

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MESTRADO DE BIOFOTÔNICA  
APLICADA A SAÚDE**

**GABRIEL DE ASSIS CUNHA MORAES**

**EFEITO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LBP) EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC):  
PARTICIPAÇÃO DA VIA PURINÉRGICA**

**São Paulo, SP**

**2016**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MESTRADO DE BIOFOTÔNICA**  
**APLICADA A SAÚDE**

**GABRIEL DE ASSIS CUNHA MORAES**

**EFEITO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LBP) EM MODELO**  
**EXPERIMENTAL DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC):**  
**PARTICIPAÇÃO DA VIA PURINÉRGICA**

Trabalho apresentado à Universidade Nove de Julho como requisito para obtenção do título de Mestre em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira**

**São Paulo, SP**

**2016**

**Resumo**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Moraes, Gabriel de Assis Cunha.

Efeito da terapia com laser de baixa potência (IBP) em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPCO): participação da via purinérgica. / Marlette Cassia Oliveira Ferreira. 2016.

44 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira.

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Laser de baixa intensidade.  
3. Inflamação pulmonar.

I. Oliveira, Ana Paula Ligeiro de.

II. Título

CDU 615.831

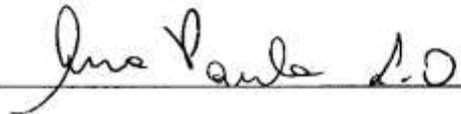
São Paulo, 23 de fevereiro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): GABRIEL DE ASSIS CUNHA MORAES

Título da Dissertação: "Efeito da terapia com laser de baixa potência (LBP) em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC): participação da via purinérgica"

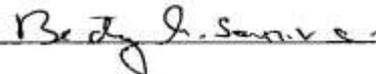
Presidente: PROFª. DRª. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Membro: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro: PROFª. DRª. BEATRIZ MANGUEIRA SARAIVA ROMANHOLO



## DEDICATÓRIA

*Dedico a todos meus familiares,*

*Aos meus pais, irmão e familiares por me incentivarem por mais uma conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço principalmente a minha orientadora Profa. Dra Ana Paula pelos ensinamentos passados ao longo deste curso e por ter me orientado com muita paciência.

A Universidade Nove de Julho pela bolsa de Mestrado, a Diretoria de pós-graduação em Biofotônica, pela oportunidade de ingresso no Mestrado.

Ao Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira, pelo conhecimento passado, pelo contato inicial em meados de 2013, abrindo as portas do Laboratório de Imunologia Pulmonar do Exercício, cuja paciência, dedicação e experiência me ajudaram muito.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício: Alana Dias, ao nosso grupo de pesquisa: Ricardo, Paulo, Erasmo, Breanne, Adilson, Nicole, Jeferson, Ana Roberta, Léia, Luana e aqueles que eu esqueci também. Aos colegas de curso por estarem sempre ao meu lado nas horas de aperto e nas horas que não sabíamos o que fazer.

As técnicas do laboratório Ângela pela paciência e pelos ensinamentos das técnicas que me foram úteis para desenvolver este projeto, meus agradecimentos. E principalmente a Deus por me dar forças e paciência para completar este objetivo de vida.

## Resumo

Atualmente a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) apresenta impacto em morbidade e mortalidade em todo o mundo, com alta prevalência e um elevado custo econômico e social. Ela é caracterizada por limitação lenta e progressiva do fluxo aéreo, desencadeado pela inalação de partículas nocivas presente na fumaça do cigarro. Neste contexto, vários modelos experimentais têm sido propostos, objetivando a descoberta de novas opções terapêuticas. Neste sentido, a terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) é uma terapia relativamente nova e eficaz, de baixíssimo custo, sem efeitos colaterais e de possível utilização no tratamento das doenças crônicas pulmonares. No presente estudo estudamos alguns parâmetros em animais com DPOC submetidos à terapia com laser de diodo (808nm), 30 mW, 60s por ponto (3 pontos por aplicação) por 15 dias antes da eutanásia. O protocolo utilizado para a indução da DPOC consistiu em nebulizar camundongos fêmeas C57BL/6 com fumaça de cigarro por 75 dias (2 vezes/dia). No dia 76, os animais foram anestesiados, traqueostomizados, canulados e o lavado broncoalveolar (LBA) coletado. Foram estudados parâmetros funcionais e estruturais, como contagem total e diferencial de células recuperadas do LBA, os níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e CXCL1/KC) bem como o acúmulo de muco e colágeno. Foi realizada também a histologia nos pulmões para a quantificação do número de linfócitos nas vias aéreas, assim como o remodelamento brônquico. Além disso, avaliamos a expressão dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 no homogenato do tecido pulmonar por meio da técnica de Western Blotting. Os nossos resultados mostraram que a terapia com laser de baixa potência em um modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), diminuiu o número de células no LBA, a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17), quimiocina (CXCL1/KC), produção de muco e colágeno, morte celular, alargamento alveolar, bem como a diminuição da expressão do receptor purinérgico P2X7 e também aumento da citocina anti-inflamatória (IL-10). Portanto, sugerimos que o laser 808nm é eficaz para reduzir a inflamação pulmonar em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

Palavras-chave: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, Laser de Baixa Intensidade, inflamação pulmonar.

## Abstract

Currently, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has an impact on morbidity and mortality throughout the world with high prevalence and a high economic and social cost. It is characterized by slow and progressive airflow limitation, triggered by the inhalation of harmful particles present in cigarette smoke. In this context, several experimental models have been proposed, aiming at the discovery of new therapeutic options. In this regard, low-power laser therapy (LBP) is a relatively new and effective therapy for very low cost, no side effects and possible use in the treatment of chronic pulmonary diseases. In the present study we study some parameters in animals with COPD undergoing therapy diode laser (660 nm), 30 mW, 60 s per point (3 points per application) for 15 days prior to euthanasia. The protocol used for COPD induction consisted of nebulized female C57BL / 6 with cigarette smoke for 75 days (2 times / day). On the day 76, the animals were anesthetized, tracheotomy, cannulated and bronchoalveolar lavage (BAL) was collected. Structural and functional parameters were studied, the total and differential counts of cells recovered from BAL fluid, cytokine levels (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and CXCL1/KC) as well as the accumulation of mucus and collagen. It also performed lung histology to quantify the number of lymphocytes in the airway, and bronchial remodeling. Moreover, we will evaluate the expression of the purinergic receptors P2Y2 and P2X7 in the homogenate of lung tissue by Western Blotting technique. The results showed that LLLT significantly reduced the number of total cells in the bronchoalveolar (BAL), the levels of cytokines IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  and CXCL1/KC, mucus production and collagen, cell death, alveolar enlargement, as well as the expression purinergic P2X7 and increased cytokine anti-inflammatory (IL-10). Therefore, we suggested that the laser 808nm is effective to reduce lung inflammation in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

**Keyword:** Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Low Level Laser, lung inflammation.

## SUMÁRIO

1.Introdução.....	01
-------------------	----

1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.....	01
1.2. Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) na inflamação pulmonar.....	04
1.3. Receptores Purinérgicos.....	09
2.Objetivos.....	11
3.Materiais e métodos.....	12
3.1. Animais e grupos experimentais .....	12
3.2. Modelo Experimental.....	12
3.3.Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar.....	13
3.4. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA.....	14
3.5. Avaliação da inflamação e remodelamento.....	14
3.6. Análise da expressão dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 por meio da técnica de Western Blotting .....	14
3.7. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo.....	15
3.8. Avaliação da mecânica pulmonar .....	15
3.9. Análise Estatística .....	17
4.0.Resultados.....	18
5.0.Conclusão.....	30
3.8. Referencias Bibliográficas.....	31

# 1. Introdução

## 1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é atualmente a quarta maior causa de morte no mundo e representa um grande desafio, tendo grande impacto em morbidade e mortalidade<sup>1</sup>. Muitas pessoas sofrem dessa doença por anos, e morrem prematuramente devido às suas complicações<sup>2</sup>. De acordo com dados do Projeto Latino – americano de Investigação Pulmonar<sup>3</sup>, a prevalência de DPOC no Brasil é de 15,8% nas pessoas acima de quarenta anos de idade, sendo que apresenta elevados custos de tratamento quando comparada com outras doenças<sup>3</sup>. Além disso, dados nacionais identificam a DPOC como a quinta maior causa de internamento no sistema público de saúde, com uma prevalência estimada de 12% nos indivíduos acima de quarenta anos. Apesar de todos os esforços para se aumentar o seu diagnóstico, ela ainda continua sendo uma doença complexa, desde sua fisiopatologia até o seu tratamento<sup>3,4</sup>.

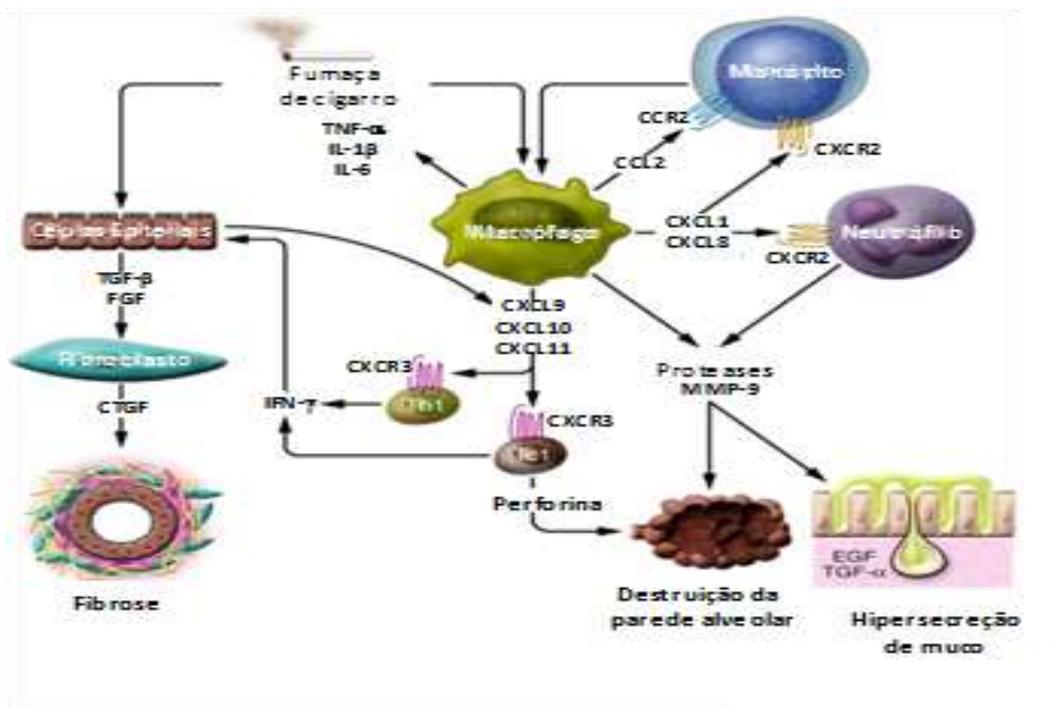
Segundo o Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2015), a DPOC é caracterizada por limitação do fluxo aéreo, sem total reversibilidade, em geral progressiva independentemente do tratamento instituído, com manifestações respiratórias e sistêmicas<sup>4</sup>. Ela está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à exposição e inalação de partículas ou gases nocivos. Outras causas mais raras de DPOC incluem doenças genéticas, como a deficiência de alfa 1 – antitripsina (AAT), a queima de biomassa, e a poeira tóxica como nos casos da mineração.

A DPOC pode ter diferentes apresentações clínicas e muitos pacientes são diagnosticados como portadores de enfisema pulmonar ou bronquite crônica. Os agentes irritantes presentes no fumo tais como os aldeídos, elementos fenólicos, cetonas, álcoois e amônia promovem alterações nos brônquios, denominado ciliostase. Tal processo, verificado experimentalmente em animais, ocorre no homem ao fumar em torno de cinco cigarros por dia, resultando na diminuição e parada dos movimentos ciliares. Com a continuidade do fumar, os cílios acabam por cair, desnudando extensas áreas da luz brônquica gerando uma série de alterações que em essência são: edema e inflamação da mucosa, com hipersecreção de muco, aumento do número de células caliciformes, que também produzem muco. Com o tempo, surgem ainda hipertrofia dos músculos lisos,

fibrose da parede brônquica e destruição alveolar, característica do enfisema, levando a obstrução das vias aéreas <sup>4,5</sup>.

A fisiopatologia da DPOC está relacionada com a inalação da fumaça de cigarro e outros irritantes os quais recrutam células inflamatórias para o parênquima pulmonar. Dentre estas, neutrófilos, macrófagos e linfócitos T CD8 são os mais relevantes. Biópsias em portadores de DPOC mostraram um aumento no número de neutrófilos no parênquima e no lavado broncoalveolar<sup>6</sup>. A presença dessas células e da elastase neutrofílica parecem ser importantes para o desenvolvimento do enfisema<sup>7</sup>. Já os macrófagos são encontrados mais frequentemente em pacientes com DPOC, sendo apontado como a célula principal no desenvolvimento da doença. Ativados por substâncias presentes no cigarro, podem secretar TNF- $\alpha$ , MCP-1, LTB<sub>4</sub>, IL-8 e ROS<sup>8</sup>. Assim estas células podem ser consideradas reagentes do processo inflamatório e efetoras da lesão pulmonar. A liberação desses mediadores ativa as células epiteliais e macrófagos alveolares a liberar mais fatores quimiotáticos como CCL2, CXCL1 e CXCL8 que atraem os neutrófilos e monócitos, aumentando o processo inflamatório. Também ocorre liberação de CXCL9, 10 e 11, que vão atrair os linfócitos Th1 e células citotóxicas tc1.

Estas células são responsáveis pela secreção de proteases, como a MMP-9 e 12, que causam a degradação da elastina, proteína que reveste o parênquima, causando o enfisema. A elastase dos neutrófilos aumenta a secreção de muco causando a bronquite. Os macrófagos também secretam TGF-  $\beta$ , que estimula a proliferação dos fibroblastos, causando fibrose. Para uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvido na DPOC (Esquema1).



**Esquema1. Citocinas e quimiocinas envolvidas na fisiopatologia da DPOC.**

A teoria da protease/antiprotease no enfisema induzido por fumaça de cigarro é baseada em uma resposta inflamatória crônica no trato respiratório inferior, onde as células inflamatórias liberam uma grande variedade de proteases que se sobrepõe às defesas antiproteolíticas, com subsequente degradação de tecido conjuntivo <sup>7,8</sup>. A perda do recolhimento elástico e a evidência histológica de dano das fibras elásticas implicam necessariamente em degradação de elastina como um fator chave na patogênese do enfisema.

Vale lembrar que o processo inflamatório crônico correlaciona-se com o aumento da expressão de múltiplos genes associados às reações inflamatórias. Muitos destes genes são regulados pelo fator nuclear de transcrição, o NF-κB (NF – Kapa Beta), o qual está aumentado em pacientes com DPOC e fumantes, ativado por citocinas pró-inflamatórias e pelo estresse oxidativo. <sup>7,8</sup> Ocorrem também um aumento da ativação de NF-κB em macrófagos alveolares, durante as exacerbações da DPOC, interligando infecções, estresse oxidativo e a expressão aumentada de genes inflamatórios <sup>7,8</sup>. Assim as exacerbações da DPOC parecem ser devido à amplificação do processo inflamatório. Isto implica que os tratamentos que suprimem a inflamação na DPOC também bloqueiam as exacerbações. Sendo assim, mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da DPOC devem ser mais bem elucidados para utilizarmos terapias mais pontuais no tratamento dessa doença.

Nenhuma terapia disponível no momento reduz a implacável progressão da doença. A DPOC é normalmente tratada com os fármacos usados para tratar a asma, o que quase sempre é inapropriado, já que o processo inflamatório na DPOC difere do da asma. O reconhecimento global da importância desta doença e o aumento de sua prevalência têm levado a esforços para o desenvolvimento de novas terapias, particularmente para o controle da inflamação<sup>7</sup>. Sendo assim, terapias que melhorem o desconforto respiratório do paciente e também reduza os custos despendidos com esta doença são de grande importância. Vale destacar que não existem trabalhos acerca da Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) e DPOC <sup>6,7,8</sup>.

## **1.2. *Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) na inflamação pulmonar***

A luz solar é utilizada como terapia, desde a antiguidade <sup>9</sup>. Segundo Miserendino e Pick, descreve que os indianos em 1400 a.C, foram os primeiros a utilizar a fotoquimioterapia, empregando um fotosensibilizador exógeno obtido de plantas (Psoralens) usado na forma de loção aplicada na pele, capaz de absorver luz solar e resultar em um efeito terapêutico no tratamento do vitiligo. Os egípcios também haviam usado a mesma substância para o tratamento de leucoedema <sup>10</sup>. Até meados de 1900, o estudo da luz se limitou a verificar seu comportamento. Com o decorrer do tempo, os cientistas identificaram fontes de luz, porém não entendiam como essa luz era gerada.

A teoria de Einstein (1915-1916) sobre a emissão estimulada de luz teve como base a teoria quântica proposta por Planck (1900). Essa teoria analisava as relações entre a quantidade de energia liberada por processos atômicos. Assim, Einstein discorreu sobre a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação eletromagnéticas em termos de absorção e emissão espontânea de radiação e, concluiu que o terceiro processo de interação, a emissão estimulada, deveria existir e nela, a radiação eletromagnética deveria ser produzida por um processo atômico <sup>10</sup>.

A geração do raio laser ocorre dentro de uma cavidade conhecida como cavidade de Perot- Fabry, que consiste de uma câmara contendo um meio ativo. O meio ativo consiste em um material que pode ser sólido, líquido, gasoso ou semicondutor. No instante em que o meio ativo é excitado, ele faz com que os elétrons contidos na cavidade óptica ganhem e liberem energia para formação da radiação laser. O tamanho

e a forma da câmara variam de acordo com o meio ativo e a potência do aparelho laser. Dois espelhos com níveis de reflexão diferentes estão posicionados em cada uma das extremidades da câmara. Um dos espelhos é totalmente reflexivo (100%) e o outro parcialmente reflexivo (98%). A diferença de capacidade de reflexão dos espelhos permite a saída da radiação de dentro da cavidade, formando assim o raio laser. A fonte energética pode ser elétrica ou luminosa, e é o que alimenta o sistema de três maneiras: continuamente (CW), pulsada, que origina ondas pulsadas desencadeadas ou Q-switched. A emissão contínua é resultante da excitação contínua de um meio ativo por uma descarga elétrica, como nos casos dos lasers gasosos, ou por uma fonte contínua de bombeamento óptico. A emissão pulsátil é resultante do bombeamento pulsátil do meio ativo, o qual é progressivamente bombeado até chegar a um nível de excitação suficiente para produzir emissão laser. Já a emissão desencadeada, ou também denominada de destravada ou Q-switched, ocorre em lasers pulsáveis e se verifica quando o bombeamento é feito para além do limiar de funcionamento, permitindo que a emissão ocorra quando tiver alcançado um nível suficiente <sup>10</sup>.

A origem da luz ocorre através dos fótons, que são desenvolvidos quando os elétrons que circulam em torno do núcleo atômico mudam seu curso. Normalmente isso ocorre quando uma energia extra é aplicada ao átomo, essa energia pode ser aplicada de diferentes formas, sejam elas, através da oscilação de calor, da colisão de átomos ou elétrons e da energia de reações químicas. A energia que é exercida nos átomos de alguma das formas citadas acima é armazenada pelos elétrons quando são excitados e isso leva a mudança desses elétrons para um nível energético superior ao seu estado natural. Apenas um número particular de elétrons pode ocupar um dado nível energético, e nenhuma forma de radiação ocorre quando os elétrons se mantêm em seus níveis orbitais. Cada órbita está associada a um nível de energia, sendo o mais baixo deles conhecido como estado fundamental, neste estado os elétrons estão mais próximos do núcleo. O fenômeno da absorção ocorre quando a estrutura atômica estável reage com um fóton, passando a um estado mais energizado. A energia de excitação pode ser do tipo cinético (choque entre átomos, partículas ou moléculas) ou eletromagnético. Nestes casos, a radiação que chega ao átomo foi total ou parcialmente absorvida. O estado estável corresponde ao nível mínimo de energia; e a transferência para o estado excitado se dá pela absorção de energia externa ao sistema atômico. O átomo não pode permanecer em um estado excitado, visto que é bastante instável, e por isso deve retornar ao estado de repouso, liberando espontaneamente a energia. A passagem a um estado de repouso se dá através da

liberação de fótons de luz. Esta liberação fotônica caracteriza a emissão espontânea de radiação <sup>10,11</sup>.

O termo LASER (“light amplification by stimulated emission radiation”) é um acrônimo da versão em inglês de “amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação” <sup>12</sup>. As características que diferem a luz laser e a luz de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência <sup>13</sup>.

A utilização do laser operando em baixa potência é estudada desde os anos sessenta e vários trabalhos vêm sendo realizados para se avaliar os efeitos dessa radiação sobre os tecidos. O alvo da laserterapia é um tecido alterado, onde a radiação restabelece a homeostase energética fazendo com que as células voltem a proliferar, diferenciar e secretar citocinas. Além disso, pode-se observar modulação da inflamação, redução da dor e edema e cicatrização de feridas acelerada nos pacientes irradiados <sup>14, 15, 16, 17</sup>. O efeito fotoquímico ocorre devido à presença de moléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por moléculas intracelulares específicas podem alterar suas atividades e assim, produzir estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Existe no organismo uma fotorregulação, com alterações nos fotorreceptores provocando assim, mudanças na atividade funcional e metabólica da célula. Estas mudanças fotodinâmicas podem alterar processos fisiológicos com conotações terapêuticas. Karu *et al.* <sup>18, 19</sup> demonstraram alguns desses efeitos associados à terapia com laser de baixa intensidade tais como: estimulação de crescimento celular, reparação celular, efeito anti-inflamatório, redução de edema/revascularização, redução da formação de tecido fibroso, maior atividade tissular e estimulação nervosa.

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos do LBP sobre células em diferentes situações metabólicas, é importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do laser de baixa potência sobre tecidos biológicos não são conclusivas, mas sim, inconsistentes e escassas. Por isso, estudos que permitam compreender qual o tipo de sinalização celular desencadeada pelo laser, se fazem pertinentes. A partir da compreensão da sinalização celular do LBP e de sua respectiva dosimetria, será possível estabelecer de fato a eficácia da terapia laser para diferentes doenças.

Outros autores já mostraram o efeito do LBP em doenças que acometem as vias aéreas. Mikhailov *et al.* <sup>20</sup> observaram que a terapia com LBP duas vezes ao dia aumentou a complacência pulmonar e a eficácia de trocas gasosas em pacientes asmáticos. Pidaev <sup>21</sup>

avaliando o efeito do LBP em indivíduos acometidos por inflamação pulmonar crônica observou que o LBP irradiado sobre a pele na região acima do brônquio principal reduz a migração celular para o pulmão. Apesar de a terapia medicamentosa ser mais eficaz, pois possui agentes broncodilatadores, antibióticos e corticóides, esses autores indicam a terapia com LBP nas condições de hipercapnia, hipóxia e disfunção de trocas gasosas. Porém, vale ressaltar que o LBP representa uma “ferramenta” não farmacológica no tratamento de afecções pulmonares. Assim, parece-nos razoável que o sucesso dessa terapia com LBP depende de um maior entendimento de processos biológicos associados a seus efeitos anti-inflamatórios no tratamento de doenças pulmonares <sup>22,23</sup>.

Na literatura, trabalhos apontam para um papel anti-inflamatório da terapia com LBP sobre a inflamação pulmonar desencadeada pela isquemia e reperfusão intestinal. Lima et al. <sup>22</sup> observaram que a fototerapia com LBP reduziu edema, bem como o influxo de neutrófilos, reduzindo a produção de TNF- $\alpha$  e aumentando a de IL-10. Em outro trabalho, a utilização do LBP na inflamação pulmonar induzida por aerossol de LPS em ratos, reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no pulmão e no LBA. A fototerapia também preveniu o aumento da expressão de ICAM-1 no pulmão. O trabalho sugere que esse efeito do laser foi devido à inibição de ICAM-1 via inibição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  <sup>22</sup>. Ainda, Aimbireet al. <sup>23</sup> mostraram que a fototerapia também reduziu a síntese de TNF- $\alpha$  após a indução da inflamação pulmonar por imunocomplexos. Todos esses dados em conjunto, sugerem papel supressor do LBP sobre a inflamação pulmonar tanto desencadeada pelo LPS, isquemia e reperfusão intestinal e por imunocomplexos. Portanto, investigações cujo intuito é melhor compreender os mecanismos moleculares e celulares resultantes da terapia com LBP durante a inflamação pulmonar crônica se revestem de importância adicional.

Alguns trabalhos *in vitro* com células inflamatórias obtidas do pulmão, mostraram que a Terapia com LBP em macrófagos alveolares estimulados com LPS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduz a geração de ROS intracelular bem como a expressão de MIP-2. A redução de NF- $\kappa$ B também foi observada nas mesmas condições. Porém, estudos acerca dos efeitos da fototerapia com LBP em modelos experimentais de doenças pulmonares crônicas ainda são inexistentes.

Nosso grupo de pesquisa, Oliveira et al. <sup>24</sup> investigaram o efeito do LBP em modelo experimental pulmonar de LPS na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), demonstrando que o LBP reduziu a inflamação pulmonar através da redução do número total de células, neutrófilos no lavado broncoalveolar, redução dos níveis das interleucina

IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TNF-  $\alpha$ . Dessa forma, concluíram que a terapia pode ser eficaz no tratamento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).

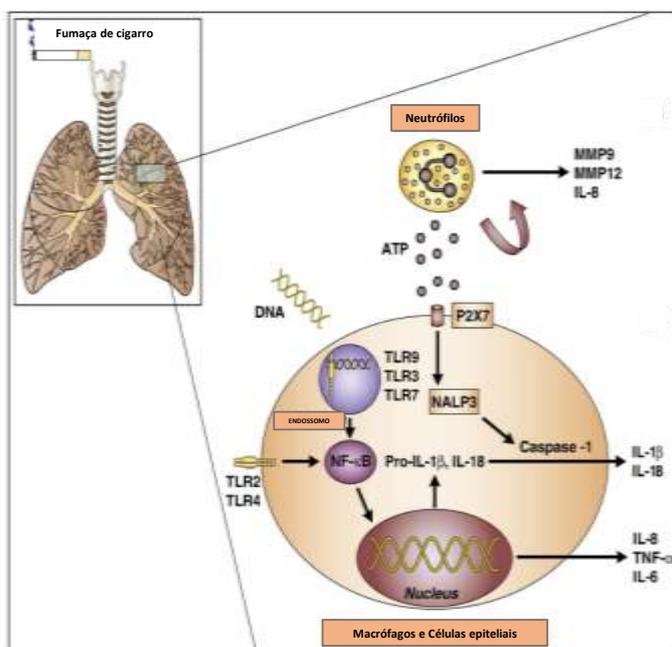
Outro trabalho demonstrou o papel antiinflamatório da terapia com LBP sobre a inflamação pulmonar desencadeada pela OVA (ovalbumina). Silva *et al.*<sup>25</sup> observaram que a hiperresponsividade do músculo liso brônquico, ou seja, o aumento da contração induzida por acetilcolina, analisada nos camundongos desafiados com o antígeno da OVA, foi significativamente inibida pelo LBP. Nesse sentido, demonstraram ação antiinflamatória do laser de baixa potência em modelo experimental de asma alérgica, pela redução do número de eosinófilos, bem como dos níveis de IL- 4, IL- 5 e IL-13 no lavado broncoalveolar, produção de muco e colágeno. Assim, esses resultados em conjunto, mostraram que o LBP é uma terapia não invasiva e capaz de diminuir a reatividade brônquica e a inflamação pulmonar. Peron *et al*<sup>26</sup> em outro estudo, mostraram a eficácia da associação do LBP com células tronco mesenquimais (CTM) de tuba uterina humana, onde camundongos expostos a fumaça de cigarro receberam CTM associada ao LBP, apresentaram redução da inflamação pulmonar. Essa redução se deu pela diminuição do número de células inflamatórias do LBA, bem como os níveis de citocinas pró - inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF-  $\alpha$  e KC), diminuição da produção de muco e do acúmulo de colágeno.

Assim, o presente projeto pretende identificar parte de um mecanismo celular e molecular acerca dos efeitos anti-inflamatórios da terapia com LBP na DPOC. Possibilitando inclusive, a aplicação de uma terapia eficiente ou pelo menos auxiliar do tratamento farmacológico, diminuindo assim os efeitos colaterais medicamentosos nesses pacientes.

### **1.3. Receptores Purinérgicos**

Os receptores purinérgicos (P2R) são receptores transmembranais ionotrópicos P2X (P2X1 – P2X7) ou metabotrópicos P2Y (P2Y1 – P2Y14; receptores acoplados as proteínas G) e são expressos em inúmeros tipos celulares, como leucócitos e também sobre células estruturais, como o epitélio brônquico e o epitélio alveolar<sup>27,28</sup>. Esses receptores (P2R) são

ativados através do acúmulo de purinas/nucleotídeos (ATP, ADP, AMP, UDP, UTP, etc.) no espaço intracelular <sup>27,28</sup>. A molécula de ATP extracelular tem recentemente ganhado muita atenção como um importante sinalizador da via de ativação desses receptores. Durante hipóxia, trauma, infecções e inflamações, os níveis de ATP podem aumentar, assim como as células epiteliais brônquicas e alveolares, atingindo uma concentração capaz de ativar os receptores purinérgicos (P2R). Embora estudos mostrem um papel de proteção do ATP em patologias pulmonares e DPOC, a sinalização dos receptores purinérgicos em inflamação induzida por fumaça de cigarro ainda não é clara.



**Esquema 2. Representação do possível mecanismo de ação do ATP na patogênese do enfisema pulmonar. (Burnstock et al., 2010)**

Assim, a ativação da sinalização purinérgica pela fumaça de cigarro parece estar envolvida na patogênese da DPOC. Como ilustrado no esquema 2, a fumaça de cigarro induz a liberação de ATP dos neutrófilos, o qual tem papel central na liberação de quimiocinas (CXCL12) responsável pelo recrutamento destes no sítio inflamatório e a elastase que leva à destruição do tecido pulmonar. Mortaz et al. <sup>29</sup> sugerem mais tarde, o envolvimento dos receptores P2X7 nesse processo.

Lucattelli et al. <sup>30</sup> descreve a importância da via dos receptores purinérgicos, e que o P2X7R tem grande relevância na fisiopatologia de processos inflamatórios crônicos. Segundo esse autor, o aumento de ATP extracelular contribui para o desenvolvimento da

inflamação e do enfisema via ativação do P2X7R, sendo assim a inibição desse receptor pode ser um novo alvo para o tratamento dessa patologia.

Recentemente, alguns trabalhos mostram a participação dos receptores purinérgicos em doenças pulmonares alérgicas. Vieira *et al*<sup>31</sup> em um estudo com camundongos verificou que o treinamento físico aeróbio diminui a expressão do P2X7R pelas células do epitélio brônquico de camundongos em modelo experimental de asma. Nesse trabalho demonstraram que a inibição dos receptores purinérgicos é capaz de inibir a secreção de IL-1 $\beta$ , além de aumentar a produção de IL-10.

Já Cicko<sup>32</sup> mostraram que o excesso de ATP induz o recrutamento de neutrófilos para os pulmões via P2Y2R. Além disso, camundongos deficientes de P2Y2R tiveram uma inflamação pulmonar reduzida após exposição à fumaça de cigarro. Uma série de experimentos com P2Y2R e com animais quimera revelou que a sua expressão sobre as células hematopoiéticas tem um papel fundamental nessa patologia, demonstrando que o ATP também contribui para a formação e desenvolvimento do enfisema via ativação do P2Y2R.

Outros trabalhos mostram que o P2Y2R, vem sendo estudado devido a sua participação na hipersecreção de muco, incluindo a bronquite crônica e a fibrose cística<sup>33</sup>.

Sendo assim, o nosso trabalho ajudará a esclarecer se os efeitos antiinflamatórios do LBP atuam via sinalização purinérgica, uma vez que a inibição desses receptores reduz a inflamação induzida por fumaça de cigarro e bem como o enfisema em modelo experimental de DPOC.

## 2. Objetivos

- Quantificar as células recuperadas do lavado broncoalveolar (LBA) e analisar morfometricamente a inflamação e o remodelamento, bem como avaliação das

fibras de colágeno e análise do mucos dos grupos experimentais após a terapia com LBI;

- Analisar a produção de citocinas e quimiocinas pelas células do LBA (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e CXCL1/KC);
- Avaliar a expressão dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 no homogenato do tecido pulmonar dos grupos experimentais por meio da técnica de western blotting;
- Avaliar a morte celular (necrose) no pulmão por citometria de fluxo dos grupos estudados;
- Avaliação da mecânica pulmonar dos grupos experimentais após a terapia com LBI;

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais e grupos experimentais**

Previamente ao início dos experimentos, o projeto do estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho, Protocolo AN006/2014.

Os animais foram obtidos no biotério de criação da Universidade Nove de Julho e foram mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho. Foram utilizados sessenta e nove Camundongos (C57Bl/6), fêmeas, pesando aproximadamente 20 gramas, os quais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. Basal (não manipulados), 2. DPOC (inalados por 75 dias com fumaça de cigarro), 3. DPOC+ Laser 660 nm (nebulizados por 75 dias com fumaça de cigarro onde foram tratados nos 15 últimos dias com laserterapia).

### **3.2. Modelo experimental**

A indução da resposta inflamatória pulmonar foi realizada pela inalação de fumaça de cigarro comercial (alcatrão 13,0 mg, nicotina 1,10 mg, monóxido de carbono 10 mg), onde os animais foram fumantes ativos, inalando a fumaça de 14 (quatorze) cigarros por dia, duas sessões diárias de 30 minutos, seis dias por semana, durante 75 dias. Foi utilizada uma caixa de plástico, com tampa acoplada a um ventilador mecânico (Harvard). Cada cigarro queimou em torno de 4 min. Somando o total de aproximadamente 30 min. por sessão e 1 h por dia (Figura 3).



**Esquema 3. Esquema ilustrativo da caixa de exposição à fumaça de cigarro.**

### ***3.3. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar (LBA)***

Após anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) foi feita a traqueotomia, os animais foram canulados e os pulmões lavados com 1,5 ml de PBS. O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para análise das citocinas por meio de ELISA. O botão celular foi ressuscitado em 1 ml de PBS e a determinação do número de células totais no LBA foi realizada por meio de contagem na Câmara de *Neubauer*. Alíquotas do material ressuscitado foram utilizadas para preparação de lâminas de *cytospin* as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa (onde 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial).

### **3.4. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA**

Os níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, e IL-10) e quimiocina (CXCL1/KC) no sobrenadante do LBA foram avaliados através dos kits Duo Set da *R&D Systems* conforme instrução do fabricante.

### **3.5. Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas por histologia**

Amostras de pulmão foram guardadas em formalina 10% por até 7 dias e submetidos ao processamento histológico de rotina. As lâminas foram coradas com o corante Picrosírius para detecção das fibras de colágeno, PAS para avaliação do muco e com Hematoxilina e Eosina para avaliação das células do espaço Peribrônquico e da distensão alveolar. A análise quantitativa foi realizada através da técnica morfométrica descrita por Vieira <sup>29</sup>. Os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software Image Pró Plus (versão 4.5, NIH, Maryland, EUA).

Para a avaliação da Inflamação Peribrônquica (células mononucleares e polimorfonucleares) foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal, cinco campos por via aérea, avaliados num aumento de 1000x. A área utilizada para a avaliação da densidade de células inflamatórias foi calculada a partir do número de pontos que incidiam na parede das vias aéreas (localizados entre o músculo e a adventícia). A densidade de células foi determinada com o número de células positivas em cada campo, dividido pela área de tecido. A densidade de células foi expressa em células/ $\mu\text{m}^2$  e os resultados foram transformados para cells/mm<sup>2</sup>.

### **3.6. Análises da expressão dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 no pulmão por meio da técnica de Western Blotting**

A avaliação da expressão dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 nos pulmões foi realizada através da técnica de Western Blotting. O tecido pulmonar foi homogeneizado em RIPA lysis buffer (Santa Cruz, CA, USA) acrescido de inibidor de protease (Complete TM-Without EDTA, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) e centrifugado a 14.000 rpm a 4° C por 10 min. O sobrenadante foi coletado e as amostras foram quantificadas pelo método

de Bradford. Para todas as amostras 100 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida-SDS com gradiente de concentração (8-14%), que posteriormente foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) em TBST (10 mM tris-HCl pH=7,5, 150 mMNaCl e 0,1 %Tween 20) por 1h em temperatura ambiente sob agitação e incubadas com anticorpo primário anti-P2X7 ou anti-P2Y2. Posteriormente, foram lavadas 3x por 10 min com TBST e incubadas com anticorpo conjugado à peroxidase anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) na diluição 1:5000, durante 1 h sob agitação. As membranas foram lavadas 3x por 10 min com TBST e revelada através do sistema de quimiluminescência com ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA). A análise densitométrica da expressão das bandas foi realizada usando o Image J do NIH.

### **3.7. Avaliação de morte celular por citometria de fluxo.**

As células do pulmão foram incubadas com o anticorpo monoclonal 7AAD para células em necrose (Biolegend®, San Diego, CA, EUA) por 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 0,01% de BSA e azida sódica e ressuspensas em 200 µl do mesmo tampão. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD Accuri C Sampler (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA).

### **3.8. Avaliação da mecânica Pulmonar**

Os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (i.p.) na dose de 0,004 mg/g e colocados sobre a mesa cirúrgica, onde foi realizada uma pequena incisão longitudinal na região anterior do pescoço do animal. Os tecidos adjacentes foram divulsionados até que a traquéia ficasse exposta, quando então se realizou uma incisão transversal entre dois anéis fibrosos para que se pudesse introduzir uma cânula de traqueostomia para pequenos animais. A seguir, o animal foi levado até o sistema de registro, onde a cânula de traqueostomia foi conectada a um pneumotacógrafo para mensurar o fluxo traqueal pela sensibilidade de queda pressórica através do pneumotacógrafo com um transdutor diferencial de pressão (Hans Rudolph Inc., Shawnee,

USA). A pressão traqueal foi verificada através da conexão de um transdutor de pressão na porta lateral localizada entre o pneumotacógrafo e a cânula.

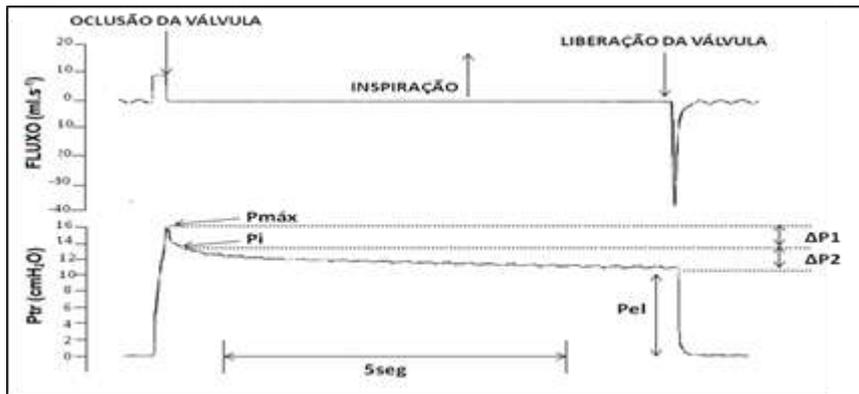
A entrada do pneumotacógrafo foi conectada à uma peça em Y de um ventilador mecânico volumétrico (MV215, Montevideo, UY) projetado para a ventilação artificial de roedores<sup>1</sup>. Os pulmões foram submetidos à ventilação mecânica convencional com um padrão quasi-sinusoidal de fluxo com um volume corrente de 10 ml/kg de peso do camundongo, uma frequência respiratória de 100 ciclos/min e uma pressão expiratória positiva final de 2 cmH<sub>2</sub>O quando o animal teve sua parede torácica anterior removida cirurgicamente (caixa torácica aberta), para contrabalançar a ausência da pressão pleural fisiológica negativa em repouso. Os sinais de fluxo e de pressão dos transdutores foram analogicamente filtrados (Butterworth, 8 pólos, 32Hz), amostrados 100 Hz (PCI-6036, National Instruments) e armazenados para posterior análise (LabView).

### *Avaliação da Elastância pulmonar*

As propriedades mecânicas do pulmão foram analisadas por meio do comportamento da Elastância pulmonar dinâmica (Edyn) e estática (Est) (Ferre et al., 2005).

As Est e Edyn foram verificadas por meio da técnica de oclusão ao final da expiração realizada suprimindo um botão correspondente no ventilador mecânico, como demonstrado na figura 1. Após a oclusão ao final da expiração, observa-se uma queda rápida da pressão traqueal (DP1) até um ponto de inflexão (com pressão  $P_i$ ), a partir daí ocorre uma queda lenta (DP2) lenta que decorre até um platô (PEL) o qual equivale à pressão de retração elástica do pulmão. Considerando que DP1 está associada com a pressão dissipada contra a resistência pulmonar, DP2 reflete propriedades visco elásticas do tecido ou o fenômeno de pendelluft. Levando-se em conta o valor de pressão pré-inspiratória ( $P_o$ ), a Elastância estática pulmonar (Est) é calculada como o ajuste da pressão de platô ( $P_{el}-P_o$ ) gravada após 5s de oclusão dividida pelo volume corrente.

A Edyn é mensurada dividindo-se a pressão do ponto de inflexão ajustada ( $P_i-P_o$ ) pelo volume corrente. As Est e Edyn foram obtidas a partir de cinco oclusões ao final da inspiração, cada uma realizada depois de 1 min de ventilação mecânica normal. Podemos observar as curvas de fluxo e pressão traqueal em relação ao tempo de acordo com o protocolo de cálculo através do método da pausa inspiratória na figura 1.



Esquema 4. Curvas fluxo e pressão traqueal em relação ao tempo.

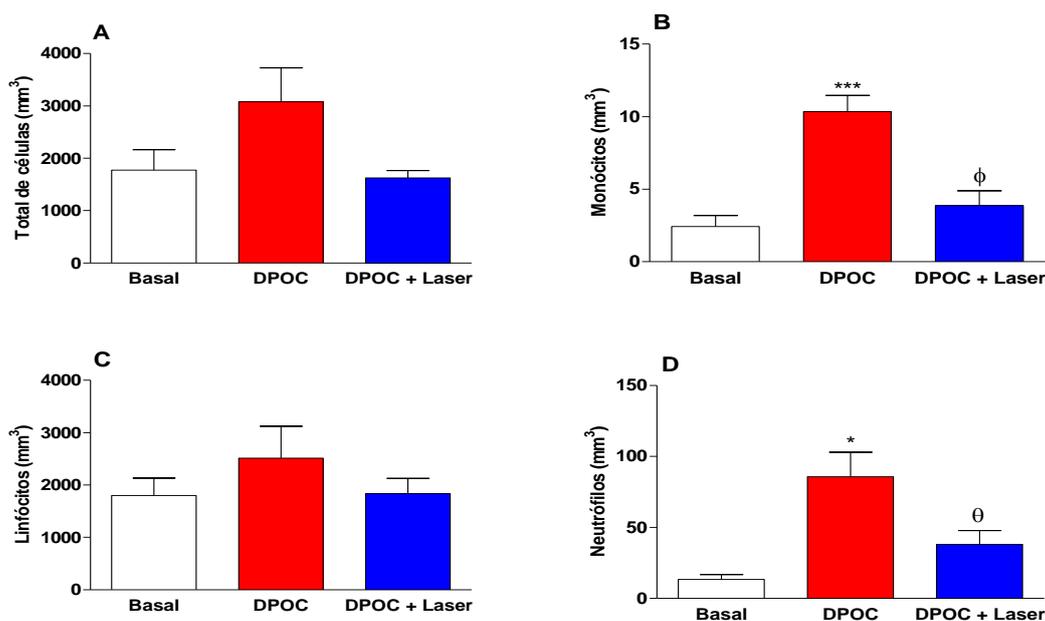
### 3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 3.1 (EUA). Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ( $p < 0.05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando-se também o software GraphPad Prism 3.1 (EUA).

## 4. Resultados

### 4.1. Quantificação das células presentes no sangue.

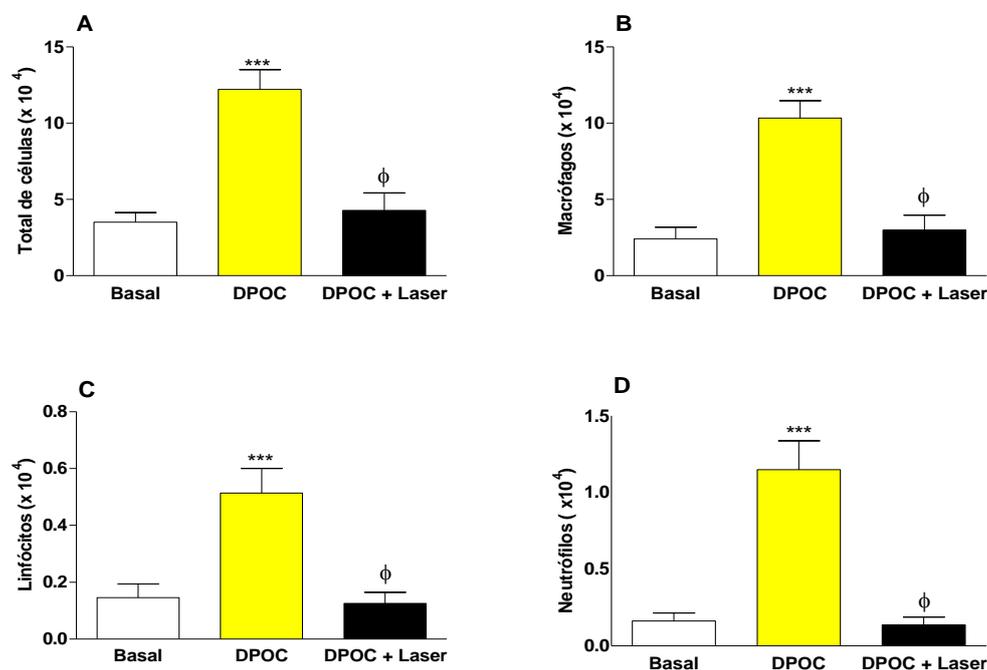
Os resultados relacionados á contagem total das células (A), bem como de monócitos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) presentes no sangue estão apresentados na figura 1. Verificamos aumento significativo ( $p < 0,001$ ) no número total de células, monócitos, neurófilos e linfócitos no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. Porém, quando comparamos o grupo DPOC com todos os outros grupos tratados com o laser de baixa potencia (LBP), observamos diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do número de todas as células avaliadas em relação ao grupo sem tratamento (DPOC).



**Figura 1. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de células (A), monócitos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) circulantes.** Os grupos usados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), DPOC (animais nebulizados com fumaça de cigarro) e DPOC+Laser (animais nebulizados com fumaça de cigarro e tratados com laser). Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

## 4.2. Quantificação das células presentes no lavado broncoalveolar (LBA).

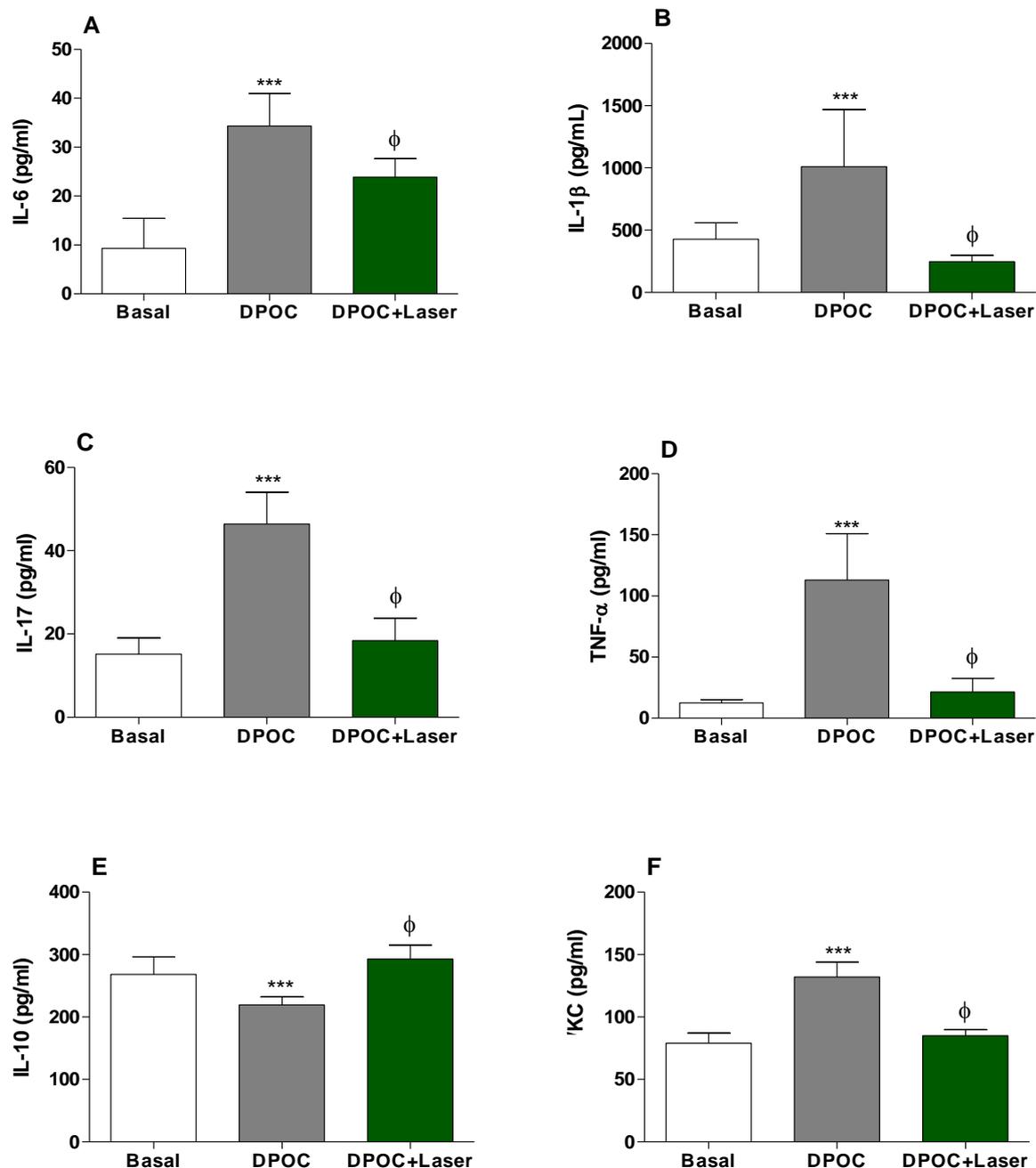
Os resultados da quantificação do número total de células (A), bem como macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) presentes no lavado broncoalveolar no pulmão (LBA) demonstraram um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de células no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. Por outro lado, observamos diminuição ( $p < 0,001$ ) dessas populações celulares em todos os grupos tratados com laser (LBP).



**Figura 2. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de células (A), macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) recuperadas do lavado broncoalveolar (LBA).** Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 1. Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo basal; phi  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### **4.3. Quantificação das citocinas/quimiocinas no sobrenadante do lavado broncoalveolar (LBA).**

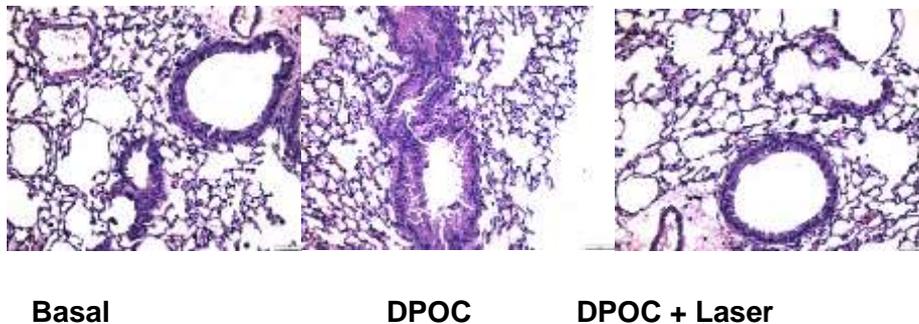
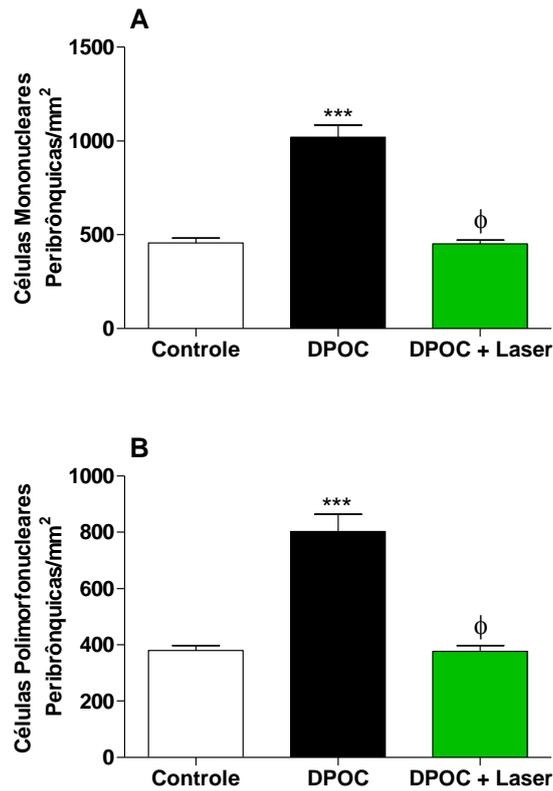
Os resultados referentes à quantificação dos níveis das citocinas: IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-17 (C) e TNF- $\alpha$  (D), IL-10 (E) e CXCL1/KC(F), estão apresentados na Figura 3. Observamos aumento significativo ( $p < 0,001$ ) dos níveis de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  e CXCL1/KC no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. Por outro lado, quando comparamos todos os grupos tratados com laser (LBP), observamos a diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo DPOC. Com relação à dosagem de IL-10, verificamos aumento no grupo DPOC+LASER em relação ao grupo DPOC.



**Figura 3. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre os níveis de IL-6 (A), IL-1β (B), IL-17 (C) e TNF-α (D), IL-10 (E) e CXCL-1/KC (F) no sobrenadante do lavado broncoalveolar. Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 3. Valores expressos como média ± SEM. \*\*\* p<0,001 quando comparado ao grupo Basal; φp<0,001 quando comparado ao grupo DPOC.**

#### **4.4. Quantificação das células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) no parênquima pulmonar.**

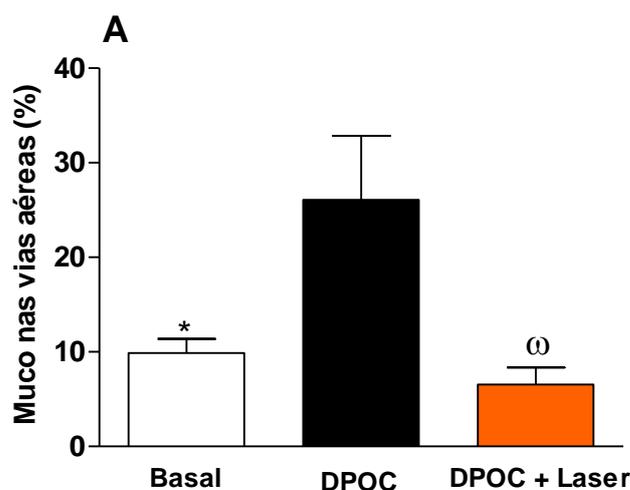
Os resultados da contagem das células MN (A) e PMN (B) no parênquima pulmonar estão apresentados na Figura 4. Observamos aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. Por outro lado, quando comparamos todos os grupos tratados com laser (LBP), observamos a diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) do número de células mononucleares (MN) bem como polimorfonucleares (PMN) no pulmão do grupo DPOC+LASER quando comparados ao grupo DPOC (figura 4).



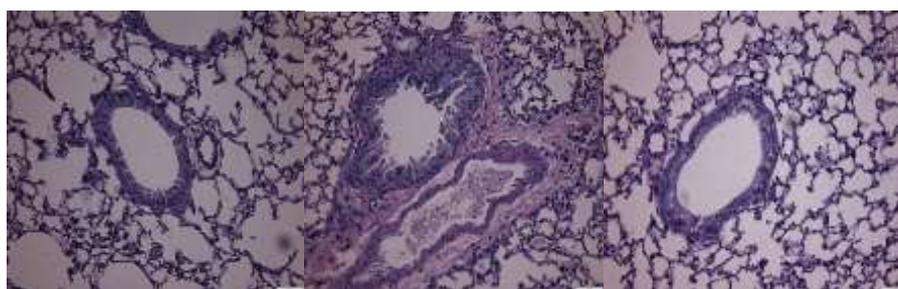
**Figura 4. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a densidade Peribrônquica de células mononucleares (A) e polimorfonucleares (B).** Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 4. As fotomicrografias representativas dos grupos experimentais (C). Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.5. Quantificação da produção de muco nas vias aéreas

O resultado da quantificação de muco nas vias aéreas está representado em porcentagem (Figura 5). Observamos aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) da quantidade de muco no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. Os tratamentos com o laser de baixa intensidade (LBP) apresentaram diminuição ( $p < 0,001$ ) da produção de muco em relação ao grupo DPOC.



**B**



Basal

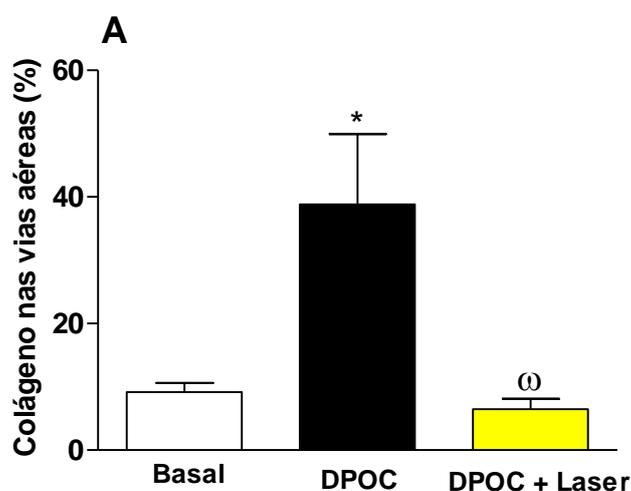
DPOC

DPOC+Laser

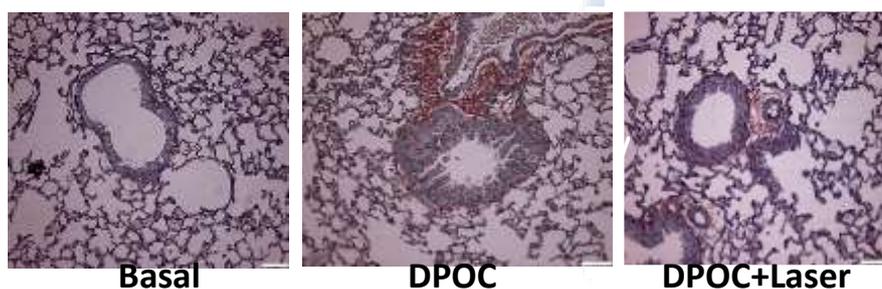
**Figura 5. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a produção de muco nas vias aéreas.** Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 5. As fotomicrografias representativas dos grupos experimentais (B). Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Basal; <sup>ω</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.6. Quantificação de colágeno nas vias aéreas

Os resultados da quantificação de colágeno nas vias aéreas estão apresentados na figura 6. Verificamos aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) da deposição de fibras colágenas no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. No entanto, o grupo tratado com laser de baixa intensidade (LBP) apresentou redução de colágeno nas vias aéreas quando comparado ao grupo DPOC.



**B**

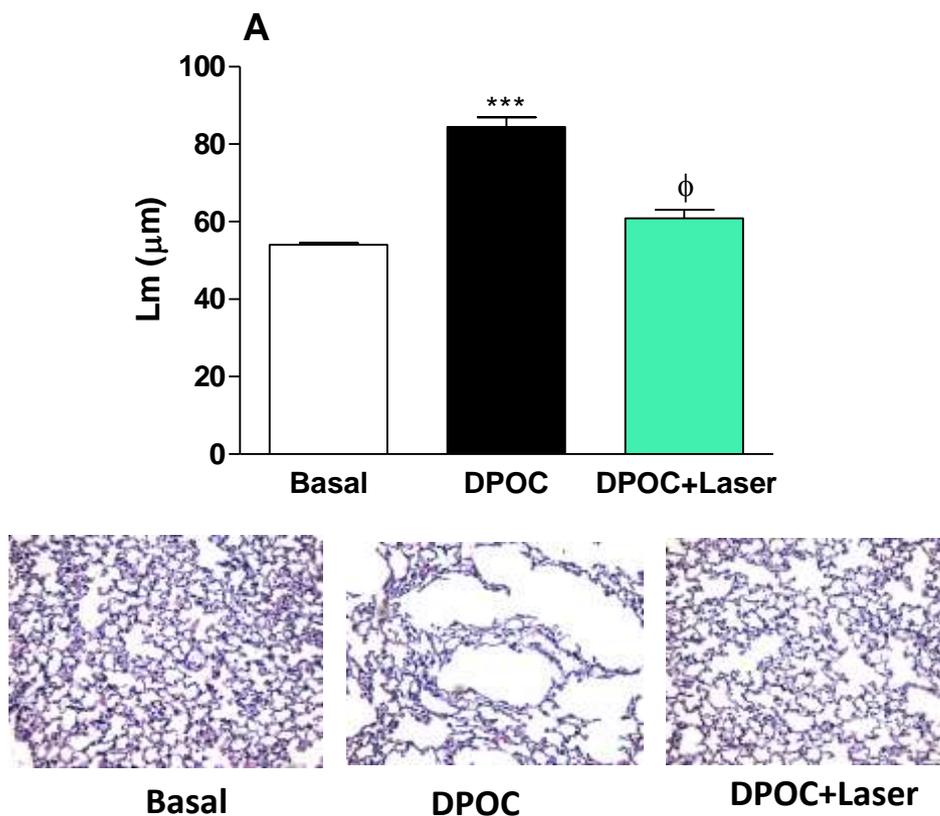


**Figura 6. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre as fibras colágenas nas vias aéreas.** Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 6. As fotomicrografias representativas dos grupos experimentais (B). Valores expressos

como média  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,005$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi p < 0,05$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.7. Quantificação do diâmetro alveolar médio (Lm)

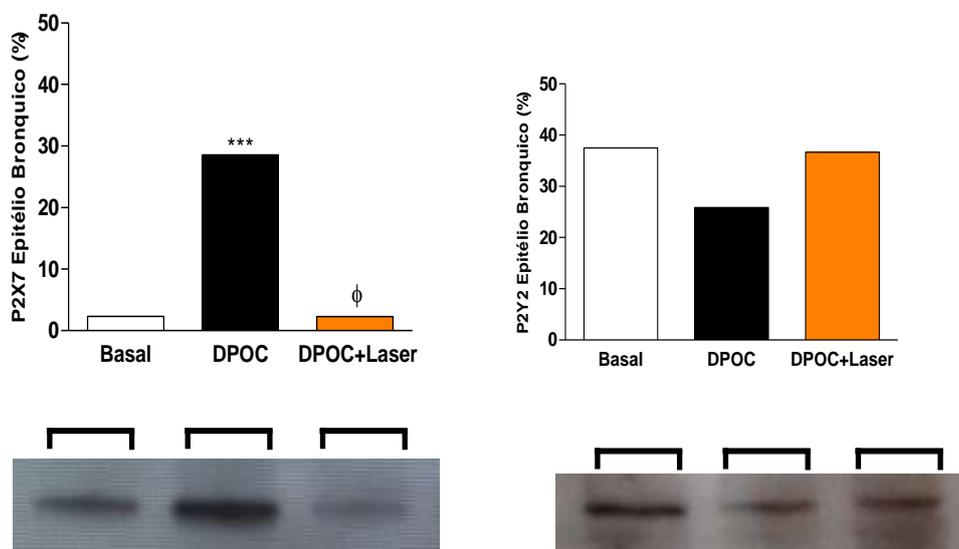
Os resultados da quantificação do intercepto linear médio estão representados na Figura 7. Podemos observar aumento significativo ( $p < 0,001$ ) do Lm no grupo DPOC em relação ao grupo Basal. Verificamos que o grupo tratado com laser de baixa intensidade (LBP) apresentou redução significativa ( $p < 0,001$ ) do Lm em relação ao grupo não tratado (DPOC).



**Figura 7. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o alargamento alveolar.** Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 7. As fotomicrografias representativas dos grupos experimentais (B). Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.8. Avaliação da expressão do receptor purinérgico P2X7 e P2Y2 no pulmão por meio da técnica de Western Blotting.

Os resultados da determinação da expressão do receptor purinérgico P2X7 no pulmão demonstraram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. No entanto, o grupo tratado com laser (DPOC+LASER) apresentou diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo DPOC (figura 8). Já o receptor purinérgico P2Y2, não foi possível verificar o efeito positivo, o qual foi inibido no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal.

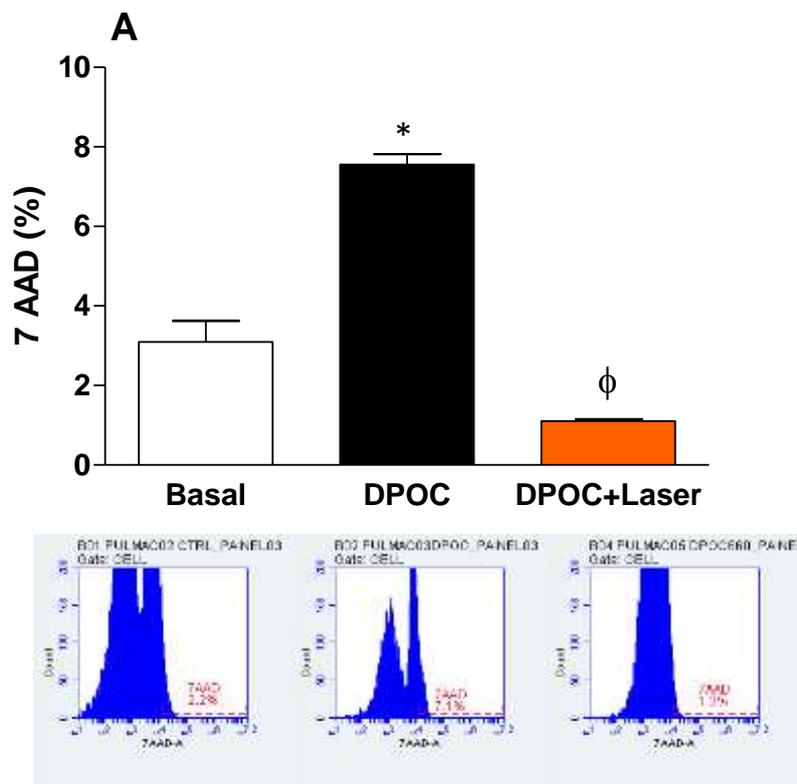


**Figura 8. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a expressão de P2X7 e P2Y2 no epitélio brônquico.** Os grupos usados no experimento estão descritos na

figura 12. Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.9. Avaliação de morte celular por necrose nas células do tecido pulmonar

Os resultados da avaliação de morte celular por citometria de fluxo nas células do tecido pulmonar estão apresentados em forma de porcentagem na figura 9. Verificamos aumento estatisticamente significativo da morte celular no grupo DPOC quando comparado ao grupo basal. No entanto, o laser foi capaz de diminuir o dano tecidual no grupo DPOC+LASER quando comparado ao grupo DPOC.



**Figura 9. Efeito do LBI sobre a morte celular por necrose no pulmão.** Os grupos usados no experimento estão descritos na figura 9. Valores expressos como média  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.10. Avaliação da mecânica pulmonar em modelo experimental de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).

A figura 10 representa a avaliação da Elastância dinâmica (A) e Elastância estática (B). Observamos uma redução tanto da Elastância dinâmica quanto da estática no grupo DPOC em relação ao controle. Por outro lado, verificamos aumento significativo da Elastância dinâmica quanto da estática com o tórax fechado no grupo DPOC+Laser quando comparado ao grupo DPOC.

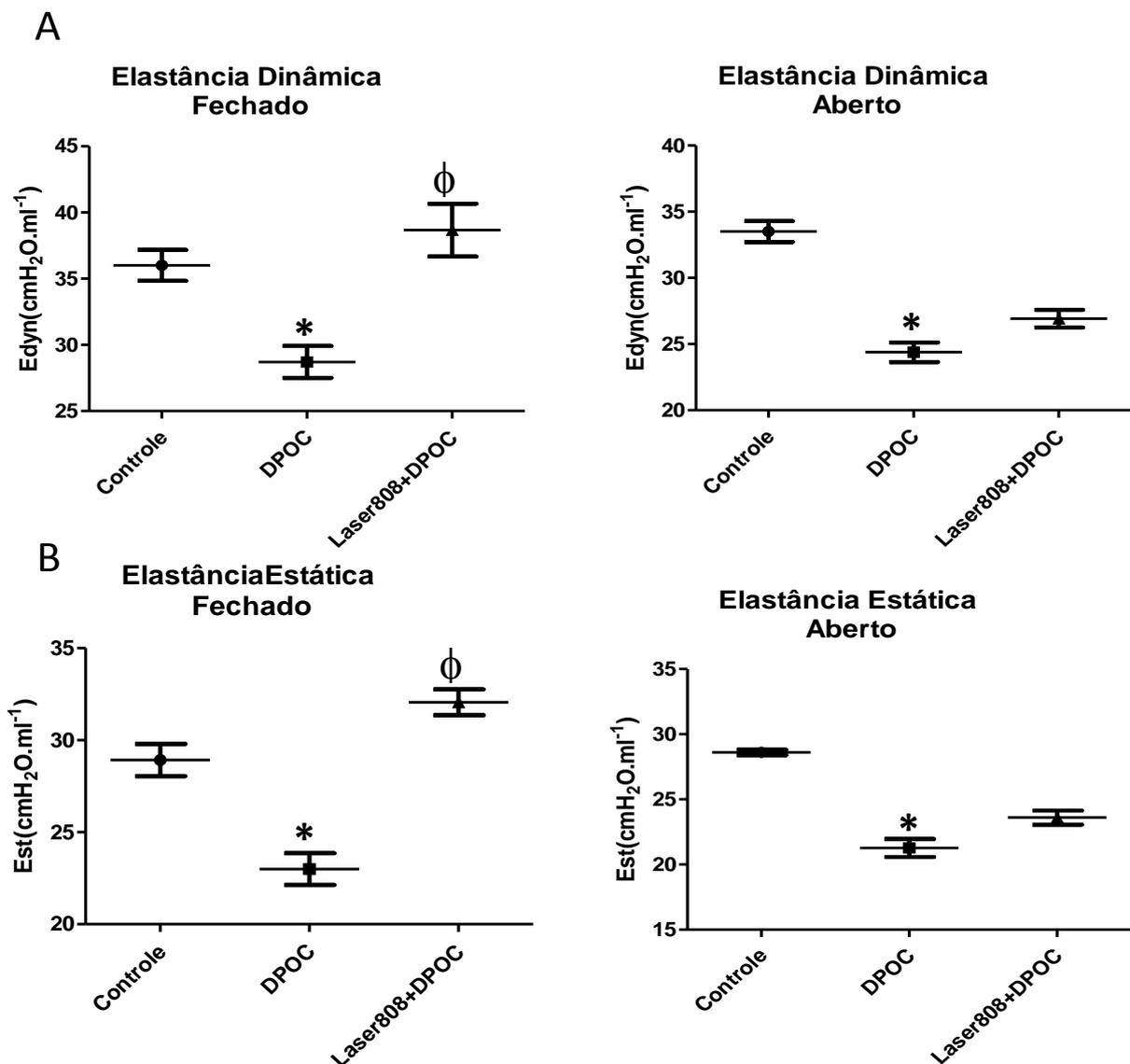


Figura 9. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a Elastância Dinâmica (A) ou Elastância Estática (B) em modelo experimental de DPOC. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos estão descritos na Figura 12. \* p<0,05 quando

## **5. Conclusão**

Os nossos resultados mostram que a terapia com laser de baixa potência em um modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), diminuiu o número de células no LBA, a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17) e quimiocina (CXCL1/KC), produção de muco e colágeno, morte celular, alargamento alveolar, bem como adiminuição da expressão do receptor purinérgico P2X7 e aumento da citocina anti-inflamatória (IL-10), após uso da terapia com LBI. Sendo assim, a utilização do laser de baixa intensidade pode ser considerada uma possível ferramenta para tratamento de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.

## 6. Referências Bibliográficas

1. World Health Report. Geneva: World Health Organization. Available from URL: <http://www.who.int/who/2000/en/statistics.htm>(2000).
2. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *European Respiratory Journal* 27:397-412 (2006).
3. MenezesAM,Perez-Padilla R, Jardim JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 366(9500): 1875 – 1881 (2005).
4. Moreira GL, Manzano BM, Gazzotti MR, et al. PLATINO, a nine –year follow up study of COPD in the city of São Paulo, Brazil: the problem of underdiagnosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia: Publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 40(1):30-37 (2014).
5. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2014. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.2014. Accessed 15/11, 2014
6. Retamales, I., Elliott, W. M., Meshi, B., Coxson, H. O., Pare, P.D., Sciruba, F. C., Rogers, R. M., Hayashi, S. and Hogg, J. C. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 164, 469–473 (2001).
7. Shapiro, S. D. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease.*Am J Respir Crit Care Med* 150, S160-164(1994).
8. Wright, J. L., and Churg, A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 142, 1422-8, (1990).

9. Miserendino, L.J.; Pick, R.M. Lasers in Dentistry, Quintessence Publishing Co. Inc.,(1995).
10. Pinheiro, A.L.B.; JR, A.B. Lasers na odontologia moderna. Ed. Pancast. São Paulo(1998).
11. Pontinen P.J. Guidelines for LLLT. Low Level Laser Therapy as a medical treatment modality: A manual for Physicians, Dentists, Physiotherapists and Veterinary surgeons. Pontinen P.J., Eds. 148. Art Urpo Ltd. Tampere, Finland (1992).
12. Basford, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. Lasers Surg Med. v.16, n.4, p.331-342, (1995).
13. Karu, T.I.; Piatibrat, L.V.; Kalendo, G.S. Radiation-modifying effect of UV and visible laser light. Radiobiologia. v.27, n.6, p.804-809 (1987).
14. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tunè J, Frigo L, Gjerde K, Martins RA.L . A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. Supportive Care in Cancer. 19: 1069-77 (2011).
15. Aimbire F, Bjordal JM, Iversen VV, Albertini R, Frigo L et al. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. Lasers Surgery Medicine. 38(8): 773-8 (2006).
16. Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. J PhotochemPhotobiol B. 27;74(2-3):101-7 (2014).
17. Lima, F.M.; Bjordal, J.M.; Albertini, R.; Santos, F.V.; Aimbire, F. Low-level laser therapy (LLLT) attenuates RhoA mRNA expression in the rat bronchi smooth muscle exposed to tumor necrosis factor- $\alpha$ . Lasers Med Sci. 25: 661–8. (2010).
18. Karu T, Pyatibrat LV, Kalendo G. Thiol reactive agents eliminate stimulation of possible involvement of cellular redox status into low power laser effects. Laser Ther. 11:177–187 (1999)
19. Karu T, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. PhotochemPhotobiol. 80:366–72 (2014).

20. Mikhaïlov VA, Aleksandrova Olu, Gol'dina EM. The immunomodulating action of low-energy laser radiation in the treatment of bronchial asthma. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 4:23-5 (1998).

21. Pidaev AV. A mathematical assessment of the efficacy of the methods for treating patients with chronic nonspecific lung diseases at a health resort. *LikSprava.* 6:168-72 (1997).

22. Mafra De Lima, F.; Costa, M.S.; Albertini, R.; Silva, J.A.Jr., Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg Med.* 41: 68-74 (2009).

23. Aimbire F, Oliveira APL, Albertini R, Corrêa JC, Campos CBL et al. Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 $\beta$  Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. *Inflammation.* 31(3):189-97 (2008).

24. Oliveira MC Jr, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Custódio RW, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR, Almeida FM, Albertini R, Lopes-Martins RA, de Oliveira LV, de Carvalho Pde T, Ligeiro de Oliveira AP, Leal Jr EC, Viera RP. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 134:57-63(2014).

25. Silva VR, Marcondes P, Silva M, Villaverde AB, Neto HCCF, Vieira RP, Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 194: 37-48 (2014)

26. Peron JP, de Brito AA, Pelatti M, Brandão WN, Vitoretto LB, Greiffo FR, da Silveira EC, Oliveira-Junior MC, Maluf M, Evangelista L, Halpern S, Nisenbaum MG, Perin P, Czeresnia CE, Câmara NO, Aimbire F, de Paula Vieira R, Zatz M, de Oliveira AP. Correction: Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice. *PLoS One.* 25;10(9) (2015).

27. Muller T, Vieira RP, Grimm M, Durk T, Cicko S, Zeiser R, Jakob T, Martin SF, Blumenthal B, Sorichter S, Ferrari D, Di Virgillio F, Idzko M. A potential role for P2x7R

in allergic airways inflammation in mice and humans. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 44(4):456-64 (2011).

28. Vieira RP, Muller T, Grimm M, Von Gernler V, Vetter B, Durk T, Cicko S, Ayata CK, Sorichter S, Robaye B, Zeiser R, Ferrari D, Kirschbaum A, Zissel G, Virchow JC, Boeynaems JM, Idzko M. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184(2):215-23 (2011).

29. Mortaz E, Braber S, Nazary M, Givi ME, Nijkamp FP, Folkerts G. ATP in the pathogenesis of lung emphysema. *Eur J Pharmacol.* 619: 92–96. (2009)

30. Lucattelli M, Cicko S, Muller T, Lommatzsch M, Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Durk T, Zissel G, Sorichter S, Ferrari D, Virgilio F, Virchow C, Lungarella G, Idzko M. P2X7 Receptor Signaling in the Pathogenesis of Smoke-Induced Lung Inflammation and Emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* Vol 44, (2011).

31. Vieira, R.P. et al. Purinergic Receptor Type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, (2011).

32. Cicko S<sup>1</sup>, Lucattelli M, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Dürk T, Zissel G, Boeynaems JM, Sorichter S, Ferrari D, DiVirgilio F, Virchow JC, Lungarella G, Idzko M. Purinergic receptor inhibition prevents the development of smoke induced lung injury and emphysema. *J Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):688-97.

33. Kellerman DJ. P2Y(2) receptor agonists: a new class of medication targeted at improved mucociliary clearance. *Chest.* 2002 May;121(5 Suppl):201S-205S.