

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

WELLINGTON DOS SANTOS ALVES

ESTUDO DA AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O
RECRUTAMENTO CELULAR E OS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
PULMONARES NA DPOC EXPERIMENTAL EM RATOS

São Paulo, 2015

Wellington dos Santos Alves

Estudo da ação do laser de baixa intensidade sobre o recrutamento celular e os mediadores inflamatórios pulmonares da DPOC experimental em ratos

Tese apresentada à
Universidade Nove de Julho,
para obtenção do título de Doutorado em
Ciências da Reabilitação.
Orientador: Prof. Drº João Carlos Ferrari Corrêa

São Paulo, SP
2015

Alves, Wellington dos Santos.

Estudo da ação do laser de baixa intensidade sobre o recrutamento celular e os mediadores inflamatórios pulmonares da dpoc experimental em ratos. / Wellington dos Santos Alves. 2015.

81 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.

Orientador (a): Prof. Dr^o João Carlos Ferrari Corrêa.

1. Reabilitação pulmonar. 2. Laser de baixa potência. 3. DPOC.

I. Corrêa, João Carlos Ferrari.

II. Título

CDU 615.8

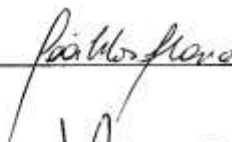
São Paulo, 26 de fevereiro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

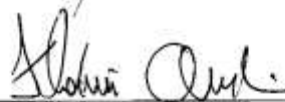
Aluno(a): WELLINGTON DOS SANTOS ALVES

Título da Tese: "Estudo da ação do laser de baixa intensidade sobre o recrutamento celular e os mediadores inflamatórios pulmonares da DPOC experimental em ratos".

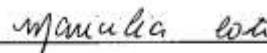
Presidente: PROF. DR. JOÃO CARLOS FERRARI CORREA



Membro: PROF. DR. FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



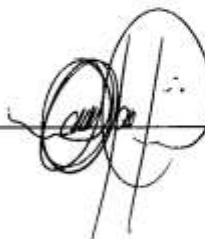
Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA



Membro: PROFA. DRA. LUCIANA MARIA MALOSÁ SAMPAIO



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



Agradecimentos

Agradeço a todos que de um modo ou de outro me ajudaram na realização desta pesquisa, desse trabalho. Aos professores Dr. Rodolfo Vieira e Dr^a Ana Paula Ligeiro pelos seus ensinamentos no início do curso. A professora Dr^a Regiane Albertine pela ajuda sempre que necessário, sempre contribuindo de forma positiva para o sucesso desse trabalho. Ao professor Dr. Flavio Aimbire pela sua enorme contribuição, apoio e incentivo para que eu fizesse o doutorado, uma pessoa que considero muito e sempre terei respeito e admiração. “Obrigado professor!”

Agradeço ainda a Universidade Estadual do Piauí e a Faculdade Santo Agostinho pelo apoio a realização deste curso, com os seus programas de bolsa de incentivo à pós-graduação.

Sem deixar de falar do meu amigo e ex-aluno José Lopes Júnior por sempre estar disponível a ajudar a qualquer momento, inclusive nas horas de inalação da fumaça de cigarro.

Também a Dr^a Maria de Fátima Pires (GERATEC/UESPI) pela colaboração em emprestar seu laboratório sempre que necessário.

Estudo da ação do laser de baixa intensidade sobre o recrutamento celular e os mediadores inflamatórios pulmonares da DPOC experimental em ratos

Resumo

Introdução: Uma das doenças mais comuns no século atual , a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) tem a sua marca na inflamação pulmonar, caracterizada por uma série de células como os macrófagos, linfócitos e principalmente os neutrófilos que degradam as fibras elásticas e liberam uma série de mediadores inflamatórios que recrutam outras células que atuam na defesa a nível pulmonar. **Objetivo:** desenvolver um modelo de DPOC com inalação passiva de fumaça de cigarro num período de 45 dias e promover o tratamento da doença com o laser de baixa potência. **Metodologia:** os animais foram organizados em grupos, o controle (respira o ar ambiente sem fumaça de cigarro), o grupo DPOC (45 dias de inalação passiva de fumaça de cigarro) e Laser (45 dias de inalação passiva + 15 dias de aplicação do laser de baixa potência). **Resultados:** A contagem total e diferencial das células, bem como as análises histológicas e bioquímicas mostra a presença da DPOC. Os dados do grupo tratado com laser de baixa potência mostra que houve redução do número de células inflamatórias e da concentração dos mediadores inflamatórios presentes na DPOC nos tecidos animais. **Conclusão:** A inalação passiva de fumaça de cigarro por 45 dias ocasionou a DPOC, e o laser de baixa potência foi eficaz no seu tratamento pois levou a redução dos mediadores inflamatórios e células presentes nesta doença pulmonar.

Palavras chaves: Reabilitação Pulmonar; Laser de Baixa Potência; DPOC.

Low intensity laser action study on cell recruitment and pulmonary inflammatory mediators of experimental COPD in rats

Abstract

Introduction: One of the most common diseases in the present century, COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) has its mark on pulmonary inflammation, characterized by a number of cells such as macrophages, lymphocytes and neutrophils mainly degrading elastic fibers and release a series of inflammatory mediators that recruit other cells that act in defense in the lung. **Objective:** To develop a COPD model with passive inhalation of cigarette smoke in a 45 day period and promote the treatment of the disease with low-power laser. **Methodology:** the animals were organized into groups, control (breathing room air without cigarette smoke), the COPD group (45 days of passive inhalation of cigarette smoke) and Laser (45 days of passive inhalation + 15 days of application low power laser) .**Results:** Total and differential cell counts as well as histological and biochemical analysis shows the presence of COPD. Data from low-power laser-treated group shows that there was a reduction in the number of inflammatory cells and the concentration of the inflammatory mediators present in animal tissue in COPD. **Conclusion:** The passive inhalation of cigarette smoke for 45 days resulted in COPD, and the low-power laser was effective in the treatment because it took the reduction of inflammatory mediators and cells present in this lung disease.

Key words: Pulmonary Rehabilitation; Laser Low Power; COPD.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura 1 Total count of cells in the Broncho alveolar lavage (A) and differential (B).....	42
Figura 2 Inflammatory mediators in both groups.....	43
Figura 3 Expression of RNAm of chemokines for the groups studied.....	44
Figura 4 Percentage of mucus in the respiratory epithelium of the groups studied.....	44
Figura 5 Values of the mean linear intercept in groups.....	45
Figura 6 Percentage of collagen in the respiratory epithelium of the groups studied.....	46
Figura 7 Percentage of elastic fibers in the lung parenchyma of the groups studied.....	47

Artigo 2

Figura 1 Cell count in bronchoalveolar lavage	59
Figure 2 Differential cell counts	59
Figura 3 Histology of the groups studied.....	60
Figura 4 Chemokines in the both groups	60
Figura 5 Chemokines and Cytokines in the groups studied.....	61
Figura 6 Chemokines and Cytokines in the groups studied.....	61

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

AsGa – Arseneto de gálio

ATP – Adenosina trifosfato

ATT-1 – Antitripsina 1

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CVF – Capacidade vital forçada

C5a – Componente 5 do complemento

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ERO – Espécies Reativa de Oxigênio

ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio

ET-1 – Endotelina 1

GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GM-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos

HE – Hematoxilina-eosina

He-Ne – Hélio-Neônio

IFN- γ – Interferon gama

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-8 – Interleucina 8

InGaAlP – Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio

LBA – Lavado bronco alveolar

LBP – Laserterapia de baixa potência

LLLT – Low level laser therapy

LPS - Lipopolissacarideo

LTB-4 – Leucotrieno B4

MCP – Proteína quimiotóxica de macrófago

MEC – Matriz extracelular

MHC – Complemento principal de histocompatibilidade

MMP-1 – Metaloproteinase da matriz 1

MMP-9 – Metaloproteinase da matriz 9

MMP-12 – Metaloproteinase da matriz 12

MPO – Mieloperoxidase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF – fator de ativação plaquetária

PBS – Solução salina fosfatada tamponada

PGG2 – Prostaglandina G2

PGH2 – Prostaglandina H2

POE – Proteína catiônica eosinofílica

PQM-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

SBPT – Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia

TGF- β – Fator de crescimento mutável beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VEF1 – Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1 Contextualização	12
1.1 Tabagismo.....	12
1.2 Alterações funcionais pulmonares decorrentes do tabagismo	13
1.3 Células envolvidas no processo de inflamação pulmonar.....	14
1.3.1 Neutrófilos	14
1.3.2 Macrófagos	15
1.3.3 Linfócitos	16
1.4 Ação dos mediadores na formação da DPOC.....	17
1.5 Modelos de inflamação pulmonar.....	19
1.6 Laser de baixa potência.....	21
2 Justificativa	25
3 Objetivo	26
4 Resultado	27
4.1 Artigo 1.....	27
4.2 Artigo 2.....	48
5 Discussão da tese	62
6 Conclusão da tese.....	68
7 Referências Bibliográficas.....	69
Anexo 1 Submissão do artigo 1	78
Anexo 2 Submissão do artigo 2	79
Anexo 3 Comitê de ética	80
Anexo 4 Comitê de ética.....	81

1 Contextualização

1.1 Tabagismo

Segundo WHO, 2011, tabagismo é o consumo de qualquer derivado do tabaco, produtor ou não de fumaça (cigarro, charuto, cachimbo, cigarrilha, cigarro de palha, rapé, tabaco mascado, narguillé). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o tabagismo como uma doença crônica, epidêmica, transmitida através da propaganda e publicidade, tendo como vetor, a poderosa indústria do tabaco. É a maior causa isolada evitável de adoecimento e mortes precoces em todo o mundo, e responsável pela morte de um a cada dez adultos no mundo, 5 milhões de mortes cada ano. Se nada for feito, e o padrão de consumo atual se mantiver, prevê-se 10 milhões de mortes anuais em 2020, sendo 70% delas em países em desenvolvimento. No Brasil, dados da Organização Pan-americana de Saúde, apontam para 200 mil mortes anuais devido ao tabagismo.

O tabagismo é responsável por aproximadamente 45% das mortes nos homens com menos de 65 anos de idade e por mais de 20% de todos os óbitos por doença coronariana nos homens com idade maior que 65 anos. Além disso, homens fumantes entre 45 e 54 anos de idade têm quase três vezes mais probabilidade de morrer de infarto do miocárdio, embolia pulmonar e tromboflebite. Calcula-se que o tabagismo seja responsável por 40% dos óbitos por doença coronariana em mulheres com mais de 65 anos de idade. Uma vez cessado o hábito de fumar, o risco de doença cardíaca começa a declinar. Após 1 ano, o risco é reduzido à metade, e após 10 anos é semelhante ao de indivíduos sem antecedentes ao tabagismo (Luz, 2003).

A morbidade e mortalidade da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é um problema de saúde de dimensão global e a fumaça de cigarros tem sido identificada como o risco mais importante para o desenvolvimento de DPOC (Torres e Godoy, 2004). A fumaça de cigarro, uma mistura composta por mais de 4.700 substâncias, predispõe a doenças pulmonares e cardiovasculares, como a doença arterial periférica e infarto do miocárdio. É uma das fontes exógenas de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente) (Santos-Silva et al, 2013).

No mundo vêm ocorrendo mobilizações para a redução do tabagismo, no entanto, este continua sendo um grave problema de saúde pública, que compromete o estado físico e mental das pessoas. O tabaco é um agente causador de importantes problemas

relacionados à saúde, o que constitui um desafio não só para os serviços de saúde, mas também para o desenvolvimento econômico, social, educacional e ambiental (Echer, Ferreira e Lucena, 2011).

Atualmente mais de um bilhão de pessoas são fumantes no mundo e na década de 2030 estima-se que esse total poderá chegar a dois bilhões. A maioria destes fumantes estará nos países em desenvolvimento. O impacto sobre a saúde decorrente do uso do tabaco é bem conhecido: responsável por 90% dos tumores pulmonares, 75% das bronquites crônicas, 25% das doenças isquêmicas do coração(Wünsch Filho, et al, 2010).

A dependência à nicotina conta com três componentes básicos: dependência física, responsável por sintomas da síndrome de abstinência como menor concentração e atenção, ansiedade, vontade de fumar; dependência psicológica, responsável pela sensação de ter no cigarro um apoio ou mecanismo para lidar com sentimentos de solidão, frustração, pressões sociais; e condicionamento, representado por hábitos associados ao fumar, presente na vida diária, muitas vezes durante anos (Ferreira, *et al.*, 2011).

1.2 Alterações funcionais pulmonares decorrentes do tabagismo

Hoje existem mais de 50 doenças relacionadas ao tabagismo, atingindo principalmente os aparelhos respiratórios, cardiovasculares, digestivos, genitourinário, neoplasias malignas, perturbações na gravidez e no feto e outras. Fumar compromete a oxigenação dos tecidos, não apenas devido aos efeitos vasomotores, mas também devido aos níveis aumentados de carboxihemoglobina, em resultado da exposição ao monóxido de carbono existente no fumo. Uma eritrocitose compensatória pode ser encontrada em alguns fumadores, em particular quando o consumo de tabaco é elevado. Em resultado de todos estes mecanismos os fumadores apresentam uma menor capacidade de transporte de oxigênio e um compromisso da circulação periférica, devido ao aumento da viscosidade sanguínea e da leucocitose (Rodrigues, Viegas & Lima, 2002).

Para Testoni, 2005, o fumo provoca vários efeitos nas células epiteliais pulmonares, causando lesões crônicas e reações inflamatórias, o que se caracteriza por elevado número de células inflamatórias nos espaços aéreos, como os neutrófilos, linfócitos e macrófagos e maior sequestro dessas células nos espaços aéreos distais . Além disso, esse agente provoca também aumento da permeabilidade epitelial, conduzindo ao

edema pulmonar, colapso e maior destruição dos alvéolos, em decorrência da maior quantidade de elastase liberada.

A inflamação e as alterações estruturais vão condicionar aumento da resistência ao fluxo aéreo e perda da retração elástica pulmonar, conjunto de alterações que promovem obstrução das vias aéreas, cuja evolução vai resultar no declínio da função pulmonar (Rodrigues, 2007). Tornando mais difícil a liberação de ar e oxigênio aos pulmões durante o exercício intenso. Esses fatores levam à intolerância ao exercício e à piora progressiva do condicionamento físico, chegando a limitar as atividades da vida diária, provocando isolamento social, ansiedade, depressão e dependência (Testoni, 2005).

Os macrófagos liberam mediadores inflamatórios (citocinas) que atraem maior quantidade de leucócitos e neutrófilos, gerando reação inflamatória em cadeia. A alteração mais precoce nos brônquios devido ao fumo resulta da ciliotoxicidade, a qual provoca uma diminuição e até mesmo inibição dos movimentos ciliares prejudicando imediatamente o transporte mucociliar. Com a continuidade do hábito de fumar, os cílios acabam por cair, desnudando extensas áreas da luz brônquica (Tarantino, 2008).

1.3 Células envolvidas no processo de inflamação pulmonar

1.3.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são uma das células centrais no mecanismo fisiopatogênico da DPOC, em que existem claramente acúmulo e ativação deste tipo celular. Os neutrófilos são abundantes no sangue, mas praticamente ausentes nos tecidos pulmonares em pessoas saudáveis (Dallegrì; Ottonello, 1997; Wagner; Roth, 2000).

Tanto a estrutura quanto a função dos neutrófilos estão modificadas nos tabagistas. O fumo aumenta o número de inclusões citoplasmáticas de algumas células residentes no pulmão e altera a fixação do receptor para o composto C3 do complemento ativado, o que dificulta a fagocitose. Diminui também as rugosidades da membrana dos neutrófilos e macrófagos (Dallegrì; Ottonello, 1997).

Os neutrófilos estão implicados na liberação de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e enzimas capazes de promover dano tecidual. Além disso, podem promover hipersecreção de muco por meio de efeito secretagogo e pela proliferação de glândulas mucosas (Holz et al, 2008; Costa; Rufino; Silva, 2009).

Numerosos neutrófilos são observados no escarro induzido e no lavado broncoalveolar (LBA) de portadores de DPOC. O aumento do número de neutrófilos também ocorre nos indivíduos tabagistas e sem DPOC, porém em menor proporção que nos portadores de DPOC. Além do mais, há estudos que mostram atividades nesses neutrófilos dentro do tecido pulmonar quando avaliadas a mieloperoxidase (MPO) e a lipocalina neutrofílica humana. Os neutrófilos secretam proteinases como a elastase neutrofílica, a catepsina neutrofílica e a proteinase neutrofílica-3, que irão contribuir para o desequilíbrio entre proteases e antiproteases e provocar destruição do tecido pulmonar e hipersecreção crônica da mucosa brônquica. No período da exacerbação da DPOC, há maior aumento do número de neutrófilos nas vias aéreas e no lavado broncoalveolar (LBA) (Tarantino, 2008).

1.3.2 Macrófagos

Os macrófagos migram para locais de inflamação, atraídos por certos mediadores, particularmente o C5a (um membro da cascata do complemento). No tecido conjuntivo possuem as seguintes características estruturais: eles contêm abundantes lisossomas, necessários para a fragmentação de partículas fagocitadas. Macrófagos ativos possuem numerosas vesículas fagocíticas (ou fagossomas) para o armazenamento transitório de materiais ingeridos. O núcleo tem um contorno irregular. Os macrófagos do tecido conjuntivo propriamente dito desempenham três funções principais: reabsorção e degradação de componentes da MEC, como fibras antigas. Apresentação de antígenos a linfócitos como parte das respostas inflamatórias e imunológicas. Produção de citocinas (p. ex., a interleucina-1, um ativador dos linfócitos T auxiliares [*helper*] e o fator de necrose tumoral- α , um mediador inflamatório) (Kierszenbaum, 2008).

Apresentam importante pleomorfismo no pulmão, com tamanhos diferentes, o menor com intensa capacidade de fagocitose e os maiores com grande atividade bioquímica (Dallegrì; Ottonello, 1997; Hogg; Senior, 2002). Em geral, representam na contagem celular do lavado broncoalveolar 90% das células aspiradas. Nos fumantes, pode até ser mantido este percentual; contudo, o número absoluto costuma ser quatro a cinco vezes maior. Estão localizados difusamente desde nas grandes vias aéreas até no alvéolo (Rufino; Silva, 2006).

Macrófagos são visualizados nas pequenas e grandes vias aéreas e no parênquima pulmonar dos pacientes portadores de DPOC. Naqueles com maior predomínio de enfisema, os macrófagos encontram-se localizados em locais de destruição da parede alveolar. Os macrófagos desempenham, provavelmente, um papel preponderante na inflamação da DPOC por meio da liberação de mediadores, tais como TNF- α , IL-8 e LTB₄, que promovem a inflamação neutrofílica. Em biópsias brônquicas obtidas a partir de vias aéreas centrais, nos constatou que fumantes tiveram um aumento do número de macrófagos e linfócitos T em comparação com não fumantes (Menezes, 2005).

1.3.3 Linfócitos

Evidências acumuladas nos últimos quatorze anos indicam que a DPOC é uma doença com forte participação patogênica de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. Expressam moléculas MHC I e os linfócitos T CD4⁺, MHC II. Além desta diferença, as células T CD8⁺ possuem alta suscetibilidade para apoptose e baixa sobrevivência. Este último dado pode ser um dos fatores para explicar o pouco conhecimento das células CD8⁺. Outro fator de importância na diferenciação entre os subtipos de linfócitos é a alta resistência para apoptose induzida pela ligação do receptor Fas nos linfócitos T CD4⁺ (Majo; Ghezzi; Cosio, 2001). Os linfócitos CD8⁺ predominam nas regiões perivasculares, enquanto que os CD4⁺ predominam no subepitélio. Quando ocorre ativação dos CD8⁺, eles levam à citólise de células infectadas ou alteradas do hospedeiro, através da liberação de Interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α , ocasionando rápida resolução de infecções virais. A excessiva e inapropriada estimulação de CD8⁺, em modelos experimentais, tem demonstrado alterações patológicas destrutivas pulmonares (Silva, et al, 1989).

Alguns autores publicaram trabalhos que evidenciavam o aumento da concentração de CD8⁺ nos pulmões de pacientes com DPOC fumantes em relação a não fumantes. Outros também encontraram maior população de células CD8⁺ no sangue periférico em pacientes com DPOC (De Jong et al, 1997; Saetta et al, 1993; O'shaughnessy et al, 1997).

Os linfócitos T CD8⁺ (citotóxico) podem ser visualizados por todo o tecido pulmonar. Sua função na inflamação da DPOC ainda não foi totalmente compreendida, mas eles podem contribuir para a DPOC liberando perforina, granzima-B e TNF- α , que causam citólise e apoptose das células epiteliais alveolares que são provavelmente responsáveis pela persistência da inflamação.

1.4 Ação dos mediadores no desenvolvimento da DPOC

Vários insultos, como a fumaça do cigarro, induzem a produção de quimiocinas e outros quimioatrativos, tais como a interleucina-8 (IL-8), a proteína quimiotática de monócitos-1 (PQM-1) e o leucotrieno B₄ (LTB₄), promovendo o acúmulo de células inflamatórias no pulmão. Essas células, principalmente os neutrófilos e os macrófagos, produzem citocinas, tais como o fator de necrose tumoral TNF- α , IL-1 β , IL-6 e espécies reativas de oxigênio (EROs); em particular, o ânion superóxido (Foronjy et al., 2006). Além disso, liberam proteinases, incluindo as elastases e as metaloproteinases da matriz (MMP-9 e MMP-12). Essas últimas são enzimas que degradam a matriz extracelular do tecido pulmonar ocasionando o enfisema. São secretadas por neutrófilos, macrófagos, monócitos e até mesmo pelos fibroblastos, clivando moléculas ou liberando moléculas bioativas que contribuem eventualmente, para o desenvolvimento do enfisema (Calverley & Rennard, 2007).

Dentre os mediadores presentes nesta doença pulmonar podemos destacar os MIP's (Proteínas Inflamatórias de Macrófagos), destacando a MIP-2 também identificada por CXCL2 e o MIP-3 α , conhecido como CCL20 (Zlotnik & Yoshie, 2000). Estas proteínas estão relacionadas com a quimiotaxia de monócitos e outras células inflamatórias como os linfócitos. Sua produção pode ser estimulada por fatores de células T como o IL-17 e INF-gama, também sabe-se que o IL-1 β e TNF- α induzem a sua produção (Caux et al, 2000). Em pacientes com DPOC há uma grande expressão de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

O TNF- α ativa diretamente as vias de transdução de sinal que afeta a produção de matriz de tecido conectivo e síntese de enzimas proteolíticas. Em estudos com camundongos o TNF- α está em níveis aumentados logo após a exposição a fumaça de cigarro, levando ao enfisema pulmonar (Dinarello, 1996; Lucey et al, 2002).

Há também o fator de crescimento transformador (TGF)- β , um fator de crescimento com multifuncionalidade que modula várias funções celulares, incluindo o crescimento e a diferenciação celular, apoptose e remodelamento da matriz extracelular.(McDevitt, 2007). É secretada in vivo como um complexo latente inativo que exige a ativação para liberar a molécula biologicamente ativa. Conforme Tarantino, 2008, esses mediadores podem atuar no remodelamento das vias aéreas ocasionando fibrose e estreitamento bem como obstrução irreversível, levando a DPOC.

A IL-1 β é uma proteína membro da família das interleucinas 1, sendo produzida de forma primária por macrófagos, neutrófilos, linfócitos e várias outras células, é ativada por caspase 1 (CASP1/ICE). É um importante mediador inflamatório, especialmente no início da inflamação, induzindo a secreção de quimiotáticos pelas células epiteliais dos capilares, aumentando a atividade de moléculas de adesão, recrutando células mononucleares e ativando macrófagos, ocasionando o aumento das metaloproteinases macrofágicas(MMP's) contribuindo de forma indireta para a destruição da matriz extracelular. (Wewers et al, 1997)

De acordo com Tarantino (2008) além dos já citados, ainda participam desta patologia, a MCP-1, proteína quimiotática de macrófago, presentes no LBA de pacientes com DPOC e de fumantes sem DPOC, atraindo macrófagos. GM-CSF, fator estimulador de colônia de magrófagos que é importante para a sobrevivência dos neutrófilos e a endotelina-1 (ET-1) presente em pacientes graves.

Analisando vários outros artigos há citações de proteases e anti-proteases, como por exemplo a protease α 1-antitripsina, que é a principal responsável pela inibição da elastase neutrofílica, onde a redução de sua concentração no soro e nos tecidos está associada à DPOC (Serra et al, 2008) .

Todos os achados que compõem a hipótese protease/antiprotease e a hipótese oxidante/anti-oxidante, têm sido o conceito dominante na patogênese do enfisema pulmonar (Elias & Lee, 2005). Contudo, os agentes anti-inflamatórios ou anti-oxidantes somente reduzem os sintomas, eles não afetam o declínio da VEF1 (Calverley & Rennard, 2007). Dessa forma, outros mecanismos patogênicos devem estar envolvidos com o desenvolvimento do enfisema. Ademais, embora o ato de fumar seja considerado o mais importante fator de risco para o enfisema, apenas 15-20% dos fumantes realmente desenvolvem enfisema pulmonar (Fletcher & Peto, 1977; Pauwels et al., 2001). Isso sugere que a susceptibilidade para a DPOC para cada indivíduo é, pelo menos em parte, determinada geneticamente (Patel et al., 2008).

1.5 Modelos de inflamação pulmonar

Estados patológicos pulmonares que são caracterizados por limitação progressiva, não reversível, ao fluxo aéreo são reunidos sob a designação geral de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Dentro do espectro desta doença existem 2

entidades nosológicas: bronquite crônica e enfisema. A primeira é caracterizada por fibrose, estreitamentos luminiais, resistência aumentada e inflamação das vias aéreas. O enfisema pulmonar, por sua vez, apresenta como principal característica a destruição das paredes alveolares distais ao bronquíolo terminal, sem fibrose pulmonar significativa (Ribeiro-Paes et al, 2014)

Na busca de investigar os processos envolvidos na inflamação pulmonar, diversos estudos e protocolos foram desenvolvidos no objetivo de se melhor entender os mecanismos que atuam no enfisema, sendo os estudos realizados com papaína e fumaça de cigarros os mais comuns.

A instilação intratraqueal de papaína, tem como principal característica a destruição do parênquima pulmonar (Fujita e Nakanishi, 2007), esse modelo foi proposto inicialmente por Gross et al em 1965, havendo a formação de enfisema pulmonar. Desde então, outros autores também se utilizaram desta protease para desenvolver o enfisema pulmonar, por exemplo, Fusco et al, 2002, que instilaram em ratos, 20mg/Kg corporal de papaína diluídas em 3,5ml/Kg em solução fisiológica a 09,% . Após 40 dias da instilação, o resultado mostrou enfisema pan-acinar com hiperdistensão alveolar, além da redução na quantidade de fibras elásticas no tecido pulmonar dos animais instilados com papaína.

Segundo Antunes e Rocco, 2011, modelos com proteases são eficazes por reforçar a hipótese do desequilíbrio protease/antiprotease, sendo modelos rápidos de se realizar e que ocasiona lesões estruturais e inflamação sistêmica semelhantes ao enfisema em humanos. Apesar dessas vantagens, estes modelos apresentam aspectos divergentes à doença humana devido a ausência de componentes inflamatórios responsáveis pela obstrução das vias aéreas (March et al, 2000).

Conceitos atuais sugerem que a fumaça do cigarro leva a uma resposta inflamatória anormal no trato respiratório inferior que, por sua vez, conduz ao dano e destruição do tecido (Togo et al, 2008). A presença de mais de 4.700 compostos químicos, incluindo altas concentrações de radicais livres oxidantes são tidos como os responsáveis por induzir um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, que é identificada como um importante fator etiológico na patogênese da DPOC (Karvonen et al, 2013)

No modelo de DPOC induzida por fumaça do cigarro ocorrem várias mudanças estruturais, como o alargamento do espaço aéreo nos pulmões ou enfisema, alterações inflamatórias e hiperplasia de células caliciformes secretoras de muco nos tecidos das vias aéreas, além de outras mudanças bioquímicas que se assemelham a clínica características de DPOC em pacientes (D'huslt et al, 2005, Alves et al, 2010). Apesar de

que na década 80 estudos com fumaça de cigarro eram questionados quanto a sua confiabilidade (March et al, 2000) hoje estes modelos experimentais são amplamente divulgados e utilizados para avaliar as drogas que podem ser úteis em pacientes com DPOC, no entanto a maior parte utiliza tempo muito prolongado de exposição a fumaça, existindo modelos com 36 semanas (Zheng et al, 2009), 6 meses (Toledo et al, 2012).

O estudo de Rafiq et al, 2013, baseou-se na exposição crônica durante sete semanas à fumaça de cigarro o que causou danos à histoarquitetura da traquéia e os pulmões de ratos Wistar, que foi observada por meio elevados níveis de citocinas (TNF- α) e concentrações de proteínas totais no LBA. Além disso, os laudos histopatológicos confirmaram a bronquite causada pela fumaça do cigarro.

No nosso estudo, Alves, 2010, a indução da resposta inflamatória pulmonar deu-se pela inalação passiva de fumaça de cigarro comercial. Os animais foram fumantes passivos inalando a fumaça de 14 cigarros por dia, 6 dias por semana durante 45 dias com intervalo de 15 minutos entre uma sessão de inalação e outra. Houve avaliação histológica na qual verificou-se o infiltrado inflamatório, espessamento septal, intensidade do enfisema, além da presença de células inflamatórias. Oliveira et al, 2010, em seu estudo induziu o processo inflamatório pulmonar por meio da inalação passiva de fumaça de cigarro seguindo mesmo protocolo de Alves, 2010.

O processo de inflamação pulmonar também pode ocorrer por meio de microrganismos, tais como as bactérias. Na pesquisa de Ferreira et al, (2007) usou-se lipo polissacarídeo (LPS) (100 μ g/mL) de *Salmonella abortus* em salina estéril instilados na cavidade nasal dos animais gerando um processo inflamatório. De acordo com o autor infecções bacterianas são causas relevantes de morbidade e mortalidade no mundo. As respostas às infecções envolvem uma interação complexa entre os componentes bacterianos e o sistema imune. Endotoxinas liberadas de bactérias gram-negativas são estímulos potentes para o sistema imune e a resposta competente do organismo a estes agentes determina a evolução do processo.

O processo inflamatório é invariavelmente caracterizado pela produção de prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradiquinina, fator de ativação de plaquetas, as interleucinas (IL), e as células que migram. O recrutamento de células polimorfonucleares (PMNs) a partir da circulação para o tecido inflamado tem uma função chave na degradação e remodelação do tecido lesado (Ribeiro et al, 2014).

1.6 Laser de baixa potência

Embora Albert Einstein originalmente tenha iniciado a tecnologia a *laser* em 1917 com a Teoria da “Emissão Estimulada foi somente em 1960 que Theodore Maiman produziu o primeiro disparo de luz *laser* de rubi no Hughes Laboratories nos EUA. Nas décadas subsequentes, vários dispositivos *laser* baseados no protótipo original de Maiman têm encontrado aplicações que vão desde apontadores a *laser* e leitores de código de barras, até localizadores para utilização militar e sistemas para alcance de alvos (Kitchen, 2003). O primeiro laser a gás, um He-Ne, foi desenvolvido por Javan e colaboradores em 1961 (Genovese, 2000).

Nos últimos 15 anos, a introdução de pequenos fotodiodos compactos para emissão de *laser* tem produzido um aumento no uso dessa terapia, conhecida como laserterapia de baixa potência ou baixa intensidade (*LILT – low-intensity laser therapy*) no ocidente. A laserterapia, tem encontrado aplicação cada vez maior por fisioterapeutas (para uso humano e animal), dentistas, acupunturistas, podólogos e alguns médicos, para uma variedade de condições incluindo o tratamento de feridas abertas, lesões de tecidos moles, condições artríticas e dores associadas a várias etiologias (Genovese, 2000).

O princípio de funcionamento de um sistema laser consiste no bombeamento de um fóton ou partícula energética de luz para um meio ativo ou meio laser. Essa ação faz com que os átomos do meio laser absorvam, reflitam ou transmitam a energia fornecida por esse fóton. Nas duas últimas situações (transmissão ou reflexão) não haverá modificações na energia luminosa do sistema, mas quando existe absorção o fenômeno é observado (Young, 1998).

Trata-se então de um complexo de ondas eletromagnéticas que apresentam características ou propriedades precisas (Agne, 2005), como a monocromaticidade que é considerada como a luz produzida por um laser de uma cor só, como consequência do seu único comprimento de onda oscilar na mesma frequência. (Guirro; Guirro, 2004; Kitchen, 2003). No caso dos lasers visíveis é produzida uma única cor pura, por exemplo, os lasers de rubi dão uma luz vermelha de 694,3 nm. A radiação laser com comprimento de onda único é também chamada de monocromática nas regiões infravermelha e ultravioleta, apesar de invisível (Low; Reed, 2001; Agne, 2005). O comprimento de onda é um fator crítico na determinação dos efeitos terapêuticos produzidos por tratamentos por laser, já que esse parâmetro determina quais biomoléculas específicas serão absorvidas na

radiação incidente e assim qual a interação fotobiológica básica por trás de um determinado efeito de tratamento (Genovese, 2000).

A radiação *laser* pode ser classificada de acordo com a potência de emissão em categorias considerando sua potência e perigos, em potência muito baixa, são os que emitem luz vermelha visível, categorias I e II, potência média, categorias IIIA e IIIB, geralmente inferior a 50 mW, tendo luz vermelha visível e infravermelha invisível, e laser de potência elevada, categoria IV, sendo os utilizados nas cirurgias para coagulação ou corte, incluindo cauterização e oftálmicos (Agne, 2005). Outros autores consideram Laser de Alta Potência ou Laser Cirúrgico, sistema que emite radiações de alta potência com poder destrutivo associado aos efeitos fototérmicos; e Laser de Baixa Potência ou Laser Não-cirúrgico, que emitem radiações de baixa potência, sem poder ser destrutivo, e possuem ação fotoquímica e fotobiológica, como analgésica, antiinflamatória e de bioestimulação (Silva, 2003).

A laserterapia de baixa intensidade ou de baixa potência é um termo genérico que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminosos monocromáticos com potencia relativamente baixa ($< 500 \text{ mW}$) para o tratamento de doenças e lesões utilizando dosagens (normalmente $< 35 \text{ J/cm}^2$) consideradas baixas demais para efetuar qualquer aquecimento detectável nos tecidos irradiados. Essa laserterapia é, portanto, uma modalidade de tratamento atérmica, essa modalidade é também conhecida com frequência de laser (foto) bio estimulação, particularmente nos EUA, onde o termo é, às vezes, abreviado para biostim (Kitchen, 2003).

Vários efeitos podem ser esperados, como antiálgicos, bioestimulantes de trofismo celular, antiinflamatório, antiedematoso, normalizador circulatório e estimulante do reparo tecidual, que para alguns autores é o mais expressivo (Rabelo et al, 2006).

A ação antiinflamatória e a antiedematosa é exercida mediante a aceleração da microcirculação, originando as alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários. Por outro lado, o laser aumenta a celularidade dos tecidos irradiados acelerando o tempo de mitose, a ação que se observa principalmente na reparação cicatricial das lesões, por maior vascularização e formação abundante de tecido de granulação (Karu, 1987; Veçoso, 1993) O equipamento laser de baixa potência é parte integrante do arsenal fisioterápico, estando presente em um elevado número de clínicas, consultórios e laboratórios (Weis et al, 2005).

Kitchen, 2003, em seu livro cita vários estudos com animais, desde Lyon et al, em 1987, passando por uma série de autores como Mester et al 1975, trabalhando com lesões

musculares, onde a maior parte dos relatos envolve a análise dos efeitos fotoestimuladores do laser e posteriormente outros com estudos dos efeitos neurofisiológicos e antinociceptivos, até mesmo trabalhos em seres humanos com destaque para efeitos fisiológicos e hipoalgésicos, como os de Brockhus e Elger em 1990.

Albertini et al, 2004, promoveu inflamação aguda em patas de ratos com a carragenina e trata com LBP, verificando ao final da pesquisa a redução tanto do edema quanto de mediadores inflamatórios como o IL-1 β , IL-6, TNF- α e outros. Yasukawa et al, 2007, comprovou que laserterapia de baixa potência tem eficácia no tratamento da inflamação aguda em ratos.

Grande parte dos estudos da laserterapia de baixa potencia em doenças pulmonares é experimental, como no trabalho de Aimbire, 2005, que induziu hiper-reatividade da traqueia de ratos com LPS e utilizou laser de baixa potencia no tratamento, mostrando a redução do efeito inflamatório de forma significativa, quando compara o número de neutrófilos e substâncias como a PGE2 e TAX2 que são reduzidos nos grupos de ratos tratados com laser.

Alves 2010, tratou ratos com DPOC induzida por fumaça de cigarro, verificando a diminuição de células no infiltrado inflamatório e redução na concentração de TNF- α . Oliveira, 2010, também desenvolveu modelo de inflamação pulmonar tratando um grupo com laser 904nm, mostrando a redução da DPOC acentuada para discreta, dessa forma estabilizando a inflamação.

Modelos usando a instilação de papaína foram trabalhados por Lopes, Lima e Alves, 2012, provocou enfisema pulmonar em ratos. O melhor resultado foi observado no grupo tratado com laser associado a corticoide (dexametasona 0,5 mg/kg), onde o enfisema também estabilizou nesse grupo, enfisema leve, em relação aos demais, grave. Dantas et al, 2012, também utilizando papaína para causar a inflamação, gerou enfisema pulmonar. O grupo tratado com laser, recebeu irradiação invasiva pulmonar, com fibra ótica, mostrando uma redução no número de neutrófilos e do quadro da DPOC quando tratados com laser 660nm.

2 Justificativa

No Brasil o número de fumantes está em torno de 35 milhões segundo as estatísticas sobre o uso do cigarro. Acredita-se que a fumaça do tabaco e outros poluentes causam a liberação de agentes químicos dentro dos sacos aéreos do pulmão, o que, por sua vez, danifica as paredes dos sacos aéreos. O dano aumenta à medida que o tempo passa, afetando a troca de oxigênio e dióxido de carbono nos pulmões.

Desta forma, trabalhar um modelo experimental de DPOC que reproduza essa doença respiratória se torna muito importante para o entendimento de sua fisiopatologia, pois mostra quais e como agem as células e mediadores inflamatórios que ocasionam a

destruição do parênquima pulmonar podendo estudar medidas que interfiram no seu funcionamento.

Outro aspecto são os custos com o seu tratamento, são bastante elevados aos cofres públicos, necessitando de medidas cada vez mais eficaz do tratamento desta doença respiratória. Desta forma colocando o laser de baixa potencia como uma alternativa devido a sua ação anti inflamatória associada ao baixa custo e eficácia no tratamento de outros problemas respiratórios.

3 Objetivo

Apresentar um modelo de DPOC ocasionada por inalação passiva de fumaça de cigarro e avaliar a ação do laser de baixa intensidade sobre as células inflamatórias e seus mediadores nesse processo inflamatório pulmonar.

4. Resultado

4.1 Artigo 1 “Histobiological and biochemical analysis of lung inflammation induced by cigarette smoke - a 45 day passive inhalation pattern”

Wellington dos Santos Alves, José Lopes Pereira Júnior, Regiane Albertine de
Carvalho, Flávio Aimbire Soares de Carvalho, João Carlos Ferrari Corrêa

**Histobiological and biochemical analysis of lung inflammation induced by
cigarette smoke - a 45 day passive inhalation pattern**

Wellington dos Santos Alves^a, José Lopes Pereira Júnior^d, Regiani Albertini de Carvalho^b, Flávio Aimbire Soares de Carvalho^c, João Carlos Ferrari Corrêa^b,

a. Assistant Professor at the State University of Piauí - UESPI, Doctoral Student in Rehabilitation Sciences – Nove de Julho University - UNINOVE.

b. Graduate Program in Rehabilitation Sciences – Nove de Julho University – UNINOVE.

c. Doctorate in Biomedical Engineering, Adjunct Professor at the Federal University of São Paulo, UNIFESP, São José dos Campos.

d. Degree in Pharmacy – Santo Agostinho College – FSA

ABSTRACT

Introduction: COPD is defined as a respiratory infirmity with systemic manifestations and is characterized by the presence of chronic air flow obstruction and associated with an abnormal inflammatory response. **Objective:** To analyze the effect of smoking on lung histobiology. **Methodology:** Wistar male rats (3 months old) from the animal house of Santo Agostinho College (FSA) were used. Each study group consisted of eight (08) animals and divided as follows: Group A- control; Group B - pulmonary inflammation. The animals were kept in an inhalation chamber for 10 minutes seven times a day for 45 days. The lung injury characterized by histological and biomechanical changes, was induced by passive inhalation of various harmful agents found in cigarette smoke by using 14 filtered cigarettes per day. To analyze the characteristic parameters of pulmonary inflammation in lung injury, biochemical, histological and cytological analysis were carried out. **Results:** Multiple inflammatory cells and increased production of mucus and collagen. The data also showed increased production of important inflammatory mediators such as TNF- α , TGF- β , MMP's among others. **Conclusion:** It was evidenced that there is an irritation in the epithelial cells that release TGF β , increasing the production of collagen, causing fibrosis of the lung tissue and increase in the activities of the unicellular mucous glands in the airway epithelium.

Keywords: Pulmonary Inflammation, Laser, Neutrophils, Histology.

INTRODUCTION

One of the most present diseases in modern society, causing respiratory insufficiency and important cardiac comorbidities is COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, a respiratory disorder of multifactorial genetic aspect diagnosed by spirometry test that proves the loss of vital capacity of patients due to progressive airflow limitation, besides presenting airway hyper responsiveness (NAZIR et al, 2009;. Seimetz et al, 2011;. PUCKETT et al, 2008.).

The air flow obstruction is usually progressive and associated with abnormal inflammatory response of the lungs to inhalation of particles or toxic gases, with smoking as the main etiological factor, as well as occupational dusts, chemical irritants, environmental pollution, poor socioeconomic conditions and severe respiratory infections. (PAMPLONA et al.,2009; KAICKER et al.,2014). However, genetic factors, oxidative stress, respiratory infections, nutritional changes, socioeconomic status, are also regarded to trigger the disease.

This inflammatory process can cause pulmonary emphysema or chronic bronchitis.

The lung reacts to the aggression caused by most often smoking-related toxic gases through an inflammatory response. Cells such as macrophages, neutrophils and lymphocytes are recruited and oxidative substances, antioxidants and immune mediators released, interfering with the function and structure of the parenchyma and of the airways. This inflammation promotes remodeling for both parenchyma and airways (Silva et al, 2010;. RUFINO et al., 2006).

Contrary to many chronic diseases which are declining, the progression of COPD is alarming, displaying universally increasing numbers. It is predicted that by 2020 it will be the third most frequent cause of death worldwide, exceeded only by ischemic heart disease and cerebrovascular disease (WÜNSCH SON et al., 2010).

Among chronic obstructive diseases we highlight the Pulmonary Emphysema which is characterized by the increase of the airspace distal to the terminal bronchioles, with the destruction of their walls. It is observed that this is an anatomical definition; in other words, the diagnosis is presumptive in living patients (HOGG et al. 2007).

Many experimental models have been developed to study the respiratory injury from the use of papain, pancreatic enzymes, carrageenan and passive inhalation of cigarette smoke. In the latter model, the literature shows results in 4 or 6 months in mice.

Authors such as Rufino obtained several results in 10, 20, 30 and 60 days, with different cellular and biochemical profiles.

To promote further natural models of emphysema is important because it shows the inflammatory aspect of the disease, enabling the development of new treatment measures. Faced with this challenge, the goal of this study is to present a pulmonary emphysema in Wistar rats at a shorter interval of time, 45 days, a model of natural passive inhalation to study possible histological, cytological and biochemical alterations induced by cigarette smoke when they reach the pulmonary alveoli.

MATERIAL AND METHOD

Ethical Aspects

The animals were treated in accordance with the rules established by the Ethical Principles of Animal Experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee for Research of State University of Piauí-UESPI (Protocol 001/12).

Animals

Wistar male rats (3 months old) from the animal house of the Santo Agostinho College (FSA) were used. Laboratory was kept at $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and light-dark cycle of 12/12 hours (starting the light phase at 07:00 hours). Water and food were provided "ad libitum". Each study group consisted of eight (08) animals divided as follows: group G1 - control; Group G2 - pulmonary inflammation. In the control group, the animals received only smokeless cigarette air; in group B, the animals received cigarette smoke by passive inhalation for 45 days and shortly thereafter euthanized for analysis of pulmonary inflammation.

Induction of the inflammatory process

For the induction of the inflammatory process, the animals remained in an inhalation chamber for 10 minutes 07 times a day, getting the smoke of 02 cigarettes every 15-minute interval throughout the 45 days. The chamber had the following measures: 40cmx30x25cm. The lung injury characterized by histological and biomechanical changes, was induced by passive inhalation of various harmful agents found in cigarette smoke by using 14 filtered cigarettes daily.

Cell Counting

After induction of lung injury parameters of pulmonary inflammation such as infiltration of inflammatory cells in the Broncho alveolar lavage, lung histology and concentrations of inflammatory mediators were evaluated.

Once the inhalation period was complete, the animals were anesthetized with ketamine (100 mg / kg, ip) and xylazine (20 mg / kg, ip), a longitudinal incision was made in the ventral cervical region and the trachea was exposed and cannulated. A cannula was then attached to one of the entries; to a second entry, a syringe containing 20 ml of PSB, and an empty syringe to a third entry. After application of PBS and massage in the chest of the animal, 10ml of lung lavage were collected. The BAL obtained was centrifuged for 10 minutes at 1500 rpm, after collection of the supernatant the cell button was resuspended in 1 ml of PBS to collect cells to be counted into a Neubauer chamber (total cells) and differentiated counting in slides prepared in the caliper and stained with fast Panoptic.

Methods for quantification of inflammatory mediators

Real Time - PCR - RNA expression in lung tissue of animals treated or not with I / R-i was quantified by RT-PCR for the following proinflammatory mediators: CCL20, MMP-9 and MMP-12. The assays were conducted by following manufacturer specifications. To this, 1 µg of total RNA was used for cDNA synthesis for the analysis of gene expression by RT-PCR. Initially, the contaminating DNA was removed by using DNase I (Invitrogen) at a concentration of 1 unit / µg RNA in the presence of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) containing 2 mM MgCl₂ for 15 minutes at 37 ° C. After that stage, this material was incubated at 95 ° C for 5 minutes to inactivate the enzyme. Reverse transcription (RT) was performed in a solution of 200 µl in the presence of 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTP and 50 ng of primers randomized with 200 units of reverse transcriptase (Invitrogen). Conditions for this reaction were as follows: 20 ° C for 10 minutes, 42 ° C for 45 minutes and 95 ° C for 5 minutes. The reaction product was amplified through real time PCR based detection system of 7000 sequences (ABI PRISM, Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBRGreen reaction kit (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: 50 ° C for 2 minutes, 95 ° C for 10 minutes and thereafter, 40 cycles at 95 ° C for 15 seconds

and 60 ° C for 1 minute. The experiments were performed in triplicates for each point. The presence of RNAm for MMP-12, MMP-9 and CCL20 was quantified as a relative value compared to an internal reference, in which, concentration does not vary during different experimental conditions. Quantitative values for the molecules mentioned above and transcription of RNAm to GAPDH were obtained from the curve of the cycle number at which the increased signal associated with the exponential growth of the products begin to be detected. Melting curves were constructed at the end of each cycle to ensure product uniformity. The level of protein expression of each gene was normalized based on the expression of GAPDH used as an endogenous RNA control. The ΔC_t values of each sample were determined by subtracting the average C_t value from RNAm to MMP-12, MMP-9 and CCL20 of the average C_t value of GAPDH used as an internal control. Thus, the parameter of $2^{-\Delta C_t}$ was used to express the relative expression of RNAm.

ELISA (Enzyme linked immunosorbance assay) - The method used is based on antibody-antigen interaction. It was used an inert surface plate with wells where they were absorbed into the antigens of interest together with a carbonate buffer-sensitization. After this phase, a washing with PBS was done. Subsequently, blocking was made with PBS Tween with 10% of BSA to occupy the free wells. The surface is then treated with primary antibody solution - knowing that there is a greater amount of protein than antibody - specific to the protein of interest, and that will bind to it. The surface was washed again to remove the primary antibodies that were not incorporated into any protein. Then the product was treated with secondary antibodies that have an attached enzyme to produce a colored substance and which consists of an antibody to the primary antibody. The surface was washed again to remove the secondary antibody that did not bind to the primary antibody. It was added the binding substrate for the enzyme to produce the colored substance and thus measuring the color intensity of the surface one can verify and quantify the presence of some substance of interest. Inflammatory mediators in the lung tissue analyzed by ELISA were: TNF- α , TGF- β , CINC-1 and IL-1 β , through their respective kits.

Histology

For histological evaluation, the right lungs of each animal were removed after cardiac perfusion performed for removal of the pulmonary blood. Then, the animals were again attached to the cannula. Through this, it was added 10% buffered formaldehyde. The lungs were preserved for a period of 24 hours and then transferred to vessels containing 70% ethyl alcohol, where they remained for

about 72 hours. Next, we proceeded to the parts in alcohol dehydration series of increasing concentrations (80% for one hour, 90% for one hour, 95% for one hour and 100% in two baths of one hour each). Then they were cleared in xylol (two passages of two hours) and impregnated in histological paraffin (two passages of two hours in stove at 60°C) and inclusion in paraffin blocks. The blocks were cut into sections with 5.0 µm thick. The sectioned samples were then deparaffinized in xylol (2/3 minutes) and hydrated in alcohol series, of decreasing concentrations to pure water (100% / 2 minutes, 95% / 2 minutes, 70% / 2 minutes and distilled water).

The slides containing the sections were then stained by the methods of hematoxylin-eosin (HE), PAS-Alcian Blue and Picrosirius, according to the manufacturer's instructions, Easypath®.

Analysis of pulmonary morphometry

The quantification of pulmonary emphysema was verified by the presence of alveolar destruction determined by measuring the mean alveolar diameter in micrometers (Lm). This technique consists in determining the number of times the parenchymal structures for gas exchange intercepts a set of coherent lines. Thus, in the case of emphysema, the number of intercepts of alveolar structures with a system of lines will be shorter, indicating alveolar destruction. The mean alveolar diameter Lm is obtained by the equation:

$$Lm = Ltot / Li$$

where Ltot is the total length of lines in the microscopic field, and Li is the number of intercepts of alveolar structures with the lines of the reticule. Aiming to perform the morphometry, five microscopic fields at a magnification of 10x10 times, randomly chosen, non-overlapping, were photographed and analyzed by using a reticule 100 points and 50 lines overlaid the picture of the lung parenchyma.

Statistics

The results obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA) and then the Newman-Keuls test. Statistical analyzes were carried out using Graph Pad Prism

5. Results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Values of $p < 0.001$ were considered as significant.

RESULTS

Figure 1 represents the total number of cells found in the BAL after 45 days of passive inhalation, it is noticed that there is a significant difference ($p < 0.05$) between the two groups, with an increase of cells in the inflammation group, characterizing that cigarette smoke promoted cellular reactions that recruited cells to possible protection against antigens in the lungs.

In COPD, alterations in the lung cellular components are common, increasing the number of macrophages, neutrophils and lymphocytes as shown in Figure 1b. This change in cell type causes the destruction of the alveoli leading to lung hyperinflation (Barnes et al., 2004).

(figure 1)

COPD is defined as a disease characterized by the presence of airflow obstruction (Barnes et al., 2004). A variety of MMPs (matrix metalloproteinases) can participate in COPD by degrading the extracellular matrix components, especially elastin (VALENCIA et al., 2008).

However, MMPs also play a role in the regulation of inflammation by generating cytokines and chemokines and opening routes in the tissue barriers for the passage of inflammatory cells (Shapiro et al. 2002). These substances can be observed in figures 2 and 3 which show an increase in the production of those mediators for both groups.

(FIGURE 2) AND (FIGURE 3)

Emphysema probably results when cigarette smoke causes extensive and continuous recruitment of inflammatory cells to release proteolytic enzymes into the extracellular matrix. Destruction of the lung parenchyma is permanent due to the failure to repair the widening of airspaces, characteristic of emphysema (LAGENTE et al., 2005).

Figure 4 shows the two study groups in which the control group displays low proportion of mucus and the lung inflammation group features a considerable percentage of mucus when compared to control group.

The ciliated epithelium cells suffer squamous metaplasia, leading to an impairment in the mucociliary clearance mechanism. These changes are usually the first to occur, and may be present years before symptoms and other abnormalities arise.

(Figure 4)

Images of histology presenting no or irrelevant amount of mucus with preservation of airspaces (Figure 4 e 5). LAGENTE and colleagues (2005) argue that emphysema probably occurs when tobacco smoke causes extensive and continuous recruitment of inflammatory cells to liberate proteolytic enzymes into the extracellular matrix. In their study they found a histological pattern with septal thickening, reduced elastic fibers parallel to (figure 7) an increase in collagen fibers (figure 6) and an increase in alveolar macrophages. These factors affect the alveolar spaces resulting in parenchymal destruction and causing a high production of mucus by caliciform cells in the respiratory epithelium, as shown in Figures 4 and 5.

Figure 5

Figure 6

Figure 7

DISCUSSION

During the inflammatory process occurs recruitment of a larger number of cells as shown in Figure 1b. COPD and other airway diseases such as cystic fibrosis and bronchiectasis show a large amount of neutrophil prominent to chemotactic activity in the sputum fluid phase (HACZKU et al., 2012).

According to COSTA et al, 2009 the number of macrophages is increased between 5 and 10 times in the broncho alveolar lavage (BAL) of patients with COPD compared to nonsmoking volunteers. The accumulation of macrophages on the walls of the airways and lung parenchyma of smokers who develop COPD can be explained both by prolonging the life of the cell in the lungs as by increased recruitment of monocytes (its precursor) from circulation.

Macrophages are cells that perform a striking repertoire of functions, among which: phagocytosis and killing of an array of infectious microorganisms, tissue debris; phagocytize parenchymal cells and apoptotic neutrophils; lead to repair injured tissue and serve as a bridge between the innate and adaptive immune responses (Shapiro et al., 2011).

The numbers of macrophages are also elevated in the lungs of smokers and patients with COPD, where they accumulate in the alveoli, bronchioles and small airways (LAGENTE et al., 2005).

In inflammation, macrophages act as APCs, potentiating the activation of LT and LB by the expression of coestimulatory molecules, and release pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α and chemokines (CRUVINEL et al., 2010).

CRUVINEL and colleagues (2010) point out that monocytes are 3% to 8% of the circulating leukocytes, and on connective tissue or organ parenchyma originate macrophages and myeloid dendritic cells. Monocytes and macrophages are efficient phagocytes, engulfing pathogens and cellular debris. Unlike neutrophils, macrophages can remain in the tissue for months to years, acting as true sentinels.

Neutrophils are involved in the release of inflammatory cytokines, lipid mediators and enzymes that promote tissue damage.

The increase in the number of neutrophils also relates to the high production of mucus, as shown in Figure 6, and mucus hypersecretion occurs via secretagogue effect and the proliferation of mucous glands (COSTA et al, 2009; MRÓZ et al., 2006).

According to the results, it is observed a significant increase in the levels of metalloproteinases in the inflammation group in comparison to the control group. Among the existing metalloproteinases, there are those of matrix - 2 (gelatinase A) MMP - 2 and matrix - 9 (gelatinase B) whose substrates are collagens I, IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatin, fibronectin, laminin, and casein. Due to different substances affected by this enzyme, its activity level is responsible for the course of several pathological processes in humans (ŚMIGIELSKI et al., 2013).

According to COSTANZO metalloproteinases are associated to the extracellular remodeling that occurs in the process of injury. Still, they participate in the process of cell migration, which may in some cases contribute to tumor proliferation, being evident in the early stages of tumor progression. The study of (SOARES et al., 2006) shows that tumors with overexpression of metalloproteinases (2 and 9) have higher capacity for tissue invasion.

MMP-9 is synthesized by neutrophils during maturation in the bone marrow and is stored in specific granules from which it is easily released. At this point it is observed that there is a direct relation between the expression of MMP-9 and an increase in neutrophils in the inflammatory process, which will be discussed in Figure 2.

MMP-12 seems to play a major role in the pathogenesis of chronic lung injury and particularly in emphysema. In fact, MMP-12 is capable of degrading different substrates, including elastin (LAGENTE et al. 2005).

The inflammation group showed a significant increase in TNF- α , which is a pleiotropic cytokine that performs the promotion of growth, cytotoxicity, inflammation and immunomodulation. Studies suggest that TNF- α plays an important role in many inflammatory diseases, participating in the activation of defense cells (KANKAANRANTA et al., 2014).

Figure 2 shows an increased expression of the growth factor (TGF- β) in the inflammation factor group compared to the control group. The transforming growth factor β (TGF- β) is a multifunctional cytokine that regulates inflammatory and fibrotic disorders, playing a critical role in embryonic development, besides participating in the resolution of tissue damage in multiple organs, including lungs.

It plays a major role in the development of pulmonary fibrosis and airway remodeling during the late phases of chronic lung injury. It is also evidenced that TGF- β is directly related to the increase in alveolar epithelial permeability by increasing the distance between the endothelial cells. This distance enables the migration of neutrophils, which stimulates repair of the lung epithelium (AKBARSHAH et al, 2011; PIEK et al., 1999).

The research data tells us that there was an increase in the amount of interleukins in the inflamed group. Proinflammatory cytokines have been associated to chronic inflammation and inflammatory diseases. Increased levels of interleukin (IL) have been associated to the exacerbation of the inflammatory disease (ZAROGOULIDIS et al., 2014).

These cytokines are known for their ability to induce the release of other cytokines amplifying the inflammatory process. The best known is IL-1, or pyrogenic factor, which is present in practically all inflammatory processes. It can be released by various cell types and induces molecular adhesion, expression of intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 and the vascular cell adhesion molecule (VCAM) -1 (COSTA et al, 2009).

The increase in the number of neutrophils also relates to the high production of mucus, as shown in Figure 4, and mucus hypersecretion occurs via secretagogue effect and the proliferation of mucous glands (COSTA et al, 2009; MRÓZ et al., 2006).

According to RAMOS et al, 2014 mucus production is part of the native immune lung function which retains particles and microorganisms, allowing its release from the lung by ciliary transportation and coughing. Hypersecretion by goblet cells associated with decreased mucus discharge are the main mechanisms responsible for excessive accumulation in COPD affecting several important results such as lung function, quality of life health.

It is noted that a disruption of the pulmonary parenchyma occurs in animals dosed with smoke for 45 days (Figure 6 C), characterizing the presence of COPD, as shown also on Valença et al (2008), with broken septums and spaced alveoli that in relation to Figure 6B, shows normal spaces and intact septums, characterizing normal mice. In relation to histological sections of the lung, the emphysema refers to distension and confluence of the alveoli, forming larger air sacs that are inefficient for gas exchange (DAVIES, 2002).

Serra et al (2008), cites two studies in his work, one in 1963 in which two authors describe that the destruction of elastic fibers would be associated with the Alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD) as this is the major inhibitor of neutrophil elastase in the lung, and the other in 1965 when a group of researchers discovered that the papain when instilled into the trachea causes emphysema. These studies, according to Serra indicate that emphysema is connected to the destruction of the elastic fibers in the lung. These fibers are major structural components of the walls of the bronchioles and alveoli, and their destruction causes emphysema. Neutrophils and macrophages are cells that actively participate in this process. The first, when they are stimulated by cigarette smoke, they release proteases and chemotactic to recruit neutrophils, and these in turn release elastase, which in chronic smokers destroy the elastic fibers of the lung.

CLOSING REMARKS

According to the study carried out it was observed that the harmful substances released by cigarette smoke inhaled by the mice originated an inflammatory process where several inflammatory mediators from the group of cytokines and chemokines were produced, resulting in the recruitment of white blood cell for airways and lung parenchyma, besides increasing collagen fibers in the lung region and exacerbating the production of mucus in the respiratory epithelium, thus characterizing a typical inflammatory process of COPD, which suggests that this inflammation is also caused even in the passive inhalation of cigarette smoke.

Bibliography

Akbarshahi H, Axelsson JB, Said K, Malmström A, Fischer H, Andersson R. TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. **J Transl. Med.** 2011;9:219.

Barnes P.J., 2004. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacological reviews.** 56 (4):515-48.

Costanzo RM, Perrino LA, Kobayashi M. Response of matrix metalloproteinase-9 to olfactory nerve injury. **Neuroreport.** 2006;17(17):1787.

Costa C.H., Rufino R., Lapa e Silva J.R., 2009. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC; Inflammatory cells and their mediators in COPD pathogenesis. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 55(3): 347-54.

Cruvinel WdM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWSd, Silva NPd, et al. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev bras reumatol.** 2010;50(4):434-47.

Haczku A, Emami K, Fischer MC, Kadlecsek S, Ishii M, Panettieri RA, et al. Hyperpolarized³He MRI in Asthma: Measurements of Regional Ventilation Following Allergic Sensitization and Challenge in Mice—Preliminary Results¹. **Academic radiology.** 2005;12(11):1362-70.

Hogg J., Senior R. 2007. Chronic obstructive pulmonary disease c 2: Pathology and biochemistry of emphysema. **Thorax.** ;57(9):830.

Hogg J.C., Chu F., Utokaparch S., Woods R., Elliott W.M., Buzatu L., et al., 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. **New England Journal of Medicine.** 350(26):2645-53.

Kankaanranta H., Lahdensuo A., Moilanen E., Barnes P.J.,2004. Add-on therapy options in asthma not adequately controlled by inhaled corticosteroids: a comprehensive review. **Respir Res.** 5(1):17.

Kaicker J., Dang W., D'Urzo A.,2004. The challenge of objective confirmation of asthma diagnosis in primary care. **NPJ primary care respiratory medicine.** 24.

Lagente V., Manoury B., Nenán S., Le Quement C., Martin-Chouly C., Boichot E. 2005. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** ;38(10):1521-30.

Mroz R., Minarowski L., Chyczewska E.,2013. Indacaterol add-on therapy improves lung function, exercise capacity and life quality of COPD patients. **Respiratory Regulation-The Molecular Approach: Springer;** p. 23-8.

Nazir S.A., Erbland M.L. 2009. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Drugs & aging.* ;26(10):813-31.

Pamplona P., Mendes B.,2009. Estratégia de tratamento do tabagismo na DPOC. **Revista Portuguesa de Pneumologia;**15(6):1121-56.

Puckett J.L., George S.C., Partitioned exhaled nitric oxide to non-invasively assess asthma.2008. **Respiratory Physiology & Neurobiology.** 163(1):166-77.

Rufino R., Silva J.R.L.,2006. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica., **J. Bras. Pneumol.** ;32(3):241-8.

Santos A.A., Malaguti C., Dal Corso S., da Silva C.A.2009. Expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. **Fisioterapia e Pesquisa.** 2009;16(4):299-305.

Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, et al. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. **Cell**. 2011;147(2):293-305.

Shapiro S.D., Ingenito E.P.,2005. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. **American journal of respiratory cell and molecular biology**.32(5):367-72.

Silva, A. A. D.; Gonçalves, R. C. Reactive oxygen species and the respiratory tract diseases flarge animals:[review]. **Ciênc.rural**, v. 40, n. 4, p. 994-1002, 2010.

Śmigielski J, Brocki M, Kuzdak K, Kołomecki K. Serum MMP 2 and TIMP 2 in patients with inguinal hernias. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(6):584-8.

Soares , F. A . 2006. The expression of metaloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. *Virchows Arch*, v. 449, n. 6, p. 637-46.

Santana VT, Squassoni SD, Neder JA, Fiss E. Influência do tabagismo atual na aderência e nas respostas à reabilitação pulmonar em pacientes com DPOC. *Rev Bras Fisioter*. 2010;14(1):16-23.

Valença S.S., Porto L.C.,2008. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 34(10):787-95.

Wünsch Filho V., Mirra A.P., López R.V.M., Antunes L.F.,2010. Tobacco smoking and cancer in Brazil: evidence and prospects. *Rev. Bras. de Epidemiologia*.;13(2):175-87.

Zarogoulidis P, Papanas N, Kioumis I, Chatzaki E, Maltezos E, Zarogoulidis K. Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical practice in respiratory diseases. **European journal of clinical pharmacology**. 2012;68(5):479-503

Figures

A

B

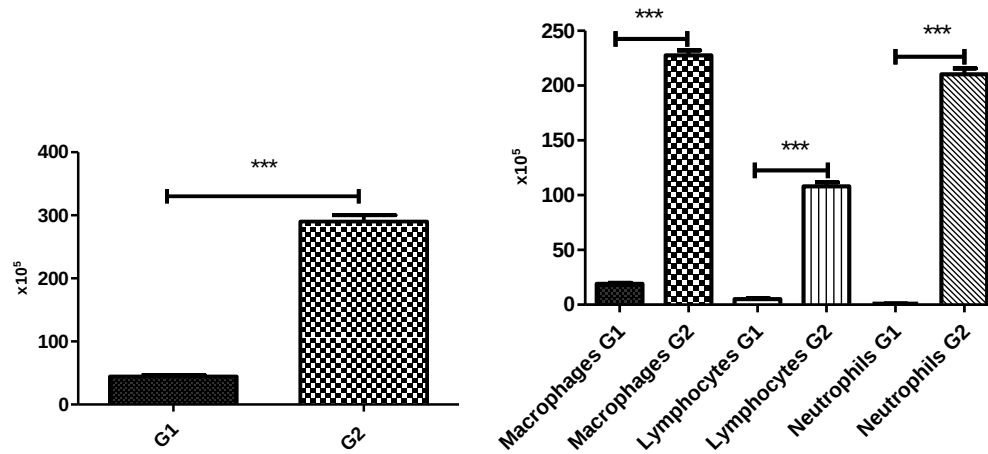


Figure 1. Total count of cells in the Broncho alveolar lavage (A) and differential (B). Groups G1 and G2. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments performed. *** statistically significant, $p < 0.001$.

A

B

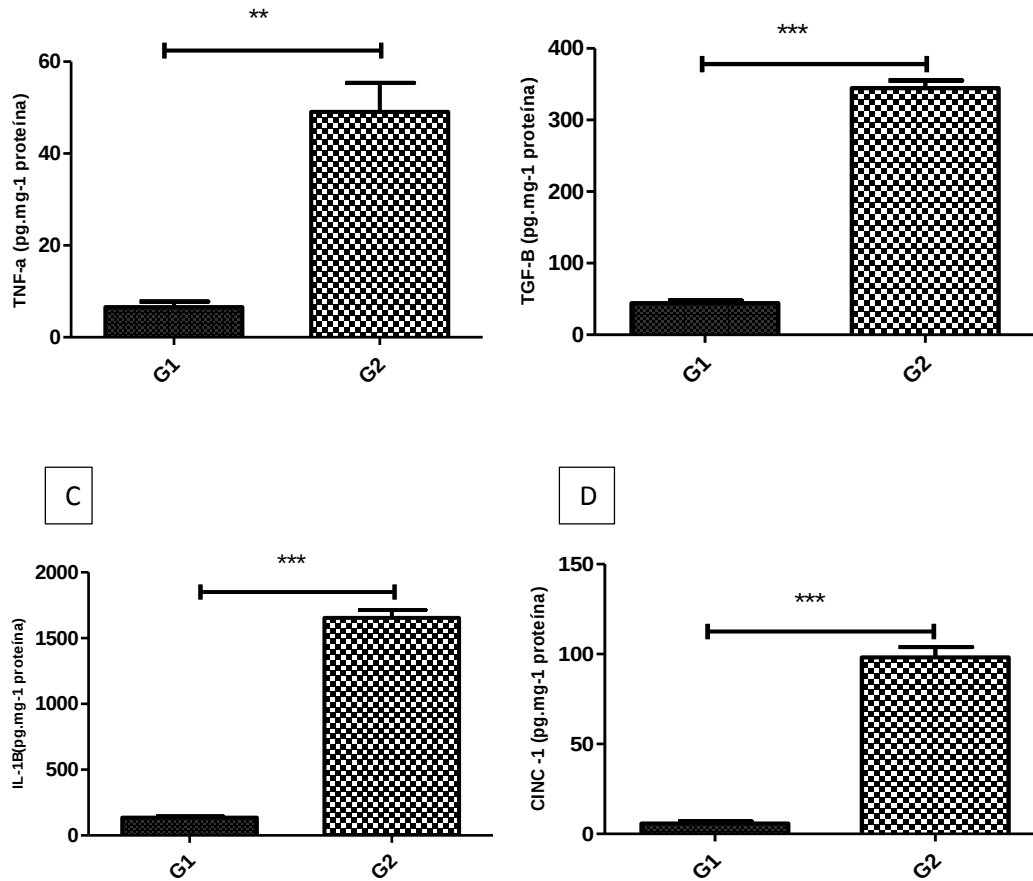


Figure 2 - Inflammatory mediators in both groups. Figure 2-A, 2-B and 2- C represent cytokines in the group control (G1) and G2, inflammation group. Figure 2-D is a chemokine in the same groups. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments. ***, statistically significant, $p < 0.001$, ** statistically significant $p < 0.05$.

A

B

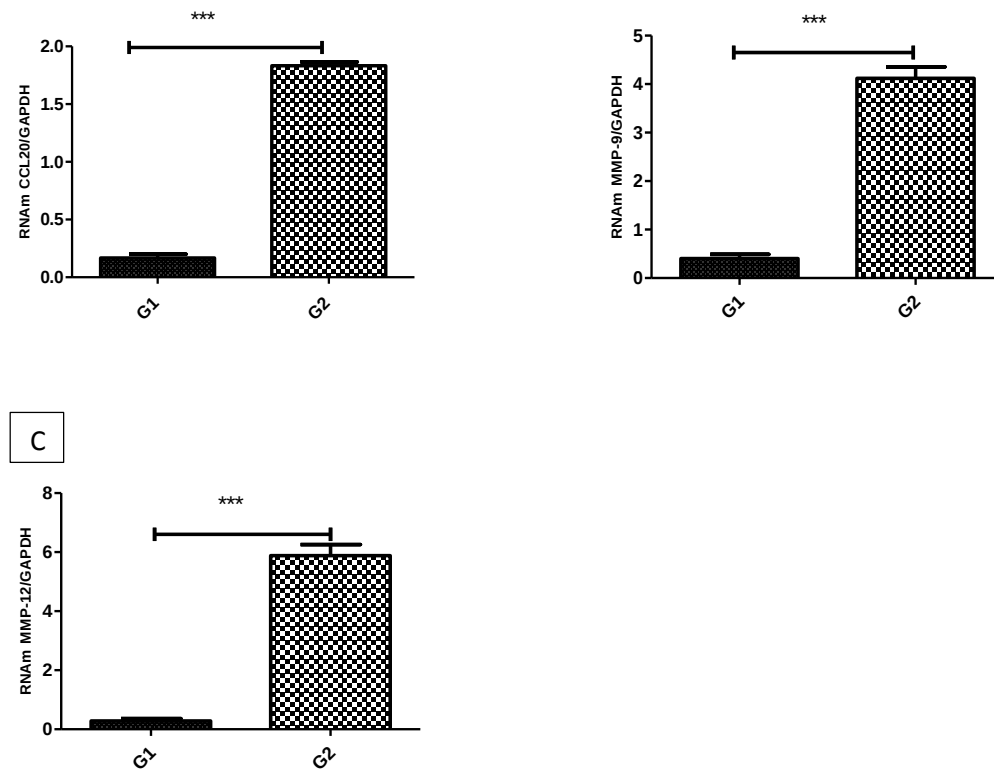


Figure 3 - Expression of RNAm of chemokines for the groups studied. Groups G1 and G2. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments performed . *** p < 0.001.

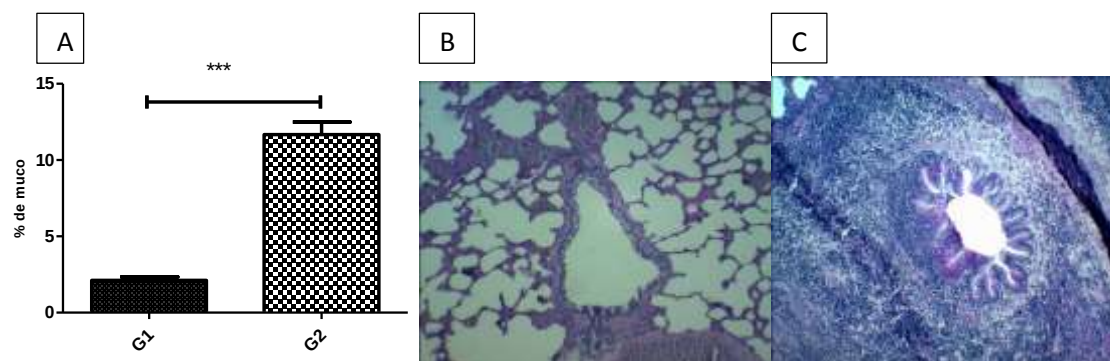


Figure 4 - Percentage of mucus in the respiratory epithelium of the groups studied, control (G1) and inflammation (G2). In A values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments performed. *** statistically significant, p < 0.001. Image B (10x10) lung airway of group G1 and C (10x10) of group G2 . Pink dots in group G2 represent mucus, PAS staining.

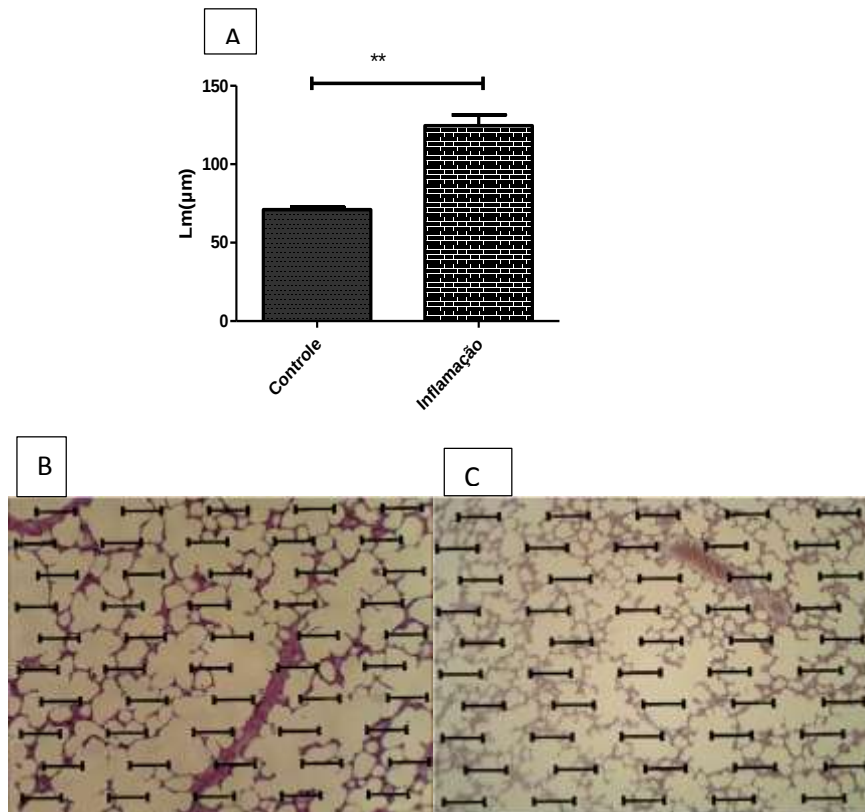


Figure 5 - Values of the mean linear intercept in groups Control (G1), and Inflammation (G2). Figures B and C, images of groups control and inhalation, respectively. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments performed. **, statistically significant, $p < 0.05$.

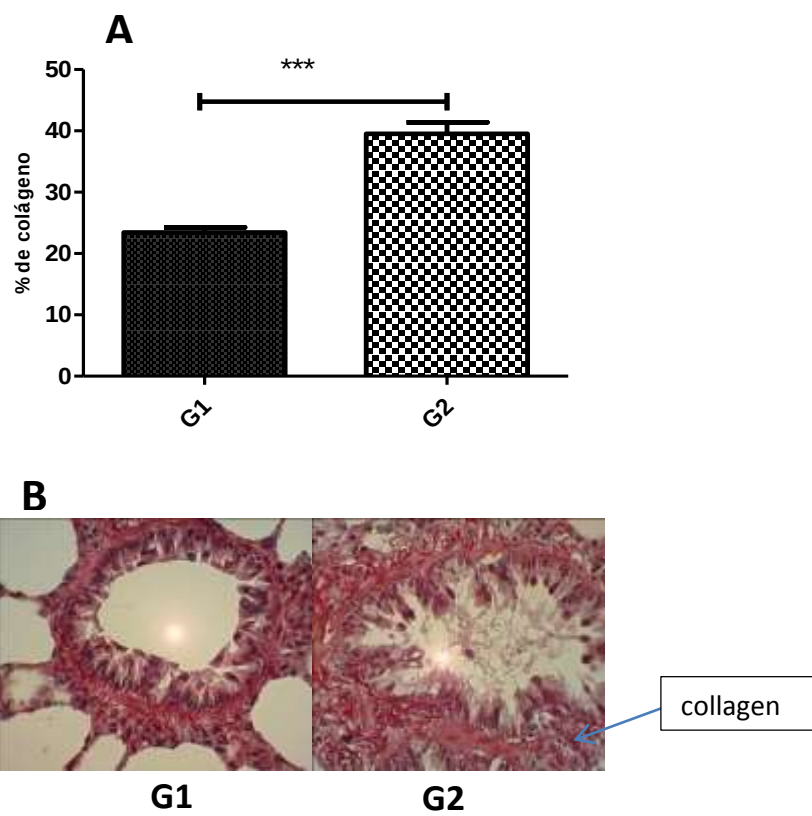


Figure 6 - Percentage of collagen in the respiratory epithelium of the groups studied. Control (G1) and inflammation (G2). In A values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments performed. *** statistically significant, $p < 0.001$. Image B lung airway of group G1 (10x40) and group G2 (10x40). Picrosirius staining.

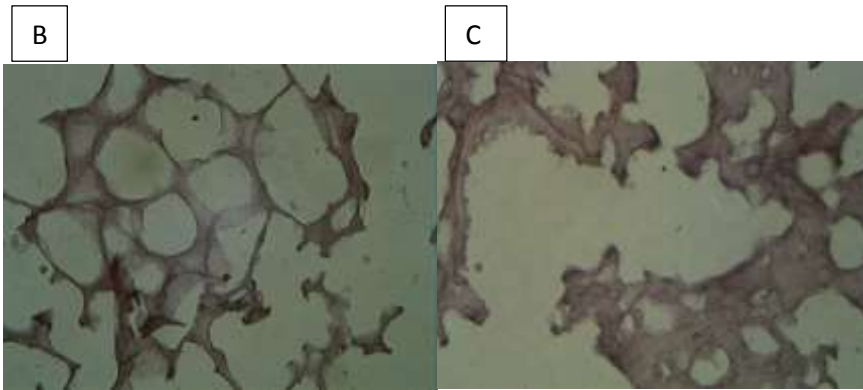
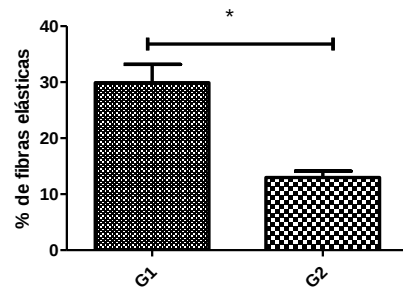


Figure 7 - Percentage of elastic fibers in the lung parenchyma of the groups studied. Control (G1) and inflammation (G2). In A values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments performed, statistically significant, $p < .001$. Image B Lung parenchyma of group G1(10x40) and C of group G2 (10x40) . Resorcin-fuchsin staining.

4.2 Artigo 2 “**Low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory markers in the chronic obstructive pulmonary disease**”

Wellington dos Santos Alves, José Lopes Pereira Júnior, Regiane Albertine de Carvalho, Flávio Aimbire Soares de Carvalho, João Carlos Ferrari Corrêa

Low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory markers in the chronic obstructive pulmonary disease

Wellington Alves¹, José Júnior², Regiane Albertini³, Flávio Aimbire³, João Carlos Corrêa¹

1- MSc and PhD Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University, São Paulo, SP, Brazil.

2- Degree in Pharmacy – Santo Agostinho College – FSA.

3- Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author:

Flávio Aimbire, PhD

Email: flavioaimbire@yahoo.com

Federal University of de São Paulo

São José dos Campos

São Paulo, Brazil

Abstract

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is defined as a respiratory illness with systemic manifestations and is characterized by the presence of chronic airflow obstruction is associated with an abnormal inflammatory response. Several studies indicate the possibility of treating respiratory disorders in rats or mice, by use of low-power laser. **Objectives:** To investigate the effect of low level laser, 670nm laser in the treatment of pulmonary inflammation induced in *Rattus norvegicus*. **Methodology:** 30 rats were divided into three groups (control group, COPD group, laser group) each group consisting of ten animals (n = 6), COPD and laser groups were exposed to cigarette smoke for 45 days and the group treated with laser 670nm laser for 15 days after the induction of the inflammatory process. To obtain these results we performed ELISA of supernatant of bronchoalveolar lavage (BAL) and Real Time PCR from lung tissue. Data

were subjected to analysis of variance (ANOVA). **Conclusion:** Treatment with low power laser therapy in experimental COPD in rats was positive, as data showed the reduction of inflammatory cells and chemical mediators that enhance the lung inflammation.

Keywords: Laser therapy, pulmonary emphysema, inflammatory mediators

Introduction

COPD is a progressive disease characterized by limitation of constant air flow, with varied degrees of narrowing of the airway wall, inflammation and emphysema. Respiratory symptoms, including shortness of breath, cough and sputum production, in addition to progressive and irreversible airflow limitation are characteristics of the disease and have significant adverse effects on the functioning of the patient and quality of life (Albert et al, 2011; Leidy et al, 2014; Sauler et al, 2014).

Exposure to cigarette smoke is the predominant risk factor for the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which affects up to 10% of individuals over 40 years of age around the world, making it the third leading cause of death worldwide by 2020 (Cho et al, 2012; Vlahos & Bozinovski, 2014). Genetic factors, related to the etiology of the disease, are added to that.

The chronic exposure to cigarette smoke results in severe pulmonary inflammation, initiating a complex inflammatory cascade accompanied by the influx and activation of various inflammatory cells and the secretion of specific disease mediators such as cytokines and growth factors (John et al, 2014) .

The inflammation of COPD involves persistent neutrophilia which persists for many years after tobacco cessation. Increased expression of chemokine and interleukins, especially IL-8 which participates in the recruitment of neutrophils, whose expression is elevated in patients with the disease. There is also the involvement of the Tumoral Necrosis Factor- α (TNF- α) and leukotriene B₄ which has the ability to promote chemotaxis and activation of neutrophils (Durham et al, 2013; Rufino & Silva, 2006). It is also suggested that the presence of COPD increases the risk of lung cancer.

Current therapy for COPD has improved the management of this difficult disease, but there is still an urgent need for new therapeutic approaches, particularly in reducing mortality and progression of the disease. There is no question that the treatment for COPD

has considerably improved with the introduction of more effective treatments and the use of non-pharmacological interventions, such as pulmonary rehabilitation and noninvasive ventilation (Rennard, 2004; Sutherland, 2004).

There are currently various therapies under development for COPD, that are oriented on the chronic inflammatory process (Barnes, 2002; Barnes, 2004). Low intensity laser action in the treatment of pulmonary emphysema, although experimentally in rats, has been found among these new modalities.

Methods

Ethical Aspects

The animals were treated in accordance with the standards established by the Ethical Principles for Animal Experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee for Animal Research, Santo Agostinho College (Protocol 190/09).

Animals

Groups of rats (*Rattus norvegicus*, Wistar) (12-15 weeks, 250-300 g) purchased at the Central Biotherium of Santo Agostinho College - FSA (Teresina - PI). The animals were selected randomly, after quarantine (seven days) they were placed in cages and maintained on a 12 h light / dark cycle with free access to water and standard food. The animals were divided into three groups of 6 animals ($n = 6$) in each. In group A, called control, the animals were breathing ambient air, without any pollutant or cigarette smoke. In group B, called COPD, the animals in pairs passively inhaled smoke doses of two commercial cigarettes (13.0 mg tar, 1.10 mg nicotine, 10 mg carbon monoxide) in seven daily sessions of 10 minutes, totaling 14 cigarettes per day for each pair. In group C, called COPD + laser, the animals suffered the same cigarette applications as group B and after 45 days of inhalation were treated for 15 days with Indium Gallium Aluminium Phosphorus diode laser (InGaAlP) 670nm wavelength (Physiolux Dual Bioset Laser, 30W power and 670nm wavelength, and energy density of 7J/cm²).

Induction of Inflammation

The induction of pulmonary inflammatory response occurred by the inhalation of commercial cigarette smoke (13.0 mg tar, 1.10 mg nicotine, 10mg carbon monoxide). The animals were arranged in pairs inside a wooden box with dimensions of 40 cm x 30

cm x 25 cm 15, passively inhaling smoke from 14 cigarettes a day. For each pair, seven daily sessions of 10 minutes, 06 days a week, for 45 days with intervals of fifteen (15) minutes between sessions. The inhalation chamber was equipped with four holes on the lid, one on each side of 30 cm, through which cigarettes were connected, a total of six holes and a protective nylon mesh to prevent animals from any physical contact with the cigarette.

Treatment Protocol

For treatment, the 670 laser animals were anesthetized only once with Ketamine - 100 mg / kg, IM (Injected Dopalen 10ml, Vetbrands®) and Xylazine -20 mg / kg, IM (Injected Anasedan 10 ml, Vetbrands ®) for tricotomy. Over the 15 days receiving laser, applications were made at three points, one in the region of the carina, and one in each hemithorax, right and left, making a triangular shape. Each animal received one dose per day, lasting 21s at each point, and calculated by the device itself, at 30mW power and energy density of 7 J/cm².

Bronchoalveolar lavage fluid Assessment (BAL)

After 15 days of laser application to the 670 laser group, the animals of the three groups were anesthetized to undergo tracheostomy and to obtain the bronchoalveolar lavage. Following anesthesia, 10 ml of blood were taken from the abdominal artery. Then, tracheotomy and coupling of the cannula was performed, which was attached to the trachea to prevent extravasation of Phosphate Buffered Saline (PBS). Through the cannula were introduced 20 ml of PBS. During the introduction, a massage was performed in the thoracic region and then 15-17 ml of lavage were aspirated, which was centrifuged for 10 min at 1500 rpm. Then, 0.5 ml were collected for differentiated count (slides prepared in suta's camera). To the button cell were added 0.5 ml of PBS and 0.8 ml of crystal violet. Next, it was collected 0.1 ml of the sample for counting in a Neubauer chamber. The differential count was performed after staining with Fast Panoptic, according to the manufacturer's instructions.

Methods for quantification of inflammatory mediators

Real-Time PCR - mRNA expression in lung tissue of animals subjected or not to I / R- I was measured by RT-PCR for the following proinflammatory mediators: MMP-9, MMP-12 and CCL20. The tests were conducted following the manufacturer's

specifications. To this end, 1 µg of total RNA was used for cDNA synthesis to analyze the gene expression by RT-PCR. Initially, DNA contamination was removed using DNase I (Invitrogen) at a concentration of 1 unit / µg RNA in the presence of 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) containing 2 mM MgCl₂ for 15 minutes at 37°C. After that step, this material was incubated at 95°C for 5 minutes to inactivate the enzyme. Reverse transcription (RT) was performed in a solution of 200 µg in the presence of 50mM Tris HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTP and 50 ng of primers randomized with 200 units of reverse transcriptase (Invitrogen). The conditions for this reaction were: 20°C for 10 minutes, 42°C for 45 minutes and 95°C for 5 minutes. The product of the reaction was amplified by real-time PCR in a 7000 sequence detection system (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA) using SybrGreen reaction kits (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes and thereafter, 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The experiments were performed in triplicates for each point. The presence of mRNA of the above mentioned mediators was measured as a relative value compared to an internal reference in which concentration does not vary during the various experimental conditions. Quantitative values for the above mentioned molecules and transcription of mRNA to GAPDH were obtained from the curve of the number of cycles in which the increased signal associated with the exponential growth of the products start being detected. Melting curves were constructed at the end of each cycle to ensure product uniformity. The level of gene expression of each protein was normalized based on the expression of GAPDH used as an endogenous RNA control. The ΔC_t values for each sample were determined by subtracting the average C_t value of the mRNA from the average C_t value of GAPDH used as an internal control. Thus, the $2^{-\Delta C_t}$ parameter was used to express the relative expression of mRNA.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) - The method used is based on antibody antigen interaction. It was used an inert surface plate with wells which have been absorbed with antigens of interest, together with a carbonate sensitization buffer. After that phase we carried out a PBS washing. Followed by block with PBS-Tween with 10% BSA so that it would occupy the free wells. The surface was then treated with primary antibody solution - knowing that there is a greater amount of antibody than protein – specific to the protein of interest, and that will bind to it. The surface was washed again to remove the primary antibodies which were not incorporated into any protein. Next, the product was treated with secondary antibodies that have an attached enzyme to produce a colored

substance and which is an antibody to the primary antibody. The surface was once again washed to remove the secondary antibody that did not bind to the primary antibody. The binding substrate was added for the enzyme to produce the colored substance and so by measuring the color intensity of the surface, one can verify and quantify the presence of any substance of interest. Inflammatory mediators in the lung tissue analyzed by ELISA were: TNF- α , TGF- β , IL-1 β , MIP-2 and CINC-1 through their respective kits.

Statistical Analysis

The results of LBA, PCR and ELISA were subjected to analysis of variance (ANOVA), expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). P values <0.05 were considered significant and $p < 0.001$ were considered highly significant.

Results

Pulmonary emphysema manifestation is characterized by the presence of several chemical substances of category of cytokines, chemokines and other mediators that recruit together or activate immune cells in the pulmonary region, leading to the destruction of the parenchyma. Among the principal cells are macrophages, lymphocytes and neutrophils (Figure 1), which release their proteolytic enzymes by destroying pulmonary elastic fibers. Among the chemokines, there is CCL20 in Figure 2 that according to the graph has a discrete participation in the control group compared to the group that received inhalation, $p < 0.0001$, upon treatment with 670 nm laser, the presence of this cytokine in the treatment group has a significant value, with $p < 0.05$. In figure 2 it can be seen a characteristic of the inflammatory process, the great presence of MMP-9 in the COPD group, $p < 0.05$ compared to the control. At the same image the laser action is clear, with a reduction in cytokine MMP-12 when compared to the group that received inhalation, $p < 0.05$.

According to Figure 3, which also presents a chemokine, the CINC-1, the laser also promotes a reduction in the inflammatory process, with a reduction of about 90-pg.mg from the protein of the COPD group to approximately 45pg.mg in the treated group, a significant difference $p < 0.05$. There is also a reduction of MIP-2 action in the animals that received the low intensity laser therapy compared to the group that inhaled cigarette for 45 days (COPD). This chemokine expression is stimulated by TNF- α action which causes the attraction of neutrophils and other inflammatory cells into the inflamed area, as shown in Figure 1.

Figure 4 shows laser action on cytokines, TNF- α , IL-1 β and TGF- β , the latter with an increase in their concentration during the laser application, laser $< p$ 0.05 compared to the group COPD who received only inhalation. As shown in the same figure, the remaining molecules have a high level for COPD group and a low level for animals treated with laser, showing that the cascade reaction which triggers inflammation also decreases when laser is applied, reducing inflammatory agents, from the number of cells to the lowering of mediators involved in the process, such as IL-1 β and TNF- α .

Discussion

Exposure to cigarette smoke is a major factor in the appearance of pulmonary inflammation, and low-level laser acts as an anti-inflammatory agent. Studies with animal models, particularly in rats or mice, show that exposure to this type of smoke passively, for the shortest possible time is already able to activate inflammatory cells and mediators that can cause lung inflammation related to emphysema (Valença & Porto, 2008; Shapiro, 2000; Barnes & Stockley, 2005). This inflammation is characterized by the presence of macrophages, neutrophils, CD8⁺ lymphocytes, associated with the change in the number of collagen and elastic fibers and the increased diameter of the pulmonary alveoli, contributing to the gain of the physiological dead space and the reduced respiratory capacity of individuals. This process involves chemicals such as mediators TNF- α , TGF- β , IL-1 β and others that promote an inflammatory chain degrading the lung parenchyma or by increasing the secretion in this area, causing respiratory injury (Shapiro, 2000; Barnes & Stockley, 2005). Neutrophils, one of the major inflammatory cell in the lung, are responsible for producing serine proteases neutrophil proteolytic enzymes that have various activities such as the degradation of elastic fibers in lung tissue, and one of the few human enzymes capable of performing this destruction (Serra et al, 2008). The anti-inflammatory effect of low level laser that was used as a non-medicated and non invasive treatment mechanism could be seen as positive, because after the inhalation period, the animals treated for 15 days with a daily application of laser at three points, one on the level of the carina, and another in each hemi thorax, promoted a considerable reduction in neutrophil and lymphocyte type cells. Its effectiveness can also be observed through the reduction of cytokines and chemokines that act in COPD, such as CCL20 expression. According to Geraldes (Geraldes, Todo Bom & Loureiro, 2009) these molecules act in the recruitment of cells during the process of formation of allergic contact pulmonary inflammation, especially when it comes to cigarette smoke. There is also an action against expressions of CINC-1, an important protein which during acute inflammation recruits

lymphocytes (Campbell et al, 2003). The study on patients with emphysema shows a strong increase in the MMP-12 (Nenan et al, 2005), since this substance recruits macrophages for the lung region triggering the typical inflammatory process of COPD. The laser decreases the expression of these two substances besides promoting an increased production of TGF- β , the changeable growth factor, various stimuli are related to this cytokine for the production of collagen and fibroblasts (Swigris & Brown, 2006) which modulates a variety of cellular functions, including cell growth and differentiation, apoptosis, and remodeling of the matrix. The biological effects are mediated by type I and type II TGF receptors (McDenitt et al, 2007).

According to Karu (1999) the laser action is not in the temperature but in the biological stimulation which promotes, in certain cellular organelles or membranes, the acceleration of the synthesis of compounds commanded by DNA as anti-inflammatory drugs that inhibit the action of IL-1 β and TNF- α , promoting systemic effects. Thus, low intensity laser therapy, besides having an analgesic and anti-inflammatory function is also a powerful blocker of cellular communication by chemotaxis that happens during the inflammatory process. It is this communication that attracts mediators to the site of the respiratory physiopathology.

When the low intensity light is used, there is no thermal effect, that is, the energy of the absorbed photon is not transformed into heat but into photochemical, photophysical and photobiological effects (Rocha Junior, 2007). The induction of mitotic activity of epithelial cells and fibroblasts; the incentive for collagen production by those cells; secretory inhibition of some chemical mediators; change in capillary density and stimulus to local microcirculation (Rocha Junior, 2006).

The therapy with this type of laser can be effective in the mediation of inflammation symptoms by stabilizing the cell membrane by normalization of calcium, sodium and potassium, which contributes to the repair of cells, vasodilatation, increased oxygen and nutrients transport to the damaged cells and facilitating repair and removal of cell debris by accelerating the activity of leukocytes, increasing the synthesis of prostaglandins, due to the conversion of Prostaglandin PGG₂ and peroxidase PGH₂ to prostaglandins of PG₁₂ which have anti-inflammatory and vasodilator actions (Costardin et al, 2008). The anti-inflammatory effect of low level laser therapy (LLLT) has been demonstrated in several experimental activities ranging from the respiratory, rheumatology, dermatology areas, etc. It was observed that one of the low intensity laser functions, for example, in an experimental model of osteoarthritis, is the increased

production of mucopolysaccharides, which are responsible for maintaining the collagen fibers together and ensure the integrity of the cartilage; also enhancing the production of shock proteins preservers of chondrocytes of the synovial cartilage (Bertolini et al, 2009). In the respiratory studies there is a performance in the reduction of the inflammatory processes that arise from asthma, ARDS and now COPD.

In his studies, Rocha Junior (2006) observed that the surgical lesions subjected to treatment with low-intensity laser when compared to the lesions of the control group showed a more developed tissue repair process with greater wound contraction and increased epithelial migration speed. It is emphasized that the therapeutic laser has no direct healing effect, but it acts as an important analgesic agent, giving the body a better response to inflammation, with consequent reduction of edema and minimization of painful symptoms besides favoring quite effectively the repair tissue of the injured region through cell bio stimulation.

Conclusion

Based on the analysis, it is verified that the lung inflammation caused by COPD can be treated with low intensity laser, as it attenuated the inflammatory process, reduced the presence of neutrophils and decreased the concentration of the inflammatory mediator's determinants of emphysema, acting directly on the cascade reaction of the cessation of the inflammatory process. It is noted, however, the need for further studies to corroborate these findings to hereafter support the use of LIL to treat patients with COPD, not as an agent that leads to healing, but to alleviate the disease and thus improve the quality of life of patients, becoming inexpensive and with less side effects that often pharmacological agents have; or perhaps used in a concomitant manner to drugs.

References

- 1.Albert RK, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. N Engl J Med 2011.365: 2234-2237.
- 2.Leidy NK, et al. Measuring respiratory symptoms in clinical trials of COPD: reliability and validity of a daily diary. Thorax. 2014.69(5):443-9.
- 3.Sauler M, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014;306(6):487-96
- 4.Cho MH, et al. A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. Hum Mol Genet. 2012;21(4):947-57.

5. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(4):253-65
6. John G, et al. The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clin Sci (Lond)*. 2014 ;126(3):207-21
7. Durham AL, et al. Regulation of Wnt4 in chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J*. 2013 ; 27(6):2367-81
8. Rufino R, Silva JRL. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J. Bras. Pneumol*. 2006. 32(3): 241- 248
9. Rennard SI. Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004; 364(9436):791-802.
10. Sutherland ER, Cherniack RM. Management of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350: 2689-2697.
11. Barnes PJ. New treatments for COPD. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 01:437-446.
12. Barnes PJ, Hansel TT. Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004; 364 (9438): 985-996.
13. Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2008;34(10):787-95.
14. Shapiro SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease. age of klotho and Marlboro mice. *Am. J. Respir*. 2000;22:4- 7.
15. Barnes PJ, Stockley RA. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Resp*, 2005;25:1084-1106.
16. Serra HG. et al. Avaliação da concentração de alfa 1-antitripsina e da presença dos alelos S e Z em uma população de indivíduos sintomáticos respiratórios crônicos. *J Bras Pneumol*. Dez.2008;34(12): 1019-25.
17. Geraldles L, Todo-Bom A, Loureiro C. Avaliação da inflamação das vias aéreas. Vias áreas superiores e compartimento broncopulmonar. *Rev. Port. Pneumol*.2009; 15(3).
18. Campbell SJ, et al. CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury. *FASEB J*. 2003 ;17(9):1168-70.
19. Nénan, Soazig, et al. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 2005; 100(supl.1):167-172.
20. Swigris JJ., Brown KK.. Fibrose pulmonar idiopática: uma década de progressos. *J. Bras. Pneumol*. 2006 ; 32(3): 249-260
21. McDevitt TM, et al. Role of endogenous TGF- β in glucocorticoid-induced lung type II cell differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 ;292(1):L249-57
22. KARU TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR irradiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 ;49(1):1-17.
23. Rocha Junior AM, et al. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *J Vasc Bras*. 2007;6:258-66.
24. Rocha Júnior AM, et al. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Ann. Bras. Dermatol*. 2006 ; 81(2): 150-156.
25. Costardi CHZ, et al. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. *Fisioter. Mov*. 2008 abr/jun;21(2):21-30.
26. Bertolini Gladson, et al. Aplicação do laser 808nm na dor articular crônica de ratos Wistar. *Rev Bras Med*. 2009 ; 15(4): 264- 267.

Figures

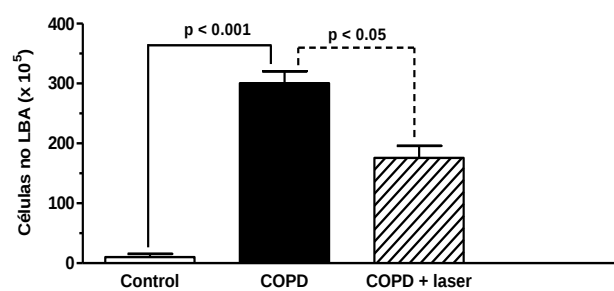


Figure 1 - Cell counts in bronchoalveolar lavage. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments. *** statistically significant, $p < 0.001$. ANOVA followed by Tukey.

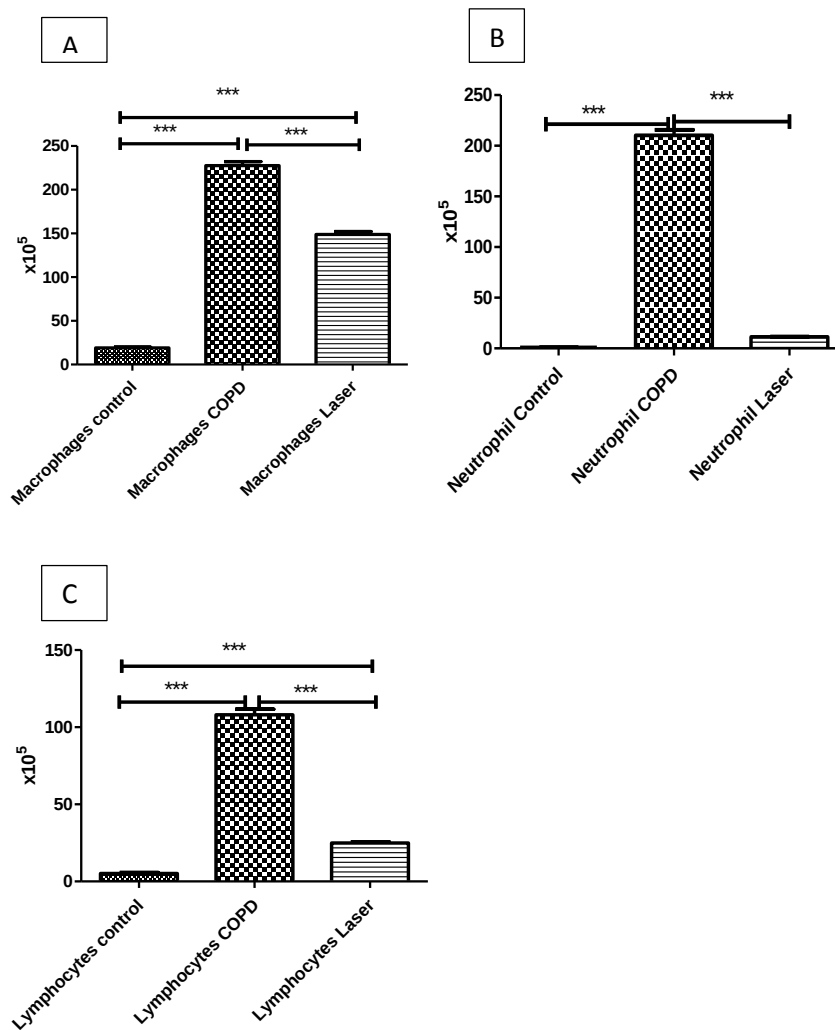


Figure 2 – Differential cell counts, A –macrophages, B – neutrophil, D –lymphocytes. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments (n = 6). *** statistically significant, $p < 0.001$. ANOVA followed by Tukey

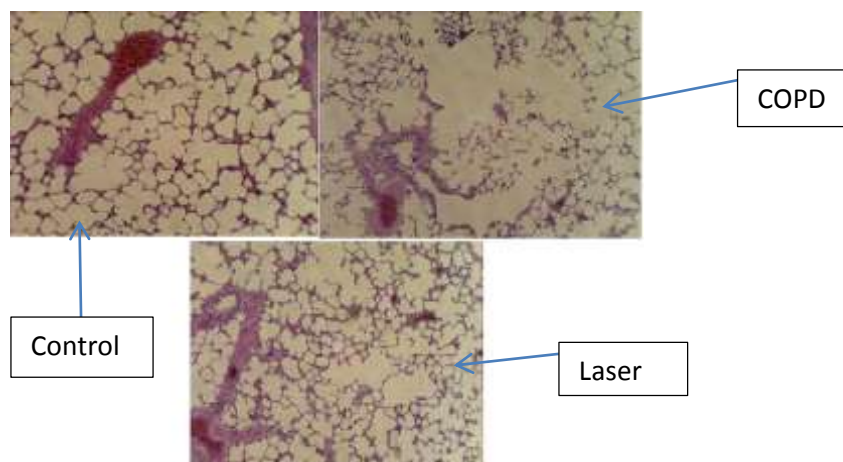


Figure 3 – Histology of the groups studied. HE staining, increased 10x10.

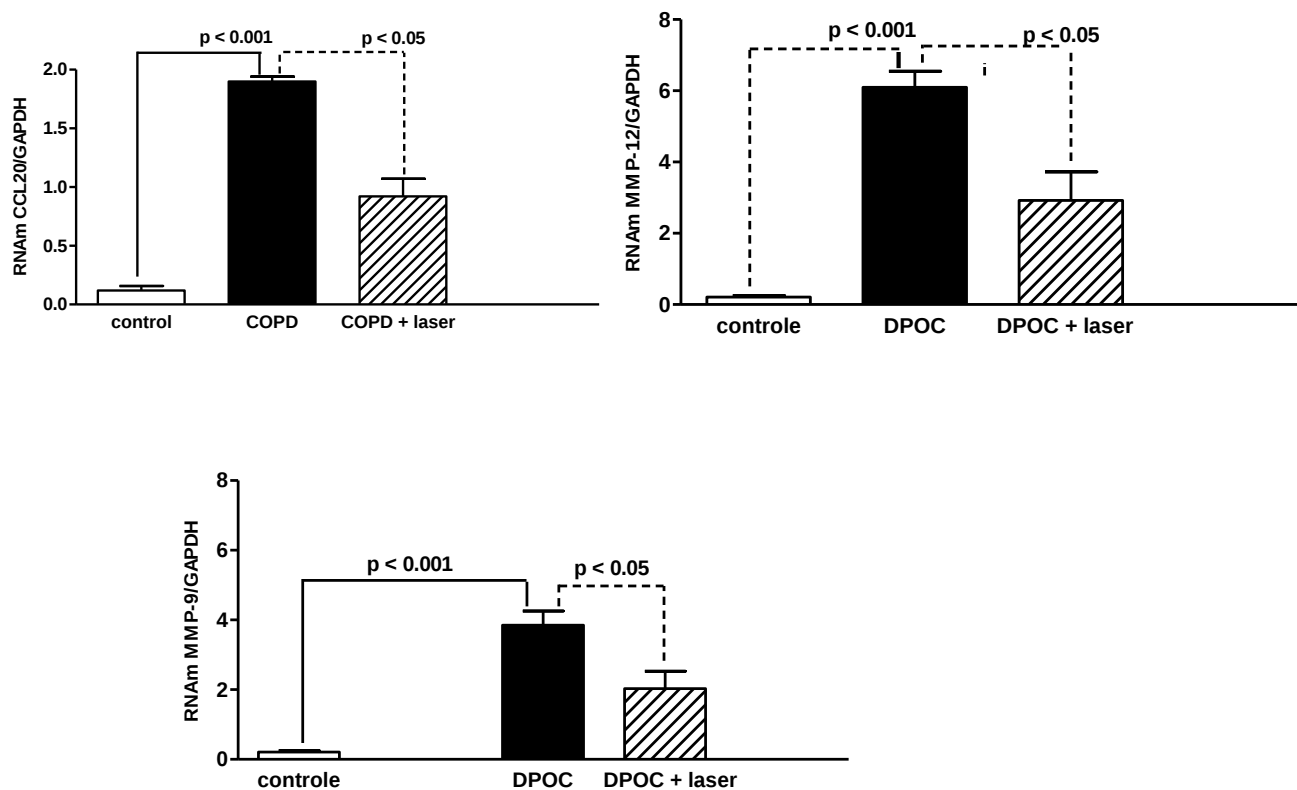


Figure 4 - Chemokines in both groups. Control, COPD and COPD+ Laser. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments (n = 6). *** statistically significant, p < 0.001. ANOVA followed by Tukey.

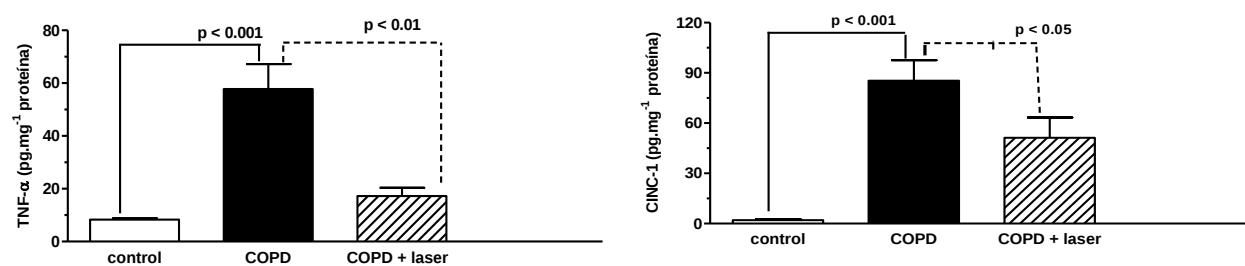


Figure 5 - Chemokines and Cytokines in the groups studied. Control, COPD, COPD + Laser. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments. *** statistically significant, $p < 0.001$. ANOVA followed by Tukey.

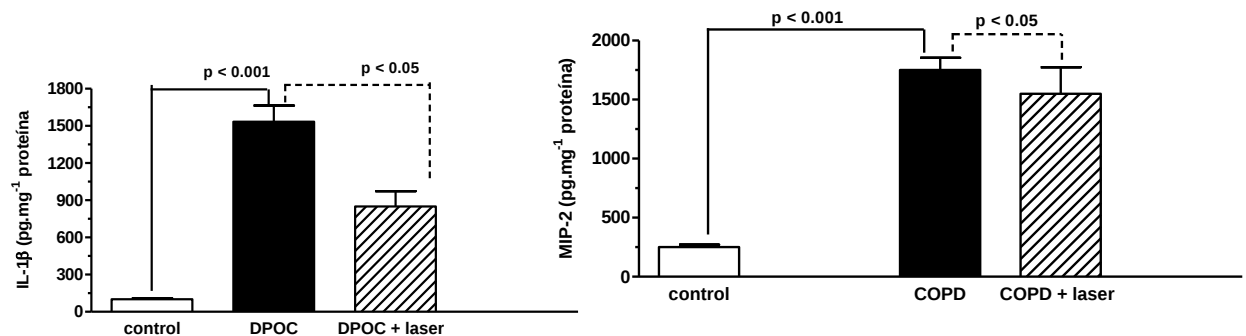


Figure 6 – Chemokines and Cytokines in the groups studied. Control, COPD, COPD+Laser. The values shown represent the mean $\pm$ SEM of experiments ($n = 6$). *** statistically significant, $p < 0.001$. ANOVA followed by Tukey.

5 Discussão da tese

As doenças respiratórias caracterizadas por bronquite aguda, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), rinite (alérgica) e sinusite (rinossinusite crônica) são importantes causas de morbidade no mundo. Nos Estados Unidos, essas doenças foram responsáveis pelo maior número de visitas aos serviços ambulatoriais médicos por pessoas de até 15 anos entre 2001 e 2011. Além disso, exercem importante pressão sobre os serviços de saúde e são responsáveis por frequente absenteísmo escolar. As doenças

respiratórias são consideradas condições sensíveis à atenção ambulatorial e, portanto, de hospitalização evitável, contraditoriamente, aparecem como primeira causa de hospitalização (Carandinaiv; Goldbaumv; Pereira, 2012). Essas doenças são caracterizadas por infiltração de tecido celular por diversas células, dentre as quais células efetoras, incluindo linfócitos T, eosinófilos, monócitos / macrófagos e neutrófilos (Oliveira, et al, 2012)

A complexidade dos problemas respiratórios tem levado inúmeras instituições nacionais e internacionais a desenvolverem ações visando a identificação das práticas atuais no que se refere ao manejo dessas importantes entidades nosológicas (Berquó, et al,2004).

Estudos com modelos animais, mostram que a exposição à fumaça de cigarros de forma passiva, é capaz de ativar células inflamatórias e mediadores que podem levar a inflamações pulmonares relacionadas a DPOC (Shapiro,2000;Valença & Porto,2008). Esta inflamação é caracterizada pela presença de macrófagos, neutrófilos, linfócitos CD8+, associada à alteração do número de fibras colágenas e elásticas e o aumento do diâmetro dos alvéolos pulmonares, aumentando o espaço morto fisiológico, diminuindo a capacidade respiratória dos indivíduos (Tarantino, 2008). Este processo tem a participação de substâncias químicas, como os mediadores TNF- α , TGF- β , IL-1 β e outros que promovem uma cadeia inflamatória degradando o parênquima pulmonar ou aumentando a secreção nesta área, provocando a injúria respiratória (Barbes & Stockley,2005; Chung & Adcock, 2008)

Na tentativa de se estudar a DPOC, vários pesquisadores desenvolveram modelos desta inflamação que produzissem as células e os mediadores inflamatórios nas proporções que a caracterizem. Cendon et al, 1997, utilizou um modelo de inalação passiva de fumaça de cigarros onde os ratos eram expostos três vezes ao dia, 10 cigarros por período, por 45 e 90 dias, e já com 45 dias houve destruição do espaço aéreo distal, diminuição da elastância e elevado grau de inflamação.

D'hulst et al, 2005, expôs ratos a fumaça de cigarros por 24 semanas (6 meses), observando aumento do número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos tanto nas vias aéreas como no parênquima pulmonar, houve também presença de infiltrado por células dendríticas (DCs) 10 vezes mais no grupo exposto a fumaça do que o que inalou ar ambiente. No aspecto histológico D'hulst et al,2005, também relata destruição da arquitetura pulmonar normal comprovada pelo aumento significativo do intercepto linear

médio quando se observa o pulmão de ratos expostos a 24 semanas (6 meses) de fumaça de cigarro.

Valença e Porto, 2008, trabalharam com camundongos C57BL/6 machos, que foram expostos a fumaça de 3 cigarros comerciais 3 vezes ao dia, totalizando 9 cigarros/dia. Os animais foram organizados em grupos conforme o tempo, em 10, 20, 30 e 60 dias. Foram observados aumento de macrófagos no BAL quando comparado ao controle, além da destruição do parênquima e a presença de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-6. Esses dados sugerem a instalação da DPOC nestes grupos.

Em nosso modelo, a inflamação ocorreu por inalação passiva de fumaça de cigarros comerciais por 45 dias. Os ratos receberam a fumaça de dois cigarros por 10 minutos, sete vezes ao dia, totalizando 14 cigarros/dia. Ao final do processo, a análise do BAL e a contagem diferencial mostraram a presença de células inflamatórias como os macrófagos, neutrófilos e linfócitos em maior concentração quando comparados com o grupo controle. Os macrófagos produzem enzimas metaloproteases da matriz (MMP's), como a MMP-9 e MMP-12, causando a degradação protéica e recrutando células para o infiltrado tecidual no pulmão (Lagente, 2005).

Os neutrófilos presentes no grupo DPOC, assim como os linfócitos, representam o maior significado citológico da inflamação pulmonar, pois estas células são marcantes nos diversos modelos encontrados na literatura, assim como no nosso modelo. Associado às células estão os mediadores inflamatórios como o TNF- α . Essa citocina é produzida por macrófagos e ou células do epitélio respiratório que proporciona uma comunicação celular por meio de sinais químicos. Este mediador é uma substância da categoria das monocinas e sua secreção pelos macrófagos pode ser ativada por vários estímulos, exercendo atividades como a proliferação, diferenciação e apoptose celular, o que provoca no caso da DPOC, a destruição do parênquima. Esta molécula também estimula a liberação de collagenases e aumenta a expressão de moléculas de adesão, que também são encontradas na DPOC, provocando o extravasamento leucocitário. que atrai neutrófilos, que atuam na parede pulmonar provocando inflamação, especialmente na DPOC grave. Os neutrófilos também liberam suas elastases, promovendo o desequilíbrio entre proteases/anti-proteases, que degradam ou desorganizam as fibras elásticas.

Um outro composto encontrado em nosso modelo foi o TGF- β , substância responsável pela ativação de fibroblastos para a produção de colágeno. Esse dado pode ser confirmado na contagem de fibras colágenos no grupo DPOC em nossos resultados, assim também como a produção de muco pelas células caliciformes. O fator de

crescimento transformante β desempenha papel crucial no desenvolvimento de fibrose pulmonar e remodelamento das vias aéreas durante as fases tardias da lesão pulmonar crônica. Evidencia-se também que TGF- β apresenta relação direta com aumento da permeabilidade epitelial alveolar através do aumento da distância entre as células endoteliais. Tal distanciamento possibilita a migração de neutrófilos, o qual estimula a reparação do epitélio pulmonar (Akbarshahi et al., 2011)

Embora não se possa reconhecer o tipo de linfócito presente em nosso modelo, é certeza que eles estão bastante acentuados no grupo DPOC quando comparado ao controle. Essas células, especialmente as CD8⁺, na DPOC, são responsáveis pela produção TNF- α e interleucinas e a sua ação pode ser mediada pela presença de MIP-2 e CCL20, dois medidores também encontrados em nossos resultados quando de analisa os animais que receberam inalação por 45 dias de fumaça de cigarro.

Todo esse conjunto de característica marca a existência da DPOC no grupo que recebeu a inalação passiva de fumaça de cigarro por 45 dias, mostrando que o modelo é passível de gerar a DPOC.

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada como uma doença inflamatória das vias respiratórias, do parênquima e dos vasos pulmonares, evoluindo com lenta, progressiva e irreversível obstrução ao fluxo expiratório, secundária à bronquite crônica ou ao enfisema pulmonar (GOLD, 2004). Esse mesmo documento, GOLD,2004, sugere que novas intervenções sejam testadas para o tratamento desta inflamação, medicamentos que suprimam a progressão da doença, com a utilização de antagonistas para LTB₄, inibidores de citocinas ou bloqueadores de IL-8, inibidores de TNF- α e fatores de transcrição como o NF-K β .

Não sendo uma terapia medicamentosa, a utilização do laser de baixa potencia, mesmo assim, tem esses efeitos quando aplicados sobre inflamações de várias estruturas corporais, pele, tendão e também em inflamações pulmonares.

Vários autores (Guerino et al., 2000; Ciconelli et al., 1998; Cecchin; Cecchini,1993; Jimbo et al, 1998; Walker, 1983), verificaram importantes efeitos antiinflamatórios e analgésicos da terapia laser de baixa potência. (Bertolini; Nohama, 2007). A terapia com esse tipo de laser pode ser efetiva em mediar os sintomas do processo inflamatório por meio da estabilização da membrana celular pela normalização das concentrações de cálcio, sódio e potássio, contribuindo com a reparação celular; da vasodilatação, aumentando o transporte de oxigênio e nutrientes para as células danificadas e facilitando a reparação e remoção dos restos celulares; acelerando a

atividade dos leucócitos; aumentando a síntese de prostaglandina devido à conversão das prostaglandinas PGG₂ e PGH₂ perossídeos em prostaglandinas PGI₂ que possui ação vasodilatadora e antiinflamatória (Prentice, 2004); reduzindo a interleucina I; aumentando a resposta dos linfócitos afetando benéficamente toda a resposta linfática; estimulando a angiogênese de capilares linfáticos e sanguíneos por induzir o aumento de óxido nítrico e de fatores do crescimento que contribuem com este processo, levando a um aumento na capacidade de aderência celular, aumentando, assim, a reparação tecidual. (Costardi, 2008; Bolognoni, 1994).

O laser de baixa potencia já vem sendo utilizado há um certo tempo no tratamento de diversas inflamações pulmonares, seja experimental ou em tratamentos de doenças humanas, como mostra Burduli e Aksenova, 2007, que fizeram aplicações intravenosa de laser de baixa potencia em pacientes que receberam medicação convencional no tratamento da DPOC e compararam com o grupo que recebeu apenas medicamentos, observando que a utilização do laser proporciona uma melhora na hemodinâmica dos pacientes.

Kashanskaia e Fedorov, 2009, utilizando o laser de baixa potencia em pacientes com bronquite obstrutiva crônica. O laser foi associado a outras modalidades de tratamento, e desta forma obteve-se um melhora no quadro clínico bem melhor nos pacientes irradiados do que os não irradiados. O laser promoveu uma melhora na drenagem dos pulmões e normalizando a imunidade.

Aimbire et al, 2005, induziu inflamação pulmonar em ratos pela aplicação de LPS e tratou com laser de baixa potencia, causando a diminuição de fatores inflamatórios, promovendo a redução de neutrófilos, PGE₂ e TXA₂.

Em 2010, Alves et al, induziu DPOC em ratos com a inalação passiva de fumaça de cigarros. Um dos grupos de animais foi tratado com laser de baixa potencia por 15 dias. Após esse período verificou que houve redução no número de células inflamatórias e mediadores produzidas por elas, como o TNF- α , IL-8 e MIP-2. O laser também estabilizou a degradação do parênquima pulmonar.

Em nosso estudo, o laser de baixa potencia foi utilizado para o tratamento de DPOC experimental. O resultado se mostrou positivo pois o laser diminuiu a concentração de células que marcam a existência da DPOC. Os macrófagos que são as células residentes no espaço alveolar, que durante o processo inflamatório secreta vários

mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β , CCL-10 e metaloproteinases da matriz 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9).

A análise da histologia pulmonar mostra que a diminuição destas substâncias pela ação do laser diminui o ritmo da destruição do parênquima, havendo uma estabilização da “construção” de espaço morto que acontece no pulmão dos animais que receberam a fumaça de cigarro e foram tratados com laser. Este fato pode representar uma melhora na qualidade da respiração de indivíduos DPOCíticos. Essa estabilização está diretamente ligada com a diminuição da cascata inflamatória promovida pela laserterapia, pois com a diminuição da liberação de mediadores que recrutam células, há uma parada da destruição das fibras elásticas e da fagocitose realizada pelos macrófagos e neutrófilos.

Aimbire et al, 2006, em seus estudos já demonstrou que o laser reduz a atividade do TNF- α , na inflamação pulmonar, inclusive aumentando a capacidade mecânica do diafragma com a redução deste composto no músculo respiratório em ratos. Nosso trabalho mostra a redução de uma série de outros mediadores, IL-1 β , MMP-2, MMP-9, CCL-20, MIP-2. Algumas terapias para o tratamento de enfisema pulmonar, utilizam inibidores de TNF- α , efeito também encontrado na nossa pesquisa quando da utilização do laser 670nm, o que coloca a laserterapia como uma perspectiva de tratamento futuro, pois alguns trabalhos sugerem que a interrupção dos receptores específicos para os mediadores podem reduzir a cascata inflamatória, e o laser atua, como analgésico e também como antiinflamatório nesta pela interrupção da comunicação celular.

Em nosso modelo de inflamação pulmonar, viu-se que o efeito do laser de baixa potência sobre a expressão de RNAm de mediadores como CCL-20, MMP-2 e MMP-9 atenuou a infiltração de neutrófilos no pulmão. Albertini et al, 2004, observou-se que a utilização de laser de baixa potencia reduz a expressão de RNAm de fatores anti-apoptóticos de neutrófilos de camundongos inflamado sistemicamente com LPS através de um mecanismo dependente da sinalização de NF-kB. Esses dados mostram a ação do laser em reduzir o processo inflamatório.

6 Conclusão da tese

- A inalação de fumaça de cigarros de forma passiva por um tempo de 45 dias ocasionou a DPOC uma vez que células inflamatórias como os macrófagos, neutrófilos e linfócitos foram encontradas no BAL e na contagem diferencial em números bem mais significantes do que no grupo controle.
- Observa-se também que uma série de mediadores inflamatórios como o TNF- α , TGF- β , IL-1 β , CINC-1, CCL20, MMP-9 e MMP-12 presentes na DPOC foram encontradas de forma significativa no grupo que recebeu inalação de fumaça de cigarro por 45 dias, caracterizando a existência de inflamação pulmonar.
- A análise histológica também confirma a DPOC quando revela o aumento de muco e fibras colágenos nos animais que inalaram fumaça de cigarro, seguido

de um aumento do espaço morto anatômico pela destruição dos alvéolos, assim como a diminuição das fibras elásticas no grupo DPOC.

- A DPOC experimental pode ser tratada com laser de baixa potência, pois atenuou o processo inflamatório, uma vez que reduziu a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos nos grupos irradiados e também diminui a presença de CCL20, MMP-9, MMP-12, CINC-1, MIP-2, IL-1 β e TNF- α , nos mesmos grupos quando comparados com o grupo inflamação, mostrando que o tratamento é positivo já que estes são os principais mediadores inflamatórios determinantes dessa inflamação pulmonar, agindo diretamente na reação em cascata da cessação do processo inflamatório.
- Nota-se no entanto a necessidade de novos estudos que possam corroborar com esses resultados, podendo, futuramente, fundamentar a utilização da LBP no tratamento de pacientes com DPOC, não como uma agente que leve a cura, mais que atenua a doença e possa assim melhorar a qualidade de vida do paciente e se torne um modo mais barato e com menores efeitos colaterais que muitas vezes os agentes farmacológicos podem deixar, ou quem sabe utilizado de forma concomitante a medicamentos.

7 Referências bibliográficas

1. AIMBIRE F, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg.** V.24, n.1; p. 33-7.2006.
2. AIMBIRE F, et al.. Effect of LLLT Ga-Al-As (685nm) on LPS induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med Sci.** v.20, n.1, p.11-20. 2005.
3. AKBARSHAHI H, et al. TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory response is IRF3-mediated. **J Transl. Med.** V.9. p. 219.2011.
4. ALVES et al. Terapia com laser 670nm no tratamento da DPOC experimental em ratos. **Conscientiae Saúde**,v.9, n.4.p. 610-617. 2010.

5. ANTUNES MA. ROCCO PRM. Elastase-induced pulmonar emphysema: insights from experimental models. **Acad Bras Cienc.** V.83, n.4,p:1385-95.2001.
6. ALBERTINI, R., et al.. Effects of different protocol doses of low power galium-aluminium-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carraggenan induced rat paw edema. **J Photochem Photobiol B.** v.74, n.2-3, p.101-7, 2004.
7. AGNE, J. E. **Eletrotermoterapia teoria e prática.** Capítulo: Laserterapia. P. 309 a 328. 2005.
8. BARNES, P.J., STOCKLEY R.A. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. **Eur. Resp J.**v.25,p.1084-1106.2005.
9. BERQUÓ, L. S. et al. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade. **Rev. Saúde Pública,** v. 38, n. 3, p. 358-364,2004.
10. BERTOLINI, G.R.F.; NOHAMA, P. Avaliação da conformidade dos equipamentos laser de baixa potência e emissão contínua empregados em Fisioterapia. **Fisioterapia em Movimento,**v.20, n.2,p:13-23. 2007.
11. BOLOGNONI, L.; et al. Effects of low-power 632 nm radiation (HeNe laser) on a human cell line: influence on adnylnucleotides and cytoskeletal structures. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,** v.26,n.3,p.257-64.1994.
12. BURDULI NM. AKSENOVA IZ. The effect of intravenous laser irradiation of blood on the system hemodynamics of patients with chronic obstructive bronchitis exacerbation. **Klin Med (Mosk).** V.85, n.9.p:58-61.2007.
13. BROCKHUS, A.;ELGER, C.E. Hypoalgenic efficacy of acupuncture on experimental pain in man. Comparison of laser acupuncture and needle acupuncture. **Pain** v.43,p.181-186.1990.
14. CARANDINAI, L.; GOLDBAUM, M.; PEREIRA, J. C. R. Doenças respiratórias e fatores associados: estudo de base populacional em São Paulo. **Rev Saúde Pública,** v. 46, n. 1, p. 16-25, 2012.
15. CAUX C, et al. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. **Springer Semin Immunopathol** .v.22,n.04. p:345-369.2000.
16. CALVERLEY P, RENNARD SI. What have we learned from large drug treatment trials in COPD? **The Lancet.** V.370,n.9589,p:774-85.2007.

17. CECCHINI, R.C.M.; CECCHINI, S.C.M. O papel coadjuvante do Nd: YAG laser na endodontia. Caso clínico. **Revista da Associação Brasileira de Odontologia Nacional**, v.1,n.2,p.102-4, 1993.
18. CENDON S, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: na experimental study in rats. **Braz J Med Biol Res**. V.30, p:1241-7.1997.
19. CHUNG K.F., ADCOCK,J.M. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair destruction. **Eur Respir J**.v.31,p.1334-56.2008.
20. CICONELLI, K.P.C. et al. Bioestimulação óssea utilizando laser de baixa densidade de potência diodo semiconductor 830 nm em caso de micro mini implante. **Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica**,v.2, n.11, p.39-42 1998.
21. COSTA, C. H.; RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.55, n.3,p.347-354, 2009.
22. COSTARDI, C.H.Z.; et al. Efeito do laser de baixa intensidade (670nm) após contusão muscular em ratos. **Fisioter. Mov**.v.21, n.2, p.21-30. 2008.
23. DALLEGRI, F.; OTTONELLO. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflammation Research**, v.46,n.10,p.382-91..1997.
24. DANTAS, RL et al. Fotobiomodulação experimental na prevenção de enfisema pulmonar. **Conscientiae Saúde**. V.11, n.01. p.53-59. 2012.
25. DE JONG, J. W. et al. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, ige and lung function. **Respiratory Medicine**,v.91, n.02,p:67-76.1997.
26. D'HULST, A.I. et al. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. **Eur Respir J**.v.26,p.204–213.2005.
27. DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, 1996.
28. ECHER, I. C.; FERREIRA, S. A. L.; LUCENA, A. L. D. F. T. Tabagismo em uma escola de enfermagem do sul do Brasil. **Texto and Contexto Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 152,2011.
29. ELIAS JA, LEE CG. Lipid let loose in pulmonary emphysema. **Nature medicine**. V.11,n.5.p:471-2.2005.
30. FERREIRA, Alexandre et al . Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. **Rev. Bras. Cienc. Farm**. v. 43, n. 3, . 2007.

31. FERREIRA, S. A. L. et al. Motivation for smoking in the community of a high education nursing school. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 32, n. 2, p. 287-293, 2011.
32. FORONJY, R. et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke–or elastase-generated emphysema in mice. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 173, n. 6, p. 623-631, 2006.
33. FUSCO et al. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. **J Pneumol** v.28, n.1. p.1-7. 2002.
34. FLETCHER, C.; PETO, R. The natural history of chronic airflow obstruction. **British Medical Journal**, v. 1, n. 6077, p. 1645, 1977.
35. FUJITA M. NAKANISHI Y. The pathogenesis of COPD: Lessons learned from in vivo animal models. **Med Sci Mon.** v.13. p.19-24.2007.
36. GENOVESE, W. J. **Laser de Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.
37. GOLD -Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD, 2004.
38. GROSS P, et al. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Archives of Environmental Health: An International Journal**. V.11,n.1,p:50-8.1965.
39. GUERINO, M.R.; et al. Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis. **Applied Surface Science**. v.155,n. 1,p.561-564, 2000.
40. GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-funcional**. 3ª ed., São Paulo: Manole, 2004.
41. HOGG, J. C; SENIOR, R. M. Chronic obstructive pulmonary disease part 2: pathology and biochemistry of emphysema. **Thorax**, v.57,n.9,p.830- 834. 2002.
42. HOLZ, O. et al. Assessing airway inflammation in clinical practice - experience with spontaneous sputum analysis. **BMC Pulmonary Medicine**, v.8,n.5,p.1-7, 2008.
43. JIMBO, K.; et al. Suppressive effects of low-power laser irradiation on bradykinin evoked action potentials in cultured murine dorsal root ganglion cells. **Neuroscience Letters**.v. 240,p.93-96.1998.
44. KARVONEN, Henna M., et al. Myofibroblast expression in airways and alveoli is affected by smoking and COPD. **Respiratory research**, v.14.n 1: p.84. 2013.

45. KARU, T.I. Photobiological fundamental of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics**, v.23, p.1703.1987.
46. KASHANSKAIA EP. FEDOROV AA. Low-intensity laser radiation in the combined treatment of patients with chronic obstructive bronchitis. **Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult**. V.2.p:19-22.2009.
47. KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
48. KITCHEN, S. Eletroterapia Prática Baseada em Evidências. 11ª Ed. Barueri, SP: Manole, 2003.
49. LAGENTE V et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.v.38.n.10.p:1521-30.2005.
50. LOPES, FLT. LIMA, AIM. ALVES, WS. Laserterapia associada ao corticoide no tratamento de inflamação pulmonar em ratos. **Conscientiae Saúde**. V.11, n.01.p-94-102.2012.
51. LOW, J; REED, A. **Eletroterapia Explicada – Princípios e Prática**. 3ª Ed. Barueri, SP: Manole, 2001.
52. LUCEY, E. C. ET AL. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factoralpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. **Lab Invest**.v.82, n.01.p:79-85. 2002.
53. LUZ, P.L. et al. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. EditoraAtheneu 2003.
54. MAJO, J.; GHEZZO, H.; COSIO, M. G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. **European Respiratory Journal**. V.17,n.05.p:946-53. 2001.
55. MARCH T. et al. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease. **Inhalation Toxicology**. V.12. p: 155-87.2000.
56. MESTER, E. et al. The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers. **Zeitschrift Experimentelle Chirurgie** v.8, p. 258-262.1975.
57. McDEVITT, Theresa M, et al. Role of endogenous TGF- in glucocorticoid-induced lung type II cell differentiation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** n.292, p: L249 –L257, 2007

58. MENEZES, A. M. B. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21,n.5, p.1565-1573, set-out, 2005.
59. OLIVEIRA JUNIOR, Geraldo Cardoso et al. Efeito da laserterapia de baixa potência na inflamação pulmonar em *rattus novergicus* **ConScientiae Saúde**, v.9, n.4,p:659-666.2010.
60. O'SHAUGHNESSY T. et al. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.155,n.3, p.852-857. 1997.
61. PATEL, B. D. et al.. International COPD Genetics Network. Airway wall thickening and emphysema show independent familial aggregation in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 178, n. 5, p. 500-505, 2008.
62. PAUWELS, R. A. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.163, n.05, p.1256-76, 2001.
63. PRENTICE, William E. Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 472p
64. RABELO, S. B. et al. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*, v.24, n.4, p.474-479. 2006.
65. RAFIQ, Mohamed, et al. Poly-Ingredient Formulation Bresol® Ameliorates Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in Rats. **Scientia pharmaceutica**, v. 81.n. 3: 833.2013.
66. RIBEIRO-PAES, J. T., et al. Proposta de um protocolo de terapia celular para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 20; n. 2: 84-91.2014.
67. RIBEIRO, A., et al. Cannabidiol improves lung function and inflammation in mice submitted to LPS-induced acute lung injury. **Immunopharmacology and immunotoxicology**,v.37, n.01,p:35-41. 2015.

68. RODRIGUES, S. L.; VIEGAS, C. A. A.; LIMA, T. Efetividade da Reabilitação Pulmonar como Tratamento Coadjuvante da Doença Pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 28, n. 2, p. 66-70, 2002.
69. RODRIGUES JC, et al. Efeito do índice de massa corpórea na gravidade da asma e na reatividade brônquica induzida pelo exercício em crianças asmáticas com sobrepeso e obesas. **R Paul Pediatr**. V.25,n.3, p:207-13.2007.
70. RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**,v.32, n.3,p:241-8. 2006.
71. SAETTA, M., A. et al. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. **American Review of Respiratory Disease**, v.147, n.2,p:301-6. 1993.
72. SANTOS-SILVA, M. A. et al. A Resposta Oxidativa em Corações de Camundongos é Modulada por Background Genético. **ArqBrasCardiol**, v. 100, n. 2, p. 157-163,2013.
73. SERRA HG. et al. Avaliação da concentração de alfa 1-antitripsina e da presença dos alelos S e Z em uma população de indivíduos sintomáticos respiratórios crônicos. **J Bras Pneumol conferir**. V.34,n.12, p: 1019-25.2008.
74. SHAPIRO, Steven D. Animal Models for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Age of klotho and Marlboro mice. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**.v.22,n.1,p.4-7. 2000.
75. SHAPIRO S.D., INGENITO E.P.,2005. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. **American journal of respiratory cell and molecular biology**.v32,n.5.p:367-72.2005.
76. SILVA, J. R. L. et al. Immunopathology of experimental bronchiectasis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.1, n.4, p.297-304.1989.
77. TARANTINO AB. Doenças pulmonares; Lung diseases: Guanabara Koogan; 2008.
78. TESTONI, Fernanda, et al. - Estudo das Alterações Pulmonares em Idosos Tabagistas: Ênfase em Reabilitação Pulmonar. **Anais do IX INIC**, Univap. São José dos Campos - SP.2005.
79. TOGO, Shinsaku, et al. Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.178.n.3,p: 248-260.2008.

80. TOLEDO AC, et al. Aerobic exercise attenuate pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **ERJ Express**. V.39,n.2, p:254-64.2012.
81. TORRES, BS. GODOY, Irma de. Doenças tabaco relacionadas , capítulo 4, in: Diretrizes para a cessação do tabagismo.**J. bras. Pneumol**. V.30, s.2. p:S2-76, 2004.
82. VALENÇA, S. S; PORTO, L. C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **J Bras Pneumol**. V.34,n.10, p.787-795, 2008.
83. VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.
84. YASUKAWA, Akio., et al. The effect of Low Reactive-Level Laser Therapy (LLLT) with Helium-Neon Laser on Operative wound Healing in a Rat Model. **J.Vet. Med. Sci**. v.69, n.8, p.799-806. 2007.
85. YOUNG, M. **Óptica e Lasers**. São Paulo: EDUSP, 1998.
86. WAGNER, J. G; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v.52,p.349–374,2000.
87. WALKER, J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. **Neuroscience Letters**. V.43, I.2-3,p.339-344.1983.
88. WEIS, L.C., et al. Utilização do laser de baixa potência nas clínicas de fisioterapia de Piracicaba, São Paulo. **Fisioterapia Brasil**.v.06,n.2,p.124-129.2005.
89. WEWEES MD et al. Il-1 beta converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1beta release limitations is ICE independent. **Immunol**.n159, p:5964-5973. 1997.
90. World Health Organization (WHO). Why do young people smoke [online]. Geneva; [s.d.]. Available from: <www.who. int> Acesso em 14 de novembro de 2011.
91. WÜNSCH FILHO, V. et al. Tobacco smoking and cancer in Brazil: evidence and prospects. **Rev. bras. epidemiol**, v. 13, n. 2, p. 175-187, 2010.
92. ZLOTNIK A, YOSHIE O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**. V.12, n.2. p.:121-127. 2000.
93. ZHENG H. et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. **Toxicology Letters**. V.189,n.3,p:225-34.2009.

Anexos



[MANUSCRIPT HOME](#) [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) [REFeree INSTRUCTIONS](#) [HELP TIPS](#) [LOGOUT](#) [JOURNAL HOME](#)

Manuscript #	4751
Current Revision #	0
Submission Date	2015-02-05 15:57:36
Current Stage	Manuscript Submission
Title	Histobiological and biochemical analysis of lung inflammation induced by cigarette smoke - a 45 day passive inhalation pattern
Running Title	Histobiologia and biochemistry of experimental COPD
Manuscript Type	Full Paper
Corresponding Author	Wellington Alves (Universidade Estadual do Piauí-UESPI)
Contributing Author	N/A
Abstract	Introduction: COPD is defined as a respiratory infirmity with systemic manifestations and is characterized by the presence of chronic air flow obstruction and associated with an abnormal inflammatory response. Objective: To analyze the effect of smoking on lung histobiology. Methodology: Wistar male rats (3 months old) from the animal house of Santo Agostinho College (FSA) were used. Each study group consisted of eight (08) animals and divided as follows: Group G1- control; Group G2 - pulmonary inflammation. The animals were kept in an inhalation chamber for 10 minutes seven times a day for 45 days. The lung injury characterized by histological and biomechanical changes, was induced by passive inhalation of various harmful agents found in cigarette smoke by using 14 filtered cigarettes per day. To analyze the characteristic parameters of pulmonary inflammation in lung injury, biochemical, histological and cytological analysis were carried out. Results: Multiple inflammatory cells and increased production of mucus and collagen. The data also showed increased production of important inflammatory mediators such as TNF-α, TGF-β, MMP's among others. Conclusion: It was evidenced that there is an irritation in the epithelial cells that release TGFβ, increasing the production of collagen, causing fibrosis of the lung tissue and increase in the activities of the unicellular mucous glands in the airway epithelium.
Section Editor	Not Assigned
Key Words	Pulmonary Inflammation, Neutrophils, COPD, Histology
Subject Areas	Biomedical Sciences/Cell Biology
Conflict of Interest	No , there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Publication Charges	wsa
Manuscript Items	1. Merged File containing manuscript text and 1 Figure file. (PDF not available) a. Article File PDF (475KB) Source File (DOCX) 55KB Approve b. Article File (PDF not available) Source File (DOCX) 0KB c. Figure 2 PDF (276KB) Source File (DOCX) 1880KB Approve Figure

Anexo 1 – Comprovante de submissão do artigo 1.

Inflammation Research
Low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory markers in the chronic obstructive pulmonary disease
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	INRE-D-14-00523
Full Title:	Low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory markers in the chronic obstructive pulmonary disease
Article Type:	Original Research Paper
Corresponding Author:	Flávio Ambire BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Wellington Alves
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Wellington Alves José Júnior Regiane Albertini Flávio Ambire João Carlos Corrêa
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is defined as a respiratory illness with systemic manifestations and is characterized by the presence of chronic airflow obstruction is associated with an abnormal inflammatory response. Several studies indicate the possibility of treating respiratory disorders in rats or mice, by use of low-power laser. Objectives: To investigate the effect of low level laser, 670nm laser in the treatment of pulmonary inflammation induced in Rattus norvegicus. Methodology: 30 rats were divided into three groups (control group, COPD group, laser group) each group consisting of ten animals (n = 6), COPD and laser groups were exposed to cigarette smoke for 45 days and the group treated with laser 670nm laser for 15 days after the induction of the inflammatory process. To obtain these results we performed ELISA of supernatant of bronchoalveolar lavage (BAL) and Real Time PCR from lung tissue. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA). Conclusion: Treatment with low power laser therapy in experimental COPD in rats was positive, as data showed the reduction of inflammatory cells and chemical mediators that enhance the lung inflammation.
Suggested Reviewers:	Rodrigo Martins martins@usp.br Paulo de Tarso Camillo de Carvalho paulo.tarso@uninove.br Ernesto Leal Jr ernesto.leal.junior@uninove.br

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo 2.



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ – UESPI
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Olavo Bilac, 2335 Centro - Fone: (86)3221-6658
CEP 64001-280 Teresina-PI

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: CEP-UESPI 001/12

Título: “ESTUDO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR EXPERIMENTAL EM RATOS”.

Pesquisador responsável: WELLINGTON DOS SANTOS ALVES

Documentos analisados: **Folha de Rosto, carta de encaminhamento, projeto de pesquisa e bibliografia pertinente.**

Data de entrada: **11 de abril de 2012**

Proposição do(a) Relator(a):

- ☒ **Aprovação**
☐ Aprovação com pendências
☐ Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-UESPI: 24.04.2012

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Piauí, em **Reunião 05/2012** realizada em 24.04.2012, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Teresina, 25 de abril de 2012.


Prof. Mauro Roberto Biá da Silva

Coordenador do CEP-UESPI

Anexo 3 – Parecer do comitê de ética



FACULDADE SANTO AGOSTINHO

CEUA-Comitê de Conduta Ética para o Uso de Animais Experimentais

Parecer do Comitê de Conduta Ética para o Uso de Animais Experimentais

O projeto de pesquisa “Efeito da laserterapia de baixa potência na inflamação pulmonar induzida em *Rattus norvegicus*: aspectos histológicos” tem por objetivo observar a inflamação pulmonar através da análise histopatológica, comparando grupos experimentais e correlacionando os resultados obtidos diante do experimento

O estudo atende os aspectos relativos à Lei 11.794, de oito de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais em instituições de ensino superior, cujos procedimentos experimentais efetuados em animais vivos, visam à elucidação de fenômenos, oferecendo possibilidades de gerar conhecimento na área de fisioterapia.

Somos de parecer favorável a execução do projeto de pesquisa.

Teresina (PI), 12 de outubro de 2009

Prof. Ms. Charles Dourado

Presidente do Comitê de Conduta Ética para o Uso de Animais Experimentais