



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
SAMANTHA CARDOSO DE ANDRADE

**A LASERTERAPIA EM BAIXA POTÊNCIA AUMENTA A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO EM MACRÓFAGOS EM CULTURA**

VIRTUS IMPAVIDA

Recife – PE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
AREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA INTEGRADA
SAMANTHA CARDOSO DE ANDRADE

**A LASERTERAPIA EM BAIXA POTÊNCIA AUMENTA A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO EM MACRÓFAGOS EM CULTURA**

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

Orientador: Prof. Jair Carneiro Leão, PhD

Co-orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Wylla Tatiana Ferreira e Silva

Recife – PE

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A553I

Andrade, Samantha Cardoso de.

A laserterapia em baixa potência aumenta a liberação de óxido nítrico em macrófagos em cultura / Samantha Cardoso de Andrade. – Recife: O autor, 2013.

46 f. : il.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Jair Carneiro Leão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Pós-graduação em Odontologia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. Bioestimulação a laser. 3. Inflamação. 4. Macrófagos. 5. Óxido nítrico. I. Leão, Jair Carneiro (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2013-024)

Ata da 128ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 07 de fevereiro de 2013.

Às 9hs (nove horas) do dia 07 (sete) do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze, reuniram-se no auditório da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, atuando como presidente, Prof. Dr. RAUL MANHÃES DE CASTRO, atuando como primeiro examinador. Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“EFEITO DO LASER DE BAIXA POTENCIA SOBRE A LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS RAW 264.7.”** da CD. SAMANTHA CARDOSO DE ANDRADE, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação do Prof. Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO, Co-orientadora Profa. Dra. WILLA TATIANA FERREIRA E SILVA. Dando início aos trabalhos a Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias das Normas do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. A presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a candidata para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se à disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. RAUL MANHÃES DE CASTRO, **(APROVADA)**, Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS, **(APROVADA)**, Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, **(APROVADA)**, a candidata recebeu três conceitos **(APROVADA)** é considerada **APROVADA**, devendo acatar as sugestões da Banca Examinadora, face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia desde 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, o Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar foi lavrada a presente ata que vai por mim assinada, Oziclere Sena de Araújo e pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE, **SAMANTHA CARDOSO DE ANDRADE**.

Recife, 07 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. ALESSANDRA DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO
Presidente

Prof. Dr. RAUL MANHÃES DE CASTRO
1º Examinador

Orientador:

Prof. Dr. LUIZ ALCINO MONTEIRO GUEIROS
2º Examinador

Mestrando:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM CLÍNICA INTEGRADA

COLEGIADO

MEMBROS PERMANENTES

Profa. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof.Dr. Arnaldo de França Caldas Junior

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof.Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Edvaldo Rodrigues de Almeida

Profa.Dra. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof.Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof.Dra. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof.Dr. Paulo Sávio Angeiras Goes

Profa. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

Prof.Dra. Simone Guimaraes Farias Gomes

Prof.Dr. Tibério César Uchoa Matheus

MEMBRO COLABORADOR

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

SECRETARIA

Oziclere Sena de Araújo

**A laserterapia em baixa potência aumenta a liberação de óxido nítrico em
macrófagos em cultura**

Samantha Cardoso de Andrade

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/02/2013

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. (a) Dr. (a) Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho

Prof. (a) Dr. Raul Manhães de Castro

Prof. (a) Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Recife – PE

2013

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus pelo amor de Pai, pela fé, pela inspiração, sabedoria, saúde, tranquilidade e equilíbrio, pois sem Ele não teria chegado até aqui;

À minha família, minha mãe Socorro, meus irmãos Roberta e Júnior, minha tia Arlete e meu namorado Raniere, pois me proporcionaram momentos de descontração e mantiveram-se sempre ao meu lado numa fiel torcida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, que mesmo distante sempre me manteve de olhos abertos para a ciência e sempre me orientou para a vida, me servindo como fonte de inspiração para o saber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser um pai tão maravilhoso e ter me guiado para chegar até aqui;

A minha querida mãe, Socorro, pelo amor, educação, apoio e paciência;

A minha tia Arlete, pelos momentos maternos, suporte e descontração;

Aos meus irmãos Roberta e Júnior pela fonte de alegria, distração, inspiração e pela torcida;

Ao meu namorado, Raniere, pelo carinho, ajuda, paciência, pelos momentos de conforto e amor;

A minha eterna dupla-amiga-irmã Juliana e amigas Fernanda, Katharina, Luciana, Priscylla, Anna Carla e Marina, pelo convívio e amizade;

A minha amiga e sogra Solange, pela torcida e oração;

A minha família escolhida Tavares Pessoa pela fé e pelos momentos de alegria;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, pela confiança e pela credibilidade;

A minha co-orientadora Prof^a. Dra. Wylla Tatiana Ferreira e Silva por me ensinar pacientemente e estar sempre disposta a ajudar;

Ao amigo Igor Henrique Morais pela paciência, ensinamentos, conselhos e confiança;

A equipe de estomatologia Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, Prof^a. Dra. Alessandra Carvalho, Prof. Dr. Luiz Alcino, Adriana, Andreza, Déborah, Lucinha e aos monitores Tereza, Ícaro, Anivaldo Jr. e Ialy pela amizade, ajuda, companheirismo e acolhimento.

Ao Prof. Dr. Luiz Alcino Gueiros pela torcida, conselhos e preocupação;

Ao Prof. Dr. Raul Manhães de Castro pelo apoio e por ter me acolhido no laboratório multiusuário – LENIB.

A Suely Senna pelos ensinamentos e apoios laboratoriais;

Ao grupo de professores do ETAO pela compreensão e amizade;

Ao grupo de professores de Periodontia da UFPE pelos ensinamentos e apoio;

Aos meus alunos de Periodontia pelo ânimo, torcida e aprendizado;

Aos colegas da Maxi Sorriso pela animação, companheirismo e desejo explícito de que tudo desse certo, em especial ao Dr. Paulo Augusto Lopes;

Aos colegas da turma de mestrado pelas conversas, aflições compartilhadas e muitas conversas animadas;

As funcionárias Oziclere, Tânia, Ritinha e Fátima pela disposição em ajudar;

Agradeço o apoio financeiro do órgão de fomento CNPq;

Aos professores, colegas e funcionários da Graduação e Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco;

A Pós-Graduação em Odontologia e a Universidade Federal de Pernambuco por me darem condições de chegar até aqui;

“Mas os que esperam no senhor, renovarão as suas forças, subirão com asas como
águias, correrão e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão.”

(Isaías 40:31)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ARTIGO	29
Abstract	31
Introduction.....	32
Methods	34
Results	36
Discussion	37
References	39
Figures	44

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Anteparo sendo confeccionado com alginato.....	46
Figura 2. Posição do laser de baixa potência em contato com a placa de cultura celular.....	46
Gráfico 1. Efeito da irradiação na produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas pelo LPS.....	47
Gráfico 2. Efeito da irradiação na produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas e não estimuladas pelo LPS, com relação a potência e tempo aplicados.....	47
Gráfico 3. Análise da viabilidade celular – efeito da irradiação na produção de formazan por células RAW 264.7.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl: microlitro

Ga-Al-As: Gálio-Alumínio-Arsieneto

As-Ga-Al: Arsenide-Gallium-Aluminum

cm²: centímetro quadrado

cm³: centímetro cúbico

CO₂: Gás carbônico

DMEM: *Dulbeco's modified eagle medium*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*

h: hora

He-Ne: Laser de Hélio-Neônio

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

J: Joules

Laser: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LBP: Laserterapia de baixa potência

LLLT: *Low-level laser therapy*

LTD4: *leukotriene D4*

mg: miligrama

ml: mililitro

MØ: Macrófagos

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

mW: miliwatts

NaNO₂: Nitrato de sódio

nm: nanômetro

nM: nanomols

NO: Óxido nítrico

NOS2: *nitric oxide synthase 2*

NOSi: óxido nítrico sintase induzida

O₂: Oxigênio

°C: graus Celsius

p: Nível de significância estatística

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PGE2: *prostaglandine E2*

ROS: *Reactive oxygen species*

RPML: *Roswell Park Memorial Institute medium*

s: segundos

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SFB: Soro fetal bovino

SI: Sistema Imune

W: Watts

RESUMO

Durante os anos demonstrou-se que a terapia com o laser de baixa potência pode interferir na taxa de proliferação celular como no caso dos fibroblastos, mioblastos, células mesenquimais, osteoblastos e outros, além de exercer efeitos sobre o metabolismo celular. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a dose-resposta do laser de As-Ga-Al no comprimento de onda de 660nm sobre a viabilidade celular e a produção de espécies reativas do nitrogênio em macrófagos em cultura. Foi utilizada a linhagem RAW 264.7 em meio de cultura DMEM e o experimento foi dividido em quatro grupos, o primeiro grupo foi composto por apenas células e meio de cultura, o segundo grupo por células mais o meio e a irradiação com laser, o terceiro grupo pelas células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e o quarto grupo pelas células estimuladas com LPS e irradiadas com o laser. As células foram irradiadas nas potências de 10, 50 e 100mw, nos tempos de 10, 30 e 60s, dando um total de 9 densidades de energia. Este estudo indicou que a LBP aumentou significativamente ($p < 0,001$) a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos do tipo RAW 264.7, quando comparado com células não irradiadas, tanto em células estimuladas pelo LPS quanto na produção basal de NO (sem estimulação por LPS). A densidade de energia de 32J/cm² foi a que apresentou um maior aumento na produção de NO ($p < 0,011$) e analisando, apenas, o tempo de irradiação não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$ diferença) em diferentes potências. Baseado nos achados do presente estudo é possível concluir que a irradiação com 660nm aumentou a produção de NO por macrófagos em cultura, quando comparado com células não estimuladas, sem afetar a viabilidade celular.

Palavras-chaves: laserterapia de baixa potência, laser bioestimulação, inflamação, macrófagos, óxido nítrico

ABSTRACT

Over the years it was demonstrated that therapy with low-level-laser therapy may interfere on cell proliferation as in the case of fibroblasts, myoblasts, mesenchymal cells, osteoblasts and others besides exerting effects on cell metabolism. Thus, the aim of the present study was to evaluate the dose-response of As-Ga-Al laser at wavelength of 660nm on cell viability and production of reactive nitrogen species in macrophages culture. RAW 264.7 cell was used in DMEM culture medium and the experiment was divided into four groups, the first group: comprised only cells and medium, the second group: cells plus medium and irradiation with laser, the third group: simulated cells by lipopolysaccharide (LPS) and the fourth group: stimulated cells plus irradiation with laser. The cells were irradiated at powers of 10mW, 50mW and 100mW in times of 10s, 30s and 60s, giving a total of 9 power densities. Our study indicated that the LLT significantly increased ($p<0,001$) the NO production by Raw 264.7 macrophages cells when compared with non-stimulated cells, both in cells LPS-simulated cells and in basal production of NO (without stimulation by LPS). In addition, NO production was most increased when the energy density of $32\text{J}/\text{cm}^2$ was used ($p<0,011$). Also, while analyzing only the time of irradiation there was no statistically significant ($p>0,05$) difference in different power usage. Based upon the results of the present study it can be concluded that the irradiation at 660nm increases NO production by macrophages in culture when compared with non-stimulated cells, without affecting cellular viability.

Keywords: low level laser therapy, laser biostimulation, inflammation, macrophages, nitric oxide.

INTRODUÇÃO

Laser é a abreviação para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, em português, luz amplificada por emissão estimulada de radiação, cuja teoria é do físico Albert Einstein, que em seu artigo "Zur Quantum Theories der Strahlung", de 1917, expôs os princípios físicos da emissão estimulada (fenômeno laser) (Vinck et al., 2003). É um dispositivo composto de elementos sólidos, líquidos ou substâncias gasosas que produzem um feixe de luz quando excitadas por uma fonte de energia e pode ser classificado em duas categorias: laser de alta potência ou laser cirúrgico e laser de baixa potência ou laser terapêutico. O de alta potência possui efeitos térmicos como o corte, vaporização e propriedades hemostáticas enquanto o de baixa potência possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (Yarak & Okamoto, 2010).

Lasers de baixa potência interagem com os tecidos de forma indireta produzindo um efeito conhecido como fotobioestimulação que promove um aumento limitado da temperatura local, aumento do fluxo sanguíneo e produção de mediadores fisiológicos como as endorfinas (Parker, 2007).

A Laserterapia em baixa potência (LBP) envolve a aplicação local de um fóton de luz monocromática de alta densidade sobre determinados tecidos obedecendo os parâmetros pré-estabelecidos como potência em Watts (W), área a ser irradiada em centímetro quadrado (cm²) (Bensadoun, 2001; Maiya, 2006) e comprimento de onda em nanômetro (nm) do laser a ser usado, já que este determina o grau de absorção da luz no tecido-alvo (Dederich, 1993).

A terapia com laser começou a ser utilizada na Odontologia no início dos anos 90 e consiste em uma técnica simples e atraumática (Pourzarandian et al. , 2005). Atuando sobre a célula, a radiação a laser provoca um aumento no gradiente

eletroquímico de prótons nas mitocôndrias além de aumentar a disponibilidade de íons cálcio no citoplasma para estas organelas (Friedman, Lubart & Laulicht 1991). Este mecanismo poderia explicar a ação bioestimulante do laser em culturas de células, quando utilizado em pequenas doses, ou seus efeitos prejudiciais quando utilizado em altas doses (Karu, 1988). Em doses baixas o laser provoca um aumento da disponibilidade de íons cálcio no citoplasma estimulando a proliferação celular (Meininger & Binet, 1984). Em doses elevadas, o aumento da quantidade de íons cálcio no citoplasma promove o aumento da pressão osmótica local que leva à destruição da célula (Malik & Lugaci, 1987).

A tecnologia laser tem melhorado continuamente durante os últimos anos, impulsionado em parte pela procura de aplicações com finalidades terapêuticas e para fins de diagnóstico (Steiner, 2006).

Com relação a interação do laser com os tecidos, Rocha (2000) afirma que sistemas biológicos são complexos e compostos de uma grande variedade de elementos celulares e fluidos teciduais, cada qual com diferentes características de absorção. Uma vez que o corpo humano é majoritariamente constituído por água, a absorção da luz pela água é de fundamental importância para aplicações biomédicas. Os elementos dos tecidos que exibem um alto coeficiente de absorção de um particular comprimento de onda, ou por uma região do espectro, são chamados cromóforos. As interações que podem ocorrer quando a radiação laser é absorvida pelos tecidos biológicos são efeitos fototérmicos, fotoquímicos, fotomecânicos, fotoelétricos e quânticos (Hale & Query, 1973; Niemz, 2003).

Quando a radiação laser entra em contato com os tecidos pode ocorrer reflexão, refração, dispersão e absorção (Parker, 2007). A reflexão se dá quando parte do feixe de luz que incide sobre um meio, reflete formando um ângulo igual ao

da incidência. Cerca de 4 % da luz é refletida em uma aplicação típica de laser em uma pele sem oleosidade. A refração depende da relação entre o índice de refração do meio de origem da luz e o índice de refração do meio de destino da luz. Dá-se o nome de espalhamento, a interação do laser com os meios heterogêneos. O processo de refração nos substratos biológicos torna-se responsável pelo espalhamento da luz nestes meios. A absorção do laser pelos tecidos é quantificada pelo coeficiente de absorção. As moléculas, as quais compõem a região de aplicação do laser são determinantes no valor do coeficiente de absorção do mesmo. A profundidade de penetração do laser é função do seu comprimento de onda e do coeficiente de absorção do meio (Parker, 2007; Melo, 2001).

Durante a utilização terapêutica do laser, os fótons são incapazes de passar através do tecido e são absorvidos. A absorção pode ser específica ou aleatória, dependendo da forma com o que o laser incide no tecido, seja de forma localizada ou em diferentes locais de ação (Phillip & Berlien, 2006).

Novos modelos experimentais de estudos *in vitro* têm surgido com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a interação do laser com os diferentes tecidos (Pourzarandian et al., 2005; Almeida-Lopes et al., 2001; Schwarz et al., 2003; Chen et al., 2005; Arisu, Türköz & Bala, 2006; Choi et al., 2010; Petri et al., 2010). A maior vantagem deste tipo de estudo é que se pode isolar uma parte específica de um determinado processo (Freshney, 1990; Schmalz, 1994). A grande maioria dos estudos *in vitro* foi efetuada em linhagens celulares estabelecidas ou em culturas primárias de fibroblastos provenientes da pele, que tinham como objetivo avaliar a ação da LBP na proliferação de fibroblastos em cultura (Lubart et al., 1992; Lubart et al., 1995; Pourzarandian et al., 2005; Choi et al., 2010).

Sabe-se que os “lasers” com diferentes comprimentos de onda produzem diferentes efeitos sobre cultura de fibroblastos. Na literatura, estudos comparando os efeitos do “laser” visível mostram que este promove diferentes efeitos a depender de seu comprimento de onda, porém estes mesmos trabalhos demonstram que os melhores resultados com relação ao aumento na proliferação celular e produção de citocinas são obtidos quando lasers de comprimento de onda visível foram usados (Lubart, 1995; Loevschall, 1994; Almeida-Lopes, 1999). Com relação ao laser de Arsênio-Gálio-Alumínio (As-Ga-Al) foi o segundo tipo de laser mais usado na literatura (AlGhandi et al., 2011).

A LBP tem sido utilizada para tratar vários problemas de saúde incluindo feridas em processo de reparação, estimulação tecidual, complicações músculo-esqueléticas e alívio da dor (Mester, 1985). A LBP é uma técnica de fácil manejo que pode ser utilizada para o diagnóstico, prevenção e tratamento de diversas lesões orais tais como herpes labial recorrente (Maiya, 2006), ulceração aftosa recorrente (Bensadoun, 2002), estomatite protética (Bensadoun, 1999), queilite angular (Eduardo, 2007), entre outras (Steiner, 2006).

Estudos clínicos tem demonstrado que os lasers de baixa potência promovem analgesia e aceleram o processo de cicatrização de ferida (Schindl, 2000). O reparo das feridas e sua reestruturação constituem mecanismo complexo, em que vários fatores contribuem para a criação de diversos tipos de cicatrização, como hipertrofia, atrofia ou normotrofia da área lesionada (Dederich & Bushick, 2004).

Para estabelecer uma infecção, o microrganismo deve primeiro sobrepujar numerosas barreiras da superfície, dentre elas, a epiderme. Qualquer organismo que suplante essa primeira barreira encontra os dois níveis adicionais de defesa, as

respostas imunes inatas e adquiridas (Abbas & Janeway, 2000; Delves & Roitt, 2000).

A imunidade inata utiliza células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células “*natural killer*”, já a imunidade adquirida envolve a proliferação de células do tipo linfócitos T e B, quando os receptores de superfície dessas células se ligam aos antígenos (Delves & Roitt, 2000). Os macrófagos (MØ) são células do grupo dos fagócitos mononucleares, chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos. Amplamente distribuídos pelo corpo, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios e constituem uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo (Halliwell & Gutteridge, 1999; Nathan, 2000).

Macrófagos (MØ) estão intimamente envolvidos na resposta imune. As principais funções destas células estão relacionadas ao processo inflamatório, ao processamento e apresentação de antígenos, à co-ativação de linfócitos T e B, à capacidade fagocítica, à angiogênese, ao processo de hematopoiese e de reparo tecidual, além da atividade citotóxica contra células tumorais e microorganismos (Wing & Remington, 1980; Cavaillon, 1994; Popov et al., 1999; Vadiveloo et al., 2000).

Os MØ são classificados em 3 grupos que refletem seus estados funcionais: (1) Residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem nenhum estímulo; (2) Elicitados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente inflamatório não-específico, como o tioglicolato de sódio; e (3) Ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção por *Bacillus Calmette Guerin* (BGC), o qual produz um exudato rico em citocinas (Crawford et al., 1987). Cada um destes estágios é

acompanhado pela expressão específica de proteínas de membrana e produtos de secreção (Mackay, 1986).

Na presença de um estímulo estranho, o MØ se torna ativado. Neste estado, pode responder ao estímulo de três maneiras diferentes: fagocitando o elemento estranho, graças a um sistema de enzimas lisossômicas eliminando-o do fluido intersticial, quando auxiliados pelos linfócitos T ou liberando um amplo espectro de mediadores, incluindo espécies reativas do oxigênio e nitrogênio além de enzimas hidrolíticas, lipídios bioativos e citocinas (Nathan, 1992). Nesse sentido, os MØ produzem grande quantidade de oxidantes, tal como o óxido nítrico (NO) (Marshall, 2000). A importância regulatória do NO nas funções biológicas é evidente em numerosos processos fisiológicos (De Groote & Fang, 1999).

O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a MØ cujas características funcionais, bioquímicas e morfológicas refletem um aumento da atividade celular. Quando comparados com MØ residentes, os macrófagos ativados são maiores e mais aderentes às superfícies. As células ativadas demonstram aumento da expressão e secreção de enzimas lisossomais, de citocinas, de fatores de crescimento e de espécies reativas do nitrogênio (Young, 1989; Gordon, 2007).

A capacidade dos macrófagos em produzir citocinas depende do grau de maturação, ativação e localização destas células (Cavaillon, 1994). Vários componentes solúveis de bactérias, como endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas e peptidoglicanas, são capazes de induzir a ativação dos macrófagos. Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de bactérias Gram-negativas que tem sido estudado pela sua conhecida habilidade em induzir a liberação de algumas citocinas por macrófagos e monócitos (Huang, Lu & Kao, 2012).

Além das funções descritas, os MØ secretam um amplo espectro de mediadores, incluindo enzimas hidrolíticas, lipídios bioativos, quimiocinas e citocinas (Dube, 2003) além de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (Lancaster, 1992; Gordon, 2007).

Os estudos iniciais sobre a participação do óxido nítrico (NO) no sistema imune (SI) situam-se entre 1985 e 1990. À luz do conhecimento da associação entre NO e SI na época, seu papel foi assim definido: no SI, o NO é um produto de macrófagos ativados por citocinas e/ou compostos microbianos, derivado do aminoácido L-arginina pela atividade da enzima NO sintase (NOS₁/NOS₂) e funciona como uma molécula tumoricida e antimicrobiana *in vivo* e *in vitro*. Ademais, a atividade da NOS é determinada por vários mecanismos, a maioria controlada por estímulo imunológico (Bogdan, 2001). Hoje já se sabe que além de macrófagos, outras células do SI produzem NO e respondem a ele (Nathan, 1992; Bogdan, 2001).

Um dos aspectos que contribui para tornar o NO tão relevante é a imensa variedade de papéis a que está relacionado, com a participação nos processos essenciais à sobrevivência do organismo, como a regulação da pressão arterial, o desenvolvimento do SNC, os mecanismo de aprendizagem e memória e finalmente da ativação da resposta imune. O NO produzido por MØ é altamente tóxico para as células infectadas e os agentes patogênicos. Ele ingressa nas células e inativa as proteínas que são importantes para a produção de energia, transdução de sinais e síntese dos ácidos nucléicos, provocando a morte celular (Lancaster, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A. K.; Janeway Jr., C. A. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*, v.100, n.1, p.129-38, jan 7. 2000.
2. AlGhamdi, K. M.; Kumar, A.; Moussa, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*. 2011.
3. Almeida-Lopes; et al. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 29, p. 29. 2001.
4. Arisu, H. D.; Türköz, E.; Bala, O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci*, v. 21, p. 175-180. 2006.
5. Bensadoun, R. J.; Ciais, G. Radiation and chemotherapy induced mucositis in oncology: results of multicenter phase III studies. *J Oral Laser Appl*, v. 2, p. 115-20. 2002.
6. Bensadoun, R. J.; Magve, N.; Marcy, P. Y.; Demard, F. Chemotherapy and radiotherapy induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathology-physiology, prevention, and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* v. 25, p. 481-487. 2001.
7. Bensadoun, R. J.; Franquin, J. C.; Ciais, G.; Darcourt, V.; Schubert, M. M.; Viot, M;. et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. *Support Care Cancer*, v. 7, p. 244-252. 1999.
8. Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, v. 2, n. 10, p. 907-16. 2001.
9. Cavaillon, J. M. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother*, v. 48, n.10, p.445-53. 1994.

10. Chen, Y. J.; Jeng, J. H.; Jane Yao, C. C.; Chen, M. H.; Hou, L. T.; Lan, W. H. Long-Term Effect of Pulsed Nd:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Periodontal Fibroblasts. *Lasers Surg. Med*, v. 36, p. 225-233. 2005.
11. Choi, E. J.; Yim, J. Y.; Koo, K. T.; Seol, Y. J.; Lee, Y. M.; et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci*, v. 40, p. 105–110. 2010.
12. Crawford, R. M.; Finbloom, D. S.; Chara, J.; Paul, W. E.; Meltzer, M. S. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J. Immunol*, v. 139, p. 135-141. 1987.
13. Crespi, R.; Covani, U.; Margarone, J.E.; Andreana, S. Periodontal tissue regeneration in Beagle dogs after laser therapy. *Lasers Surg Med*, v. 21, p. 395-402. 1997.
14. De Groote, M. A. & Fang, F. C. Antimicrobial properties of nitric oxide. in *Nitric oxide and infection*. Fang. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York p. 231–261. 1999.
15. Dederich, D. N.; Bushick, R. D.; Lasers in dentistry. Separating science from hype, *JADA*, v. 135, p. 204-212. 2004.
16. Dederich, D. N.; Laser/tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissue? *JADA*, v. 124, p. 57-61. 1993.
17. Delves, P. J.; Roitt, I. M. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*, v. 343, n. 1, p.37-49, jul 6. 2000.
18. Dube, A.; Bansal, H.; Gupta, G. K. Modulation of macrophage structure and function by low level He–Ne laser irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* vol. 2, 851–855. 2003.

19. Eduardo, F. P.; Mehnert, D. U.; Monezi, D. A.; Zezell, D. M.; Schubert, M. M.; Eduardo, C. P.; et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med*, v. 39, n. 4, p. 365-72, apr. 2007.
20. Freshney, R. I. *Biology of the Cultured Cell. A Manual of Basic Technique*, 2nd Edition. New York: Wiley-Liss; p. 347. 1990.
21. Friedmann, H.; Lubart, R.; Laulicht, I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B: Biol*, v. 11, p. 87-95. 1991.
22. Gordon, S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol*, v. 37, n. 1, p. 9-17, nov. 2007.
23. Hale, G. M.; Querry, M. R. Optical constants of water in the 200nm to 200µm wavelength region. *Appl Opt*, v. 12, n. 3, p. 555-62. 1973.
24. Huang, T. H.; Lu, Y. C.; Kao, C. T. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. *Lasers Med Sci*. 27:621–627. 2002.
25. Halliwell, B; Gutteridge, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (eds.), Free Radic. Biol. Med., New York, p. 544-616, 1999.
26. Karu, I. Molecular mechanism of therapeutic effects of low intensity laser radiation. *Lasers Life Sci*, v. 2; p. 53-74. 1988.
27. Lancaster, J. R. Nitric oxide in cells. *American Scientist*, v. 80, p. 248-259. 1992.
28. Lubart, R.; Friedmann, H.; Sinykov, M.; Grossman, N. Biostimulation of photosensitised fibroblasts by low incident levels of visible light energy. *Laser Therapy*, v. 7, p. 101-106. 1995.

29. Mackay, R. J.; Russel, S. W. Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing. *J. Immunol, Bethesda*, v. 137, p. 1392-1398. 1986.
30. Maiya, G. A.; Sagar, M. S.; Fernandes, D. Effect of low level helium-neon (He-Ne) laser therapy in the prevention and treatment of radiation induced mucositis in head and neck cancer patients. *Indian J Med Res*, v. 124, p. 399-402. 2006.
31. Malik, Z.; Lugaci, H. Destruction of erythroleukaemic cells by photoactivation of endogenous porphyrins. *Br J Cancer*, v. 56, p. 589-595. 1987.
32. Meininger, V.; Binet, S. Characteristic of microtubules and the different stages of neuronal differentiation and maturation. *Int Rev Cytol*, v. 11, p. 47-52. 1984.
33. Melo, C. A. S.; Lima, A. L. L. A.; Brasil, I. R. C.; et al. Characterization of light penetration in rat tissues. *J CLin Laser Med Surg*, v. 19, p. 175-9. 2001.
34. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J*, v. 6, n. 12, p. 3051-64. 1992.
35. Niemz, M. H. Laser-tissue interaction. Springer. 3^o ed. p. 308. 2003.
36. Parker, S. Introduction, history of lasers and laser light production. *Br Dent J*, v. 202, p. 21-31. 2007.
37. Petri, A. D.; Teixeira, L. N.; Crippa, G. E.; Beloti, M. M.; de Oliveira, P. T.; Rosa A. L. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J*, v. 21, p. 491-8. 2010.
38. Philipp, C. M.; Berlien, H. P. The future of biophotonics in medicine: A proposal. *Med Laser Appl*, v. 21, p. 115-122. 2006.

39. Popov, S. V.; Popova, G. Y.; Ovodova, R. G.; Bushneva, O. A.; Ovodov, Y. S.
Effects of polysaccharide from *Silene vulgaris* on phagocytes. *Int. J. Immunopharmacol.*, Kidlington, v. 21, p. 617-624. 1999.
40. Pourzarandian, A.; Watanabe, H.; Ruwanpura, S; Aoki, A.; Ishikawa, I. Effect
of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival
Fibroblasts. *Periodontology*, v. 76, p. 187-193. 2005.
41. Rocha, D. V. Lasers de baixa intensidade em Odontologia. Apostila do curso de
Mestrado profissionalizante: Lasers em Odontologia. Puig, [2000]. p. 1- 7.
42. Schindl, A.; Schindl, M.; Pernerstorfer-Schon, H.; Schindl, L.; Low intensity
laser therapy: a review. *J Invest Med*, v. 48, p. 312-326. 2000.
43. Schmalz, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials:
advantages and limitations. *J Dent*, v. 22, p. 6-11. 1994.
44. Schwarz, F.; Rothamel, D.; Sculean, A.; Georg, T.; Cherbaum, W.; Becker, J.
Effects of an Er:YAG laser and the Vectors ultrasonic system the
biocompatibility of titanium implants in cultures of human osteoblast-like cells.
Clin. Oral Impl. Res, v. 14, p. 784-792. 2003.
45. Steiner, R. New laser technology and future applications. *Med Laser Appl*, v.
21, p. 131-140. 2006.
46. Vadiveloo, P. K.; Vairo, G.; Hertzog, P.; Kola, I.; Hamilton, J. A. Role of type I
interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. *Cytokine*,
London, v. 12, n. 11, p. 1639-1646, 2000.
47. Vinck, E. M.; Cagnie, B. J.; Cornelissen, M. J.; Declereq, H. A.; Cambier, D. C.
Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power
laser irradiation. *Lasers Med Sci*, v. 18, p. 95-99. 2003.
48. Yarak S.; Okamoto, O. K. Biostimulation effects of low-power laser in the
repair process. *An Bras Dermatol*, v. 85, n. 6, p. 849-55. 2010.

49. Young, S. R.; Bolton, P.; Dyson, M.; Harvey, W.; Diamantopoulos C.
Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg.Med.* vol.9, p.497–
505. 1989.

ARTIGO

**A dose response study of laser therapy on nitric oxide production in
macrophages**

Samantha Cardoso de Andrade¹, Wylla Tatiana Ferreira e Silva², Jair Carneiro Leão¹

¹Oral Medicine unit, Department of clinical and preventive dentistry, School of Dentistry, UFPE, Federal University of Pernambuco

²Department of Nutrition, School of Nutrition, UFPE, Federal University of Pernambuco

S.C Andrade

Av. Professor Moraes Rêgo, 1235

50670-901, Recife, PE, Brazil

+55 (81) 98007277

E-mail: samanthadeandrade@hotmail.com

Abstract

Background: Despite the numerous studies of low-energy lasers, the optimum exposure time, concentration, and dose to induce favourable cell responses remain ill-defined. The present *in vitro* study aimed to evaluate the effect of LLLT in the synthesis of NO and cellular viability of cultured macrophages with various application parameters. **Methods:** RAW 264.7 cells originating from a leukaemic mouse monocyte macrophage cell line were cultivated in a polystyrene bottle with DMEM medium and transferred to 96-well polystyrene plates that were irradiated using an arsenide-gallium-aluminium laser (As-Ga-Al), at a wavelength of 660 nm, power of 30, 50 and 100 mW, for a duration of 10, 30 and 60 s, totalling 9 energy densities ranged from 11 to 214 J/cm² with a spot size of 0.028 cm². Basal NO production was measured as was its production in cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS) with or without laser irradiation. NO levels were determined by assaying nitrite levels. RAW 264.7 cell attachment was observed by microscopy, and cell viability was quantified by mitochondrial colorimetric assay (MTT). **Results:** LLLT significantly increased ($p<0.001$) basal NO production by both LPS-stimulated and non-stimulated RAW 264.7 cells when compared with non-laser stimulated cells. In addition, NO production was increased to the greatest extent upon application of an energy density of 32 J/cm² ($p<0.011$). Also, analysis of irradiation duration revealed no significant ($p>0.05$) difference in power usage. Concerning cell viability was not observed any change in cell culture. **Conclusion:** These data indicate that irradiation at 660 nm increases NO production by macrophages in culture when compared with non-stimulated cells, with no effect on the viability of the irradiated cells.

Keywords: Low-level laser therapy, laser biostimulation, inflammation, macrophages, nitric oxide.

Introduction

Low-level laser therapy (LLLT) has been employed since the 1970s¹ and has been explored as an alternative, non-invasive method of promoting healing of chronic wounds and to ameliorate cell-mediated hypersensitivity reactions and inflammatory processes². Several studies have focused on the effects of low-level laser irradiation at the cellular level, and although the biological mechanisms underlying the biostimulatory effects of LLLT are not fully understood, it has been reported by several investigators to modulate cellular metabolic processes, leading to enhanced regeneration of tissues^{3,4,5}.

The mechanism underlying laser-induced immunomodulation is not straightforward. Studies focusing on immunocompetent cells such as lymphocytes and macrophages have failed to fully define the modulatory effect of the laser in these cells^{6,7,9,10}. Studies of lymphocytes show that He–Ne laser irradiation can lead to increased immunoglobulin secretion⁶, cytokine production⁷, and leukocyte priming⁸. In addition, macrophages have been shown to increase the enzyme activity of lysozyme and acid phosphatase⁹, phagocytic activity¹⁰, stimulate release of growth factors¹¹, increase phagocytotic⁶ activity, and stimulate fibroblast proliferation¹¹.

Laser application may favour tissue repair, anti-inflammatory activity, cell growth, and cellular proliferation, including that of fibroblasts, osteoblasts, mesenchymal cells, and keratinocytes⁵. LLLT has also been shown to affect macrophages^{5,11}, and although macrophages cannot be grown as a cell line culture, the macrophage-like cell line Raw 264.7 can overcome this problem. The Raw 264.7 is a permanent culture originating from a mouse leukaemic monocyte macrophage

cell line. Phenotypically, the cells resemble monoblasts and histochemically they show monocytic characteristics¹¹.

Macrophages constitute the primary line of defence against infection, playing a pivotal role in the induction, regulation and expression of the immune response by acting as phagocytic, microbicidal and tumouricidal effector cells^{12,13}. They also modulate the production and function of cytokines, chemokines and growth factors^{14,15}, bring about T-helper cell deviation through the release of nitric oxide (NO), and stimulate the nitric oxide synthase pathway¹⁶. NO, a product of macrophages that have been activated by cytokines, microbial compounds, or both, is derived from the amino acid L-arginine by the enzymatic activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS or NOS2)¹⁷.

Nitric oxide (NO) is a possible modulator of inflammatory processes, with high levels of NO co-product being found in the serum of patients with inflammatory diseases¹⁸. NO plays an important role in normal physiological processes and pathological conditions¹⁹; oxidative damage due to its overproduction and that of other reactive oxygen species (ROS) may be involved in the pathogenesis of inflammation^{20,21}.

In cultured human monocytes with the laser As-Ga-Al in wavelength 634nm and power density of 35w/cm² for 5 minutes there was an increase in production of NO²². In searches with Raw 264.7 cell type and diode laser at a wavelength of 780nm and an energy density of 2.2J/cm² an increase on release of NO, IL-10, IL-6 and gene expression reduction was verified²³.

In a study with cultured peritoneal macrophages irradiated by Helium-Neon laser at a wavelength of 632nm, power ranging from 100-600J and time 10-60s on the energy of 200J there was an increase of the enzymatic and phagocytic activity²⁴.

Despite numerous research studies on the influence of low energy laser, the optimal time of exposure, concentration and dose responses to induce favourable effects on tissues have not yet been defined^{17,18}.

Further understanding of the effect of red light on macrophages may help to explain the observed therapeutic effectiveness of such lasers in the treatment of wounds²⁵, rheumatoid arthritis²⁶ and immune system disorders²⁷. The purpose of this study was to evaluate the effect of LLLT on NO release using the RAW 264.7 murine macrophage cell line.

Methods

Cell culture

It was an experimental study with RAW 264.7 mouse leukaemic monocyte macrophage cell line was acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank, Rio de Janeiro Federal University, Clementino Fraga Filho University Hospital. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 1% penicillin and streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 10% foetal bovine serum (FBS) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells were sub-cultured approximately every two days and incubated at 37°C in 5% CO₂ in sterile 25-cm³ polystyrene bottles, each containing 5ml medium plus the cells. Cells were counted in a Neubauer chamber; each bottle contained $\sim 8 \times 10^6$ cells.

Laser irradiation

The RAW 264.7 cells were treated with RPMI medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) with FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA), transferred to sterile 96-well culture plates (Biosystems, PR, Brazil) at 100 μ l per well with a cell density of 10^6 cells per ml, and allowed to adhere to the wells for 4 h. An alginate shield prevented the laser

from passing through the wells (Figure 1). Each well was then exposed to irradiation with Arsenide-Gallium-Aluminium (As-Ga-Al) *photon lase III (DMC®)* at a wavelength of 660 nm and a spot size of 0.028 cm² contacting the external bottom of the well (Figure 2).

Irradiation was performed using power outputs of 30, 50, and 100 mW, for durations of 10, 30, and 60 s, yielding a total of nine density energy combinations: 11, 18, 32, 36, 54, 64, 107 (50 mW-60 s), 107 (100 mW-30 s) and 214 J/cm², in ascending order. Four groups were used, the first group comprising only cells and medium; the second group, cells plus medium and laser irradiation with the nine combinations. Group 3 included cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS) (10 µL per well) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the fourth group comprised stimulated cells plus laser irradiation with the nine combinations. All experiments were performed in triplicate. A total of four plates were used.

Nitric Oxide (NO) Measurement

After irradiation the cells were incubated for 24 h at 37°C and NO levels were determined by determining the nitrite level, which is a stable metabolic product of nitric oxide. The assay mixture contained medium (100 µL) plus Griess reagent²⁸ (1% sulphanilamide and 0.1% N-[1-naphtyl] ethylenediamine in 5% phosphoric acid, 100 µL), and the optical density at a wavelength of 540 nm was measured using a microplate reader (TP-Reader-Thermoplate[®]). Nitrite was quantified by comparison with a NaNO₂ standard curve. The NO detection limit was 0.20 nM.

Macrophage viability assay

Macrophage viability was assessed by Formazan's quantification²⁹. After the medium was replaced, 20 μ l of MTT (5 mg/ml) dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) were added to each well. The plate was covered with aluminium foil and incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂. The resulting formazan was solubilised with 50 μ L/ml of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) and incubated for 12 h under the same conditions. The absorbance of each well was read at 550 nm using a microplate reader (TP-Reader-Thermoplate[®]). A blank well that contained only culture medium was used for background correction.

Statistical analysis

A multivariate analysis of variance with two and three factors (ANOVA, three factors) was applied. The variable normality of the response was verified using the Smirnov-Kolmogorov test. The statistical significance level adopted was 5% ($p < 0.05$) and the software used in the analysis was STATA, version 12.0.

Results

NO synthesis

Laser irradiation resulted in increased NO production in both LPS stimulated and non-stimulated cells ($p < 0.001$) (Figure 1).

Regarding the different power levels used, 30 mW resulted in higher NO production than the other power levels, independently of duration. Concerning basal NO production, the greater the power used, the greater the NO production, independently of duration. Concerning the duration of exposure to laser light, there was no significant difference between the groups (Figure 2).

In the group not stimulated by LPS, with respect to energy density, 11 J/cm² caused a significant increase in NO production ($p = 0.048$). In the group stimulated by

LPS, the energy densities of 18, 32, and 64 J/cm² showed a significant increase in NO production ($p=0,021$, $p=0,019$ and $p=0,011$, respectively) (Figure 2).

Cell viability

Cell viability was not significantly affected by irradiation at any of the parameters used (Figure 3).

Discussion

The effect of As-Ga-Al on NO release and cell viability was evaluated in RAW 264.7 cells. The main finding of this study is that murine macrophages showed increased release of NO when stimulated by laser light.

Comparing both groups in respect to LPS-stimulation, NO production was increased by laser irradiation of the cells. Our results showed that LLLT significantly increases NO release by macrophages in culture, in terms of LPS-stimulated production and in basal NO release by LPS-stimulated cells. These data are similar to previous reports that LLLT can enhance NO release^{23,30,31}, and also that found that LLLT enhances NO release by LPS-stimulated cells, meaning that cultured macrophages are activated by endotoxin to produce NO^{15,32}.

Despite numerous reports of the influence of the low-energy laser, the ideal exposure duration, concentration, and dose to induce favourable cell responses remain undefined^{17,18}. We investigated the effect of As-Ga-Al laser irradiation on several parameters in macrophages, and analysed NO release and cell viability. Regarding the power level, 30 mW resulted in higher NO production did the other power levels, independently of duration. Concerning basal NO production, the greater the power used, the greater the NO release.

In a study with As-Ga-Al laser at a wavelength of 809nm and different dosages (1.96J/cm², 3.92J/cm² and 7.84J/cm²) in fibroblasts was increased cellular activity, but the results were similar with the different dosages³³.

The key findings of the current study are that in the group that was not stimulated by LPS, the energy density that produced the most significant increase in NO production was 11 J/cm². In the group stimulated by LPS, energy densities of 18, 32, and 64 J/cm² resulted in a significant increase in NO production. This finding suggests that higher doses are required to encourage greater production of NO in macrophages previously stimulated by LPS.

Previous *in vitro* studies by Klebanov *et al.*²⁹ showed that He-Ne laser irradiation increased NO release from macrophages by a maximum of 80% at 0.6 J/cm², and 75% at 0.36 J/cm². These results are compatible with the increase in NO secretion we report here (60–100%). The fact that a similar amount of NO secretion was obtained with He-Ne as with a 780-nm diode laser suggests a common maximum photo-reactive potential up-regulation of the NO synthetic pathway²⁹.

Viability was not significantly affected by irradiation at any of the parameters used. There was no negative effect on the viability of irradiated diabetic wound cells³³, HeLa cells³⁴, human monocytes²³, or alveolar macrophages³⁵; however, adult human adipose-derived stem cells (ADSC)³⁶ showed decreased viability.

In epithelial cell culture, the viable cell number was three times higher on the irradiated cells than non-irradiated cells³⁷.

Our results support the notion that LLLT may be an important tool in the immunological response, collaborating with the anti-inflammatory response produced by macrophages. The inflammatory response to LLLT by RAW 264.7 cells was maximal at 30 mW, independently of irradiation duration.

References

1. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971;122(4):532-535.
2. Abergel RP, Lyons RF, Costal JC, Dwyer RM, J. Uitto and Biostimulation of wound healing by lasers: Experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 1987;13:127-133.
3. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5:31-39.
4. Kamali F, Bayat M, Torkaman G, Ebrahimi E, Salavati M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J Photo chem Photobiol B.* 2007;88:11-15.
5. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2011.
6. Berki T, Nemeth P, Hegeus J. Biological effect of low power laser helium-neon (HeNe) laser irradiation. *Laser Med Sci.* 1988;3:35-39.
7. Funk JO, Kruse A, Kirchner H. He–Ne laser irradiation induces effects on cytokine production at the protein and mRNA level. *Exp. Dermatol.* 1993; 2:75-83.
8. Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res.* 1981;204(2):436-440.

9. Zeng H, Qin JZ, Xin H, Xin SY. The activating action of low level helium-neon laser irradiation on macrophages in mouse model. *Laser Therapy*. 1992;4:55-58.
10. Luza J, Hubacek J. In vitro He–Ne laser effect on some immunological functions of the polymorphonuclears and monocytes in rabbits. *Acta Univ. Palacki. Olomuc*. 1996;140:43-46.
11. Young SR, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg. Med*. 1989;9:497–505.
12. De Groote MA & Fang FC. Antimicrobial properties of nitric oxide. in *Nitric oxide and infection* (ed. Fang, F.C.) 231–261 (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999).
13. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;8841-8848.
14. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J*. 2000;14:1889-1900.
15. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*. 2001;11:66-75.
16. Kahn DA, Archer DC, Gold DP, Kelly CJ. Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med*. 2001;193:1261-1267.

17. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
18. Ciurtin C, Cojocaru VM, Miron IM, Preda F, Milicescu M, Bojinca M, Costan O, Nicolescu A, Deleanu C, Kovacs E, Stoica V. Correlation between different components of synovial fluid and pathogenesis of rheumatic diseases. *Rom J Intern Med.* 2006;44:171-181.
19. Pham TN, Rahman P, Tobin YM, Khraishi MM, Hamilton SF, Alderdice C, Richardson VJ. Elevated serum nitric oxide levels in patients with inflammatory arthritis associated with co-expression of inducible nitric oxide synthase and protein kinase C- η in peripheral blood monocyte-derived macro-phages. *J Rheumatol.* 2003;30:2529-2534.
20. Yudoh K, van Trieu N, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: Oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:380-391.
21. Kanwar JR, Kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem* 2009;16:2373-2394.
22. Lindgard A, Hulten LM, Svensson L, Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. *Lasers Med Sci.* 2007;22: 30–36.
23. Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. 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 Surg Med.* 2008;40(5):371-8.
24. Dube A, Bansal H, Gupta GK. Modulation of macrophage structure and function by low level He–Ne laser irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, 2, 851–855.
 25. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Mossbacher U, Schindl L. Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer— longterm results of 3 cases, *Photodermatol. Photoimmunol Photomed.* 2000;16:34-37.
 26. Timofeyev VT, Poryadin GV, Goloviznin MV. Laser irradiation as a potential pathogenetic method for immunocorrection in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* 2001;8:35-40.
 27. Siniukhin VN, Ianenko EK, Safanov RM, Khamaganova EG, Borisik VI. The effect of endovascular helium-neon laser therapy on the immune status of patients with acute calculous pyelonephritis. *Urol. Nefrol.* 1996;6:9-11.
 28. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988;141:2407-2412.
 29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods.* 1983;65:55-63.
 30. Klebanov GI, Poltanov EA, Chichuk TV, Osipov AN, Vladimirov YA. Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne laser radiation. *Biochemistry. Mosc.* 2005; 70(12):1335-1340.

31. Blix IJS, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 576-81.
32. Nicolette N, Tech HD, Sekhejane RP, Tech M, Abrahamse H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers Surg Med*. 2010;42:494–502.
33. Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaussen B, d'Hoedt B. Effect of low-level Ga-Al-AS laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 353–358.
34. Karu T, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med*. 2005;36:307–314.
35. Lima FM, Villaverde AB, Albertini R, Oliveira APL, Faria Neto HCC, Aimbire F. Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) m-RNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010;28(6):763-771.
36. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci*. 2010; 25(1):33–39.
37. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi DA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo P, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med*, 2007;39(4):365-72.

Figures

Figure 1. Alginate's shield:

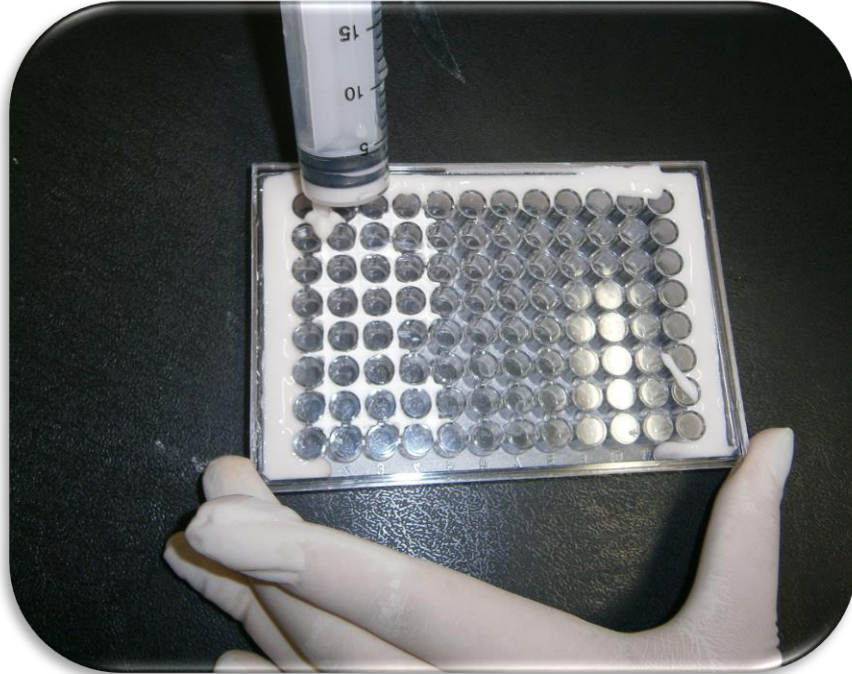
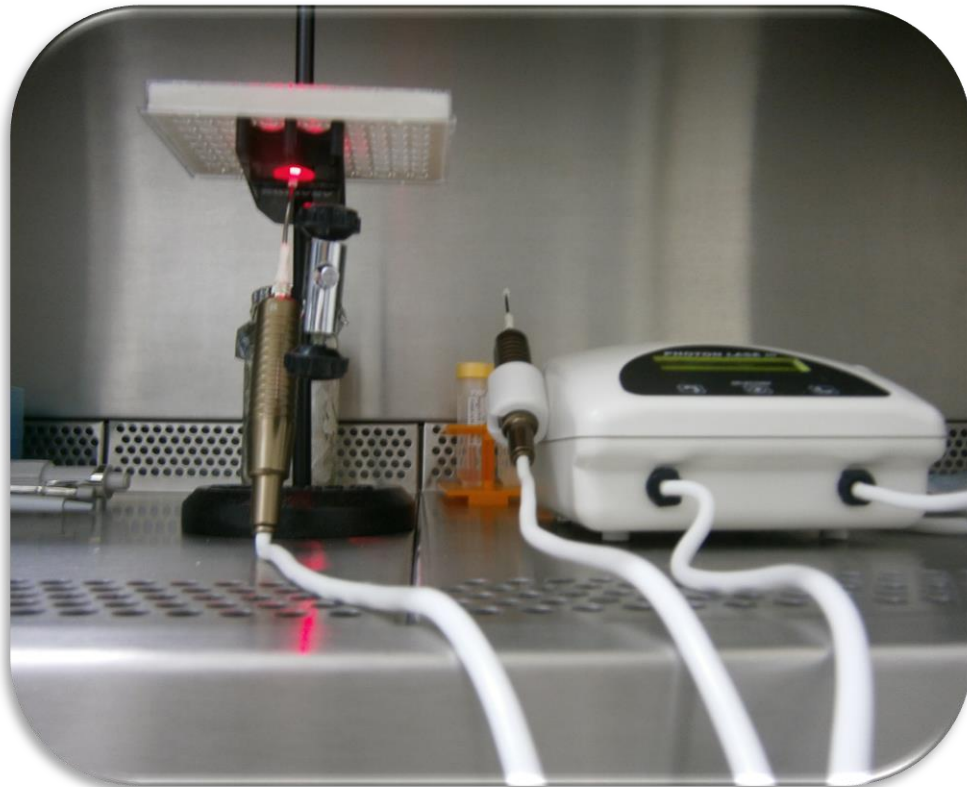
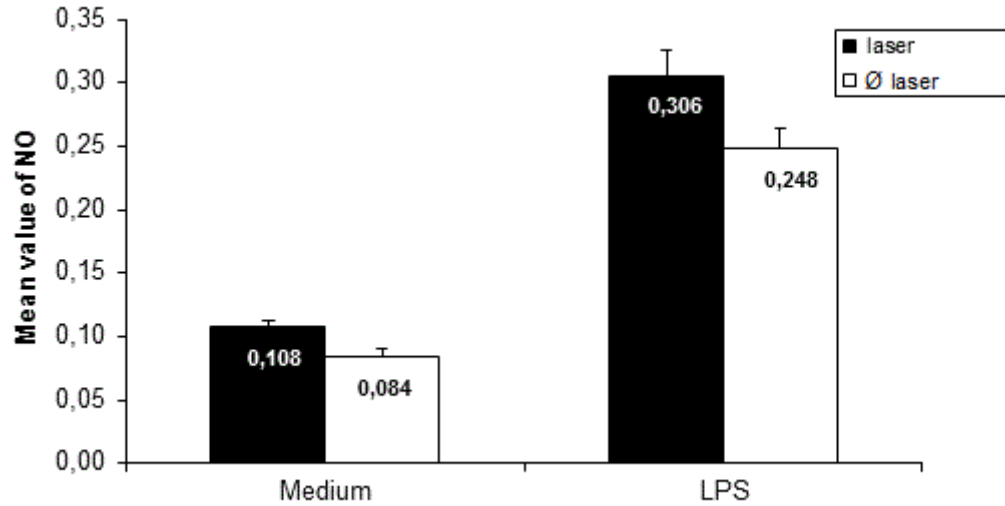


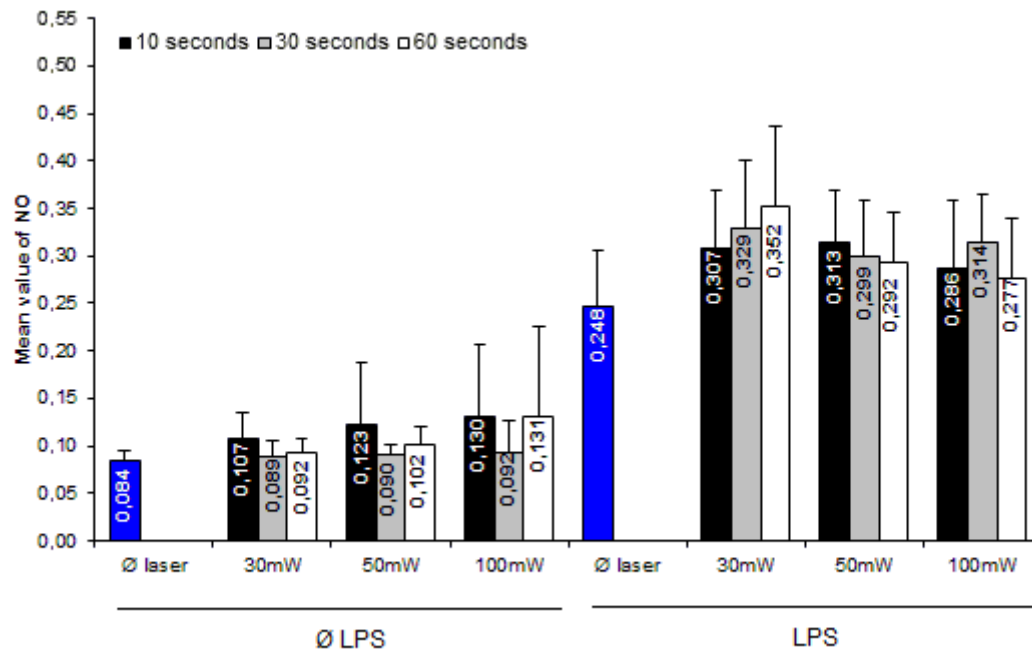
Figure 2. Laser irradiation:



Graphic 1. Effect of irradiation on NO production in Raw 264.7 stimulated or not by LPS ($p < 0,001$):



Graphic 2. Effect of irradiation on NO production in Raw 264.7 stimulated or not by LPS in different parameters of power and time:



Graphic 3. Cell viability assay - the effect of irradiation on formazan production in Raw 264.7:

