

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
DEPARTAMENTO DE BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NO
DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE PULMONAR: EFEITOS
DO TRATAMENTO COM VITAMINA C E/OU
FOTOBIMODULAÇÃO

MÁRCIA RODRIGUES SILVA

São Paulo, 2018

MÁRCIA RODRIGUES SILVA

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NO
DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE PULMONAR: EFEITOS
DO TRATAMENTO COM VITAMINA C E/OU
FOTOBIMODULAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada as Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA: Dra ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO

São Paulo, 2018

Silva, Márcia Rodrigues.

Papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da fibrose pulmonar: efeitos do tratamento com vitamina C e/ou fotobiomodulação. / Márcia Rodrigues Silva.2018.

82 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Adriana Lino Dos Santos Franco.
Fibrose Pulmonar. 2. Paraquat. 3. Vitamina C. 4. Fotobiomodulação.
5. Inflamação Pulmonar. 6. Remodelamento das Vias Áreas.
Franco, Adriana Lino Dos Santos. II. Título

CDU 615.831

São Paulo, 11 de dezembro de 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: Márcia Rodrigues da Silva

Título da Dissertação: "Papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da fibrose pulmonar: Efeitos do tratamento com vitamina C e/ou fotobiomodulação".

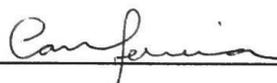
Presidente: PROF^a. DR.^a ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



Membro: PROF^a. DR.^a CHISTIANE PAVANI



Membro: PROF^a. DR.^a CAROLINE MERCANTONIO FERREIRA



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por ter me dado saúde e a oportunidade de poder desenvolver este trabalho de Mestrado e a muitas pessoas queridas e amadas que fazem parte da minha vida, que torceram por mim: meu querido esposo Marin e minhas filhas Stephanie e Bruna; Sou grata também as minhas irmãs Viviane e Valéria e principalmente aos meus pais Marcílio e Vanda que nos ensinaram com tanto amor a sempre lutar pelos nossos ideais, a olhar para a frente independente das dificuldades percorridas ao longo desta trajetória.

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora e mestre Adriana Lino que foi uma pessoa maravilhosa e que sempre com muito amor, paciência e dedicação, compartilhou seus conhecimentos e sempre nos fez acreditar em nosso potencial.

Dedico este trabalho a todos vocês!

RESUMO

A fibrose pulmonar (FP) é uma doença pulmonar crônica e progressiva caracterizada por lesão progressiva do parênquima pulmonar, infiltrado inflamatório e fibrose no interstício. É desencadeada pela excessiva e desordenada deposição de colágeno e outros componentes de matriz extracelular, resultando em severas mudanças na arquitetura da parede do alvéolo. Diversos fatores podem desencadear FP dentre eles a exposição a agentes químicos como o Paraquat. Em função da ausência de um tratamento eficaz, o objetivo do estudo foi investigar o efeito do tratamento com vitamina C e/ou Fotobiomodulação sobre o curso da FP. Para tanto, foram utilizados camundongos C57BL6 submetidos à indução de FP pela administração de Paraquat (10mg/Kg, ip) e após 7 dias da indução, os camundongos foram tratados com Vitamina C (150mg/kg, ip) e/ou Fotobiomodulação com LED (660 nm, 1x/dia, 5 dias consecutivos, 150s). Nossos dados mostraram que tanto o LED quanto a Vit C isoladamente reduziram o número de células recrutadas no pulmão e que a associação da VitC+LED não produziu efeito adicional. Em relação aos mediadores inflamatórios avaliados, nossos dados mostraram que o tratamento com Vit C foi mais eficiente que o LED. Nossos dados mostraram níveis elevados de SOD e catalase após o tratamento com vitamina C, enquanto a mesma não foi capaz de reverter a elevada resposta contrátil traqueal. Em conclusão, nossos resultados mostraram que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo de inflamação e deposição de colágeno nos pulmões após a fibrose pulmonar induzida por PQ; e a vitamina C parece ser uma ferramenta importante para o tratamento dessa intoxicação. Vale ressaltar que a vitamina C é barata e pode ser um agente viável a ser empregado como terapia. Ainda, a associação da Vit C com o LED não está mostrando efeitos adicionais que justificariam seu uso.

Palavras-chave: Fibrose pulmonar; Paraquat; Vitamina C; Fotobiomodulação; Inflamação pulmonar; Remodelamento das vias aéreas.

ABSTRACT

Pulmonary fibrosis (PF) is a chronic and progressive lung disease characterized by progressive lesion of the lung parenchyma, inflammatory infiltrate and interstitial fibrosis. It is triggered by excessive and disordered deposition of collagen and other extracellular matrix components, resulting in severe changes in the architecture of the alveolus wall. Several factors can trigger PF including the exposure to chemical agents such as paraquat (PQ). Considering the absence of an effective treatment for FP, the objective of the present study was to investigate the effect of treatment with vitamin C and/or photobiomodulation (LED) on the course of PF. For this, C57BL6 mice were submitted to the induction of PF by the administration of PQ (10mg/kg, ip) and after 7 days of the induction, the mice were treated with Vitamin C (150mg/kg, ip) and/or irradiated with with LED (660 nm, 1x/day, for 5 consecutive days, 150s). Our data showed that both, LED and Vit C treatments isolated reduced the number of cells recruited into the lungs, and VitC+LED association did not produce any additional effect. Regarding the inflammatory mediators, our data showed that VitC treatment was more efficient than LED treatment. Our data showed elevated levels of SOD and catalase after treatment with vitamin C, while it was not able to revert the high tracheal contractile response. In conclusion, our results showed that oxidative stress can be a mechanism of inflammation and deposition of collagen in the lungs after the pulmonary fibrosis induced by PQ; and vitamin C appears to be an important tool for the treatment of this intoxication. It is noteworthy that vitamin C is inexpensive and may be a viable agent to be employed as therapy. Still, the association of Vit C with the LED is not showing additional effects that would justify its use.

Keywords: Pulmonary fibrosis; Paraquat; Vitamin C; Photobiomodulation; Pulmonary inflammation; Airways remodeling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fisiopatologia da Fibrose Pulmonar	1
1.2 Estresse Oxidativo e Fibrose Pulmonar	3
1.3 Vitamina C e a Fibrose Pulmonar.....	5
1.4 Fibrose Pulmonar e Fotobiomodulação	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Animais.....	9
3.2 Modelo Experimental de Fibrose Induzida por Paraquat.....	9
3.3 Tratamento com Fotobiomodulação	9
3.4 Tratamento com Vitamina C.....	10
3.5 Delineamento experimental	10
3.6 Contagem de células totais e diferenciais presentes no lavado broncoalveolar (LBA)	11
3.7 Análise de edema pulmonar	11
3.8 Quantificação de mediadores no homogenato de tecido pulmonar	11
3.9 Avaliação da reatividade traqueal in vitro	12
3.10 Determinação da produção de colágeno no tecido pulmonar	12
3.11 Avaliação da atividade da catalase e superóxido dismutase em tecido pulmonar	12
3.12 Análise Estatística	13
4. RESULTADOS	14
4.1 Tratamento com Vit C e/ou LED reduz recrutamento celular pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat.....	14

4.2 Tratamento com Vit C isolado ou em associação com o LED aumenta edema pulmonar, porém reduz reatividade traqueal em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	16
4.3 Tratamento com vit. C e/ou LED não altera o elevado nível de MMP-9 em homogenato pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	18
4.4 Tratamento com Vit C isolada ou associada ao LED reduz a liberação de IL-6, IL-17, TNF- α e IL-10 em homogenato pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	20
4.5 Tratamento com Vit C isolado ou associado ao LED reduz a produção de colágeno em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	22
4.6 Tratamento com Vit C isolada ou associada ao LED aumenta a atividade da catalase sem alterar a SOD em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat.	24
5. DISCUSSÃO	26
6. BIBLIOGRAFIA	31
Anexo 1 - Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal Nº AN0017.2016	
Anexo 2 - Artigos publicados	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre o número de células totais e sobre a porcentagem diferencial de células presentes no LBA em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat.....	15
---	----

Figura 2. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre o edema pulmonar e sobre a reatividade traqueal in vitro em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	17
Figura 3. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre a produção de MMP-9 e TGF- β em homogenato pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	19
Figura 4. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre a liberação de IL-6, IL-17, TNF- α e IL-10 em homogenato pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	21
Figura 5. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre a quantidade de colágeno em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	23
Figura 6. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre a atividade de Catalase e SOD em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat	25

LISTA DE ABREVIATURAS

LBP - Laser de Baixa Potência

LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission Radiation*

FP - Fibrose Pulmonar

FPI - Fibrose Pulmonar Idiopática

PQ - *Paraquat*

LED - *Light Emitting Diode*

Vit C - Vitamina C

C57B6 - Camundongos 57 Black 6

LBA - Lavado Bronco alveolar

IFN- γ - Interferon Gama

IL1- β - Interleucina 1 Beta

IL - Interleucina

TNF - α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TGF - β - Fator de Crescimento Tumoral Beta

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

TIMP - *Metalloproteinase inhibitor 1*,

LPS - Lipopolissacarídeo

MMP9 - Metaloproteinase 9

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

SOD – *Superoxide Dismutase*

ERO - Espécies Reativas do Oxigênio

RNS - Espécies Reativas do Nitrogênio

MEC – Matriz Extra Celular

VCAM - 1- Molécula de adesão celular vascular 1

ICAM-1- Molécula de Adesão Intercelular 1

P-Selectin - Plaqueta Selectina

E-Selectin - Endotélio Selectina

AA- Ácido Ascórbico

NADH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NAC- N-acetilcisteína

SOD - Superóxido Dismutase

PBS - Tampão Salina Sulfato

1. INTRODUÇÃO

1.1 FISIOPATOLOGIA DA FIBROSE PULMONAR

Dentre as doenças pulmonares, a fibrose pulmonar (FP) é uma importante doença com caráter progressivo e crônico cuja etiologia pode estar relacionada a exposição a xenobióticos como paraquat, bleomicina, sílica entre outros. No entanto sua maior causa na maioria das vezes é desconhecida. A FP tem alta incidência apresentando considerável morbidade e mortalidade¹. É uma doença com pobre prognóstico, com tempo de sobrevida médio de 2.5 a 3.5 anos após o diagnóstico. E o curso clínico da evolução da doença varia de paciente para paciente, podendo ser de lenta a rápida sua progressão². Os sintomas são geralmente inespecíficos como tosse seca e dispnéia progressiva. No exame físico notam-se estertores do tipo velcro nas bases pulmonares e o baqueteamento digital. Sua predominância é no sexo masculino (1,7:10) e sua frequência aumenta com a idade (acima de 70 anos)³.

Os mecanismos operantes na FP ainda não estão totalmente estabelecidos. Sabe-se que existem três principais mecanismos: inflamação e sistema imune, estresse oxidativo e fatores pro - coagulantes⁴. A FP é caracterizada por lesão progressiva do parênquima pulmonar, infiltrado inflamatório e fibrose no interstício. É desencadeada pela excessiva e desordenada deposição de colágeno e outros componentes de matriz extracelular, resultando em severas mudanças na arquitetura da parede do alvéolo. Consequentemente, esta deposição acarreta no remodelamento pulmonar, perda da função da unidade capilar alveolar e falência respiratória⁵. Ainda, o acúmulo de exsudato vascular e células inflamatórias dentro do espaço alveolar causa injúria epitelial. Esses exsudatos aumentam a proliferação de fibroblastos residentes e sua diferenciação em miofibroblastos (fibroblastos ativados que secretam grandes quantidades de colágeno)⁶. As células epiteliais também adquirem relevância nesta patologia, uma vez que também podem se transformar em fibroblastos/miofibroblastos, fenômeno denominado de transformação epitelial-mesenquimal⁷.

Apesar de controvérsias, evidências sugerem importante papel das células inflamatórias no desencadeamento de fibrose. Nesse sentido pesquisadores mostraram que pacientes com FP experimentam episódios inflamatórios os quais se relacionam com a progressão da doença⁸. Ainda, a apoptose representa importante papel na regulação da magnitude da resposta inflamatória bem como no processo de resolução.

Deste modo, mediadores inflamatórios como IFN- γ , IL-2, IL-6, leucotrienos entre outros podem inibir apoptose de neutrófilos prolongando assim sua sobrevivência e amplificando a inflamação⁹. Macrófagos são também células críticas para o desenvolvimento da fibrose pulmonar através da produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, TGF- β , metaloproteinases entre outras.

A resposta fibrótica tem seu início imediatamente após a lesão, visando à reparação do tecido. O acúmulo de células inflamatórias e a entrada de plasma nos espaços alveolares alteram o microambiente alveolar, conduzindo a evolução do remodelamento tecidual para a fibrose progressiva. Durante o processo de reparo no tecido pulmonar, há acúmulo de TGF- β produzido pelas células inflamatórias. O TGF- β é importante para a diferenciação do fibroblasto em miofibroblasto. Após diferenciação do miofibroblasto induzido por TGF- β , a síntese e secreção de fibras colágenas são substancialmente aumentadas e a deposição de colágeno desordenada pode causar o remodelamento pulmonar¹⁰. Além disso, o TGF- β é um importante sinalizador para indução de IL-17 sendo esta citocina também responsável pelo desenvolvimento de fibrose pulmonar¹¹. A IL-17 é uma citocina importante para promover o recrutamento de neutrófilos e parece se relacionar com a mortalidade precoce em pacientes com FP¹². O TNF alfa é uma citocina que estimula a proliferação de fibroblastos e regula deposição de colágeno. A IL-6 é uma citocina inflamatória produzida por vários tipos de células e estudos mostram que sua inibição diminui a fibrose pulmonar em modelo murino, também os níveis de IL-6 são considerados importantes para avaliar a progressão da FP¹³⁻¹⁴.

A FP pode ser induzida experimentalmente. Nesse sentido, no presente projeto a FP foi induzida pela administração de Paraquat. A indução de FP por PQ consiste em um importante modelo experimental usado para investigar a fisiopatologia da FP uma vez que reproduz a fisiopatologia da doença humana a qual é caracterizada por aumento de neutrófilos e macrófagos no espaço alveolar, ativação de células epiteliais e fibroblastos e aumento da deposição de fibras de colágeno no parênquima pulmonar¹⁵.

O Paraquat (*N, N*-dimetil-4,4'-bipiridínio, dicloreto de PQ) é um herbicida de contato não seletivo com função de combater plantas daninhas provocando alterações fisiológicas severas amplamente utilizado nos países em desenvolvimento apesar de ser altamente tóxico para os seres humanos e animais, o qual é responsável por uma alta taxa de mortalidade resultante da ingestão acidental ou voluntária¹⁶⁻¹⁷. Ainda, é um sal solúvel em água, não é volátil, explosivo ou inflamável em solução aquosa¹⁸.

Geralmente o PQ é comercializado como Gramoxone®, Gramocil®, Agroquat®, Gramuron®, Paraquat®, Paraquol® e também em misturas com outros princípios ativos, como o Secamato®. Os seus sais são eletrólitos fortes que, em solução, dissociam-se em uma grande quantidade de íons positivos e negativos ¹⁹.

Seu nome comum é Paraquat (*Paraquate*), com nomenclatura química de 1,1'-*dimethyl-4,4'-bipyridinium*, fórmula bruta com C¹²H¹⁴N² e fórmula estrutural.

O principal órgão afetado pela toxicidade de PQ é o pulmão, onde é acumulado através de um processo de transporte ativo em células claras e células epiteliais alveolares tipo I e tipo II. Seus efeitos iniciais são edema pulmonar, infiltração de células inflamatórias e danos ao epitélio alveolar, seguido da resultante fibrose pulmonar e insuficiência respiratória ²⁰⁻²¹.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E FIBROSE PULMONAR

A formação excessiva de espécies reativas do oxigênio (ERO) e do nitrogênio (RNS) pode sobrecarregar a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante enzimática (superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase) e não enzimáticos (ácido úrico, ácido ascórbico, α -tocoferol) causando o desenvolvimento do estresse oxidativo e consequentemente muitas doenças devido ao dano oxidativo a uma variedade de moléculas biológicas importantes, como lipídios, DNA e proteínas ²².

Estudos clínicos sugerem que o estresse oxidativo também desempenha importante papel na FP ²³. Níveis elevados de biomarcadores como, como isoprostanos são encontrados em pacientes com FP. Em contraste, importantes antioxidantes tais como a glutathione estão diminuídos no LBA de pacientes com FPI (Fibrose Pulmonar Idiopática) ²⁴.

Além disso, o estado redox das células pulmonares modula a expressão de matriz extracelular (MEC), a qual exerce importante papel tanto em processos fisiológicos quanto patológicos incluindo a fibrogênese pulmonar ²⁵⁻²⁶. Pacientes com FP apresentam estresse oxidativo, o qual desencadeia sinalização intracelular induzindo fibro-proliferação e expressão de fatores pró-fibróticos ²⁷⁻²⁸.

A expressão de MEC é controlada durante o desenvolvimento do órgão e por toda vida adulta. Injúria tecidual desencadeia inflamação, estresse oxidativo e também regula a expressão e degradação de MEC. Normalmente, após a cessação da injúria há uma inibição da expressão de MEC e o tecido restabelece sua homeostasia caracterizando um processo

de reparo adaptativo. Entretanto, quando a injúria é exacerbada ou persistente pode haver um descontrole na expressão de MEC levando a um aumento na formação de tecido fibrótico ocasionando a perda da arquitetura e conseqüentemente função do órgão. Nesse sentido, o estresse oxidativo é importante contribuidor para o descontrole desta resposta que é caracterizada por um reparo mal adaptativo. Reação redox pode estimular a expressão de MEC por mecanismos de ativação da cascata de sinalização redox em resposta a fatores pró-fibróticos, ativação de fatores de transcrição e/ou eventos epigenéticos que dirigem a transcrição de MEC e oxidação do potencial redox de grupos tióis.

A fibrose pulmonar é caracterizada por um desequilíbrio redox pulmonar associado à inflamação. A sinalização redox no meio extracelular estimula a expressão de integrinas e outras moléculas de adesão incluindo ICAM-1, VCAM-1, *P-selectin* e *E-selectin* que são importantes para o processo de inflamação²⁹.

Para restaurar o equilíbrio, o uso de antioxidantes pode ser preconizado como terapia³⁰. Intervenções no balanço oxidante-antioxidante apresentam redução na progressão da doença em modelos animais experimentais de injúria pulmonar^{31- 32- 33}.

Apesar de alguns estudos apontarem para o importante papel do estresse oxidativo no desenvolvimento da FP, as intervenções neste sistema ainda são controversas³⁴.

Considerando a relevância do estresse oxidativo na FP, estudos têm focado no restabelecimento do balanço oxidante/antioxidante como um alvo importante para o tratamento da FP com resultados promissores. A junção do sistema de defesa endógeno e exógeno mantém a homeostase redox e é essencial para a saúde.

O sistema de defesa endógeno inclui catalisadores enzimáticos (por exemplo, superóxido dismutase, catalase) e não enzimáticos, de baixo peso molecular (como a glutathione e o ácido ascórbico).

A patogênese de muitas doenças graves como câncer, fibrose pulmonar e doença cardíaca isquêmica, inclui o estresse oxidativo que pode interferir no processo de angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) que originam-se do existente.

Os antioxidantes são responsáveis pela redução do estresse oxidativo e na influência na neovascularização, modulando o progresso e os resultados da terapia nas doenças em que esses processos desempenham um papel importante³⁵. Assim, estudos que visem avaliar o papel de antioxidantes no desenvolvimento da FP adquirem relevância.

1.3 VITAMINA C E FIBROSE PULMONAR

A Vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, possui funções pleiotrópicas relacionadas à sua capacidade de doar elétrons. Ela é encontrada na natureza sob duas formas: reduzida ou oxidada (ácido deidroascórbico); ambas são igualmente ativas, porém a forma oxidada está muito menos difundida nas substâncias naturais. A

transformação do Acido Ascórbico em ácido deidroascórbico ocorre normalmente no interior do organismo e é reversível, permitindo que uma de suas substâncias possa sempre ser transformada na outra. Essa capacidade de transformação funciona como um sistema óxido-redutor capaz de transportar hidrogênio nos processos de respiração, no nível celular.

A vitamina C é um potente antioxidante hidrossolúvel que contribui para a defesa de várias doenças causadas por danos oxidantes nos tecidos, sendo recomendado a ingestão de vitamina C em seres humanos para sobrevivência ³⁶. Tem como função formar barreira epitelial contra patógenos e promover a eliminação de oxidantes da pele, protegendo contra o estresse oxidativo ambiental. A vitamina C se acumula em células fagocísticas, como os neutrófilos, e pode melhorar fagocitose, a quimiotaxia, diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio e, finalmente, a morte microbiana sendo recomendada como prevenção profilática, a ingestão dietética de vitamina C em torno de 100-200 mg /dia ³⁷.

Estudos demonstraram que a administração de antioxidantes no tratamento de ratos com FP pode atenuar a alveolite, fibrose, apoptose e o estresse oxidativo pulmonar, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes, incluindo quinona óxido redutase, heme oxigenase, superóxido dismutase e catalase ³⁸. A terapia antioxidante combinada pareceu ser uma terapia segura e eficaz para pacientes com FPI, o que proporciona um efeito mais benéfico em termos de capacidade vital e na capacidade de difusão do monóxido de carbono ³⁹. A diminuição do antioxidante superóxido dismutase 3 extracelular (SOD3) contribuiu para a incidência de doenças pulmonares inflamatórias e fibróticas e que a redistribuição do SOD3 como resultado do polimorfismo de um único nucleótido R213G protege os ratos da fibrose induzida por bleomicina e do PH secundário por uma melhor resolução da inflamação alveolar ⁴⁰.

1.4 FIBROSE PULMONAR E FOTOBIMODULAÇÃO

Diversos estudos têm possibilitado uma melhor compreensão a respeito das diversas facetas da FP. À medida que o conhecimento se acumula, há também um aumento de possíveis alvos terapêuticos. Nesse sentido, pesquisas atuais têm proposto como alvos terapêuticos para a FP quimiocinas angiogênicas, eicosanoides, endotelina- 1, fatores de crescimento, interleucinas e seus receptores (IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α e

TGF- β), produtos de oxidação, sistema renina-angiotensina-aldosterona, *Metallopeptidase inhibitor* (TIMP) e tirocinases. Além da busca por novos alvos, há também pesquisas buscando tratamentos alternativos que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Sendo assim, terapias que melhorem o desconforto respiratório de pacientes com doenças respiratórias e também reduzam os custos despendidos são de grande importância.

A fototerapia emerge como uma terapia alternativa ou coadjuvante, apresentando bons resultados para diversas doenças com caráter inflamatório, incluindo doenças pulmonares. Dentre as terapias usadas para patologias que acometem o pulmão, o laser de baixa potência (LBP) tem se destacado devido suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, ao baixo custo e a ausência de efeitos colaterais ^{41,42,43,44}. É uma promissora terapia que tem sido pouco estudada é a LED terapia.

LED (*Light Emitting Diode*) são diodos semicondutores com emissão de luz monocromática, não coerente e não colimada, o que a difere da luz LASER ⁴⁵. Entretanto, a led terapia tem se mostrado tão eficiente quanto a laser terapia, já que a coerência da luz do LASER não é responsável pelos efeitos da terapia, haja vista que esta propriedade se perde nas primeiras camadas de tecido biológico ⁴⁶. A luz LED possibilitou uma alternativa eficaz ao laser, uma vez que pode ser produzida através de múltiplos arranjos em forma de cluster, abrangendo desta forma, áreas maiores, com mais potência e menor custo.

Estudos mostram que a terapia com LED gera efeitos semelhantes quando comparados ao LASER ^{47- 48-49}.

Com relação ao uso do LED para tratamento de doenças pulmonares, há poucos estudos na literatura, os quais vêm sendo realizados pelo nosso grupo ⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵². Assim, temos mostrado que o tratamento com LED tem efeitos benéficos em modelos experimentais de asma, de síndrome do desconforto respiratório agudo e de fibrose pulmonar.

Recentemente ⁵³ mostraram que o tratamento com LED em modelo experimental de FP reduz a migração celular, a elastância pulmonar e a produção de colágeno no tecido pulmonar, os quais são parâmetros importantes para o desenvolvimento e progressão da FP. Ainda, ⁵⁴ mostraram redução no influxo de células para o espaço alveolar, produção de muco, edema e menor resposta contrátil da traquéia em modelo experimental de asma e tais efeitos foram modulados por IL-10, IFN- γ e mastócitos. Mostraram ainda, que o tratamento com LED reverteu a inflamação pulmonar aguda induzida por LPS ⁵⁵. Assim, esses dados apontam para os efeitos promissores do LED para o tratamento de doenças pulmonares

incluindo a FP, constituindo uma ferramenta não medicamentosa que poderá refletir numa melhoria na qualidade de vida dos pacientes.

Deste modo, é razoável admitir que a LED terapia associada ao tratamento com antioxidante ou como monoterapia possa ser eficaz na redução do estresse oxidativo observado na FP, sobretudo modulando a atividade dos fibroblastos.

2. OBJETIVOS

Considerando que a FP é uma importante doença pulmonar que apresenta alta incidência com significativa morbidade, mortalidade e cujo tratamento disponível não é eficaz, o presente projeto visou investigar os efeitos do tratamento com vitamina C e/ou fotobiomodulação (LED) sobre o curso da FP. Para tanto, foram investigados os parâmetros abaixo:

- A inflamação pulmonar foi avaliada através da contagem de células totais diferenciais presentes no lavado bronco alveolar;
- Avaliação de edema pulmonar;
- Quantificação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-17) e antiinflamatórios (IL-10) no homogenato pulmonar bem como mediadores pró-fibróticos (TGF- β e metaloproteinase 9);
- A resposta máxima contrátil da traquéia foi também investigada frente estímulo colinérgico;
- Produção de colágeno no tecido pulmonar;
- Quantificação de enzimas antioxidantes no tecido pulmonar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos C57Bl/6 (20g) provenientes do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e foram mantidos no biotério de experimentação da mesma Universidade sob condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Nove de Julho com protocolo nº AN0017. 2016 (ANEXO 1).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSE INDUZIDA POR PARAQUAT

A fisiopatologia da FP pode ser experimentalmente induzida em animais de laboratório usando uma substância chamada Paraquat (PQ), um herbicida amplamente utilizado que pode causar toxicidade grave em humanos, tendo o pulmão como órgão alvo primário, e progride irreversivelmente para alveolite difusa seguida de extensa fibrose pulmonar, levando a baixos índices de sobrevivência e prognóstico⁵⁶⁻⁵⁷. Deste modo, os animais receberam PQ (10mg/Kg) por via intraperitoneal, dose única. E os experimentos foram conduzidos após 14 dias. Conforme o estudo citado, este é o período necessário para que o FP seja estabelecida.

3.3 TRATAMENTO COM FOTOBIMODULAÇÃO

Os animais foram irradiados com LED (parâmetros estão descritos na tabela abaixo), 7 dias após a indução de FP (1 vez ao dia durante 5 dias). O aparelho respiratório foi irradiado durante 2 min e 30 seg. encostando o *Spot* de 4.15 cm² diretamente na pele do camundongo. A irradiação abrangeu assim a traquéia e os dois lobos pulmonares. O aparelho utilizado foi o *BioLambda LEDsabr- Model BlackBox Min.*

TABELA DE PARÂMETROS DOSIMÉTRICOS

PARÂMETROS DOSIMÉTRICOS	
1. Potência Radiante	160 mW
2. Emissão	Contínua (cw)
3. Comprimento de onda	660nm ±20nm
4. Exposição Radiante Total	24 J
5. Área de feixe saída ou spot área	4,15cm ²
6. Densidade de energia	5,8 J/cm ²
7. Densidade de Potência	38,5 mW/cm ²
8. Tempo de exposição	150 s
9. Pontos irradiados	1 ponto
10. Método de Irradiação	Contato direto na pele
11. Localização anatômica	Traquéia e pulmões
12. Ritmo de irradiação	Pontual
13. Número de tratamentos	5 dias consecutivos
14. Propriedades ópticas do tecido	Tecido pulmonar Camundongo C57BL6

3.4 TRATAMENTO COM VITAMINA C

Durante o tratamento, os animais do grupo da vitamina C receberam somente a vitamina C (150mg/kg), por via intraperitoneal e o grupo da vitamina C e LED recebeu concomitantemente a vitamina C (150 mg/kg i.p.) o tratamento com LED durante 5 dias consecutivos.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Grupo Basal: grupos de camundongos não manipulados

Grupo F: grupos de camundongos com FP

Grupo F+LED: grupos de camundongos com FP e tratados com LED

Grupo F+Vit C: grupos de camundongos com FP e tratados com vitamina C

Grupo F+Vit C+LED: grupos de camundongos com FP e tratados com vitamina C e LED

3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS TOTAIS E DIFERENCIAIS PRESENTES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Após 5 dias do tratamento com Vit C e/ou LED (grupos F+LED, F+Vit C e

F+Vit C+LED) ou após 14 dias da indução de fibrose (grupo F), os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (100 e 20mg/kg) e as células (mononucleares e polimorfo nucleares) presentes no espaço bronco alveolar foram obtidas pela técnica de lavado bronco alveolar (LBA) ¹⁴. Para tanto, a cavidade peritoneal foi exposta para realização do dessangramento da aorta abdominal. Foi feita incisão longitudinal na região cervico-ventral e a traquéia foi exposta e canulada. Acoplou-se a cânula uma seringa pela qual foi realizada a lavagem do espaço alveolar em etapas, injetando-se lentamente um volume de 0,8 ml de PBS seguindo da aspiração do mesmo conteúdo, acompanhado de delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido até que fosse recuperado um volume de 1,5 ml. O LBA obtido foi centrifugado por 10 min a 1.500 rpm. O sobrenadante foi armazenado para dosagem de mediadores inflamatórios e

antiinflamatórios e o *pellet* ressuspenso em 1 ml de PBS para contagem de células totais em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi feita por citometria de fluxo.

3.7 ANÁLISE DE EDEMA PULMONAR

Após eutanásia, os pulmões foram removidos e o lobo direito pesado. A seguir o tecido foi levado a estufa de 37° C durante 7 dias e então o pulmão foi novamente pesado. O edema foi avaliado indiretamente pela razão do peso úmido pelo peso seco.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES NO HOMOGENATO DE TECIDO PULMONAR

Os mediadores inflamatórios (IL-6, IL-17 e TNF-alfa), antiinflamatório (IL-10) e pró-fibróticos (TGF- β e MMP9) foram quantificados por ELISA em amostras de homogenato pulmonar. Para tanto, foram utilizados *Kits Duo Set* disponíveis comercialmente da *Biolegend* e da *R & D system*. Os ensaios foram conduzidos de acordo com as normas do fabricante. Os homogenatos foram armazenados a -80°C até as quantificações serem realizadas.

3.9 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE TRAQUEAL *IN VITRO*

A força isométrica de contração foi quantificada em anéis de traquéia montados em banho para órgão isolado de 15 mL, por meio de dois ganchos de aço. A contração máxima foi determinada utilizando um transdutor de força de deslocamento acoplado a sistema de aquisição de dados (*Powerlab*®, *LabChart*, *AD Instruments*). Para tanto, anéis de traquéia foram suspensos em solução de *Krebs-Hanseleit* (KH) continuamente aerada (95% O₂ e 5% de CO₂) a 37°C. Após um período de equilíbrio de 40 segundos, a tensão traqueal foi ajustada para 0,5 g e a viabilidade dos tecidos foi determinada através da substituição da solução de KH por KCl 60 mM. Em seguida, o tecido foi lavado e administrado na cuba o agonista colinérgico (metacolina, MCh) na dose de 10⁻³M, a fim de se obter uma resposta contráctil máxima.

3.10 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COLÁGENO NO TECIDO PULMONAR

Após anestesia, os pulmões foram removidos e fixados em solução de formalina 10% por 24 h. Após este período os pulmões foram submetidos às análises histológicas. Para tanto, as lâminas foram coradas com picrossirius para quantificação da deposição de colágeno. Foi utilizada a técnica histomorfométrica e de análise de imagem. A análise de colágeno foi feita por imagem usando o programa *Image Pro plus*.

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM TECIDO PULMONAR

As atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase foram determinadas em homogenato pulmonar por ELISA de acordo com o fabricante (*Cayman, Michigan, USA*).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste *Student Newman-Keuls* para comparação de todos pares de colunas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando *Graph Pad prism Software V.5*. Os resultados foram expressos como média \pm DP (desvio padrão). Onde, os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 TRATAMENTO COM VIT C E/OU LED REDUZ RECRUTAMENTO CELULAR PULMONAR EM MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR PARAQUAT

A Figura 1 (Painel A) mostra que os tratamentos com Vit C ou LED isoladamente ou em conjunto foram eficazes em reduzir o número de células totais migradas para o LBA em relação ao grupo não tratado e não diferiram do grupo basal. Podemos ainda verificar a eficácia do modelo de fibrose pelo aumento no número de células totais no LBA do grupo F em relação ao grupo B.

No painel B podemos observar que os tratamentos com Vit C e LED isolados ou associados causaram redução na porcentagem de granulócitos em comparação com o grupo F. Observamos ainda, aumento na porcentagem de granulócitos no grupo F em relação ao grupo B.

O painel C mostra redução significativa na porcentagem de macrófagos migrados para o LBA no grupo F em relação ao grupo B. Nenhuma diferença foi encontrada entre os demais grupos de estudo.

No painel D pode ser observado aumento na porcentagem de linfócitos no LBA do grupo F em relação ao grupo B. Ainda, podemos observar que, os tratamentos com Vit C e LED isolados ou associados causaram redução na porcentagem de linfócitos em comparação com o grupo F.

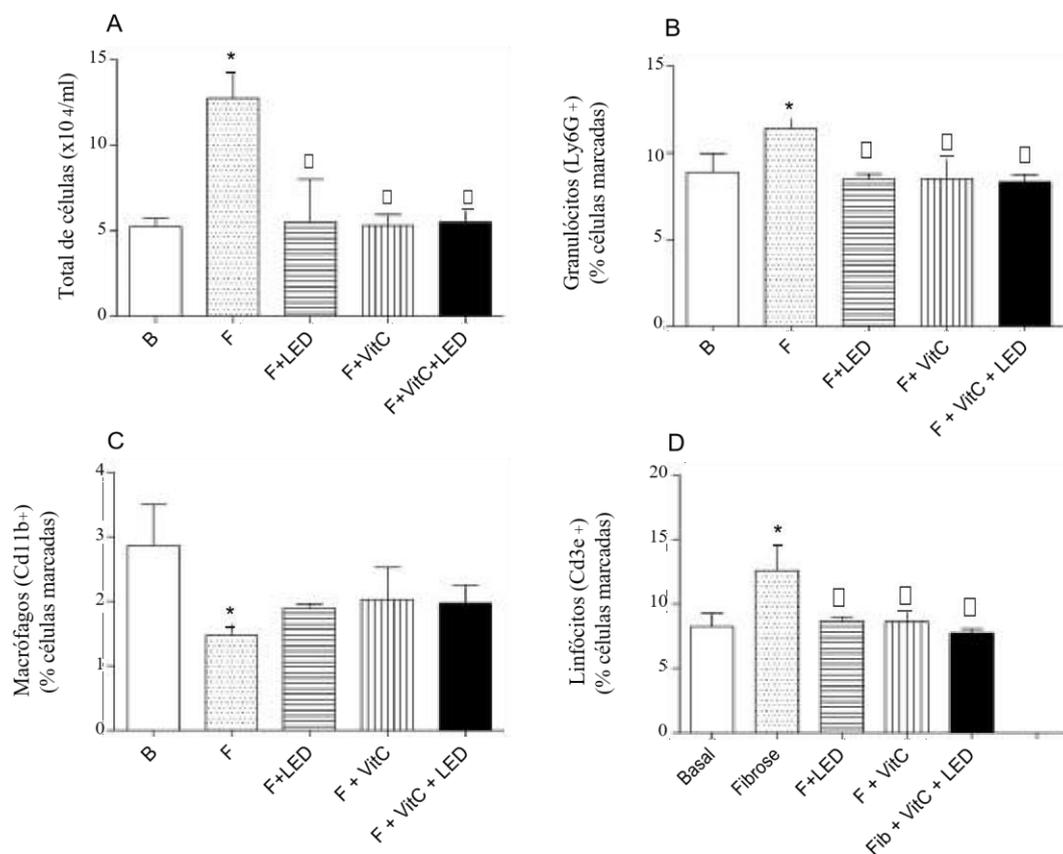


Figura 1. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre o número de células totais e sobre a porcentagem diferencial de células presentes no LBA em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat. Grupos de camundongos foram submetidos a fibrose pulmonar pela administração de PQ e após 7 dias foram tratados ou não com Vit C e/ou LED durante 5 dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento com Vit C e/ou LED o número de células totais e diferenciais migradas para o lavado broncoalveolar foram determinadas. Animais não manipulados foram utilizados para a obtenção dos parâmetros basais. Os dados representam a média \pm de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo B; ^o $P < 0,05$ em relação ao grupo F (ONE WAY-ANOVA/Student Newman-Keuls).

4.2 TRATAMENTO COM VIT C ISOLADO OU EM ASSOCIAÇÃO COM O LED AUMENTA EDEMA PULMONAR, PORÉM REDUZ REATIVIDADE TRAQUEAL EM MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR PARAQUAT

A Figura 2 (Painel A) mostra que o tratamento com Vit C isolado ou em conjunto com o LED aumentou o edema pulmonar em relação ao grupo F. Ainda, um aumento da associação do tratamento da Vit C com LED foi observado em relação ao grupo apenas tratado com LED. Podemos ainda verificar que não houve diferença no edema pulmonar entre os grupos B, F e F+LED.

No painel B podemos observar aumento na resposta contrátil da traquéia frente a estímulo colinérgico nos grupos F e F+LED em relação ao grupo B. Ainda, notamos que o tratamento com VIT C isolado ou em associação com o LED reduziu a reatividade traqueal em relação ao grupo F. Observamos também redução na contratilidade traqueal do grupo F+Vit C+LED em relação ao grupo F+LED.

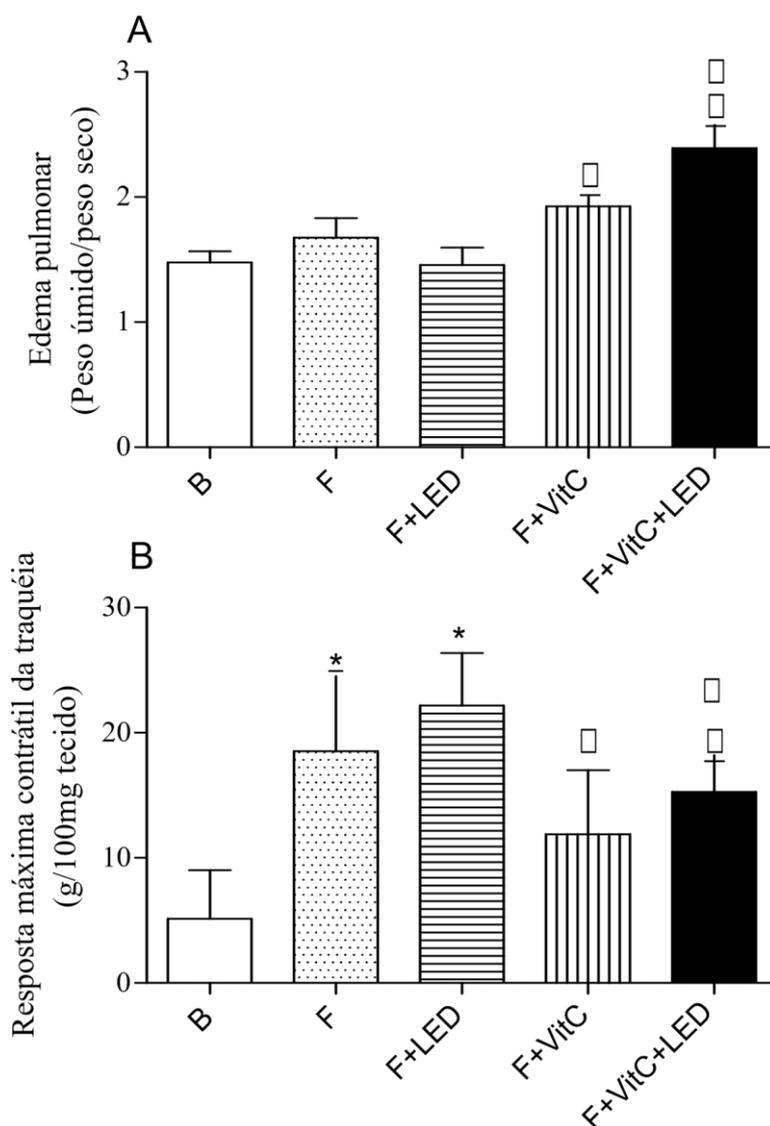


Figura 2. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre o edema pulmonar e sobre a reatividade traqueal *in vitro* em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat. Grupos de camundongos foram submetidos à fibrose pulmonar pela administração de PQ e após 7 dias foram tratados ou não com Vit C e/ou LED durante 5 dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento com VIT C e/ou LED o edema pulmonar e a resposta contrátil da traquéia *in vitro* foram determinadas. Animais não manipulados foram utilizados para a obtenção dos parâmetros basais. Os dados representam a média \pm de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo B; ^o $P < 0,05$ em relação ao grupo F; ^o $P < 0,05$ em relação ao grupo F+LED (ONE WAY-ANOVA/Student Newman-Keuls).

4.3 TRATAMENTO COM VIT C E/OU LED NÃO ALTERA O ELEVADO NÍVEL DE

MMP-9 EM HOMOGENATO PULMONAR EM MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR PARAQUAT

A Figura 3 (Painel A) mostrou que o tratamento com Vit C e/ou LED não alterou a elevada produção de MMP-9 em homogenato pulmonar em relação ao grupo não tratado. Observamos ainda, aumento na produção de MMP-9 em todos os grupos de estudo em relação ao grupo B.

O painel B mostra que o tratamento com Vit C isolado, mas não o de LED reduziu a liberação de TGF- β no homogenato pulmonar em relação ao grupo F. Observamos ainda, redução na liberação de TGF- β no grupo Vit C+LED em relação aos grupos F e F+LED. Uma elevada liberação de TGF- β foi encontrada nos grupos F e F+LED em relação ao grupo B.

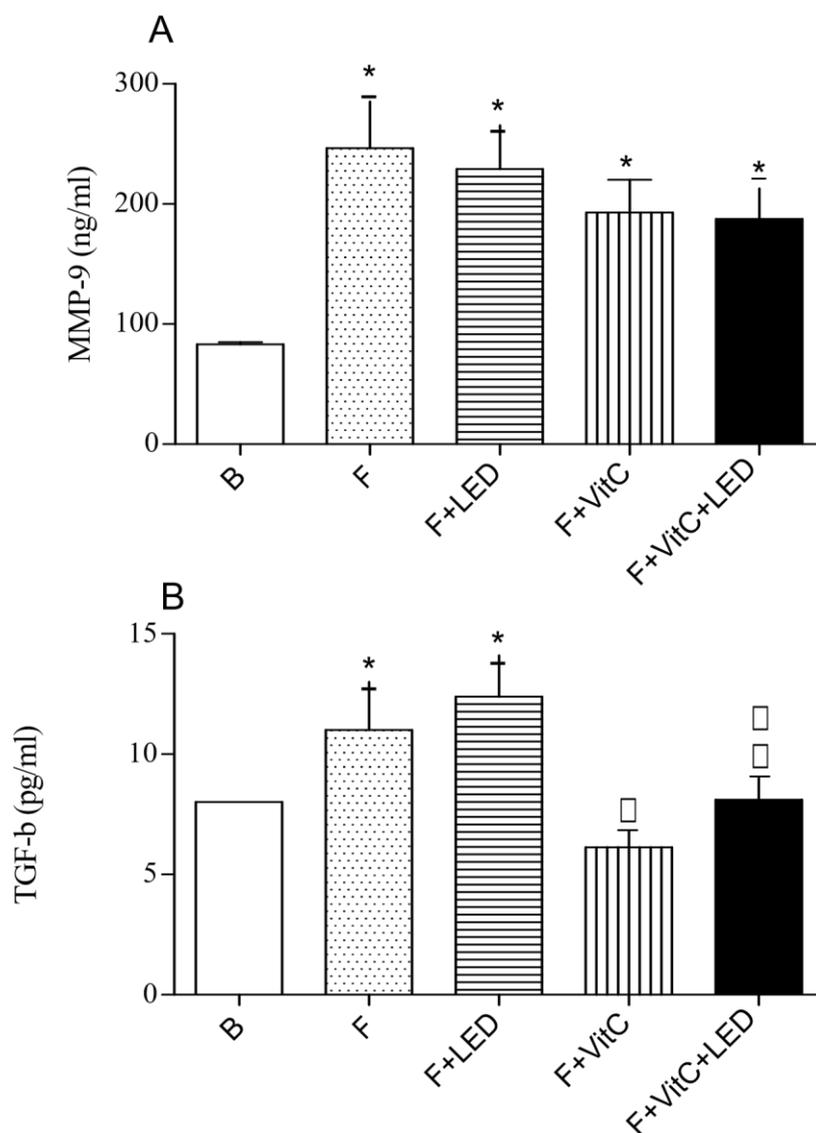


Figura 3. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre a produção de MMP-9 e TGF- β em homogenato pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat. Grupos de camundongos foram submetidos a fibrose pulmonar pela administração de PQ e após 7 dias foram tratados ou não com Vit C e/ou LED durante 5 dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento com Vit C e/ou LED a produção de MMP-9 e TGF- β foram determinadas. Animais não manipulados foram utilizados para a obtenção dos parâmetros basais. Os dados representam a média \pm de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo B; [†] $P < 0,05$ em relação ao grupo F; [‡] $P < 0,05$ em relação ao grupo F+LED (ONE WAY-ANOVA/Student Newman-

Keuls).

4.4 TRATAMENTO COM VIT C ISOLADA OU ASSOCIADA AO LED REDUZ A LIBERAÇÃO DE IL-6, IL-17, TNF- α e IL-10 EM HOMOGENATO PULMONAR EM MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR PARAQUAT

A Figura 4 (Painel A) mostrou que o tratamento com Vit C, mas não com LED, isoladamente, reduziu a liberação de IL-6 no homogenato pulmonar em relação ao grupo F. Ainda, observamos que a associação de Vit C +LED promoveu também redução na liberação de IL-6 em relação aos grupos F+LED e F+ Vit C. Uma aumentada liberação de IL-6 foi observada nos grupos F e F+LED em relação ao grupo B.

No painel B pode ser observado mais uma vez que o tratamento com Vit C, mas não com LED, isoladamente, reduziu a liberação de IL-17 no homogenato pulmonar em relação ao grupo F. Ainda, observamos que a associação de Vit C +LED promoveu também redução na liberação de IL-17 em relação ao grupo F+LED, mas não em relação ao grupo F+ Vit C. Uma aumentada liberação de IL-17 foi observada nos grupos F e F+LED em relação ao grupo B.

Ainda, os painéis C e D mostraram que o tratamento com Vit C, mas não com LED, isoladamente, reduziu a liberação de TNF- α e IL-10 no homogenato pulmonar em relação ao grupo F. Ainda, observamos que a associação de Vit C +LED promoveu também redução na liberação de TNF- α e IL-10 em relação aos grupos F+LED e F+VIT C. Não observamos diferenças entre os grupos B, F e F+LED.

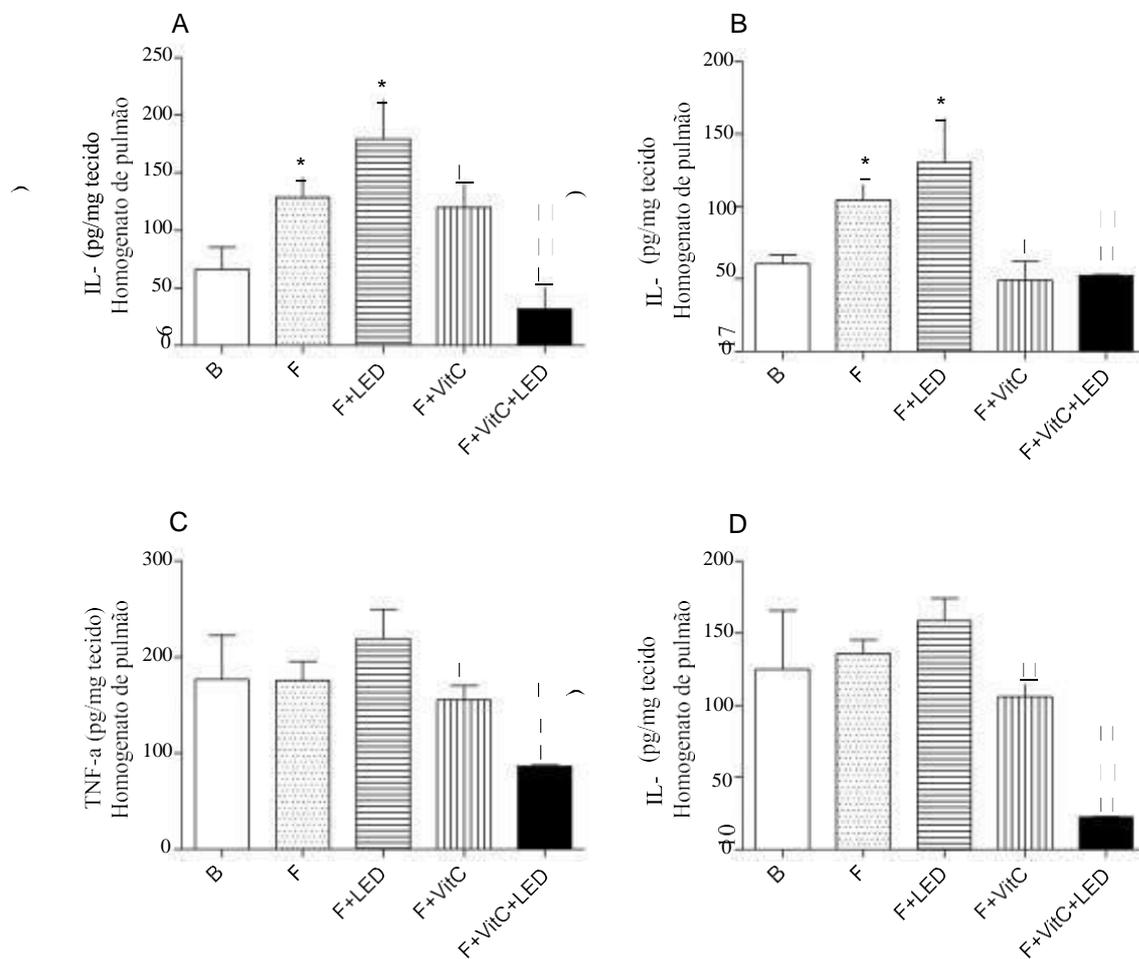


Figura 4. Efeito do tratamento com Vit C e/ou LED sobre a liberação de IL-6, IL-17, TNF- α e IL-10 em homogenato pulmonar em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat. Grupos de camundongos foram submetidos a fibrose pulmonar pela administração de PQ e após 7 dias foram tratados ou não com Vit C e/ou LED durante 5 dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento com Vit C e/ou LED a liberação de citocinas foi avaliada. Animais não manipulados foram utilizados para a obtenção dos parâmetros basais. Os dados representam a média \pm de 6 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo B; †P<0,05 em relação ao grupo F; ‡P<0,05 em relação ao grupo F+LED; §P<0,05 em relação ao grupo F+VIT C (ONE WAY- ANOVA/Student Newman-Keuls).

4.5 TRATAMENTO COM VIT C ISOLADO OU ASSOCIADO AO LED REDUZ A PRODUÇÃO DE COLÁGENO EM MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDO POR PARAQUAT.

Na figura 5 (Painel F) podemos observar elevada produção de colágeno nos grupos F e F+LED em relação ao grupo basal. Os tratamentos com Vit C isolado ou associado ao LED reduziram a produção de colágeno em relação ao grupo não tratado. Ainda, também observamos que a associação do LED com a Vit C aumentou a produção de colágeno em relação ao grupo apenas tratado com Vit C.

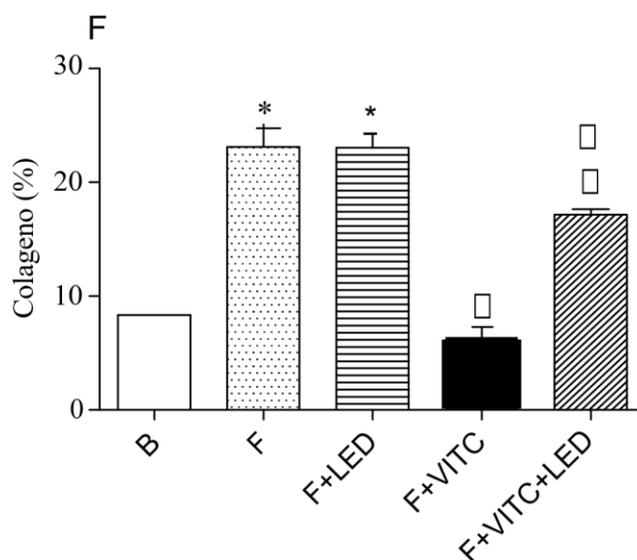
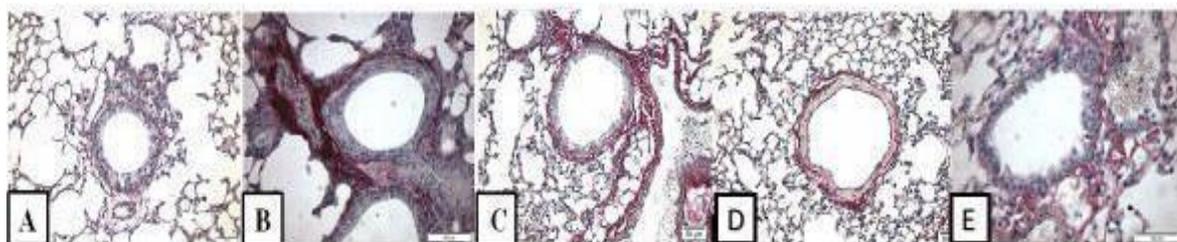


Figura 5. Efeito do tratamento com VIT C e/ou LED sobre a produção de colágeno em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat. Grupos de camundongos foram submetidos a fibrose pulmonar pela administração de PQ e após 7 dias foram tratados ou não com Vit C e/ou LED durante 5 dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento com VIT C e/ou LED a produção de colágeno foi determinada. Animais não manipulados foram utilizados para a obtenção dos parâmetros basais. Os dados representam a média \pm de 6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo B; ^θ $P < 0,05$ em relação ao grupo F; ^Ω $P < 0,05$ em relação ao grupo F+VITC (ONE WAY-ANOVA/Student Newman-Keuls).

4.6 TRATAMENTO COM VIT C ISOLADA OU ASSOCIADA AO LED AUMENTA A ATIVIDADE DA CATALASE SEM ALTERAR A SOD EM MODELO DE FIBROSE PULMONAR INDUZIDA POR PARAQUAT.

Na figura 6 (Painel A), podemos observar aumento na atividade da catalase após tratamento com vitamina C isolado sem relação aos grupos F, Basal e F+LED. Por outro lado, o tratamento com LED isolado causou redução na atividade desta enzima em relação ao grupo F. Observamos ainda, que a associação da Vit C com o LED aumentou a atividade da catalase em relação ao grupo F+LED e reduziu em relação ao grupo F+Vit C.

No painel B mostramos que não houve diferença na atividade de SOD entre os grupos estudados.

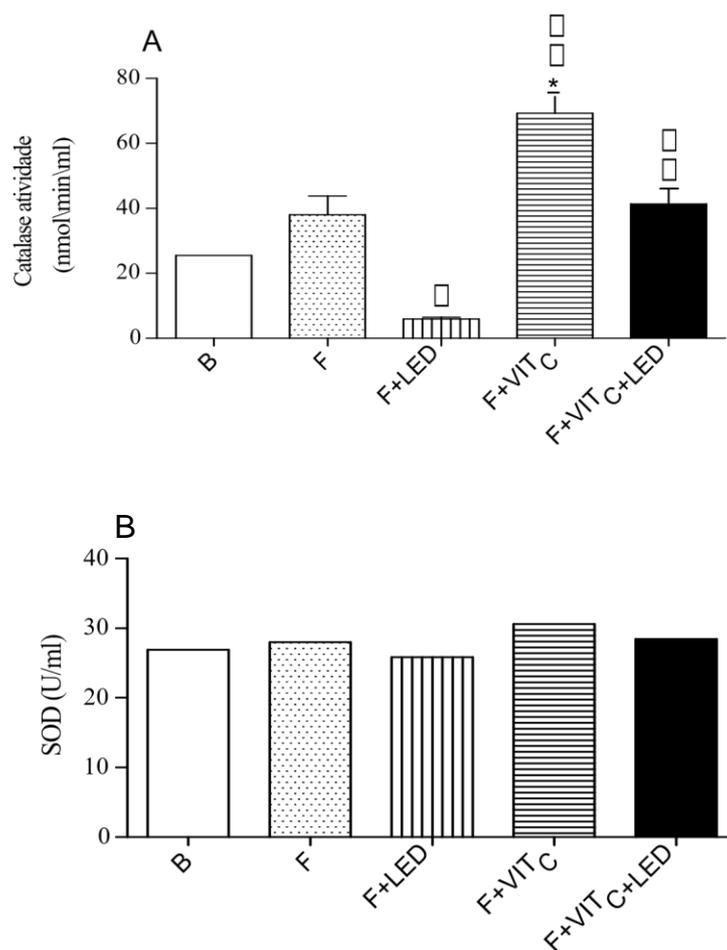


Figura 6. Efeito do tratamento com VIT C e/ou LED sobre a atividade da Catalase e da SOD em modelo de fibrose pulmonar induzida por Paraquat. Grupos de camundongos foram submetidos à fibrose pulmonar pela administração de PQ e após 7 dias foram tratados ou não com Vit C e/ou LED durante 5 dias consecutivos. Após 24 h do último tratamento com Vit C e/ou LED a atividade de Catalase e SOD foram determinadas. Animais não manipulados foram utilizados para a obtenção dos parâmetros basais. Os dados representam a média \pm de 6 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo B; ⁰P<0,05 em relação ao grupo F; ¹P<0,05 em relação ao grupo F+LED; ²P<0,05 em relação ao grupo F+VITC. (ONE WAY-ANOVA/Student Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho estão apresentados os resultados do estudo relacionado aos efeitos do tratamento com VIT C e/ou LED em modelo experimental de fibrose pulmonar induzida

por PQ. O modelo experimental utilizado nessa pesquisa é bem estabelecido na literatura e reproduz a fisiopatologia da doença humana a qual é caracterizada por aumento de neutrófilos no espaço alveolar, ativação de células epiteliais e fibroblastos e aumento da deposição de fibras de colágeno no parênquima pulmonar⁵⁸⁻⁵⁹⁻⁶⁰. O Paraquat (N, N - dimetil-4,4'-bipiridínio, dicloreto de PQ) é um dos herbicidas mais amplamente utilizado nos países em desenvolvimento. No entanto, também é um composto altamente tóxico para os seres humanos e animais, o qual é responsável por uma alta taxa de mortalidade cada ano resultante da ingestão acidental ou voluntário. O sistema de órgãos primários afetado pela toxicidade de PQ é o pulmão, onde é acumulado através de um processo de transporte ativo em células claras e células epiteliais alveolares tipo I e tipo II. Seus efeitos iniciais são edema pulmonar, infiltração de células inflamatórias e danos ao epitélio alveolar, seguido da resultante fibrose pulmonar e insuficiência respiratória⁶¹⁻⁶².

Considerando o impacto da FP na qualidade de vida, suas complicações além de seus efeitos econômicos, há necessidade da busca por novos alvos terapêuticos com maior eficiência, e se possível, menores custos e efeitos colaterais. Nesse sentido, o tratamento com fotobiomodulação tem se mostrado promissor para diversas patologias respiratórias incluindo a FP. Recentemente nosso grupo mostrou que o tratamento com LED reduziu a migração celular para o espaço alveolar, a elastância pulmonar e a produção de colágeno⁶³. Esses resultados mostraram efeitos promissores da fotobiomodulação para o tratamento da FP abrindo a oportunidade de aprofundamento de estudos na área. Assim, no presente estudo ampliamos os parâmetros avaliados após tratamento com LED e associamos um tratamento farmacológico com vitamina C na tentativa de tornar o tratamento mais eficiente.

Sabe-se que a vitamina C é um potente antioxidante fisiológico, regulando o sistema imune inato no pulmão⁶⁴. Além disso, considerando que uma das características da FP é o desenvolvimento de estresse oxidativo, assim o tratamento com fármacos que protegem o pulmão contra estas espécies reativas pode representar uma importante ferramenta para o seu controle.

Estudos mostram os benefícios dos antioxidantes nas doenças pulmonares, porém estes fármacos são pouco usados. Nesse sentido, um estudo teve como objetivo avaliar a relação entre o estado oxidante/antioxidante na fibrose pulmonar em ratos focando nos efeitos da pentoxifilina e vitamina E, concluíram que a combinação de vitamina E

e pentoxifilina foram eficientes na prevenção da fibrose pulmonar induzida por radiação, porém o benefício adicional da vitamina C, em administração concomitante a esta combinação não foi evidenciado⁶⁵. Outro estudo com resultado positivo de terapia combinada de vitaminas C e E o dano fibrótico foi reduzido no tecido pulmonar⁶⁶.

Nossos resultados mostraram que a vitamina C bem como o LED, isoladamente, foram eficientes em reduzir a inflamação pulmonar. Porém, a associação da Vit C com o LED não causou efeito adicional como esperávamos. A irradiação do LED foi feita localmente diretamente no aparelho respiratório sobre a pele, e deste modo seus efeitos foram circunscritos ao local da injúria. Já o tratamento com Vit C foi feito pela via intraperitoneal, tendo assim uma abordagem sistêmica. Quando avaliamos as porcentagens diferenciais de células migradas no LBA, notamos que mais uma vez que ambos os tratamentos isolados ou em conjunto reduziram principalmente granulócitos e linfócitos sem alterar a porcentagem de macrófagos. Assim, o reduzido número de células totais é reflexo de uma redução no número de granulócitos e linfócitos. De fato, estas são as principais células envolvidas na fisiopatologia da FP.

Outro importante parâmetro investigado foi o edema pulmonar. Nossos resultados foram muito intrigantes, uma vez que não observamos aumento no edema pulmonar no grupo fibrótico, mas uma acentuada elevação foi observada nos grupos tratados com Vit C isolada ou em associação com o LED. Este dado realmente é incongruente com os demais dados, uma vez que o edema é normalmente um evento agudo e levando em consideração que as análises foram feitas 14 dias após a injeção com PQ. Além disso, estudos mostram efeito antiedematoso da Vit C conforme o estudo que investigou os efeitos da administração de combinações de antioxidantes como *n-acetil cisteína* (NAC), vitaminas C e E no tratamento da lesão pulmonar induzida por sepse tendo como resultados a redução do desequilíbrio das atividades das enzimas antioxidantes e a atenuação da desorganização arquitetônica alveolar, infiltração de células inflamatórias e do edema pulmonar e em outro estudo a combinação de NAC e vitamina C reduziu as alterações histológicas pulmonares em ratos que apresentavam edema intersticial, metaplasias cúbicas focais de células de revestimento alveolar e arquitetura pulmonar gravemente danificada⁶⁷⁻⁶⁸.

Precisamos ampliar os estudos, principalmente no que tange mediadores pró-edematosos para melhor compreender este resultado.

A elastância pulmonar, um importante parâmetro funcional, foi investigada em estudos anteriores após tratamento com LED em duas situações: com tórax aberto e fechado. Em

ambas as situações, o tratamento com LED melhorou a função pulmonar⁶⁹. Esta melhora foi correlacionada a uma redução na produção de colágeno no tecido pulmonar, fenômeno relatado com o enrijecimento do tecido e perda da capacidade de troca gasosa. Neste trabalho resolvemos avaliar outro importante parâmetro relacionado com a capacidade respiratória, mas focando na resposta pontual do tecido das vias aéreas. Assim, avaliamos a reatividade traqueal *in vitro* frente a estímulo colinérgico. Nossos dados mostraram que os tratamentos com Vit C isolado ou concomitante com o LED reduziram a resposta contrátil da traquéia. Por outro lado, o tratamento com LED isolado não alterou a elevada reatividade traqueal. Este dado diferiu do observado anteriormente, onde mostramos redução da função pulmonar após tratamento com LED. No entanto, são abordagens muito diferentes, onde no estudo anterior a avaliação foi feita *in vivo* e a análise compreendeu todo o aparelho respiratório, sobre os brônquios e parênquima pulmonar, que são mais afetados pela FP. Já no presente estudo, a análise foi pontual sobre a traqueia e o estudo foi *in vitro* sem interferências do organismo. Daí pode-se explicar os diferentes resultados. De qualquer forma, estes resultados precisam ser mais bem explorados futuramente.

Muitos autores atribuem a progressão da FP a um depósito excessivo e desorganizado de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, resultando em alterações graves na arquitetura da parede alveolar⁷⁰. Nesse sentido, as metaloproteinases (MMPs) possuem papel importante na FP degradando a matriz extracelular e consequentemente atraindo células inflamatórias para o sítio da injúria perpetuando o ciclo de inflamação e de remodelamento⁷¹.

As MMPs podem ser induzidas por IL-1- β , TNF- α , TNF- β , TGF- α , EGF (fator de crescimento epidérmico) ou ainda podem ser inibidas por TGF- β , IL-4 e inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMP), os quais são produzidos pelas células mesenquimais controlando a ação dessas proteinases. Ressalta-se que as MMPs são importantes na remoção das proteínas em excesso, mas também podem destruir a arquitetura do pulmão.

A MMP-9 desempenha importante papel na FP humana e experimental e mostra-se elevada em pacientes com FP idiopática⁷²⁻⁷³. Reconhecendo o importante papel da MMP-9 no desenvolvimento da FP quantificamos esta quimiocina no homogenato pulmonar. Assim, o resultado é um reflexo da liberação de MMP-9 tanto por células estruturais como inflamatórias. Nossos dados mostraram que tanto o tratamento com LED quanto com Vit C isoladamente ou em conjunto não foi capaz de reduzir a liberação desta quimiocina. Sabendo que a MMP-9 possui importante papel na degradação da matriz extracelular e

também na atração de células inflamatórias para o sítio da injúria, podemos supor que nesta inflamação induzida por PQ, outras citocinas/quimiocinas sejam mais importantes neste processo, já que observamos redução da migração de células inflamatórias no pulmão dos grupos tratados com Vit C ou LED acompanhado de elevados níveis de MMP-9.

Sequencialmente avaliamos a produção de TGF- β , uma citocina pró-fibrótica que atua na proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos, produção de matriz extracelular e de sinais quimiotáticos para leucócitos ⁷⁴⁻⁷⁵. Nossos resultados mostraram mais uma vez que apenas o tratamento com Vit C isolado ou concomitante ao LED foi capaz de reduzir esta citocina. O LED por sua vez não causou alteração na liberação desta citocina. Este fato foi surpreendente uma vez que, em estudos anteriores mostramos redução na elastância pulmonar, na produção de colágeno e no espaçamento intersticial após tratamento com LED ⁷⁶. Apesar de estes resultados parecerem um pouco nebulosos, nosso estudo mostrou uma visível melhora após o LED no que tange tanto eventos inflamatórios quanto fibróticos apesar de o TGF- β estar elevado mostrando que talvez outros mediadores sejam mais importantes na FP induzida por PQ.

Reconhecendo-se que o processo inflamatório é resultado de um balanço entre mediadores inflamatórios e antiinflamatórios, investigamos a liberação de IL-6, IL-17 e TNF- α bem como de IL-10. Similarmente ao que havíamos mostrado em estudos anteriores, o tratamento com LED não reduziu a liberação de IL-6, IL-17 e TNF- α no homogenato pulmonar, porém manteve elevados níveis de IL-10. Estes níveis elevados de IL-10 no grupo LED parecem estar correlacionados com seus efeitos antiinflamatórios. Já a VIT C reduziu a liberação destas citocinas inflamatórias de forma efetiva, fato que contribui para a reduzida resposta inflamatória pulmonar. Ainda, a associação do LED com a VIT C causou efeito aditivo em relação a IL-6, TNF- α e IL-10.

O estresse oxidativo pode ser modulado por mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase), bem como não enzimáticos (ácido ascórbico e alfa-tocoferol). Assim, avaliamos o papel da vitamina C nas enzimas antioxidantes. Nossos dados mostraram níveis elevados de SOD e catalase após o tratamento com vitamina C. Portanto, a vitamina C melhorou os mecanismos de defesa dos antioxidantes e tais efeitos podem ser responsáveis, pelo menos em parte, por respostas inflamatórias e fibróticas mais baixas.

A vitamina C foi capaz de reverter muitos parâmetros, exceto a resposta contrátil traqueal. É plausível considerando seus mecanismos. A resposta contrátil é modulada por vários mediadores que não são modificados pela vitamina C, incluindo os leucotrienos.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo de inflamação e deposição de colágeno nos pulmões após a fibrose pulmonar induzida por PQ; e a vitamina C parece ser uma ferramenta importante para o tratamento dessa intoxicação. Vale ressaltar que a vitamina C é barata e pode ser um agente viável a ser empregado como terapia. Ainda, a associação da Vit C com o LED não está mostrando efeitos adicionais que justificariam seu uso.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Raghu H, Nalla AK, Gondi CS, et al. UPA and uPAR shRNA inhibit angiogenesis via enhanced secretion of SVEGFR1 independent of GM-CSF but dependent on TIMP-1 in endothelial and glioblastoma cells. *Mol Oncol*. 2012 Feb;6(1):33-47. doi:10.1016/j.molonc.2011.11.008. Epub 2011 Nov 30.
2. Matsuzawa Y, Washima T, Kuwabara R, et al. Change in serum marker of oxidative stress in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Immunol*. 2017;376:370-376. doi:10.1016/j.cellimm.2017.07.004. Epub 2017 Oct 10.
3. Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2008; 26:3:8.
4. Bertini R, Allegretti M, Bizzarri C, et al. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11791-11796.
5. Baptista G, Ferreira E, Forestier A, et al. 2006. Re: Predictors of 1-year mortality in patients discharged from the hospital following acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Age Ageing*.;35(3):321.
6. Kisseleva T, Brenner DA. Fibrogenesis of parenchymal organs. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 15; 5(3):338-42.
7. Selman M, King TE, Pardo A. American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2003;134(2):136-51.

8. King TE JR, Brown KK, Raghu G, et al. A randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(1):92.
9. Meyer KC, Arendra RA, Kalayoglu MV, et al. Tryptophan metabolism in chronic inflammatory lung disease. *J Lab Clin Med.* 1995;126(6):530-40.
10. Phan SH. Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2012; 9(3):148-52.
11. Mangan PR, Harrington LE, O'quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006; 441(7090):231-4.
12. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *Exp Med.* 2010; 207(3):535-52.
13. Strieter RM, Gomperts BN, Keane MP. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2007;117:549-556.
14. Mouradian GC, Gaurav R, Pugliese S, et al. Superoxide Dismutase 3 R213G Single-Nucleotide Polymorphism Blocks Murine Bleomycin-Induced Fibrosis and Promotes Resolution of Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* . 2017 Mar; 56 (3): 362-371. rcm.2016-0153OC.
15. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med,* 2011 208 (7):1339-1350.
16. Vale JA, Meredith TJ, Buckley BM. Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum Toxicol.* 1987 Jan;6(1):41-7.

Review.

17. Baltazar T, Dinis ORJ, Duarte JA, et al. Paraquat research: do recent advances in limiting its toxicity make its use safer? *Br J Pharmacol.* 2013 Jan;168(1):44-5. j.1476-5381.2012.02017.x.
18. Lino-dos-Santos-Franco A, Domingos HV, Oliveira AP, et al. Differential effects of formaldehyde exposure on the cell influx and vascular permeability in a rat model of allergic lung inflammation. *Toxicol Lett.* 2010 Sep 1;197(3):211- 8 (b).
19. Serra A, Domingos F, Prata MM. Paraquat intoxication. *Acta Med Port.* 2003 Jan-Feb;16(1):25-32. Review. Portuguese.

20. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*. 2002 Oct 30;180(1):65-77. Review.
21. Chang X, Lu W, Dou T. Paraquat inhibits cell viability via enhanced oxidative stress and apoptosis in human neural progenitor cells. *Chem Biol Interact*. 2013 Nov 25;206(2):248-55. j.cbi.2013.09.010. Epub 2013 Sep 21.
22. Feitosa CM. Abstract Determination of parameters of oxidative stress in vitro models of neurodegenerative diseases- A review. *Current clinical pharmacology*, - europepmc.org. 2018.
23. Kinnula VL, Myllarniemi M. Oxidant-antioxidant imbalance as a potential contributor to the progression of human pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(4):727-38.
24. Pidaev AV. A mathematical assessment of the efficacy of the methods for treating patients with chronic nonspecific lung diseases at a health resort. *Lik Sprava*. 6:168-72, 1997.
25. Silva Macedo R, Peres Leal M, Braga TT, et al. Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:9303126.
26. Rahman LL, Jacobsen NR, Aziz SA, et al. Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and pro-fibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis. *Mutat Res*. 2017 Nov;823:28-44. j.mrgentox.2017.08.005. Epub 2017 Sep 8.
27. Beeh KM, Beier J, Koppenhoefer N, et al. Increased glutathione disulfide and nitrosothiols in sputum supernatant of patients with stable COPD. *Chest*. 2004 Oct; 126(4):1116-22.
28. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. Statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(6):788-824.
29. Mastruzzo C, Crimi N, Vancheri C. Role of oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2002 Jun-Aug;57(3-4):173-6. Review.
30. Veith C, Drent M, Bast A. The disturbed redox-balance in pulmonary fibrosis is modulated by the plant flavonoid quercetin. *Boots AW. Toxicol Appl Pharmacol*. 2017 Dec 1;336:40-48. j.taap.2017.10.001. Epub 2017 Oct 4.

31. Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y. Nrf2 protects against pulmonary fibrosis by regulating the lung oxidant level and Th1/Th2 balance. *Respir Res*. 2010 Mar 18;11:31. /1465-9921-11-31.
32. Gao F, Kinnula VL, Myllamiemi M, et al. Extracellular superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb;10(2):343-54. Review.
33. Myllarniemi M, Kaarteenaho R. Pharmacological treatment of idiopathic pulmonary fibrosis - preclinical and clinical studies of irfenidone, nintedanib, and N-acetylcysteine. *Eur Clin Respir J*. 2015 Feb 10;2. /ecrj.v2.26385. eCollection 2015. Review.
34. Martinez JA, King TE JR, Brown K, et al. Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Am J Physiol*. 1997; 273(3):676-83.
35. Radomska-Lesniewska DM, Balan BJ, Skopinski P. Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. *Cent Eur J Immunol*. 2017;42(4):370-376/ceji.2017.72804. Epub 2017 Dec 30. Review.
36. Sebastian A, Prasad MN. Red and blue lights induced oxidative stress tolerance promote cadmium rhizocomplexation in *Oryza sativa*. *J Photochem Photobiol B*. 2014 Aug;137:135-43. /j.jphotobiol.2013.12.011. Epub 2013 Dec 28.
37. Carr AC, Mggini S. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*. 2017 Nov 3;9(11). pii: E1211. Review.
38. Yan B, Ma Z, Shi S, et al. Sulforaphane prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting oxidative stress via nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activation. *Mol Med Rep*. 2017 Jun; 15 (6): 4005-4014 Epub 2017 3 de maio.
39. Kandhare AD, Mukherjee A, Ghosh P, et al. Efficacy of antioxidant in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *EXCLI J*. 2016 Nov 7;15:636-651. eCollection 2016. Review.
40. Wang X, Lai R, Su X, et al. Edaravone attenuates lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome associated early pulmonary fibrosis via amelioration of oxidative stress and transforming growth factor- β 1/Smad3 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):706-712/j.bbrc.2017.10.165. Epub 2017 Nov 2.

41. Landyshev I, Avdeeva N, Goborov N, et al. S. Efficacy of low-intensity irradiation and sodium nedocromil in the complex treatment of patients with bronchial asthma. *Ter Arkh*, v. 74, p. 25-28, 2002
42. Aimbire F, Jordal B. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers Surg Med.*, v. 38, n. 8, p. 773-8; 2006.
43. Oliveira MC JR, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B.*, 4;134C:57-63, 2014.
44. Silva VR, Marcondes P, Silva M, et al. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol.*, n. 1, v. 194:, p. 37-48, 2014.
45. De Mattos LH, Álvarez LE, Yamada AL, et al. Effect of phototherapy with light-emitting diodes (890 nm) on tendon repair: an experimental model in sheep. *Lasers Med Sci* 30(1):193-201.
46. Helringle C, De Carvalho PD, Casalechi HL, et al. Effects of low-intensity non-coherent light therapy on the inflammatory process in the calcaneal tendon of ovariectomized rats. *Lasers Med Sci.*;31(1):33-40.
47. Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed. Laser Surg.* 2005; v. 23, n. 3, p. 289-294.
48. Miranda da Silva C, Peres Leal M, Brochetti RA et al. Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS One.* 2015 Nov 16;10(11):e0142816.
49. Glickman G. Light therapy for seasonal affective disorder with blue narrow-band light-emitting diodes (leds). *Society of Biological Psychiatry*, v.59, p.502- 507, 2006.
50. Costa SG, Barioni ED, Ignácio A, et al. Beneficial effects of Red Light-Emitting Diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. *Sci Rep.* 2017 Oct 4;7(1):12670. s41598-017-13117-5.
51. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci.* 2017 Nov;32(8):1825-1834. s10103-017-2281-z. Epub 2017 Jul 16.

52. Siqueira VPC, Evangelista MIS, Dos Santos A, et al. Light Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin./1574884713666180301091612. Dec;10(12):1683-1693. J Biophotonics. 2017.
53. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. Lasers Med Sci. 2017 Nov;32(8):1825-1834. s10103-017-2281-z. Epub 2017 Jul 16.
54. Siqueira VPC, Evangelista MIS, Dos Santos A, et al. Light- Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. J Biophotonics. 2017 Dec;10(12):1683-1693. /jbio.201600247. Epub 2017 Apr 18.
55. Costa SG, Barioni ED, Ignácio A, et al. Beneficial effects of Red Light-Emitting Diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. Sci Rep. 2017 Oct 4;7(1):12670. s41598-017-13117-5.
56. Liu T, Xie Y, Xu M, et al. Protective effect of thalidomide on ALI induced by paraquat poisoning in rats and its mechanism. 2017 Nov;29(11):977-981. cma.j.issn.2095-4352.2017.11.004. Chinese.
57. Shao X. "Effects of Rapamycin against Paraquat-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice". Journal of Zhejiang University. Science. B 16.1 (2015): 52-61. PMC. Web. 11 Mar. 2018.
58. Liu Z, Sun M, Wang Y, et al. Silymarin attenuated paraquat-induced cytotoxicity in macrophage by regulating Trx/TXNIP complex, inhibiting NLRP3 inflammasome activation and apoptosis. Toxicol In Vitro. 2018 Feb;46:265-272. /j.tiv.2017.10.017. Epub 2017 Oct 17.
59. Kaya V, Yaskan R, Yildiny M, et al. The relation of radiation-induced pulmonary fibrosis with stress and the efficiency of antioxidant treatment: an experimental study. Med Sci Monit. 2014 Feb 21;20:290-6. MSM.890334.
60. Ley B, Collard H.R, King T.E JR. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med, 2011 183 (4); 431- 40.
61. Zhang J, Liu KX, Gao W, et al. The roles of TSP-1 and its receptor CD47 in pathogenesis of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats.

- Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. 2017 Dec 20;35(12):881-887. cma.j.issn.1001-9391.2017.12.001. Chinese.
62. Li T, Yang X, Sin S, et al. Paraquat poisoning induced pulmonary epithelial mesenchymal transition through Notch1 pathway. *Sci Rep*. 2017 Apr 19;7(1):924. /s41598-017-01069-9.
 63. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci*. 2017 Nov;32(8):1825-1834. s10103-017-2281-z. Epub 2017 Jul 16.
 64. Li Y, Li G. Is Vitamin C Beneficial to Patients with CAP? *Curr Infect Dis Rep*. 2016 Aug;18(8):24. 11908-016-0530-0. Review.
 65. Kaya V, Yaskan R, Yildiny M, et al. The relation of radiation-induced pulmonary fibrosis with stress and the efficiency of antioxidant treatment: an experimental study. *Med Sci Monit*. 2014 Feb 21;20:290-6. MSM.890334.
 66. Hemmati AAL, Nazani Z, Ranjbari N, et al. Comparison of the preventive effect of vitamin C and E on hexavalent chromium induced pulmonary fibrosis in rat. *Inflammopharmacology*. 2008 Aug;16(4):195-7. s10787-008-7004-4
 67. Galvão AM, Wanderley MS, Silva RA, et al. Intratracheal co-administration of antioxidants and ceftriaxone reduces pulmonary injury and mortality rate in an experimental model of sepsis. *Respirologia*. 2014 outubro; 19 (7): 1080-7. resp.12363. Epub 2014 14 de Agosto.
 68. Ozturk H, Terzi EH, Kurkner A. The effects of N-acetylcysteine and vitamin C on liver and pulmonary tissue damage in rats following bile duct ligation. *Saudi Med J*. 2008 Nov;29(11):1580-4.
 69. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci*. 2017 Nov;32(8):1825-1834. s10103-017-2281-z. Epub 2017 Jul 16.
 70. Baptista G, Ferreira E, Forestier A. et al. Predictors of 1-year mortality in patients discharged from the hospital following acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Age Ageing*.;35(3):321, 2006.

71. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Dec;15(12):786-801. nrm3904. Review.
72. Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, et al. Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(12):2324-38. Epub 2007 Jul 12.
73. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* 2002; 3:3.
74. Clarke DL, Carthers AM, Mustelin T, et al. Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013 Nov 26;6(1):20. 1755-1536-6-20.

75. Bonna UD P, Georges M, Favrolt N, Camus P. Drug-induced interstitial lung diseases. *Rev Prat.* 2014 Sep;64(7):951-6. Review. French.
76. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci.* 2017 Nov;32(8):1825-1834. s10103-017-2281-z. Epub 2017 Jul 16.