

## Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages

Efeito da laserterapia em baixa intensidade na modulação da atividade mitocondrial de macrófagos

Nadhia H. C. Souza<sup>1</sup>, Raquel A. M. Ferrari<sup>1,2</sup>, Daniela F. T. Silva<sup>3</sup>,  
Fabio D. Nunes<sup>4</sup>, Sandra K. Bussadori<sup>2</sup>, Kristianne P. S. Fernandes<sup>2</sup>

**ABSTRACT | Background:** Macrophages play a major role among the inflammatory cells that invade muscle tissue following an injury. Low-level laser therapy (LLLT) has long been used in clinical practice to accelerate the muscle repair process. However, little is known regarding its effect on macrophages. **Objective:** This study evaluated the effect of LLLT on the mitochondrial activity (MA) of macrophages. **Method:** J774 macrophages were treated with lipopolysaccharide (LPS) and interferon – gamma (IFN-  $\gamma$ ) (activation) for 24 h to simulate an inflammatory process, then irradiated with LLLT using two sets of parameters (780 nm; 70 mW; 3 J/cm<sup>2</sup> and 660 nm; 15 mW; 7.5 J/cm<sup>2</sup>). Non-activated/non-irradiated cells composed the control group. MA was evaluated by the cell mitochondrial activity (MTT) assay (after 1, 3 and 5 days) in three independent experiments. The data were analyzed statistically. **Results:** After 1 day of culture, activated and 780 nm irradiated macrophages showed lower MA than activated macrophages, but activated and 660 nm irradiated macrophages showed MA similar to activated cells. After 3 days, activated and irradiated (660 nm and 780 nm) macrophages showed greater MA than activated macrophages, and after 5 days, the activated and irradiated (660 nm and 780 nm) macrophages showed similar MA to the activated macrophages. **Conclusions:** These results show that 660 nm and 780 nm LLLT can modulate the cellular activation status of macrophages in inflammation, highlighting the importance of this resource and of the correct determination of its parameters in the repair process of skeletal muscle.

**Keywords:** macrophages; low-level laser therapy; muscle repair; rehabilitation.

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

Souza NHC, Ferrari RAM, Silva DFT, Nunes FD, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther.* 2014 July-Aug; 18(4):308-314. <http://dx.doi.org/10.1590/bjpt-rbf.2014.0046>

**RESUMO | Contextualização:** O macrófago tem papel de destaque dentre as células inflamatórias que invadem o músculo após as lesões. Por outro lado, o laser em baixa intensidade (LBI) tem sido muito utilizado na clínica para acelerar o reparo muscular, e pouco se conhece sobre seu efeito nos macrófagos. **Objetivo:** Avaliar o efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial (AM) de macrófagos ativados para simular um processo inflamatório. **Método:** Macrófagos J774 foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS) e IFN-gamma (ativação) por 24 horas para simular um processo inflamatório e então foram irradiados com LBI (780 nm; 70 mW; 3 J/cm<sup>2</sup> e 660 nm; 15mW; 7,5 J/cm<sup>2</sup>). A AM foi avaliada pela técnica MTT após um, três e cinco dias das irradiações. Foram realizados três experimentos independentes, e os dados, submetidos à análise estatística. **Resultados:** Após um dia de cultivo, os macrófagos ativados e irradiados com o laser de 780 nm mostraram AM menor que os somente ativados, já os macrófagos ativados e irradiados com o laser de 660 mostraram AM semelhante aos somente ativados. Após três dias, os macrófagos ativados e irradiados (660 e 780 nm) mostraram AM maior que os macrófagos ativados; já após cinco dias, os grupos ativados e irradiados (660 e 780 nm) mostraram AM semelhante aos macrófagos somente ativados. **Conclusões:** Esses resultados mostram que tanto o LBI de 660 nm como o de 780 nm são capazes de modular a ativação celular de macrófagos em situação de inflamação, ressaltando a importância desse recurso e da determinação de seus parâmetros dosimétricos no processo de reparo do músculo esquelético.

**Palavras-chave:** macrófagos; laser em baixa intensidade; reparo muscular; reabilitação.

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Exatas, UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Received: 06/21/2013 Revised: 10/21/2013 Accepted: 02/17/2014

## ● Introdução

A regeneração muscular após uma lesão geralmente segue o mesmo padrão do desenvolvimento embrionário do músculo em termos de expressão gênica, porém o microambiente em que esses dois processos similares ocorrem é totalmente diferente<sup>1</sup>.

Essa diferença está fundamentada na presença de mais de 100.000 células inflamatórias/mm<sup>3</sup> no tecido muscular em regeneração<sup>1,2</sup>. Essas células estão ativadas e podem secretar inúmeros fatores solúveis, especialmente citocinas que irão afetar a viabilidade, a diferenciação e as atividades de transcrição das células musculares regenerativas<sup>1</sup>.

A resposta inflamatória inicial após a lesão muscular é do tipo Th1, ou seja, dominada por neutrófilos e macrófagos do fenótipo M1. Esses macrófagos produzem citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) e enzimas pró-inflamatórias (ciclooxigenase 2) e liberam óxido nítrico (NO) que, em conjunto com as citocinas, pode ampliar o dano tecidual<sup>1,3-5</sup>.

Depois de 48 horas da ocorrência da lesão, o tecido muscular passa a apresentar macrófagos do fenótipo M2 que atenuam a população de macrófagos M1 por meio da liberação de citocinas anti-inflamatórias que incluem a IL-10<sup>1</sup>. O número dessas células alcança seu pico após quatro dias e permanece elevado por muitos dias<sup>1</sup>.

A mudança no fenótipo dos macrófagos de M1 para M2 é um evento chave na regeneração muscular e coincide com a mudança do estágio proliferativo para a fase de diferenciação inicial da miogênese<sup>1</sup>.

Os macrófagos M2 são ativados em particular pelas citocinas IL-4, IL-10 e IL-13<sup>6</sup> e expressam citocinas como a IL-10<sup>1</sup>.

A complexidade e o antagonismo dos fenótipos dos macrófagos envolvidos nos quadros inflamatórios gerados por lesões musculares evidenciam a necessidade de considerar os macrófagos como células-alvo para as intervenções terapêuticas<sup>1</sup>.

Dentre as intervenções terapêuticas utilizadas com o intuito de acelerar o processo de reparo do tecido muscular esquelético após diferentes tipos de lesões, a utilização do laser em baixa intensidade (LBI) tem ganhado destaque<sup>7-12</sup>.

Porém, poucos estudos avaliaram o efeito da LBI isoladamente sobre os macrófagos e, em especial, sobre a atividade mitocondrial (ativação-AM) dessas células após a laserterapia<sup>13</sup>.

De posse desses dados, parece lícito inferir que ainda há muito a ser pesquisado para compreender os efeitos da laserterapia sobre os macrófagos envolvidos no processo de reparo muscular, bem

como para encontrar os parâmetros dosimétricos ideais que possam modular e acelerar esse processo.

Este trabalho buscou colaborar no preenchimento dessa lacuna no conhecimento avaliando o efeito do LBI sobre a atividade mitocondrial de macrófagos ativados para simular um processo inflamatório (fenótipo M1).

## ● Método

### Cultivo celular

A linhagem de macrófagos J774 foi cultivada em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina 2 mM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa (HEPA *class 3110*, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi avaliado a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

### Simulação da inflamação

Para simular a ocorrência de um processo inflamatório e o sofrimento celular, os macrófagos foram tratados, por 24 horas, com 1  $\mu$ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (E Coli) O26: B6 (Sigma, St. Louis, MO) e 0,2  $\mu$ g/mL de Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), simulando o fenótipo M1, e foram cultivados em meio de cultura DMEM contendo somente 5% de SFB<sup>14-17</sup>. As células dos grupos controle foram cultivadas da mesma maneira, porém sem a adição de LPS e de IFN- $\gamma$ . Após 24 horas, as placas foram lavadas com solução salina tamponada por três vezes. As células foram descoladas (com uso de um raspador celular) e transferidas para tubos Falcon (*Techno Plastic Products* [TPP], Trasadingen, Suíça) de 50 mL.

### Laser em baixa intensidade (LBI)

Os tubos de 50 mL contendo as suspensões celulares foram centrifugados (1200 rpm a 10°C por cinco minutos em Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e irradiados de baixo para cima em sua extremidade inferior, de modo que o feixe laser atingisse diretamente o *pellet* celular sem passar pelo meio de cultura<sup>17</sup>. As irradiações foram realizadas utilizando o aparelho *Twin-laser* (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil) no modo contínuo, em um ambiente com obscuridade parcial para não

sofrer interferência da luz externa. As células do grupo controle sofreram a mesma manipulação, porém não foram irradiadas. Os parâmetros (descritos na Tabela 1) foram determinados de acordo com os estudos prévios<sup>18-20</sup>. A potência de saída do aparelho foi verificada utilizando um medidor de potência (*Laser Check, MM Optics*, São Carlos, SP, Brasil). Na Tabela 1, estão descritos os valores de saída e os valores efetivos considerando a passagem da luz pelo tubo de polipropileno que continha os precipitados celulares, conforme descrito anteriormente<sup>21</sup>.

## Grupos experimentais

### Grupo 1

Controle (macrófagos não ativados e não irradiados); Grupo 2: macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$ ; Grupo 3: macrófagos irradiados com LBI de 660 nm; Grupo 4: macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  e irradiados com laser de 660 nm; Grupo 5- macrófagos irradiados com laser de 780 nm; Grupo 6- macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$  e irradiados com laser de 780 nm

### Ensaio de atividade mitocondrial celular – MTT

A técnica MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) está fundamentada na análise colorimétrica da habilidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, localizada em células viáveis de clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares e que ficam retidos no interior das células viáveis. A posterior lise dessas células faz com que esses sais de formazana sejam liberados. Os macrófagos ( $1 \times 10^3$ /poço) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP) em meio DMEM (5% de SFB) por um, três e cinco dias. Depois desses períodos, foi realizada lavagem com 100  $\mu$ l de PBS, foi adicionado o MTT (0,5  $\mu$ g/mL) (Thiazolyl Blue – Sigma), e as placas foram incubadas por três horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Foram então

adicionados 100  $\mu$ l de isopropanol, e foi realizada a leitura da absorbância a 620nm com auxílio de um leitor de placas (2020, *Anthos*, Eugendorf, Áustria).

### Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma independente em triplicata, e cada amostra foi feita em octuplicata. Para a análise dos dados, foram utilizados média, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) com auxílio do software “*GraphPad InStat-3*”. A significância estatística foi verificada pelo teste Tukey e considerada aceitável quando  $p \leq 0,05$ .

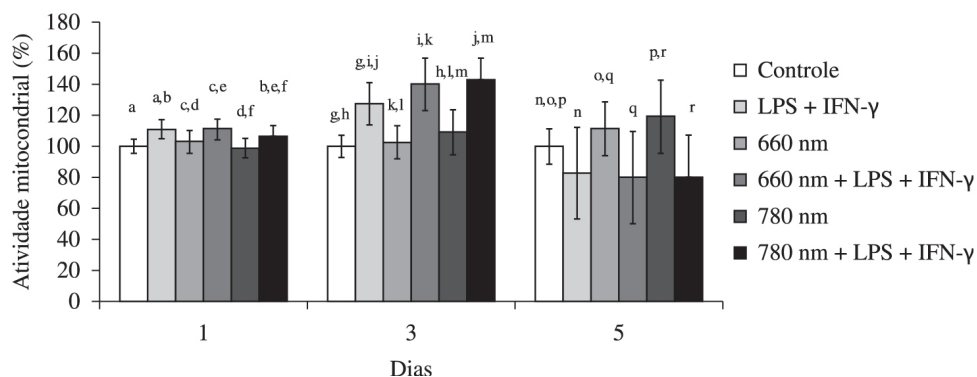
## Resultados

### Células ativadas (simulação de inflamação)

Após um dia de cultivo, os macrófagos ativados mostraram AM semelhante à dos macrófagos ativados e irradiados com laser de 660 nm, mas os macrófagos ativados e irradiados com laser de 780 nm mostraram AM inferior à dos macrófagos ativados ( $p < 0,05$ ). As células do grupo ativado e irradiado com laser de 660 mostraram AM maior ( $p < 0,05$ ) que as do grupo ativado e irradiado com laser de 780 nm. Também observamos que os macrófagos ativados mostraram AM maior ( $p < 0,001$ ) que os do grupo controle. Esse comportamento se repetiu nas culturas ativadas e irradiadas (laser 660 e laser 780 nm) que mostraram AM superior ( $p < 0,001$ ) à das culturas somente irradiadas nos respectivos parâmetros de energia (Figura 1). Após três dias de cultivo, macrófagos ativados e irradiados com laser de 660 ou de 780 nm mostraram AM superior ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) à dos macrófagos ativados. As células do grupo ativado e irradiado com laser de 660 mostraram AM semelhante às do grupo ativado e irradiado com laser de 780 nm. Além disso, os macrófagos ativados continuaram mostrando AM maior ( $p < 0,001$ ) que os do grupo controle (não ativado, não irradiado), e tal diferença ficou mais evidente (Figura 1).

**Tabela 1.** Parâmetros do laser em baixa intensidade (LBI).

Comprimento de onda (nm)	Potência de saída (mW)	Densidade de energia de saída (J/cm <sup>2</sup> )	Potência efetiva (mW)	Área cabeçote (cm <sup>2</sup> )	Tempo (s)	Área irradiada (cm <sup>2</sup> )	Densidade de potência efetiva (mW/cm <sup>2</sup> )	Densidade de energia efetiva (J/cm <sup>2</sup> )
780	70	3	53,9	0,04	1,5 (2x)	0,196	275	0,41
660	15	7,5	11,25	0,04	20	0,196	57,4	1,15



**Figura 1.** Percentual de atividade mitocondrial (método MTT) das células dos diferentes grupos experimentais em relação às células do grupo controle. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes (a,c,f,g,h,j,k,m,p,q,r=p<0,001; d,i,n=p<0,01; b,e,l,o=p<0,05).

Após cinco dias de cultivo, os macrófagos ativados mostraram AM semelhante à dos macrófagos ativados e irradiados com laser de 660 ou de 780 nm, e as células do grupo ativado e irradiado com laser de 660 também mostraram AM semelhante às do grupo ativado e irradiado com laser de 780 nm. Os macrófagos ativados passaram a mostrar AM menor ( $p<0,01$ ) que os do grupo controle (Figura 1). Na comparação entre as culturas ativadas e irradiadas (laser 660 e laser 780 nm) e culturas somente irradiadas, o comportamento observado no primeiro e no terceiro dia agora foi invertido, ou seja, a AM das células ativadas e irradiadas foi menor que a das culturas somente irradiadas nos respectivos parâmetros de energia ( $p<0,001$ ).

### Células não ativadas

Após um dia, não houve diferença entre a AM do grupo controle e a AM dos grupos irradiados. As células irradiadas com laser de 660 nm mostraram AM superior ( $p<0,01$ ) às irradiadas com laser de 780 nm (Figura 1). Após três dias, a irradiação com laser de 660 nm não alterou a AM das células quando comparadas às células não irradiadas, já a irradiação com laser de 780 nm causou um aumento na AM quando em comparação com o grupo controle ( $p<0,001$ ). As células irradiadas com laser de 660 nm mostraram AM inferior ( $p<0,05$ ) às irradiadas com laser de 780 nm (Figura 1). Após cinco dias, as irradiações com laser de 660 nm ( $p<0,05$ ) e principalmente com laser de 780 nm ( $p<0,001$ ) aumentaram a AM das células quando comparadas às células não irradiadas. As células irradiadas com laser de 660 nm mostraram AM semelhante às irradiadas com laser de 780 nm (Figura 1).

### Discussão

A modulação das diferentes fases do processo de reparo do músculo esquelético se dá principalmente pela mudança no perfil de ativação dos macrófagos, que tem como consequência a alteração de seu fenótipo e de suas funções<sup>1</sup>. Por essa razão, os macrófagos são considerados células-alvo para as intervenções terapêuticas<sup>1</sup>.

Por outro lado, na área da reabilitação das lesões musculares, muitos estudos têm evidenciado que o LBI é capaz de modular o processo de reparo muscular tanto em estudos experimentais como em estudos clínicos<sup>22-28</sup>, mas ainda não foi descrito se a laserterapia é capaz de alterar o estado de ativação dos macrófagos.

Neste estudo, avaliamos o efeito do LBI, em dois diferentes parâmetros, sobre a atividade mitocondrial de macrófagos J774 após um, três e cinco dias de irradiação, sendo que as células foram cultivadas em situação de deficiência nutricional e tratadas com LPS e IFN- $\gamma$  para simular um processo inflamatório e induzir o fenótipo M1.

Nos artigos científicos que avaliaram os efeitos do LBI e até do LED (*light emitting diode*) sobre macrófagos ou seus precursores (monócitos), não foi avaliada a atividade mitocondrial, mas sim diferentes funções dos macrófagos irradiados<sup>13,14,18-20,29-31</sup>.

A mitocôndria exerce um efeito modulatório crucial na via de ativação dos macrófagos inflamatórios, o que gera a produção de citocinas, ou seja, a via das MAK quinases (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinases*) e do NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B)<sup>32</sup>. Quando o macrófago é ativado por meio de um estímulo inflamatório (ex: LPS+IFN $\gamma$ ), essa organela amplifica a via MAPK aumentando a produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios<sup>33</sup>. A técnica MTT,

utilizada neste estudo, avalia a atividade mitocondrial e reflete diretamente o estado de ativação celular<sup>32,33</sup>.

Nos dois primeiros períodos de cultivo, houve aumento da AM dos macrófagos tratados com IFN $\gamma$  e LPS quando comparados aos macrófagos não ativados, o que demonstra que o modelo de ativação utilizado foi efetivo. Já no quinto dia de cultivo, a situação inverteu-se, ou seja, as células ativadas passaram a ter AM menor que as do grupo controle, provavelmente porque, neste período, elas tenham diminuído sua ativação e/ou sua viabilidade pela intensa estimulação nos dias anteriores e/ou pela ação dos produtos secretórios por elas produzidos.

Nas células ativadas, pudemos observar uma diminuição na AM quando da irradiação com laser de 780 nm no primeiro dia de cultivo. Já no terceiro dia, os lasers de 660 e de 780 nm modularam positivamente a AM dos macrófagos, o que pode sugerir que houve um aumento no estado de ativação celular nesse período. No quinto dia, os lasers não modularam a atividade mitocondrial das células ativadas.

Nas células irradiadas não ativadas, foi observada uma modulação positiva do LBI de 780 nm sobre a AM no terceiro dia e dos dois lasers (660 e 780 nm) no quinto dia de cultivo.

Somente o trabalho de Young et al.<sup>13</sup> avaliou a viabilidade e proliferação de uma linhagem de monócitos irradiados com laser, porém os autores usaram um laser pulsado de 820 nm (15 mW; 2,4 J/cm<sup>2</sup>; 0,3 J). Após 36 horas de cultivo, os autores também observaram, por meio do teste azul de *trypan*, um aumento no número de células viáveis quando comparado ao número de células do grupo não irradiado. A comparação direta com nossos resultados é difícil, pois os parâmetros dosimétricos, metodológicos e o desfecho são diferentes, além disso, os autores usaram monócitos, enquanto nosso trabalho avaliou uma linhagem de macrófagos.

De fato, muitos artigos têm demonstrado que o LBI atua em vários tipos celulares, principalmente por meio da ativação da cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a produção de ATP e induzindo fatores de transcrição<sup>34,35</sup>; desse modo, nossos resultados podem evidenciar que a energia entregue às células por meio da irradiação laser foi capaz de estimular esses mecanismos, aumentando a ativação nos macrófagos não ativados (780 nm no terceiro dia e 660 e 780 nm no quinto dia de cultivo) e ampliando (660 nm após um e três dias e 780 nm após três dias) esses efeitos nos macrófagos ativados.

Porém, também pudemos observar a redução da AM nas células ativadas e irradiadas com laser de 780 nm após um dia de cultivo. Esse resultado corrobora

os achados de Sousa et al.<sup>18</sup>, que descreveram a diminuição da produção de TNF- $\alpha$  24 horas após irradiação de macrófagos ativados para o perfil M1 com os mesmos parâmetros dosimétricos e metodologia por nós utilizados.

Embora os estudos *in vitro* nos proporcionem modelos padronizados de alta reprodutibilidade e possibilitem avaliações celulares e moleculares, logicamente, não podemos estabelecer uma correlação direta dos resultados obtidos *in vitro* com os desfechos clínicos futuros. Porém, é muito importante conhecer previamente o efeito do LBI e dos demais recursos terapêuticos sobre cada tipo celular que compõe o tecido muscular para podermos propor protocolos *in vivo* que modulem mais efetivamente o processo de reparo desse tecido.

Além disso, é fundamental conhecer as características ópticas dos tecidos/células a serem irradiados e das barreiras que a luz irá atravessar para atingi-los. No modelo experimental utilizado neste estudo, os lasers precisaram atravessar o fundo do tubo de ensaio para atingir os macrófagos, assim, parte da energia de saída foi perdida devido aos fenômenos de reflexão, espalhamento e absorção pelo polipropileno que constitui o tubo de ensaio<sup>21</sup>. Por essa razão, os valores de potência efetiva (remanescente) foram incorporados aos cálculos de densidade de potência e de densidade de energia apresentados. Esses valores foram calculados conforme proposto com Silva et al.<sup>21</sup>.

Para transpor os parâmetros dosimétricos para outro modelo experimental, deve-se conhecer o comportamento da luz nas diferentes barreiras que ela atravessará até atingir o seu alvo e ainda conhecer o coeficiente de absorção do tecido alvo, já que somente a energia absorvida é responsável pelo efeito terapêutico da luz.

De posse de dados experimentais tanto em nível celular como em ensaios com animais e humanos, o uso clínico de cada recurso será baseado em evidências científicas que o justifiquem e determinem e não no empirismo.

## ● Conclusão

Os LBI de 660 nm (15 mW, 7,5 J/cm<sup>2</sup>) e de 780 nm (70 mW, 3 J/cm<sup>2</sup>) podem modular a atividade mitocondrial e, portanto, o estado de ativação de macrófagos da linhagem J774 cultivados de maneira a simular a presença de um quadro inflamatório. Desse modo, mais estudos se fazem necessários para entender os mecanismos envolvidos na modulação desse processo bem como para avaliar os efeitos

da irradiação sobre outras funções importantes dos macrófagos.

## ● Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 2011/14474-9), Brasil, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq nº 303662/2012-3), Brasil e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROSUP), Brasil, pelo apoio financeiro. Ao Carlos Pelleschi Tabora (ICB – USP), pela doação da linhagem de macrófagos J774.

## ● Referências

- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(5):R1173-87. PMID:20219869 PMCID:PMC2867520. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00735.2009>
- Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J Cell Biol.* 2001;155(1):123-31. PMID:11581289 PMCID:PMC2150800. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200105110>
- Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):482-96. PMID:18996917 PMCID:PMC2638796. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn376>
- Schwab N, Waschbisch A, Wrobel B, Lochmüller H, Sommer C, Wiendl H. Human myoblasts modulate the function of antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol.* 2008;200(1-2):62-70. PMID:18644633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.06.012>
- Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol.* 2003;547(Pt 1):125-32. PMID:12562965 PMCID:PMC2342622. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2002.031450>
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35. PMID:12511873. <http://dx.doi.org/10.1038/nri978>
- Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anat Rec.* 1993;235(3):374-80. PMID:8430907. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1092350306>
- Bibikova A, Oron U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. *Anat Rec.* 1995;241(1):123-8. PMID:7879917. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1092410116>
- Oliveira NM, Parizzotto NA, Salvini TF. GaAs (904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. *Lasers Surg Med.* 1999;25(1):13-21. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(1999\)25:1<13::AID-LSM3>3.0.CO;2-7](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9101(1999)25:1<13::AID-LSM3>3.0.CO;2-7)
- Weiss N, Oron U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl).* 1992;186(5):497-503. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00185463>
- Lopes-Martins RA, Marcos RL, Leonardo PS, Prianti AC Jr, Muscará MN, Aimbire F, et al. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. *J Appl Physiol.* 2006;101(1):283-8. PMID:16627677. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01318.2005>
- De Almeida P, Lopes-Martins RÁ, Tomazoni SS, Silva JA Jr, De Carvalho PT, Bjordal JM, et al. Low-level laser therapy improves skeletal muscle performance, decreases skeletal muscle damage and modulates mRNA expression of COX-1 and COX-2 in a dose-dependent manner. *Photochem Photobiol.* 2011;87(5):1159-63. PMID:21749398. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00968.x>
- Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989;9(5):497-505. PMID:2811573. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.1900090513>
- 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. PMID:18563774. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20635>
- Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NHC, Silva CAA, Martins MD, Bussadori SK, et al. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol.* 2011;49(6):423-8. PMID:21702221.
- Da Silva TD, Mesquita-Ferrari RA, Souza NHC, Silva CAA, Martins MD, Bussadori SK, et al. Efeito da laserterapia de baixa potencia sobre a proliferação de mioblastos C2C12. *Fisioter Bras.* 2010;11(3):216-20.
- Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006;38(4):332-6. PMID:16526043. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20298>
- Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(1):37-42. PMID:19182976. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2007.2220>
- Bolton PA, Young S, Dyson M. Macrophage responsiveness to light therapy- a dose response study. Tissue repair research Unit Division of anatomy. 1990;2(3):101-6.
- Bolton P, Young S, Dyson M. Macrophage responsiveness to light therapy with varying Power and energy densities. *Laser Ther.* 1991;3:105-11.
- Silva DF, Mesquita-Ferrari RA, Fernandes KP, Raele MP, Wetter NU, Deana AM. Effective transmission of light for media culture, plates and tubes. *Photochem*

- Photobiol. 2012;88(5):1211-6. PMID:22540924. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01166.x>
22. Dourado DM, Favero S, Baranauskas V, Da Cruz-Hofling MA. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops moojeni snake venom. *Lasers Surg Med.* 2003;33(5):352-7. PMID:14677163. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.10237>
  23. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimaraes-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by Bothrops jararacussu snake venom. *Toxicol.* 2008;51(7):1236-44. PMID:18439641. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.02.007>
  24. Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Munin E, Fernandez CM, Cogo JC, et al. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by Bothrops jararacussu snake venom. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(4):591-7. PMID:19530909. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2008.2296>
  25. Mesquita-Ferrari RA, Martins MD, Silva JA Jr, Da Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VC, et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in skeletal muscle during the repair. *Lasers Med Sci.* 2011;26(3):335-40. PMID:21053039. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-010-0850-5>
  26. De Souza TO, Mesquita DA, Ferrari RA, Dos Santos Pinto D Jr, Correa L, Bussadori SK, et al. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. *Lasers Med Sci.* 2011;26(6):803-14. PMID:21761120. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-011-0951-9>
  27. Baptista J, Martins MD, Pavesi VC, Bussadori SK, Fernandes KP, Dos Santos Pinto D Jr, et al. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):11-7. PMID:20701543. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2009.2737>
  28. Fernandes KP, Alves AN, Nunes FD, Souza NH, Silva JA Jr, Bussadori SK, et al. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 $\beta$  in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):1043-6. PMID:23179308. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-012-1233-x>
  29. Mehrsai A, Afsharpad M, Afsharpad M, Mohyidin M, Ansari B, Pourmand G, et al. The effect of low-level helium-neon (HeNe) laser radiation on the secretion of cytokines that promote chronic graft rejection – An in vitro study. *Med Laser App.* 2009;24(3):194-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mla.2009.03.001>
  30. de Lima FM, Villaverde AB, Albertini R, De Oliveira AP, Faria HC No, Aimbire F. Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) mRNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(6):763-71. PMID:21142721. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2009.2638>
  31. Dube A, Bansal H, Gupta PK. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation. *Photochem Photobiol Sci.* 2003;2(8):851-5. PMID:14521221. <http://dx.doi.org/10.1039/b301233f>
  32. Emre Y, Nübel T. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett.* 2010;584(8):1437-42. PMID:20227410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.014>
  33. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986;94(1-2):57-63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)
  34. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516-33. PMID:22045511 PMID:PMC3288797. <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>
  35. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009;16:4. PMID:19272168 PMID:PMC2644974. <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-16-4>

**Correspondence**

**Kristianne Porta Santos Fernandes**  
 Rua Vergueiro, 249, Liberdade  
 CEP 01504-001, São Paulo, SP, Brasil  
 e-mail: kristianneporta@gmail.com