLLT because cell viability was not altered. There are studies that show the protective role of nitric oxide in some situations by increasing in its release (17, 23). Gavish (56) demonstrated that LLLT using laser of 780 nm and 2 J/cm² increases collagen synthesis by muscle cells in swine aortas (56). It has also been demonstrated that the addition of exogenous NO to smooth muscle cells increases the extracellular collagen synthesis (57) and promotes angiogenesis by the stimulation and release of VEGF by cells of the smooth and striated cardiac muscles in rats (58) and in human endothelial cells (59). Tuby (60) using similar parameters (diode laser, 808 nm, 1.5 j/cm²) demonstrated that LLLT stimulated VEGF and iNOS expression as well as angiogenesis in an acute myocardial infarction model. From these data, Gavish (24) demonstrated that the increase in NO release from LLLT (780 nm, 2 mW/cm², 2.2 j/cm²) in RAW 264.7 cells stimulated by

LPS promoted an increase in collagen synthesis in the smooth muscles of vessels in addition to promoting angiogenesis, proving the non inflammatory effect exerted by the stimulation of nitric oxide release.

Conclusion

In conclusion, LLLT promoted changes in nitric oxide release and in cell viability only at the wavelength of 660 nm. In addition, LLLT promoted an increase in NO release without affecting cell viability when the energy density of 64 J/cm² was used.

References

1. Moriyama, Y.; Nguyen, J.; Akens, M.; Moriyama, E.; Lilge, L.(2009) In Vivo Effects of Low Level Laser Therapy on Inducible Nitric Oxide Synthase Lasers in Surgery and Medicine. 41, 227–231.
2. Pinheiro, S.L.; Donegá, L.M.; Seabra, L.M.S.; Adabo, M.D.; Lopes. T.; Dias do Carmo, T.H.; Ribeiro, M.C.; Bertolini, P.F.R. (2010) Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets. Lasers Med Sci. 25, 87–91.
3. Frozanfar, A; Ramezani, M; Rahpeyma, A; Khajehahmadi, S; Arbab, H. R. (2013)The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. Iran J Basic Med Sci. 16, 1071-1074.
4. Almeida Lopes, L; Rigau, J; Zangaro, R. A; Guidugli-Neto, J; Jaerger, M.M. (2001) Comparasion of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. Lasers surg Med. 29, 179-184.
5. Kreisler, M; Christoffers, A.B; Al-Haj, H; Willershausen, B; d’Hoedt, B. (2002) Low level 809 nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. Lasers Surg Med. 30, 365-392.
6. Rocha Jr, A.M; Andrade, L.C.F; Oliveira, R.G; Aarestrup, F.M; Farias, R.E. (2006) Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. An Bras Dermatol. 81, 150-156.
7. Ribeiro, M.S; Da Silva, D de F; De Araujo, C.E; De Oliveira, S.F; Pelegrini, C.M; Zorn, T.M. (2004) Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. J Clin Laser Med Surg. 22, 59-66.

8. Hagiwara, S; Iwasaka, H; Hasegawa, A; Noguchi, T. (2008) Pre-Irradiation of blood by gallium aluminum arsenide (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Anesth Analg.* 107, 1058-1063.
9. Mizutani, K; Musya, Y; Wakae, K; Kobayashi, T; Tobe, M; Taira, K; Harada, T. (2004) A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 22, 537-539.
10. Meneguzzo, D.T; Lopes, L.A.; Pallota, R.; Soares-Ferreira, L.; Lopes-Martins, RÁ; Ribeiro, M.S. (2013) Prevention and treatment of mice paw edema by near-infrared low-level laser therapy on lymph nodes. *Lasers Med Sci.* 28, 973-980.
11. Albertini, R.; Villa Verde, A.B.; Aimbire, F.; Bjordal, J.M.; Brugnera, A.J.; Mittmann, J.; Silva, J.A.J.; Costa, M.S. (2008) Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy (LLLT). *Photomed. Laser Surg.* 26, 19–24.
12. Lima, F.M.; Villaverde, A.B.; Albertini, R.; Corrêa, J.C.; Carvalho, R.L.P.; Munin, E.; Araújo, T.; Silva, J.A.; Aimbire, F. (2011) Dual effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers Surg. Med.* 43, 410–420.
13. Boschi, E.S.; Leite, C.E.; Saciura, V.C.; Caberlon, E.; Lunardelli, A.; Bitencourt, S.; Melo, D.A.; Oliveira, J.R. (2008) Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Lasers Surg Med.* 40, 500-508.
14. Lima, F.M.; Vitoretto L.; Coelho F.; Albertini, R.; Breithaupt-Faloppa, A.C.; Lima, W.T.; Aimbire, F. (2013) Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. *Lasers Med. Sci.* 28, 551–564.
15. Safavi, S.M; Kazemi, B; Esmaeili, M.; Fallah, A.; Modarresi, A.; Mir, M. (2008) Effects of low-level He–Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1b, TNF-a, IFNc, TGF-b, bFGF, and PDGF in rat's gingival. *Lasers Med. Sci.* 3, 331– 335.
16. Lowenstein, C.J.; Padalko, E. (2004) iNOS (NOS2) at a glance. *J Cell Sci.* 117, 2865–2867.
17. Nathan, C. (2002) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J.* 6, 3051-3064.
18. Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357, 593-615.

19. Servetto, N.; Cremonezzi, D.; Simes, J.C; Moya, M.; Soriano, F.; Palma, J.A.; Campana, V.R. (2010) Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med.* 42, 577-583.
20. Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2, 907-916.
21. Lancaster, J. R. (1992) "Nitric oxide in cells". *American Scientist.* 80, 248-259.
22. Tune'r , J.; Hode, L. (2002) *Laser therapy: Clinical practice and scientific background.* Sweden: Prima Books.
23. Moriyama, Y.; Moriyama, E. H.; Blackmore, K.; Akens, M. K.; Lilge, L. (2005) *In Vivo Study of the Inflammatory Modulating Effects of Low-level Laser Therapy on iNOS Expression Using Bioluminescence Imaging.* *Photochemistry and Photobiology,* 8, 1351-1355.
24. Gavish, L.; Perez, L. S.; Reissman, P. (2008) Irradiation With 780 nm Diode Laser Attenuates Inflammatory Cytokines but Upregulates Nitric Oxide in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages: Implications for the Prevention of Aneurysm Progression. *Lasers in Surgery and Medicine.* 40, 371–378, 2008.
25. van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. (2011) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 731, 237-245.
26. Huang, T. H.; Lu, Y.C.; Kao, C.T. (2012) Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. *Lasers Med Sci.* 27, 621–627.
27. Silva Garcez, A.; Simões Ribeiro, M.; Núñez, S. C. (2012) *Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na Odontologia.* Rio de Janeiro: Elsevier.
28. Novoselova, E. G.; Glushkova, O. V.; Cherenkov, D. A.; Chudnovsky, V. M.; Fesenko, E. E. (2006) Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 22, 33–38.
29. Huang, Y.-Y.; Chen, A.C.H.; Carrol, J.D.; Hamblim, M.R. (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose response.* 7, 358-83.
30. Albertini, R.; Aimbire, F. S. C.; Correa, F. I.; Ribeiro, W.; Cogo, J. C.; Antunes E.; Teixeira S. A.; De Nucci G.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Zangaro R. A.; Lopes-Martins, R. A. B. (2004) Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J. Photochem. Photobiol.* 74, 101-107.

31. Karu, T. (2003) Low power laser therapy. In Biomedics Photonics Handbook. Boca Raton, FL: CRC Press, Tennessee.
32. Kroncke, K. D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V. (1997) Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? Nitric Oxide. 1, 107-120.
33. Wilden, L.; Karthein, R. (1998) Import of phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. J. Clin. Laser Med. Surg. 16, 159-165.
34. Wahl, S. M.; McCartney-Francis N.; Chan, R. Dionne J.; Ta, L.; Orenstein J. M. (2003). Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? Cells Tissues Organs. 174, 2633.
35. van Breugel, H.H.; Bär, P.R. (1992) Power and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med. 12, 528-537.
36. Azevedo, L.H.; de Paula Eduardo, F.; Moreira, M.S.; de Paula Eduardo, C.; Marques, M.M. (2006) Influence of different Power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. Laser Med Sci. 21, 86-89.
37. Raetz, C.R.; Ulevitch, R.J.; Wright, S.D.; Sibley, C.H.; Ding, A.; Nathan, C.F. (1991) Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. Faseb j. 5, 2652–2660.
38. Wu, C-H.; Chen, T-L.; Chen, T-G.; Ho, W-P.; Chiu, W-T.; Chen, R-M. (2003) Nitric Oxide Modulates Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. J Trauma. 55, 540 –545.
39. Sies, H. (2007) Biological redox systems and oxidative stress. Cell Mol Life Sci. 64, 2181–2188.
40. Dávila, S.; Vignola, M. B.; Cremonuzzi, D.; Simes, J. C.; Soriano, F.; Campana, V. R. (2011) Low level laser therapy on experimental myopathy. Laser Therapy. 20, 287-292.
41. Madan, B.; Mandal, B.C.; Kumar, S.; Ghosh, B. (2003) *Canscora decussata* (Roxb.) Schult (Gentianaceae) inhibits LPS-induced expression of ICAM-1 and E-selectin on endothelial cells and carrageenan-induced paw-edema in rats. J Ethnopharmacol. 89, 211–216.
42. Schroder, A.K.; Von der Ohe, M.; Kolling, U. (2006) Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. Immunology. 119, 317–327.

43. McInnes, I.B.; Al Mughales, J.; Field, M. (1996) The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nature Med.* 2, 175–182.
44. Sebbag, M.; Parry, S.L.; Brennan, F.M.; Feldmann, M. (1996) Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumour necrosis factor- α , but not interleukin-10: Possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 27, 624–632.
45. McInnes, I.B.; Liew, F.Y. (2005) Cytokine networks—towards new therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 1, 31–39.
46. Brennan, F.M.; Maini, R.N.; Feldmann, M. (1998). Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 20, p. 133–147.
47. Feldmann, M.; Brennan, F.; Maini, R.N. (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 14, 397–440.
48. Drapier, J.C.; Wietzerbin, J.; Hibbs, J.B. (1988) Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 18, 1587–1592.
49. Corradin, S.B.; Fasel, N.; Buchmuller-Rouiller, Y.; Ransijn, A.; Smith, J.; Mauel, J. (1993) Induction of macrophage nitric oxide production by interferon- γ and tumor necrosis factor- α is enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 23, 2045–2048.
50. Gadiant, R.A.; Patterson, P.H. (199) Leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells.* 17, 127–137.
51. Frode, T.S.; Souza, G.E.P.; Calixto, J.B. (2002) The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 17, 149–156.
52. Opal, S.; DePalo, V. (2002) Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 117, 1162–1172.
53. Aimbire, F.; Albertini, R.; Pacheco, M.T.; Castro-Faria-Neto, H.C.; Leonardo, P.S.; Iversen, V.V.; Lopes-Martins, R.A.; Bjordal, J.M. (2006) Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 24, 33–37.
54. Vladimirov, Y. A, A. N.; Klebanov, G. I. (2004) Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. Review. *Biochemistry.* 69, 81-90.

55. Lindgård, A.; Hultén, L. M.; Svensson, L.; Soussi, B. (2007) Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human Monocytes. *Lasers Med Sci.* 22, 30–36.
56. Gavish, L.; Perez, L.; Gertz, S.D. (2006) Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med.* 38, 779–786.
57. Schmidt, A.; Geigenmueller, S.; Voelker, W.; Seiler, P.; Buddecke, E. (2003) Exogenous nitric oxide causes overexpression of TGFbeta1 and overproduction of extracellular matrix in human coronary smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 58, 671–678.
58. Kuwabara, M.; Kakinuma, Y.; Ando, M.; Katare, R.G.; Yamasaki, F.; Doi, Y.; Sato, T. (2006) Nitric oxide stimulates vascular endothelial growth factor production in cardiomyocytes involved in angiogenesis. *J Physiol Sci.* 56, 95–101.
59. Papapetropoulos, A.; García-Cardeña, G.; Madri, J.A.; Sessa, W.C. (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 15, 3131–3139.
60. Tuby, H.; Maltz, L.; Oron, U. (2006) Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med.* 38, 682–688.