

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

DEPARTAMENTO DE BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS  
CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARLON DA PALMA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA  
RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA  
INDUZIDA POR SEPSE**

São Paulo, 2018

MARLON DA PALMA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA  
RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA  
INDUZIDA POR SEPSE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho como cumprimento das exigências da Universidade para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORA: PROF.<sup>a</sup> DRA. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO

São Paulo, 2018

Cruz, Marlon da Palma.

Avaliação da fotobiomodulação na resolução da inflamação pulmonar aguda induzida por sepse. / Marlon da Palma Cruz. 2018. 74 f.

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

Orientador (a): Dr<sup>a</sup>. Prof<sup>a</sup>. Adriana Lino dos Santos Franco.

1. Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). 2. Fotobiomodulação. 3. Sepse. 4. Resolução inflamatória. 5. Citocinas.

I. Franco, Adriana Lino dos Santos. II. Título.

CDU 615.831

Sao Paulo, 13 de dezembro de 2018

TERMO DE APROVACAO

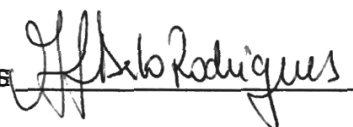
Aluna: Marlon da Palma Cruz

Titulo da Dissertag4o: "Avaliag9o da fotobiomodula ão na resolugãõ da inflamagãõ pulmonar aguda induzida por sepse"

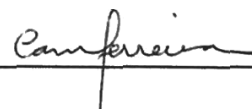
Presidente: PROFº. DR.º ADRIANA LINO DOS SANTOS FI



Membro: PROFº. DR". MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROFº. DRº. CAROLINE MARCANTONIO FER



## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo fornecimento de inteligência, sabedoria, coragem e muita calma para superar todos os obstáculos.

A minha excelentíssima orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Lino dos Santos Franco, eu deixo um enorme agradecimento, pois logo no início, no momento da entrevista ela que me fez acreditar que tudo isso era possível, destaco também todo o apoio prestado, a forma interessada, admirável, valiosa e pela sua grandiosa contribuição para o meu crescimento como pesquisador.

Meu eterno agradecimento por todo o apoio.

Aos meus pais Pedro Alves e Eliani da Palma, pelo suporte nas decisões e pela ajuda nos momentos mais difíceis.

A Universidade Nove de Julho pela oportunidade para elaboração deste projeto.

E a todos os amigos do Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

## RESUMO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é caracterizada por ruptura do endotélio e injúria alveolar decorrente de uma resposta inflamatória pulmonar descontrolada causando o comprometimento da troca gasosa. Dentre os principais causadores da SDRA, destaca-se a sepse, sobretudo em ambientes hospitalares. A restauração da função pulmonar normal é muito complicada e um fenômeno difícil de ser estudado já que a resolução da inflamação é um processo bioquimicamente ativo. O tratamento da SDRA ainda é um problema clínico de saúde, assim novas terapias são necessárias. Nesse sentido a fotobiomodulação vem apresentando bons resultados para diversas doenças com caráter inflamatório, incluindo doenças pulmonares. Tendo em vista que em estudos anteriores observamos que o tratamento com diodo emissor de luz (*Light Emitting Diode*, LED) reduziu a migração de neutrófilos em modelo experimental de SDRA, o presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com LED sobre o processo de resolução da inflamação pulmonar aguda em modelo de SDRA induzida por lipopolissacárideo (LPS). Para tanto, camundongos Balb/c machos adultos foram submetidos ou não à injeção de LPS (*Salmonella abortus equi*, ip) e irradiados ou não com LED 2 e 6 h após a injeção com LPS. Os parâmetros foram investigados 1, 3 e 7 dias após a injeção com LPS. Nossos resultados até o presente momento mostraram que o tratamento com LED foi capaz de atenuar a inflamação pulmonar aguda induzida por sepse, interferindo sistemicamente na mobilização de células de seus compartimentos de reserva como sangue e principalmente medula. Importante que mesmo tendo sido realizadas duas irradiações, os efeitos do LED impactaram alterações até 7 dias após. Ainda, notamos que o LED modulou IL-17A, IL-6, lipoxina A4 e contribuiu para uma menor responsividade traqueal. Nesse contexto, o estudo proposto poderá fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos que medeiam a SDRA, bem como permitirão propor alternativas terapêuticas para esta condição tão importante.

**Palavras Chave:** Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), Fotobiomodulação, Sepse, Resolução inflamatória, Citocinas.

## ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by rupture of the endothelium and alveolar injury as result by an uncontrolled lung inflammatory response causing gas exchange impairment. Among the main causes of ARDS, sepsis is highlighted, especially in hospital. The restoration of normal lung function is very complicated and a phenomenon difficult to be studied, since the resolution of inflammation is a biochemically active process. Treatment of ARDS is still a clinical health problem, so new therapies are needed. In this context, photobiomodulation has been showing good results for several inflammatory diseases, including lung diseases. Considering that in previous studies we observed that the treatment with light emitting diode (LED) reduced neutrophil migration in an experimental ARDS model, the present work aimed to evaluate the effect of treatment with LED on the resolution process of acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS). For this, adult male Bal/c mice were submitted to LPS injection (*Salmonella abortus equi*, ip) and irradiated or not with LED 2 and 6 h after LPS injection. The parameters were investigated 1, 3 and 7 days after LPS injection. Our results showed that LED treatment was able to attenuate acute lung inflammation induced by sepsis, interfering systemically in the mobilization of cells from their reserve compartments as blood and mainly bone marrow. Importantly, even though two irradiations were performed and the effects of LED were observed up to 7 days after. Further, we note that the LED modulated IL-17A, IL-6, lipoxin A4 and contributed to lower tracheal responsiveness. In this context, the proposed study may provide support for the understanding of the mechanisms that mediate ARDS, as well as allow proposing therapeutic alternatives for this important condition.

**Key Words:** Acute respiratory distress syndrome (ARDS), Photobiomodulation, Sepsis, Inflammatory resolution, Cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Parede de bactéria gram-negativa .....	14
<b>Figura 2:</b> Resumo da cascata de ativação via TLR4.....	16
<b>Figura 3:</b> Procedimento – Lavado Femural .....	26
<b>Figura 4:</b> Câmara de Neubauer – Contagem Global de Leucócitos .....	26
<b>Figura 5:</b> Câmara de Neubauer – Contagem Global de Hemácias.....	27
<b>Figura 6:</b> Efeito do tratamento com LED sobre o recrutamento de células totais para o espaço broncoalveolar após inflamação induzida por LPS .....	30
<b>Figura 7:</b> Efeito do tratamento com LED sobre os leucócitos circulantes após inflamação induzida por LPS.....	32
<b>Figura 8:</b> Efeito do tratamento com LED sobre o número de plaquetas no sangue após inflamação induzida por LPS .....	34
<b>Figura 9:</b> Efeito do tratamento com LED sobre as células presentes na medula óssea após inflamação induzida por LPS.....	36
<b>Figura 10:</b> Efeito do tratamento com LED sobre a liberação de IL-6 no fluido do lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS .....	38
<b>Figura 11:</b> Efeito do tratamento com LED sobre a liberação de IL-17 no fluido do lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS .....	40
<b>Figura 12:</b> Efeito do tratamento com LED sobre a liberação de IL-10 no fluido do lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS .....	42
<b>Figura 13:</b> Efeitos do tratamento com LED nos níveis de resolução e liberação de lipoxina e resolvina no LBA após lesão pulmonar aguda.....	44
<b>Figura 14:</b> Efeitos do tratamento com LED na resposta contrátil máxima da traqueia após lesão pulmonar aguda.....	46



## LISTA DE ABREVIACOES

- SDRA:** Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
- ERONS:** Espécies Reativas Derivadas do Oxignio e do Nitrogênio
- SIRS:** Síndrome da Resposta Inflamatória Sistmica
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- PAMPs:** Padrões Moleculares Associados a Patógenos
- TLRs:** *Toll-Like Receptors*
- LBP:** *Lipopolysaccharide Binding Protein*
- MD-2:** *Myeloid Differentiation Protein-2*
- NF  $\kappa$ B:** *Fator Nuclear Kappa B*
- IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 $\beta$
- IL-17:** Interleucina 17
- IL-6:** Interleucina 6
- IL-12:** Interleucina 12
- IL-8:** Interleucina 8
- TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral ‘Alfa’
- TGF- $\beta$ :** Fator de Crescimento Transformador ‘Beta’
- VEGF:** Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- COX-2:** Ciclooxygenase-2
- ICAM-1:** *Intercelular Adhesion Molecule-1*
- VCAM-1:** *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
- iNOS:** xido Ntrico Sintase Induzida
- NETs:** *Neutrophil Extracellular Traps*
- STAT3:** *Signal Transducer and Activation of Transcription 3*
- PAF:** *Platelet Activating Factor*
- PUFA:** cidos Graxos Poli-Insaturados Endógenos
- SPMs:** Mediadores Especializados Pr-Resolução
- LXA4:** Lipoxina A4
- ECMO:** Oxigenação de Membrana Extracorpórea
- LED:** *Light Emitting Diode*
- LBA:** Lavado Broncoalveolar
- IFN- $\gamma$ :** Interferon ‘Gama’
- CXCL1/KC:** Quimiocina Derivada de Queratinócitos

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Fatores de risco da SDRA.....	13
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros do tratamento com LED .....	24

## SUMÁRIO

<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b><u>12</u></b>
1.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA): DEFINIÇÃO E PATOGENIA.....	12
1.2 SEPSE.....	13
1.3 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E RESPOSTA IMUNE.....	14
1.4 RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	17
1.5 FOTOBIMODULAÇÃO: DEFINIÇÃO E SUA INTERAÇÃO COM OS TECIDOS .....	19
<b><u>2. OBJETIVOS</u></b> .....	<b><u>22</u></b>
<b><u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u></b> .....	<b><u>23</u></b>
3.1 ANIMAIS .....	23
3.2 INDUÇÃO DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA) PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) .....	23
3.3 TRATAMENTO COM LED .....	23
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	24
3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LBA.....	25
3.6 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO FEMURAL.....	25
3.7 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS E PLAQUETAS CIRCULANTES NO SANGUE PERIFÉRICO .....	26
3.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E MEDIADORES PRÓ-RESOLUÇÃO NO LAVADO BRONCOALVEOLAR .....	28
3.9 RESPONSIVIDADE DA TRAQUEIA À METACOLINA .....	28
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b><u>4. RESULTADOS</u></b> .....	<b><u>29</u></b>
4.1 TRATAMENTO COM LED REDUZ O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS, PORÉM OS EFEITOS NÃO DURAM MAIS QUE 24 HORAS .....	29

4.2 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A MOBILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS .....	31
4.3 TRATAMENTO COM LED NÃO ALTERA O NÚMERO DE PLAQUETAS NO SANGUE PERIFÉRICO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS .....	33
4.4 TRATAMENTO COM LED MODULA A CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA DE FORMA DIFERENTE TEMPORALMENTE EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS .....	35
4.5 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A LIBERAÇÃO DE IL-6 APÓS 3 DIAS DA INDUÇÃO COM LPS .....	37
4.6 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A LIBERAÇÃO DE IL-17 APÓS INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS .....	39
4.7 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A LIBERAÇÃO DE IL-10 APÓS 7 DIAS DA INDUÇÃO COM LPS .....	41
4.8 TRATAMENTO COM LED AUMENTOU A LIBERAÇÃO DE LIPOXINA A4 APÓS 7 DIAS DA INDUÇÃO COM LPS .....	43
4.9 EFEITOS DO TRATAMENTO COM LED NA RESPOSTA CONTRÁTIL MÁXIMA DO MÚSCULO LISO AO ESTÍMO COLINÉRGICO.....	45
<b><u>5. DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>47</b>
<b><u>6. CONCLUSÃO</u></b> .....	<b>54</b>
<b><u>7. REFERÊNCIAS</u></b> .....	<b>55</b>
ANEXO 1: HISTÓRICO ESCOLAR.....	63
ANEXO 2: PROTOCOLO APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL N° AN005/2017 .....	64
ANEXO 3: ARTIGO CIENTÍFICO.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA): DEFINIÇÃO E PATOGENIA

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foi descrita pela primeira vez por Ashbaugh em 1967, cuja causa é multifatorial e associada a índices de mortalidade superiores a 40% <sup>1-2</sup>. Já sua última descrição chamada de definição de Berlim, em reconhecimento da cidade onde a reunião de consenso foi realizada (2012), teve como definição como uma lesão pulmonar aguda, difusa e inflamatória, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e perda de aeração <sup>3</sup>. A resposta inflamatória ocorre devido ao acúmulo de neutrófilos e geração de mediadores tais como proteases, citocinas e espécies reativas derivadas do oxigênio e do nitrogênio (ERONs) <sup>4-5</sup>.

Durante a fase proliferativa da inflamação, mecanismos de reparação são ativados para restaurar a função pulmonar. Se o reparo não tiver sido bem-sucedido devido a contínua lesão por ventilação mecânica ou infecção, o tecido pulmonar se torna fibrótico, fato que se associa com as altas taxas de mortalidade <sup>6</sup>.

A incidência de SDRA pode variar de 1,5 casos/cem mil habitantes em países Europeus para quase 79 casos/cem mil habitantes nos Estados Unidos da América. Já no Brasil as taxas de incidência variam entre 1,8 a 31 casos/cem mil habitantes <sup>7</sup>.

Pacientes internados em hospitais, principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), de forma geral, apresentam redução da competência imune. Deste modo, estímulos secundários como infecções bacterianas presentes no ambiente hospitalar constituem importante fator de risco para o desencadeamento da SDRA <sup>8</sup>.

Tais processos podem ser iniciados por dano direto ao pulmão incluindo pneumonia ou aspiração ou ainda como consequência de um dano endotelial seguido de ativação de neutrófilos o qual pode ser induzido por sepse ou transfusão de sangue <sup>6</sup>.

Na tabela abaixo podemos observar que de acordo com Rao et al. (2014) diversas são as causas associadas com o desenvolvimento da SDRA <sup>9</sup>.

**Tabela 1: Fatores de risco da SDRA**

Lesão pulmonar direta		Lesão pulmonar indireta	
Causas comuns	Causas incomuns	Causas comuns	Causas incomuns
Aspiração do conteúdo gástrico	Embolia gordurosa	Traumas graves com choque e transfusões múltiplas	Circulação extracorpórea
Pneumonia	Contusão pulmonar	Sepse	Pancreatite aguda
	Quase afogamento		Overdose de drogas
	Lesão por inalação		Transfusão de sangue e seus derivados
	Lesão por reperfusão após transplante pulmonar ou emboectomia		

Adaptado de Rao et al.; 2014.

## 12 SEPSE

Frequentemente ocasionada por bactérias Gram-negativas (35% dos casos) a sepse é uma das causas mais comuns de desenvolvimento da SDRA em ambientes hospitalares e representa um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer em associação com grande variedade de eventos não infecciosos, como poli traumatismos, cirurgias e queimaduras <sup>10</sup>.

A sepse acomete pessoas de todas as faixas etárias e gêneros, apesar dos avanços tecnológicos e terapêuticos e está relacionada à alta prevalência de mortalidade, variando entre 30 e 60%. Segundo o Instituto Latino Americano da Sepse, a síndrome é a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI) e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e o câncer <sup>11</sup>.

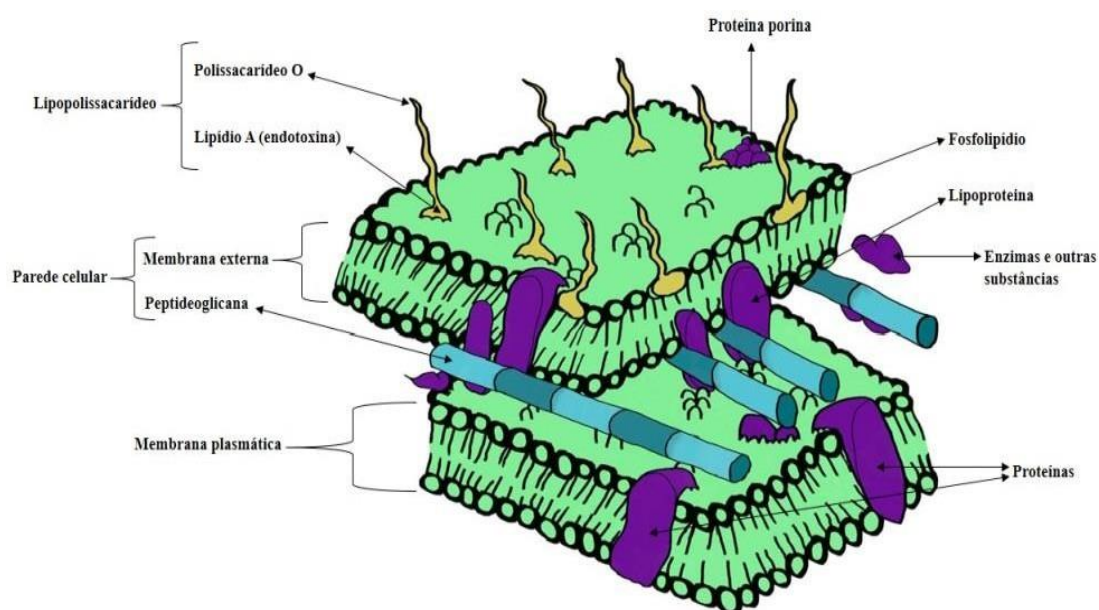
A sepse é uma condição clínica, definida pela Sociedade de Terapia Intensiva Americana, como uma resposta sistêmica à infecção manifestada por dois ou mais

sintomas, tais como alteração da temperatura corporal (acima de 38°C ou abaixo de 36°C), aumento da frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto, aumento da frequência respiratória acima de 20 respirações por minuto ou PaCO<sub>2</sub> menor que 32 mmHg e número de leucócitos no sangue acima de 12000/mm<sup>3</sup> (leucocitose) ou menor que 4000/mm<sup>3</sup> (leucopenia) <sup>10</sup>. De modo geral, a sepse associa-se à indução de SDRA em aproximadamente 40% dos pacientes <sup>12</sup>.

### 13 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E RESPOSTA IMUNE

O lipopolissacarídeo (LPS - *lipopolysaccharide*), descrito por Richard Pfeiffer em 1892 também denominados de endotoxina pode ser classificado como uma das principais moléculas presentes em bactérias e vírus que pode prejudicar o equilíbrio entre a imunidade e as respostas inflamatórias e é parte constituinte da parede de bactérias Gram-negativas <sup>13-14-15</sup>.

É um composto glicolípídico formado por um polissacarídeo hidrofílico (Antígeno-O) bastante variável e um domínio hidrofóbico altamente conservado, conhecido como lipídio A, o qual parece ser o responsável por sua atividade biológica. O LPS representa o maior fator de virulência das bactérias Gram-negativas e é essencial para a sobrevivência bacteriana <sup>16</sup>.



**Figura 1:** Parede de bactéria gram-negativa.

A resposta imune se desenvolve por meio de uma sucessão de mecanismos que visam à proteção do organismo contra patógenos os quais incluem bactérias, vírus, fungos e protozoários. O sistema imune detecta e elimina os microrganismos patogênicos pela discriminação entre as substâncias próprias (*self*) e estranhas (*non-self*) ao organismo<sup>17</sup>. Esses mecanismos de defesa são atribuídos ao organismo pelo sistema imune inato e adaptativo.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos. Os receptores do sistema imune inato podem detectar componentes específicos presentes em bactérias, vírus ou fungos que são designados como "padrões moleculares associados a patógenos" (PAMPs)<sup>16</sup>. As células imunes inatas expressam receptores TLRs (*Toll-like receptors*) que desempenham papéis críticos em reconhecimento de vários padrões moleculares associados aos patógenos. A partir desse reconhecimento ocorre a expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras a fim de eliminar esses agentes<sup>18-19-20</sup>.

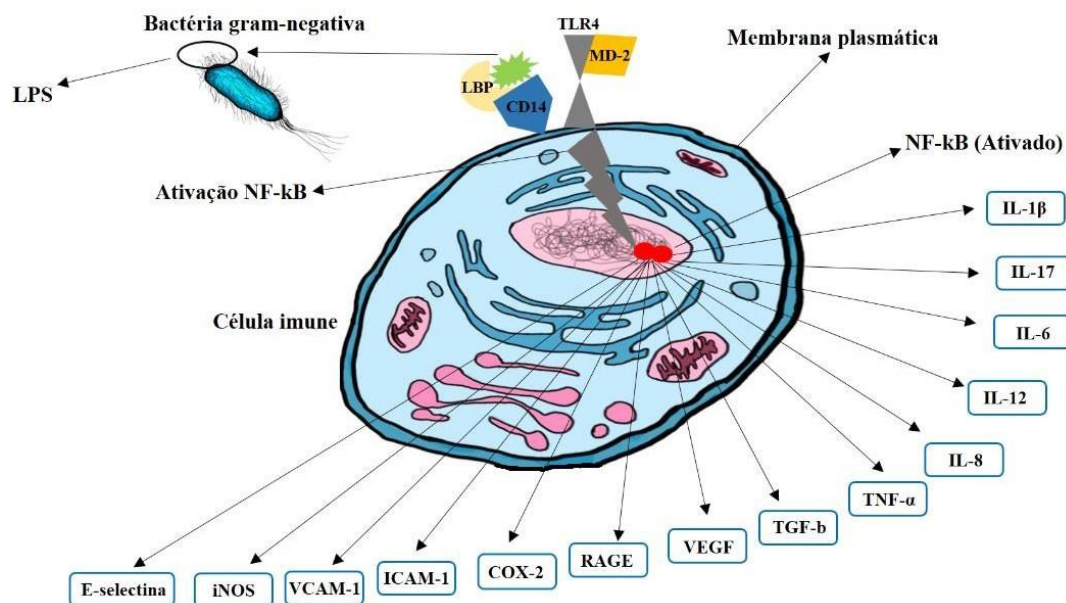
Para que o LPS desencadeie seus efeitos no organismo é necessário que haja sua ligação nesses receptores, principalmente no *Toll-like receptor 4* (TLR4), o qual foi descrito por Poltorak et al. (1998) como o receptor para o LPS. No entanto, para que o LPS acione a cascata de sinalização via TLR4 são necessárias também outras moléculas. Estudos mostram que o LPS se liga a uma proteína sérica denominada LBP (*lipopolysaccharide binding protein*) e este complexo se acopla aos receptores CD14, os quais são proteínas localizadas na membrana de células do sistema imune fundamental no reconhecimento do LPS<sup>21-22</sup>.

É interessante notar que o CD14 não possui domínio intracelular e, portanto, não pode induzir ativação celular sem que um receptor de sinal transmembrana seja acionado. Nesse contexto, estudos demonstram que o TLR4 desempenha esta função. O TLR4, juntamente com a proteína MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) aumenta a resposta celular ao LPS<sup>23</sup>.

A partir da ativação do TLR4 (pelo complexo LPS + LBP + CD14 + TLR4 + MD2) inicia-se uma cascata de sinalização que vai desencadear a ativação de um indutor da inflamação denominado fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*). O NF- $\kappa$ B por sua vez, exerce importante papel na sepse e na SDRA. Este fator de transcrição, quando ativado, parece ser responsável pelas expressões de diversos genes pró-inflamatórias<sup>24</sup>. Dentre os genes regulados pelo NF- $\kappa$ B, destacam-se as interleucinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-6, IL-12, IL-8, TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), fatores de



crescimento como TGF- $\beta$  e VEGF entre outras; enzima COX-2 (*ciclooxigenase-2*), moléculas de adesão, tais como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e E-selectina, além de enzimas envolvidas na atividade microbicida, como a iNOS (*óxido nítrico sintase induzida*)<sup>25-26</sup>.



**Figura 2:** Resumo da cascata de ativação via TLR4; O LPS da parede da bactéria Gram-negativa se liga ao LBP e este se acopla aos receptores CD14, o TLR4 se liga a proteína MD-2 aumentando a responsividade ao LPS, iniciando a cascata de sinalização ativando o NF-kB.

Após a ativação do TLR e geração de mediadores, há um maciço recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, sobretudo de neutrófilos. O infiltrado neutrofílico no espaço alveolar tem sido observado na SDRA e se correlaciona com o grau de hipoxemia e permeabilidade vascular pulmonar<sup>27</sup>. Ainda, a ativação e migração de neutrófilos é um marcador da progressão da SDRA. O excessivo recrutamento de neutrófilos observado na SDRA parece ocorrer devido a um estímulo noxônico através do aumento das *traps* extracelulares (NETs), as quais são envolvidas com mecanismo de danos pulmonares<sup>28-29</sup>.

Os neutrófilos apresentam vesículas secretórias as quais tem relevante papel na SDRA através da liberação de elastase e ERONs<sup>30-31</sup>. Ainda, a inflamação neutrofílica é provavelmente o componente chave do aumento de morte celular epitelial pela ação de

RONs derivadas da NADPH oxidase e mediada por STAT3 (*signal transducer and activation of transcription 3*)<sup>32</sup>.

Os mecanismos subjacentes à inflamação pulmonar aguda decorrente da inflamação sistêmica podem ser investigados experimentalmente pela administração de LPS por via sistêmica a animais de laboratório<sup>33</sup>.

O LPS mostrou ser o agente mais potente, conhecido por induzir mudanças na função fagocitária mononuclear, além disso, se inalado induz respostas inflamatórias no sistema respiratório, tais como, aumento da permeabilidade microvascular na circulação brônquica e pulmonar e recrutamento de neutrófilos no espaço aéreo. A exposição sistêmica a endotoxinas (LPS) resulta na liberação de numerosos mediadores inflamatórios no pulmão, incluindo aqueles liberados por monócitos/macrófagos e neutrófilos resultando em uma lesão pulmonar. Tal modelo desenvolve a lesão inflamatória principalmente por infiltração neutrofílica pulmonar e é potencializada por diversas citocinas, entre os quais se destacam IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e mediadores lipídicos, tais como eicosanóides e PAF (*platelet-activating factor*).

Ocorre também aumento da pressão arterial pulmonar, hipoxemia e edema alveolar e intestinal<sup>34</sup>. Estes efeitos observados nos modelos experimentais são similares aos sinais apresentados por pacientes quando acometidos da SDRA, assim o LPS é utilizado como um modelo de estudos para a inflamação pulmonar aguda<sup>35-36</sup>.

## 14 RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Durante a inflamação, diversos mediadores têm sido identificados em sítios inflamatórios e exercem importante papel na resolução da resposta inflamatória<sup>37-38-39</sup>. Tais mediadores são potentes reguladores do infiltrado de células inflamatórias, produção de citocinas e quimiocinas e clearance de neutrófilos apoptóticos, promovendo assim a restauração da homeostasia no tecido. Este processo parece ser crucial a diversas doenças pulmonares, as quais são caracterizadas por inflamação e significativo aumento da morbidade<sup>40</sup>.

É bem estabelecido que a resolução da inflamação é um processo bioquimicamente ativo, regulado em parte por mediadores derivados de ácidos graxos poli-insaturados endógenos (PUFA) funcionando como potentes agonistas de resolução local<sup>41-42</sup>.

Recentemente, uma nova matriz de moléculas que atuam na resolução da inflamação foi elucidada e denominada de mediadores especializados pró-resolução (SPMs). Muitas dessas SPMs são produzidas durante a resposta inflamatória aguda e sua estrutura, biossíntese e síntese orgânica foram revisadas recentemente <sup>43</sup>. Novas famílias de mediadores, incluindo lipoxinas, resolvinas e maresinas representam um novo gênero de mediadores especializados em restaurar a homeostasia <sup>44</sup>.

As lipoxinas são mediadores especializados pró-resolução (SPMs) que atuam localmente de forma parácrina ou autócrina e são metabolizados rapidamente. Eles dirigem respostas celulares potentes para atenuar a inflamação e restaurar a homeostase <sup>45</sup>. Estudos mostram diminuição da Lipoxina A4 (LXA4) nas vias aéreas de pacientes com fibrose pulmonar <sup>46-47-48</sup>.

As resolvinas são igualmente moléculas lipídicas recém-identificadas que promovem a resolução de processos inflamatórios modulando a inflamação neutrofílica, aumentando o clearance de neutrófilos apoptóticos e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias/ quimiocinas como a IL-8 <sup>49</sup>.

Para que ocorra a resolução efetiva nos tecidos, a cessação do recrutamento de granulócitos é necessária em conjunto com o recrutamento e diferenciação de macrófagos, que ajudam a limpar células inflamatórias e detritos de tecido para restaurar a homeostase dos tecidos. Os granulócitos no tecido sofrem apoptose durante a resolução da inflamação para prevenir a lesão do tecido adjacente que ocorre na liberação de conteúdo celular potencialmente tóxico <sup>43</sup>.

As lipoxinas bem como as resolvinas agem contra injúria oxidativa e contribuem para o restabelecimento da permeabilidade vascular reduzindo assim o edema <sup>50-51-52</sup>. Recentes estudos têm mostrado que a resolvina D1 desempenha importante efeito antioxidante, anti-inflamatório e ações pró-resolutivas as quais foram demonstradas em modelos animais de SDRA <sup>53-54-55</sup>.

A restauração da função pulmonar normal é muito complicada e um fenômeno difícil de ser estudado. A redução do edema, clearance de neutrófilos e reparo da barreira alveolar são pré-requisitos para restabelecimento da homeostasia pulmonar. Os mecanismos envolvidos neste processo na SDRA são pouco conhecidos e necessários para o sucesso da terapia. Assim, estudos que visem a compreensão de mecanismos envolvidos no processo de resolução inflamatório na SDRA são relevantes.

Diversos estudos têm possibilitado uma melhor compreensão a respeito das diversas facetas da síndrome do desconforto respiratório agudo. À medida que o conhecimento se acumula, há também um aumento de possíveis alvos terapêuticos.

O tratamento da SDRA é um problema clínico de saúde, pois os anti-inflamatórios são ineficazes<sup>56-57-58-59</sup>. Abordagens adicionais, como ventilação mecânica com baixo volume, posição prona (face para baixo), bem como oxigenação de membrana extracorpórea (ECMO) incluem o tratamento clínico. No entanto, esses tratamentos exigem alto custo e não são eficientes<sup>56</sup>. Portanto, novas terapias são necessárias.

## **15 FOTOBIMODULAÇÃO: DEFINIÇÃO E SUA INTERAÇÃO COM OS TECIDOS**

Fotobiomodulação pode ser definida como uma terapia baseada nos efeitos de diferentes tipos de luz sobre células e tecidos. Tal termo refere-se à modulação porque dependendo do comprimento de onda os efeitos podem ser inibitórios ou estimulantes.

A Luz é definida como uma radiação eletromagnética. Assim, as frequências com que estes campos elétricos e magnéticos oscilam determinam a ‘cor’ da luz de modo que temos um espectro de cores visíveis aos olhos humanos o qual preenche uma pequena região de comprimentos de onda dentro do espectro eletromagnético, sendo denominada a região do espectro visível aproximadamente 400-700 nm<sup>60-61</sup>.

A interação sobre a matéria decorre da ‘natureza elétrica’ da mesma. Quando a luz se propaga através do tecido, passa por uma série de interações dependendo do arranjo estrutural e as propriedades físicas do microambiente. Em contato com o tecido, os fótons em comprimento de ondas visíveis e infravermelhos são altamente dispersos, resultando em uma difusão de fótons; isto é, os fótons não se propagam ao longo de linhas retas, mas seguem padrões de difusão, além disso, a intensidade da luz é reduzida depois de passar através do tecido, como regra geral, há uma perda de aproximadamente 10 vezes da intensidade dos fótons para cada centímetro de profundidade do tecido<sup>61</sup>.

Luz com comprimento de onda de 635 nm é capaz de penetrar na pele em aproximadamente 6 mm, a profundidade terapeuticamente efetiva, entretanto, parece estar próxima de 1-3 mm, quando utilizamos luz em comprimento de 635 nm. Sendo capaz de provocar várias modificações em moléculas biológicas, o que pode ou não resultar em benefícios para diversas rotas metabólicas, acelerando-as ou provocando desvios do seu curso natural. Fato é que modernamente o campo das fototerapias cresce

numa velocidade elevada, principalmente pelo nível de sofisticação com que se podem produzir fontes luminosas como LASERS (*amplificação da luz por emissão estimulada de radiação*) e LEDS (Diodo emissor de luz) <sup>62-60</sup>.

A fotobiomodulação emerge como uma terapia coadjuvante, apresentando bons resultados para diversas doenças com caráter inflamatório, incluindo doenças pulmonares.

Mais especificamente os LEDs são diodos semicondutores que estão sendo utilizados experimentalmente para tratamento de diversas doenças pulmonares incluindo asma, fibrose pulmonar e SDRA <sup>63-64-65-66</sup>. A emissão de luz é monocromática, não coerente e não colimada e é bem usada na terapia de diversas doenças de caráter inflamatório <sup>67</sup>. A LED terapia tem se mostrado eficiente e possibilitou uma alternativa eficaz a luz 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 em baixa intensidade atua sobre as células interferindo na sua permeabilidade, atua nas mitocôndrias, na síntese de ATP e em proteínas como colágeno e elastina. Age ainda como antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante <sup>67-68-69</sup>. Apesar de a LED terapia ainda ser pouco estudada, alguns trabalhos já mostram algumas vantagens em relação a LASER terapia. No entanto, em doenças pulmonares poucos são os estudos usando esta terapia. Nosso grupo vem avançando e obtendo ótimos e promissores resultados com a biofotomodulação para tratamento em diferentes modelos de doença pulmonar.

Recentemente mostramos que o tratamento com LED reduziu o influxo de neutrófilos induzido por LPS, diminuiu os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A e aumentou os níveis de IFN-gama no fluido do lavado broncoalveolar (LBA). Além disso, o tratamento com LED aumentou os níveis de RNAm de IL-10 e IFN-gama, reduziu parcialmente o burst oxidativo elevado e aumentou a expressão de anexina V contribuindo para a menor migração de neutrófilos. Não foram observadas diferenças na ativação da expressão de NF-kappa B, TLR4, edema e produção de muco <sup>65</sup>. Assim, nossos dados mostraram, pela primeira vez, o efeito benéfico do tratamento com LED sobre a SDRA induzida por sepse. Além disso, também mostramos que, embora o tratamento com LED tenha ocorrido localmente (no aparelho respiratório) foi capaz também de alterar o perfil dos neutrófilos no sangue. Sabe-se que a sepse causa

leucopenia, caracterizada por um declínio das células mononucleares, acompanhada pelo aumento de neutrófilos no sangue <sup>65</sup>.

Outros estudos realizados por Cardoso Siqueira et al. (2017) usando modelo experimental de asma mostraram redução do infiltrado celular nos pulmões, redução de muco, edema e da resposta contráctil da traqueia após tratamento com LED. Tais efeitos foram modulados por IL-10, IFN-gama e por mastócitos. Ainda, usando modelo experimental de fibrose pulmonar, nosso grupo mostrou que a terapia com LED melhora os parâmetros inflamatórios e fibróticos apresentando-se como uma terapia promissora com baixo custo e ausência de efeitos colaterais. Nesses estudos mostramos que o tratamento com LED reduziu significativamente o número de células inflamatórias no espaço alveolar, produção de colágeno, espessamento intersticial e elastância pulmonar estática e dinâmica. Além disso, observamos níveis reduzidos de IL-6 e CXCL1/KC liberados por pneumócitos em cultura <sup>63-64</sup>.

Tais resultados podem ser considerados promissores e nesse sentido propomos através do presente projeto a continuação deste estudo visando maior compreensão dos mecanismos operantes da LED terapia no que tange o processo de resolução da SDRA.

Como visto anteriormente a inflamação neutrofílica é crucial para o desenvolvimento e agravamento desta patologia assim como o processo de resolução da inflamação é um processo ativo e regulador da sua intensidade e duração. Deste modo, pretendemos estudar os efeitos da LED terapia sobre a resolução da inflamação pulmonar. Nesse contexto, o estudo proposto poderá fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos que medeiam a SDRA, bem como permitirão propor alternativas terapêuticas para essa importante condição clínica.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista que a SDRA é uma importante patologia com alta mortalidade e que a LED terapia é uma ferramenta de tratamento promissora, o presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito da terapia com LED sobre o processo de resolução da inflamação pulmonar aguda. Para isso foram investigados os parâmetros abaixo:

- Avaliação dos leucócitos e plaquetas no sangue periférico;
- Determinação do número de células na medula óssea;
- Contagem do número de células migradas para o espaço broncoalveolar;
- Avaliação da liberação de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar;
- Responsividade traqueal à metacolina.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 60 camundongos Balb/c machos adultos (~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). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA – AN0005/2017).

#### **3.2 INDUÇÃO DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA) PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)**

Camundongos Balb/c machos adultos (~ 20g) foram submetidos à injeção de lipopolissacárideo (LPS) por via intraperitoneal (5mg/kg; *Salmonella abortus equi*) ou seu veículo (solução salina) para animais controle. A dose escolhida foi baseada em trabalhos anteriores<sup>70-65</sup>. Após 1, 3 e 7 dias da administração de LPS as análises foram realizadas. Os animais foram eutanasiados com anestesia (quetamina + xilazina 100 and 10 mg/K g; ip) seguida de exsanguinamento da aorta abdominal.

#### **3.3 TRATAMENTO COM LED**

Os camundongos foram irradiados com LED 2 e 6 horas após a administração de LPS ou salina diretamente com contato na pele na região do aparelho respiratório abrangendo traqueia e lobos pulmonares direito e esquerdo conforme estudos anteriores<sup>65-63-64-66</sup>. Abaixo segue a tabela com parâmetros que foram utilizados:



**Tabela 2. Parâmetros do tratamento com LED.**

<b>BIOLAMBDA LEDSA BR- MODELO BLACKBOX MINI, SÃO PAULO, BRASIL.</b>	
<b>1 – Potência Radiante</b>	<b>160 mW</b>
<b>2 – Emissão</b>	<b>Continua (cw)</b>
<b>3 – Comprimento de onda</b>	<b>660 nm</b>
<b>4 – Emissão radiante total</b>	<b>24 J</b>
<b>5 – Área de feixe saída ou spot área</b>	<b>4.15 cm<sup>2</sup></b>
<b>6 – Densidade de energia</b>	<b>5.8 J cm<sup>2</sup></b>
<b>7 – Densidade de potência</b>	<b>38.5 mW/cm<sup>2</sup></b>
<b>8 – Tempo de exposição</b>	<b>152 segundos</b>
<b>9 – Pontos irradiados</b>	<b>1 ponto</b>
<b>10 – Método de irradiação</b>	<b>Contato direto na pele</b>
<b>11 – Localização anatômica</b>	<b>Traqueia e pulmões</b>
<b>12 – Ritmo de irradiação</b>	<b>Pontual</b>
<b>13 – Número de tratamentos</b>	<b>1 Dia, duas aplicações</b>
<b>14 – Propriedades ópticas do tecido</b>	<b>Tecido sadio - camundongo Balb/c</b>

### **34 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Usamos em nosso estudo 7 grupos experimentais uma vez que nosso intuito foi avaliar o curso do processo de resolução pulmonar. Deste modo, analisamos os parâmetros locais e sistêmicos após 1, 3 e 7 dias da indução da SDRA. Seguem os grupos abaixo:

- **Grupo Basal:** Camundongos não manipulados;
- **Grupo LPS 1:** Camundongos submetidos a injeção com LPS e os experimentos realizados 1 dia após;
- **Grupo LPS 3:** Camundongos submetidos a injeção com LPS e os experimentos realizados 3 dias após;
- **Grupo LPS 7:** Camundongos submetidos a injeção com LPS e os experimentos realizados 7 dias após;
- **Grupo LPS + LED 1:** Camundongos submetidos a injeção de LPS e irradiados com LED e os experimentos realizados após 1 dia;
- **Grupo LPS + LED 3:** Camundongos submetidos a injeção de LPS e irradiados com LED e os experimentos realizados após 3 dias;
- **Grupo LPS + LED 7:** Camundongos submetidos a injeção de LPS e irradiados com LED e os experimentos realizados após 7 dias;

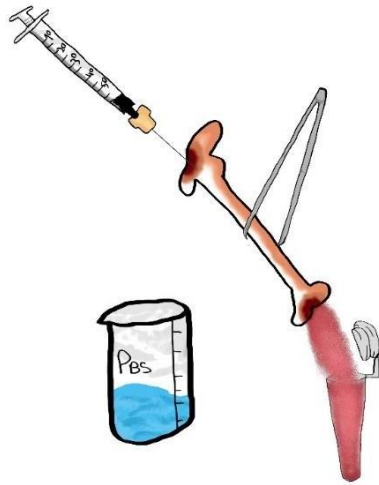
### **35 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LBA**

Após 1, 3 e 7 dias da administração as células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no espaço broncoalveolar foram obtidas pela técnica de lavado broncoalveolar (LBA) de acordo com De Lima et al. (1992) <sup>71</sup>. Para tanto, os animais foram anestesiados e a cavidade peritoneal exposta para realização do dessangramento da aorta abdominal. Foi feita incisão longitudinal na região cérico-ventral e a traqueia 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 anti-inflamatórios e o botão ressuspenso em 1 ml de PBS para contagem de células totais em câmara de Neubauer.

### **36 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO FEMORAL**

Células da medula óssea foram obtidas a partir da lavagem da cavidade femoral. Decorridos 1,3 e 7 dias da injeção com LPS os animais foram anestesiados e sacrificados por dessangramento (secção da aorta abdominal). O fêmur esquerdo foi retirado e com o auxílio de uma pinça foi mantido sobre um tubo de eppendorf. Em seguida o canal medular foi perfundido com PBS (3 ml) utilizando uma seringa plástica. A suspensão medular obtida foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta automática e centrifugada a 1.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspenso em 1ml de PBS e contadas em câmara de Neubauer.



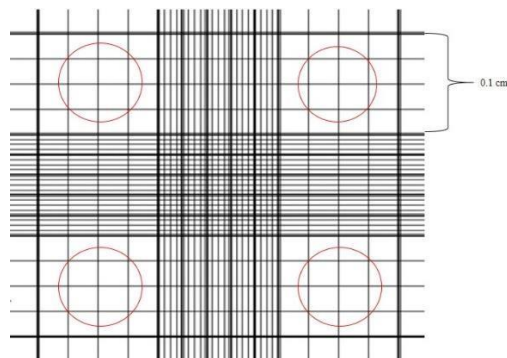
**Figura 3:** Procedimento – Lavado Femoral

### 37 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS E PLAQUETAS CIRCULANTES NO SANGUE PERIFÉRICO

A quantificação das células do sangue foi feita através dos seguintes métodos:

- Contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer (Solução de Turk):

Foi coletado 20 microlitros de sangue e o mesmo foi diluído em 380 microlitros da Solução de Turk, (Diluição 1:20). Então foi fixado a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preenchida com o sangue diluído, assim, foi contado o número de leucócitos presentes nos 4 quadrantes indicados na imagem abaixo, e multiplicado o valor total encontrado por 50.



**Figura 4:** Câmara de Neubauer – Contagem Global de Leucócitos

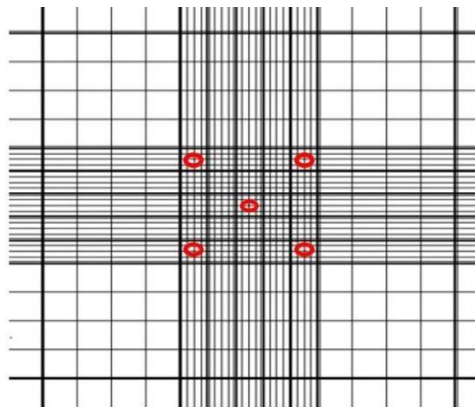
**Cada quadrante possui uma área de 0,1 cm, 4 quadrantes = 0,4 cm, logo, 20 (fator de diluição) / 0,4 = 50**

- Contagem diferencial de leucócitos;

Após a confecção do esfregaço sanguíneo o mesmo foi corado utilizando Metanol (fixador, lâmina submersa por 5 min), Eosina (corante, lâmina submersa por 30 segundos) e Azul de Metileno (corante, lâmina submersa por 60 segundos), feito isso foi realizado a contagem diferencial de Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos e Eosinófilos.

- Contagem global de plaquetas utilizando o método de fônio:

Foi primeiro determinado a quantidade total de hemácias através da câmara de Neubauer (método hemocítometro em câmara de Neubauer) utilizando 3980 microlitros da solução de Hayem e 20 microlitros de sangue (diluição de 1:200). Então foi fixado a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preenchida com o sangue diluído, assim, foi contado o número de hemácias presentes nos 5 quadrantes indicados na imagem abaixo, e multiplicado o valor total encontrado por 10,000.



**Figura 5:** Câmara de Neubauer – Contagem Global de Hemácias

Após a determinação da quantidade total de hemácias, foi realizada a contagem total de plaquetas junto ao esfregaço sanguíneo utilizando a objetiva de imersão, onde foi localizada 5 regiões da lâmina com uma média de 200 hemácias, e então foi realizado a contagem de plaquetas presentes nessas 5 áreas, feito isso, a quantidade total de plaquetas foi multiplicada pelo número total de hemácias e dividido por 1000 (método de fônio).

### **38 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E MEDIADORES PRÓ-RESOLUÇÃO NO LAVADO BRONCOALVEOLAR**

As Citocinas foram investigadas no fluido BAL. Os resultados foram expressos em pg / ml. IL-17A, IL-6 e IL-10 foram quantificados usando kits ELISA adquiridos da Biologend (San Diego, EUA). Resolvina E2 e lipoxina A4 foram quantificados usando kits ELISA comprados da MyBioSource (Vancouver, Canadá). As determinações foram feitas, em duplicado para cada amostra, usando curvas padrão de acordo com as especificações do fabricante.

### **39 REATIVIDADE DA TRAQUEIA À METACOLINA**

Para investigar os efeitos do LED sobre a resposta contrátil da traqueia, quantificou-se a força isométrica, nos anéis traqueais montados, em um banho de órgão de 15 ml por meio de dois ganchos de aço. A contração da força foi registrada usando um transdutor de deslocamento de força e um registrador gráfico (Powerlab®, Labchart, AD Instruments, Austrália). Os anéis traqueais foram suspensos em banho de órgãos preenchido com aerossol continuamente (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) solução de Krebs-Hanseleit (KH) a 37°C. Após 40 minutos, a tensão traqueal foi ajustada para 0,5 g e fora adicionado metacolina (MCh, 10<sup>-3</sup>M) para obter a máxima resposta contrátil.

#### **3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados das amostras serão submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste Student Newman-Keuls para comparação de todos pares de colunas. As análises estatísticas serão conduzidas utilizando GraphPad Software V.2.01, GraphpadInstat-TM (1990-1993). Os resultados serão expressos como média ± EPM (erro padrão da média). Valores de P<0,05 serão considerados significativos.

## 4 RESULTADOS

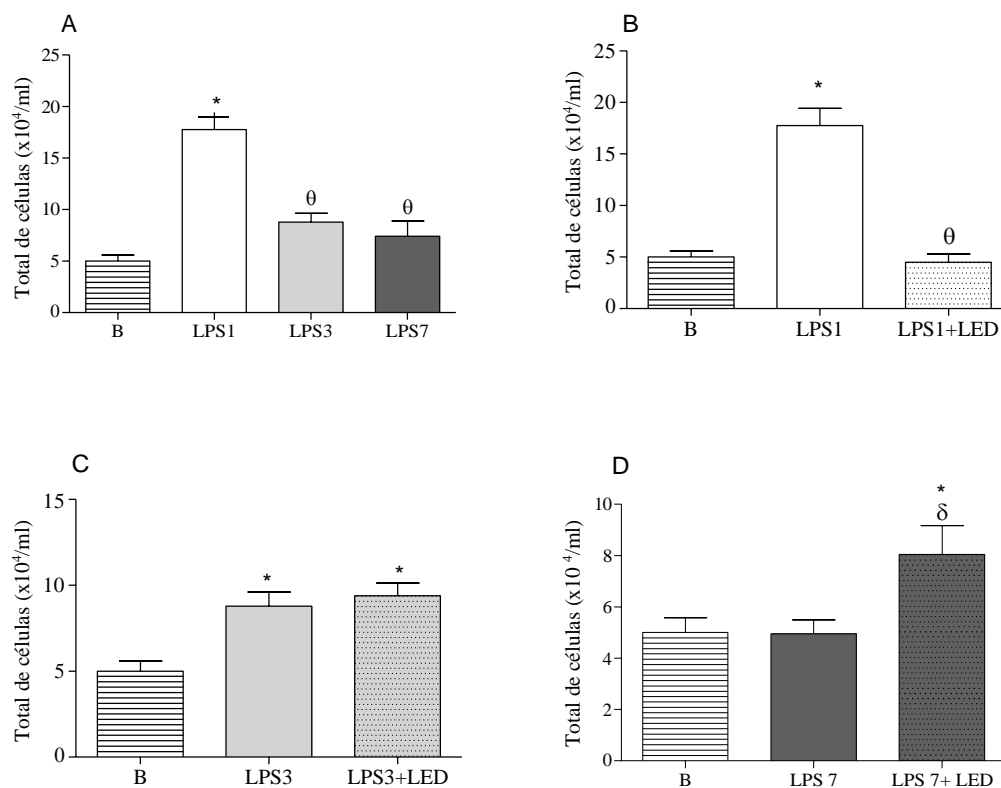
### **41 TRATAMENTO COM LED REDUZ O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS, PORÉM OS EFEITOS NÃO DURAM MAIS QUE 24 HORAS**

A figura 6 (painel A) mostra que o grupo LPS1 (administração de LPS e experimentos realizados após 1 dia) apresentou um aumento significativo de células inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar (LBA) em comparação com o grupo basal. Por outro lado, os grupos LPS3 e LPS7 (experimentos realizados 3 e 7 dias respectivamente) apresentaram redução significativa no influxo de células para o LBA em relação ao grupo LPS1 e não diferiram do grupo basal.

No painel B pudemos observar que o tratamento com LED no grupo LPS1 reduziu significativamente o número de células totais migradas para o LBA quando comparado com o grupo não tratado e não diferiu do grupo basal.

Entretanto, notamos que o tratamento com LED no grupo LPS3 não diferiu em relação ao grupo não tratado, porém permaneceu aumentado em relação ao grupo basal (Painel C).

No painel D mostramos que o tratamento com LED no grupo LPS7 aumentou o número de células recuperadas no LBA em relação aos grupos não tratado e basal.



**Figura 6. Efeito do tratamento com LED sobre o recrutamento de células totais para o espaço broncoalveolar após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda a contagem de células no LBA foi realizada. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Basal;  $\theta P < 0,05$  em relação ao grupo LPS1;  $\delta P < 0,05$  em relação ao grupo LPS7 (ANOVA/Student Newman-Keuls).

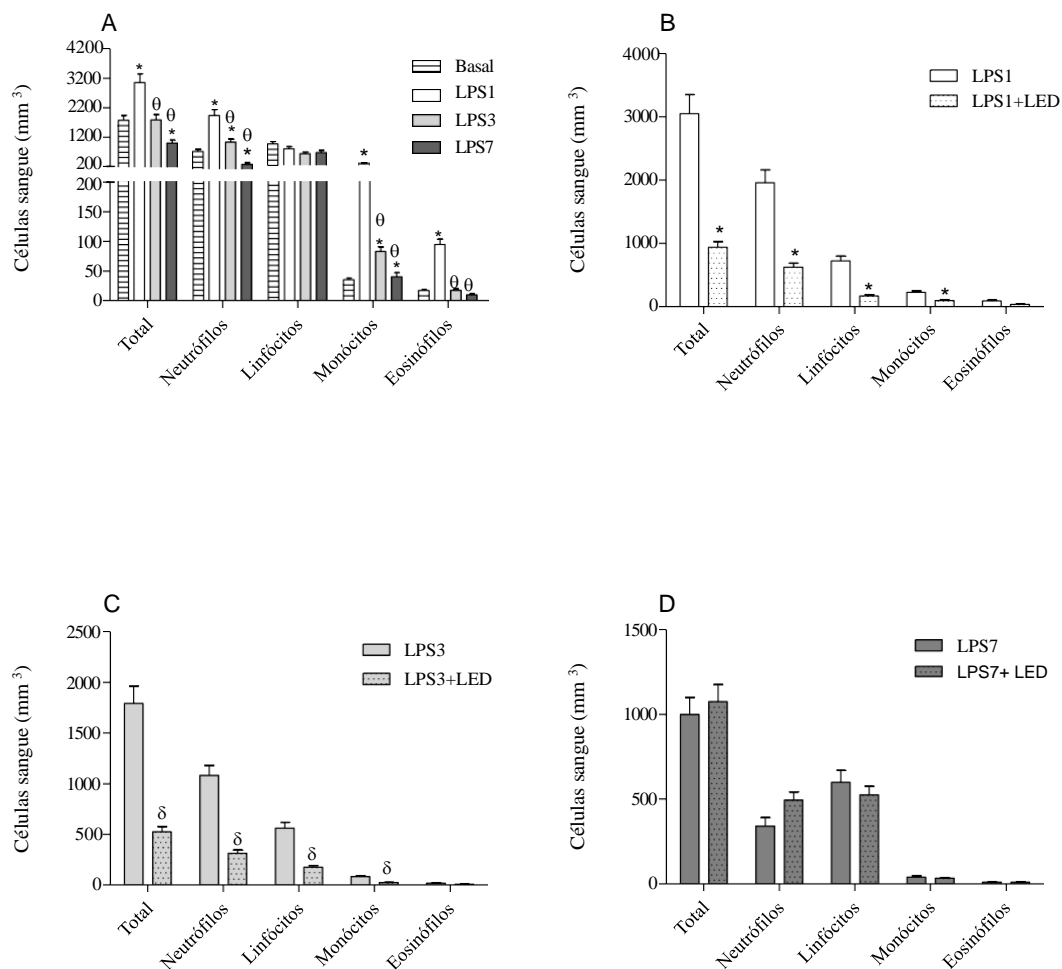
## **42 TRATAMENTO COM LED REDUZ A MOBILIZAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS**

A figura 7 (Painel A) mostra aumento significativo no número de leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e eosinófilos presentes no sangue periférico no grupo LPS1 em relação ao grupo basal. Por outro lado, os grupos LPS3 e LPS7 mostraram redução no número de leucócitos totais, monócitos, neutrófilos e eosinófilos em relação ao grupo LPS1.

Nos painéis B e C podemos observar redução significativa após tratamento com LED nos leucócitos totais, neutrófilos e monócitos em relação aos respectivos grupos não tratados.

Já no painel D nenhuma diferença foi observada em nenhum tipo celular entre os grupos tratado e não tratado.

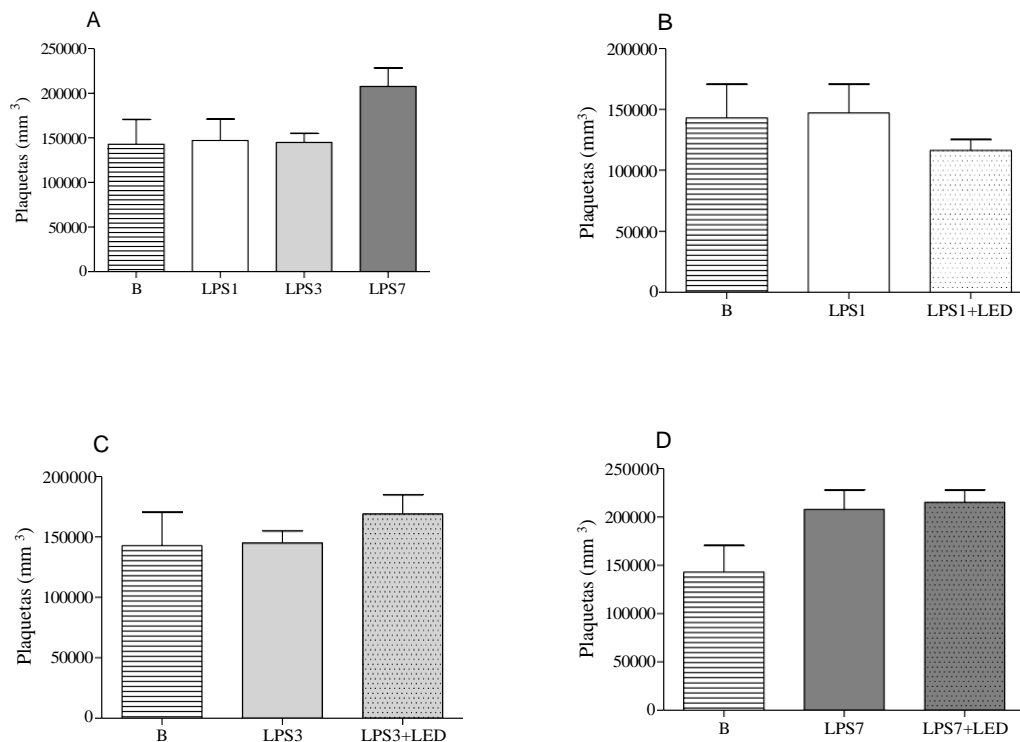




**Figura 7. Efeito do tratamento com LED sobre os leucócitos circulantes após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda a contagem de células no sangue foi realizada. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo basal; <sup>θ</sup> $P < 0,05$  em relação aos grupos LPS1 e 3; <sup>δ</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS3 (ANOVA/Student Newman-Keuls).

### **43 TRATAMENTO COM LED NÃO ALTERA O NÚMERO DE PLAQUETAS NO SANGUE PERIFÉRICO EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS**

A figura 8 (Painéis A, B, C e D) mostrou que os tratamentos com LED em animais tratados com LPS não alteraram o número de plaquetas presentes no sangue periférico em relação aos seus respectivos grupos não tratado. Não houve também diferença em relação ao grupo basal.



**Figura 8. Efeito do tratamento com LED sobre o número de plaquetas no sangue após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda a contagem de plaquetas no sangue foi realizada. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. (ANOVA/Student Newman-Keuls).

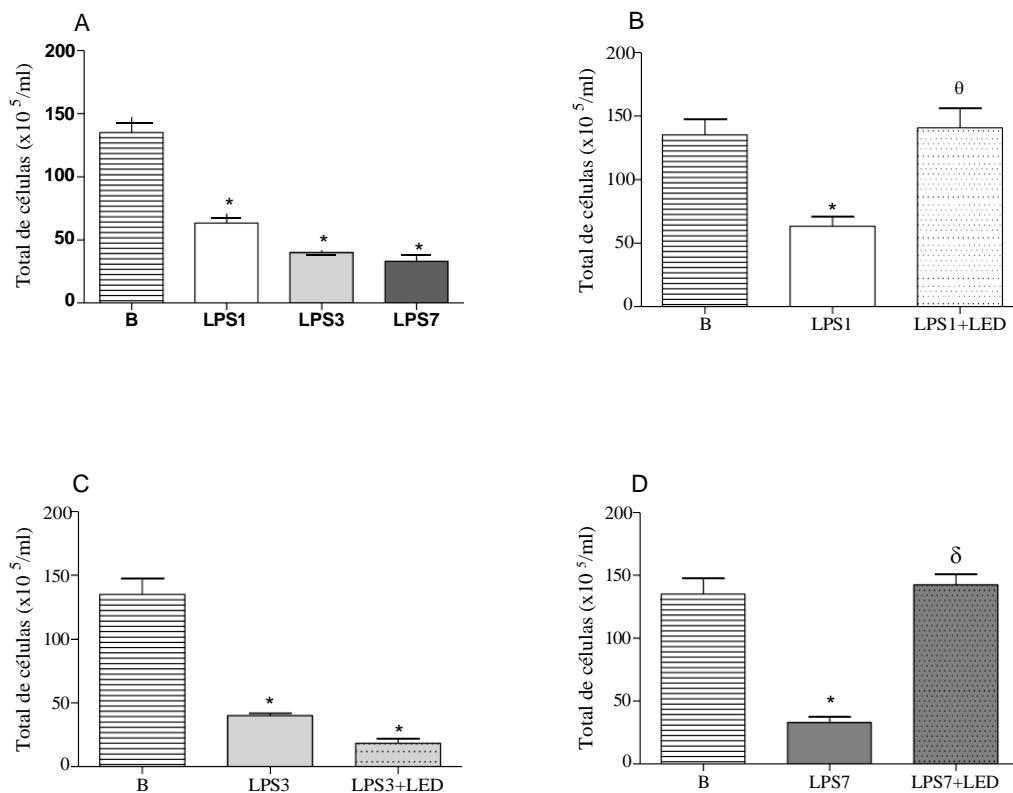
#### **44 TRATAMENTO COM LED MODULA A CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA DE FORMA DIFERENTE TEMPORALMENTE EM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR INDUZIDA POR LPS**

Como pode ser observado na figura 9 (Painel A) a administração de LPS em quaisquer dos tempos de análises (LPS1, 3 e 7) reduziu significativamente o número de células totais presentes na medula óssea em relação ao número obtido pelo grupo basal.

No painel B podemos observar que o tratamento com LED em animais expostos ao LPS aumentou significativamente o número de células presentes na medula óssea em relação ao grupo não tratado, porém não diferiu do grupo basal. Em contrapartida a administração de LPS causou redução no número de células totais da medula óssea quando comparado ao número obtido pelo grupo basal.

Já no painel C pudemos notar que ambos os grupos, tratado com LED (LPS3+LED) e não tratado (LPS3) tiveram redução no número de células presentes na medula óssea em relação ao grupo basal. Ainda, o grupo tratado com LED não diferiu do grupo não tratado.

No painel D podemos observar que o tratamento com LED aumentou a celularidade na medula em relação ao grupo LPS7 e não diferiu do grupo basal.



**Figura 9. Efeito do tratamento com LED sobre as células presentes na medula óssea após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda a contagem de células na medula foi realizada. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Basal; <sup≯</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS1; <sup>̧</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS7 (ANOVA/ Student Newman-Keuls).

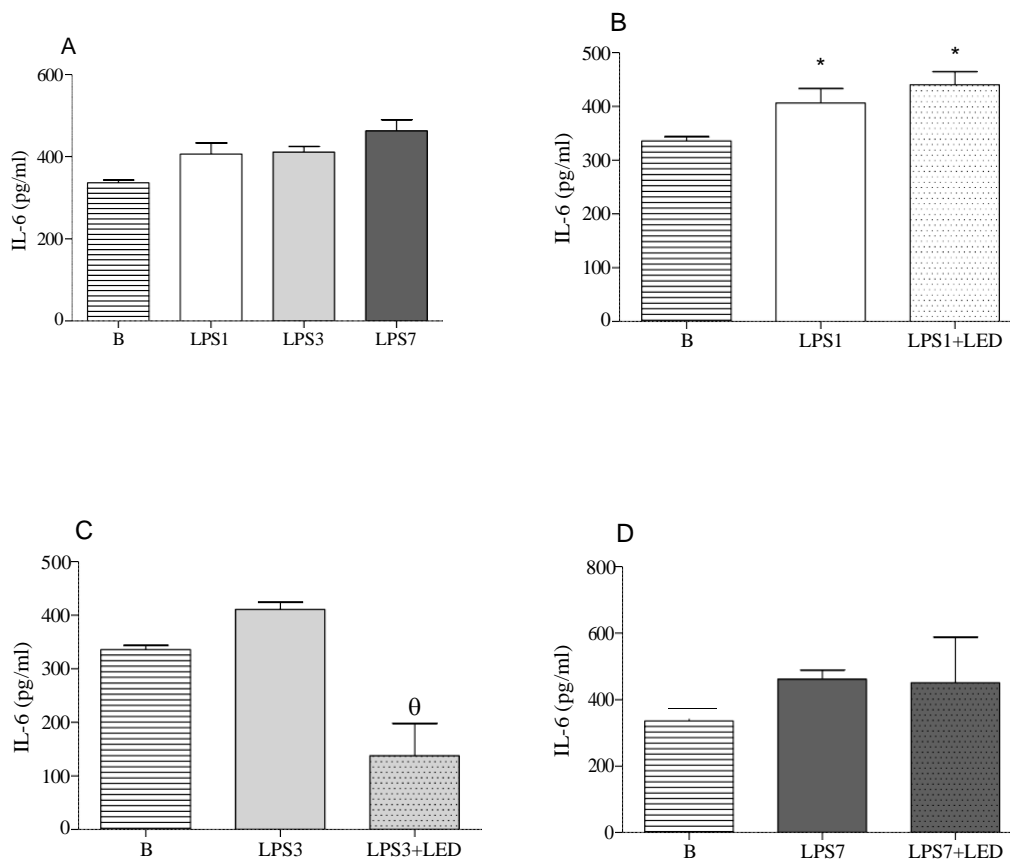
#### **45 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A LIBERAÇÃO DE IL-6 APÓS 3 DIAS DA INDUÇÃO COM LPS**

A Figura 10 (Painel A) mostrou que não houve diferença significativa na liberação de IL-6 entre os grupos de estudo.

No painel B podemos observar que tanto o grupo LPS1 quanto o grupo LPS1+LED tiveram aumento na liberação de IL-6 no fluido do LBA em relação ao valor obtido pelo grupo B. E ainda, não foram observadas diferenças entre os grupos tratado e não tratado.

No painel C mostramos que não houve diferença na liberação de IL-6 entre os grupos B e LPS3. No entanto, o tratamento com LED causou redução na liberação de IL-6 em relação ao grupo LPS3 e não diferiu do grupo B.

Como pode ser observado no painel D, não houve diferença na liberação de IL-6 entre os grupos B, LPS7 e LPS7+LED.



**Figura 10. Efeito do tratamento com LED sobre a liberação de IL-6 no fluido do lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda o LBA foi realizado e o sobrenadante recolhido para as análises das citocinas. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Basal; <sup>θ</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS3 (ANOVA/ Student Newman-Keuls).

#### **46 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A LIBERAÇÃO DE IL-17 APÓS INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS**

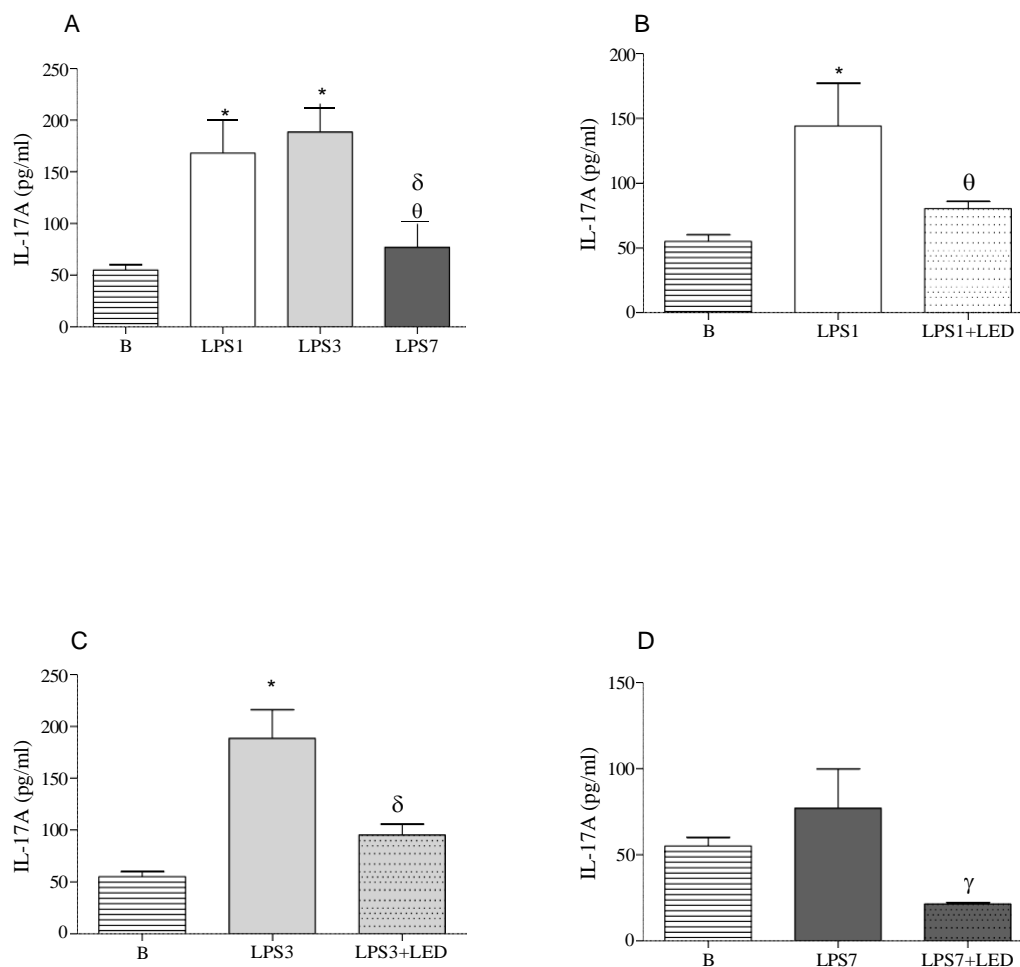
A Figura 11 (Painel A) mostrou aumento significativo na liberação de IL-17 no fluido do LBA dos grupos LPS1 e LPS3 em relação ao grupo B. Ainda, observamos redução na liberação de IL-17 no grupo LPS7 em relação aos grupos LPS1 e LPS3.

No painel B podemos observar que o tratamento com LED no grupo LPS1 causou redução na liberação de IL-17 em relação ao seu respectivo grupo não tratado (LPS1). Ainda, notamos elevação na liberação de IL-17 no grupo LPS1 em relação ao grupo B.

No painel C mostramos aumento na liberação de IL-17 no grupo LPS3 em relação ao grupo B e o tratamento com LED reverteu este aumento.

Como pode ser observado no painel D, o grupo LPS7 não apresentou diferença na liberação de IL-17 em relação ao grupo B. Por outro lado, o tratamento com LED causou redução significativa na liberação de IL-17 em relação ao grupo LPS7 e não diferiu do grupo B.





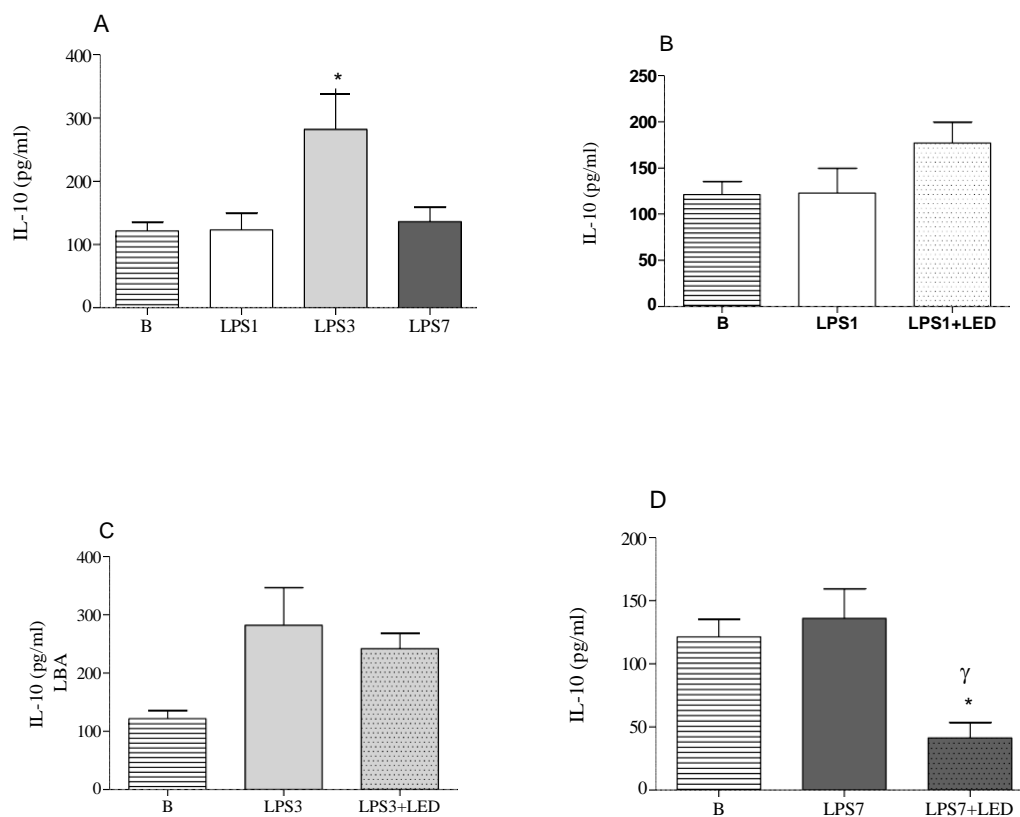
**Figura 11. Efeito do tratamento com LED sobre a liberação de IL-17 no fluido do lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda o LBA foi realizado e o sobrenadante recolhido para as análises das citocinas. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Basal; <sup>θ</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS1; <sup>δ</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS3; <sup>γ</sup> $P < 0,05$  em relação ao grupo LPS7 (ANOVA/ Student Newman-Keuls).

#### **47 TRATAMENTO COM LED REDUZIU A LIBERAÇÃO DE IL-10 APÓS 7 DIAS DA INDUÇÃO COM LPS**

A Figura 12 (Painel A) mostrou aumento significativo na liberação de IL-10 no fluido do LBA do grupo LPS3 em relação ao grupo B. Ainda, não observamos diferenças na liberação de IL-10 entre os grupos B, LPS1 e LPS7.

Nos painéis B e C podemos observar que não houve diferença na liberação de IL-10 entre os grupos de estudo.

Por outro lado, no painel D observamos que o tratamento com LED causou redução significativa na liberação de IL-10 em relação aos grupos LPS7 e B. Ainda, observamos que a liberação de IL-10 não diferiu entre os grupos B e LPS7.

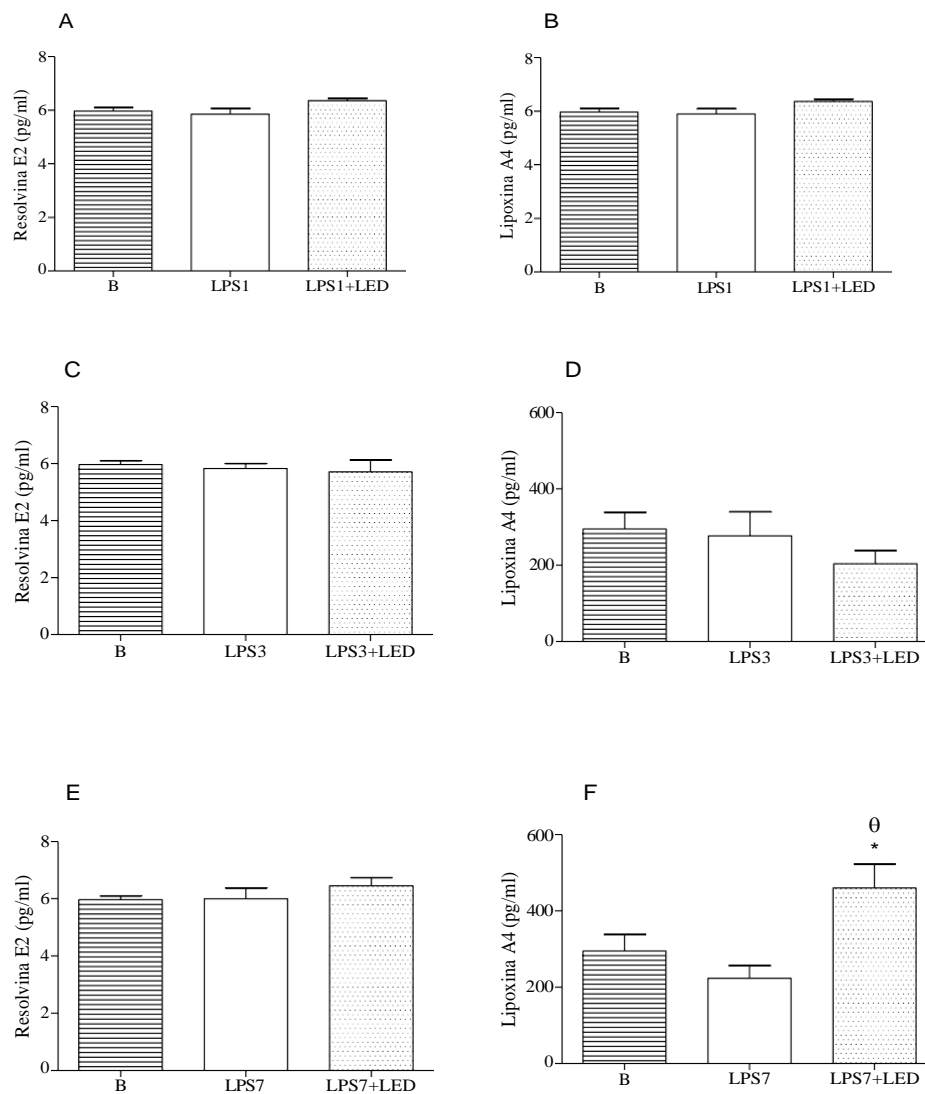


**Figura 12. Efeito do tratamento com LED sobre a liberação de IL-10 no fluido do lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS.** Grupos de camundongos com inflamação pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Em paralelo, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias da indução da inflamação pulmonar aguda o LBA foi realizado e o sobrenadante recolhido para as análises das citocinas. Os dados representam a média  $\pm$  de 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Basal;  $^{\gamma}P < 0,05$  em relação ao grupo LPS7 (ANOVA/ Student Newman-Keuls).

#### **48 TRATAMENTO COM LED AUMENTOU A LIBERAÇÃO DE LIPOXINA A4 APÓS 7 DIAS DA INDUÇÃO COM LPS**

Na figura 13 podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos estudados na liberação de Resolvina E2 e Lipoxina A4 no fluido do lavado broncoalveolar nos painéis A, B, C, D e E.

Entretanto, no painel F, podemos notar que o tratamento com LED aumentou a liberação de Lipoxina A4 em relação aos grupos LPS7 e Basal.

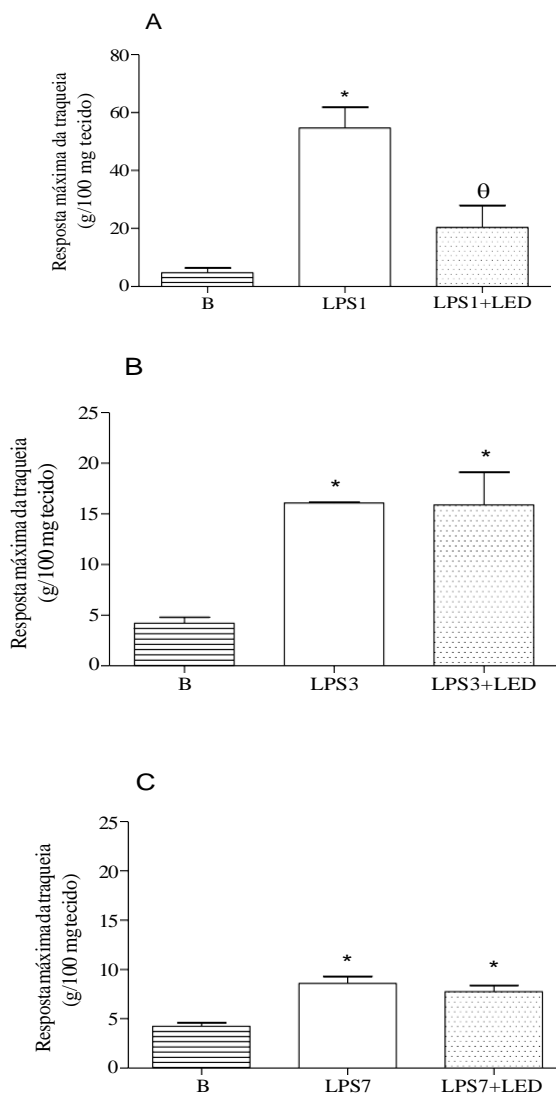


**Figura 13. Efeitos do tratamento com LED nos níveis de resolução e liberação de lipoxina e resolvin no LBA após lesão pulmonar aguda.** Grupos de camundongos com lesão pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Paralelamente, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias de injeção de LPS, o nível de resolução E2 e lipoxina A4 foram quantificados. Os dados representam a média  $\pm$  6 animais por grupo. Dados médios  $\pm$  SEM de 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo B;  $\theta P < 0,05$  em relação ao grupo LPS (ANOVA/Student Newman-Keuls).

#### **49 EFEITOS DO TRATAMENTO COM LED NA RESPOSTA CONTRÁTIL MÁXIMA DO MÚSCULO LISO AO ESTÍMULO COLINÉRGICO**

Como pode ser observado na figura 14 (painel A) o grupo não tratado LPS1 apresentou um aumento na resposta contrátil da traqueia em relação ao Basal, por outro lado, o tratamento com LED foi capaz de reverter a responsividade traqueal quando comparado ao grupo não tratado LPS1.

Já nos painéis B e C, o tratamento com LED não reverteu a resposta contrátil nos grupos LPS3 e LPS7. De fato, ambos os grupos tratados e não tratados com LED apresentaram uma maior responsividade traqueal em relação ao grupo Basal.



**Figura 14. Efeitos do tratamento com LED na resposta contrátil máxima da traqueia após lesão pulmonar aguda.** Grupos de camundongos com lesão pulmonar aguda induzida por LPS foram tratados ou não com LED. Paralelamente, animais não manipulados foram utilizados como controle (grupo basal). Após 1, 3 e 7 dias de injeção de LPS, a responsividade traqueal à metacolina foi avaliada. Os dados representam a média  $\pm$  6 animais por grupo. Dados médios  $\pm$  SEM de 6 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo B.  $\theta P < 0,05$  em relação ao grupo LPS (ANOVA/Student Newman-Keuls).

## 5 DISCUSSÃO

A sepse é uma das principais causas de mortalidade de pacientes em estado crítico e é acompanhada pelo desenvolvimento de uma resposta imune desregulada do hospedeiro à infecção. A falha de órgãos induzidos por sepse é multifatorial e acredita-se que surja em parte devido à interação entre o patógeno, o sangue e a superfície endotelial em nível micro circulatório, devido à perda de integridade da barreira endotelial microvascular e disfunção da interface endotelial sanguínea <sup>72</sup>.

Recentemente, a Society of Critical Care Medicine (SCCM) e a European Society of Critical Care Medicine (ESICM) promoveram uma nova conferência de consenso e publicaram as novas definições de sepse, conhecidas como Sepsis 3. Em resumo, a definição ampla de sepse pela nova publicação é definida pela “presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida secundária à resposta desregulada do organismo à infecção” <sup>73</sup>. Conforme o relatório da Campanha Sobrevivendo à Sepse, em 2003 foi notificado 398.000 casos e 227.000 mortes por choque séptico no Brasil. Aproximadamente R\$ 17,3 bilhões anuais são usados para o tratamento de pacientes sépticos, sendo que R\$ 10 bilhões deste total são direcionados a pacientes que evoluem a óbito, gerando um importante impacto econômico <sup>11</sup>.

A SDRA é uma das complicações mais devastadoras da sepse e do choque séptico <sup>74</sup>. A lesão no epitélio alveolar desempenha um papel crítico na patogênese da SDRA. A perda das junções e função de barreira alveolar leva a infiltração de células imunes inatas, principalmente os neutrófilos, onde são rapidamente recrutados para os alvéolos pulmonares em resposta a lesão ou a componentes presentes em bactérias tais como LPS. Os neutrófilos contribuem para a lesão alveolar através da secreção de oxidantes e proteases no epitélio alveolar e no endotélio, levando a uma maior tensão superficial dos alvéolos e maior propensão a um colapso <sup>75-9</sup>.

Considerando a importância da sepse, suas complicações e também sua alta mortalidade 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 SDRA. Recentemente nosso grupo mostrou que o tratamento com LED reduziu a inflamação pulmonar aguda, por diminuir não apenas o número de neutrófilos, mas também sua ativação. Tais efeitos foram modulados pela diminuição de IL-1 $\beta$ , IL-17A e TNF- $\alpha$ , pelo aumento de IFN- $\gamma$  e expressão de IL-10, concomitante com a



diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) <sup>65</sup>. Deste modo, resolvemos no presente estudo aprofundar a investigação do LED na SDRA, mas neste momento enfatizando o processo de resolução da inflamação pulmonar.

Para isso, nosso modelo de inflamação pulmonar aguda foi realizado de acordo com Brigham & Meyrick (1986) e Wang et al. (2014) <sup>76-33</sup>. Exatamente o mesmo modelo usado em nossos estudos anteriores uma vez que o mesmo reproduz experimentalmente sinais e sintomas que mimetizam a SDRA induzida por sepse em humanos. A abordagem de tratamento com LED utilizada neste estudo visou interferir num processo inflamatório em andamento, uma vez que o LED foi aplicado 2 e 6 horas após a administração de LPS. Ainda, ressalta-se que as avaliações foram realizadas em três tempos diferentes: 1, 3 e 7 dias após a administração com LPS. Tal protocolo visou avaliar se o tratamento com LED durante o desenvolvimento da inflamação poderia interferir no processo de resolução, eventualmente causando sua facilitação ou aceleração.

Nossos resultados mostraram mais uma vez o importante efeito do tratamento com LED em reverter a migração de células para o espaço alveolar quando avaliado 1 dia após a administração com LPS confirmando nossos resultados anteriores <sup>65</sup>. Entretanto, o tratamento com LED não causou alteração na celularidade pulmonar quando as análises foram feitas 3 dias após a indução com LPS, uma vez que neste período já se observava um menor influxo de células no LBA quando comparado com as análises realizadas após o 1º dia. Em contrapartida, quando investigamos os parâmetros celulares após 7 dias da indução, notamos que o tratamento com LED causou um aumento no influxo de células para o espaço alveolar. Este resultado foi surpreendente levando em consideração que após 7 dias da indução com LPS sem o tratamento com LED a inflamação pulmonar havia sido revertida a valores basais. Assim, nossos dados mostraram que ao longo de 7 dias o próprio organismo é capaz de restabelecer sua homeostasia pulmonar sem interferências. Mas, o tratamento com LED se mostrou eficiente e reverteu a inflamação por um período de 24 horas não exercendo efeitos tardios, pelo menos nessa primeira análise. No entanto, devemos considerar que o tipo de célula presente no pulmão não foi avaliado, este número representa células totais e, eventualmente, dependendo do tipo de célula que migrou este aumento pode ser benéfico. Para tanto, analisaremos o diferencial de células presente no pulmão a fim de elucidar este aumento. De qualquer forma esse dado é importante e pode mostrar a necessidade de reaplicação de irradiação, já que após 7 dias houve aumento no número de células no LBA ainda que não sabemos quais são essas células (macrófagos, neutrófilos, linfócitos).

Na tentativa de tentar entender a dinâmica de migração celular, fomos então investigar o número de células no sangue periférico. Nossos dados mostraram que todos os tipos celulares neutrófilos, monócitos e eosinófilos, exceto linfócitos estão reduzidos no sangue após 3 ou 7 dias da indução com LPS. Como era esperado após 1 dia da indução de SDRA com LPS observou-se elevação de neutrófilos, monócitos e eosinófilos no sangue periférico caracterizando assim, a inflamação sistêmica.

Diferentemente do que observamos em relação à migração de células no LBA, o tratamento com LED reduziu todos os tipos celulares no sangue nos três períodos de análises, mostrando deste modo efeitos tardios importantes sobre a dinâmica de migração sanguínea o que pode impactar no processo de resolução da inflamação pulmonar. Para que ocorra a resolução efetiva nos tecidos, a cessação do recrutamento de granulócitos é necessária em conjunto com o recrutamento e diferenciação de macrófagos, que ajudam a limpar células inflamatórias e detritos de tecido para restaurar a homeostase dos tecidos.

Alguns estudos observacionais e dados experimentais sugeriram um importante papel das plaquetas em pacientes com alto risco de desencadeamento da SDRA, pois sua patogênese inclui uma série de mecanismos desregulados e dentre eles a ativação plaquetária. Nestes estudos há uma correlação entre elevação no número de plaquetas e aumento na migração neutrofilica <sup>7</sup>. No entanto, em nosso estudo não observamos quaisquer alterações no número de plaquetas após a indução da SDRA e similarmente o tratamento com LED também não causou nenhum efeito.

Ainda, tentando entender o mecanismo de migração celular dos compartimentos de reserva para o pulmão investigamos a celularidade na medula óssea. Nossos dados mostraram redução significativa no número de células da medula óssea nos grupos LPS nos períodos de análises 1, 3 e 7 dias. Tal fato no grupo LPS1 pode ser explicado pela saída de células da medula óssea para o sangue e também para o pulmão, uma vez que há elevação no número de células nesses compartimentos. Já a redução celular nos grupos LPS3 e LPS7 pode ser devido à redução observada após 1 dia que se manteve, uma vez que ao longo desses 7 dias o próprio organismo está tentando restabelecer sua homeostasia pulmonar. Assim, é razoável supor que tenha ocorrido uma diminuição nos estímulos que operam a produção e saída de células da medula óssea.

Por outro lado, quando avaliamos os efeitos do tratamento com LED podemos notar que após 1 dia da indução com LPS, houve reversão do reduzido número de células da medula óssea em relação ao grupo não tratado. Esses dados diferiram dos publicados anteriormente, onde mostramos que o LED não alterava o número de células da medula,

embora houvesse uma tendência de aumento <sup>65</sup>. Esta diferença se deve a um número maior de animais usados no presente estudo, possibilitando visualizar diferença estatística. Assim, admitimos que ao LED diminuir o influxo de neutrófilos no microambiente pulmonar, são igualmente reduzidos os estímulos que induzem a saída de células da medula, daí o número aumentado de células no compartimento ósseo. O mesmo aconteceu no grupo LPS7. O LED reverteu totalmente o número de células da medula, mostrando que ajudou no restabelecimento da homeostasia. Esses dados nos permitem admitir que embora o LED seja irradiado diretamente no aparelho respiratório, ele parece exercer efeitos sistêmicos modulando a medula óssea.

Reconhecendo que o processo de migração celular é controlado por diversos fatores dentre eles citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, sequencialmente investigamos a liberação de IL-6, IL-17 e IL-10 no fluido do LBA. A escolha destas citocinas foi baseada em estudos anteriores <sup>65</sup>.

Diferentemente do observado em relação às células recrutadas no LBA, a liberação de IL-6 não foi afetada pela indução de LPS e nenhuma diferença foi notada entre os dias de análises (1, 3 e 7 dias). Com relação ao tratamento com LED mostramos que apenas após 3 dias observou-se redução significativa na liberação de IL-6, a qual retornou no 7º dia em valores basais.

A IL-6 é considerada uma citocina pleiotrópica, apresentando um papel central na fisiopatologia da SDRA. É um biomarcador de gravidade da doença e se relaciona a um mau prognóstico e risco de morte <sup>77-78-79</sup>. Ela também desempenha um papel central na defesa do hospedeiro contra o estresse ambiental, como infecção e lesão, podendo aumentar mais de 100.000 vezes durante as fases iniciais da inflamação <sup>80</sup>. No presente estudo o tratamento com LED apenas reduziu a IL-6 após 3 dias. Esses dados corroboram com os anteriores e possam decorrer eventualmente de uma menor expressão gênica de IL-6. Tal hipótese precisa ser comprovada pela análise de PCR. Assim, acreditamos que tal fato se deve a uma questão de temporalidade. Ressalta-se ainda que neutrófilos sejam neste modelo células chave e grandes produtores de IL-6. Deste modo, de certa forma é intrigante que não tenhamos encontrado níveis reduzidos desta citocina, já que os neutrófilos se mostraram diminuídos.

A interleucina 17A (IL-17A) é uma citocina produzida principalmente por células TCD4 ativadas, que estimulam a secreção de IL-6 e IL-8 por fibroblastos humanos, e tem um importante papel na proteção do organismo contra bactérias e fungos, devido a sua potente capacidade recrutar neutrófilos <sup>81</sup>. Além da capacidade de recrutar

neutrófilos, a IL-17A aumenta a permeabilidade do epitélio alveolar, favorecendo o extravasamento de plasma para os espaços alveolares, que, em conjunto com a eliminação do fluido alveolar danificado, leva ao edema alveolar<sup>82-75</sup>. Ainda, neutrófilos também são produtores de IL-17<sup>83</sup>. Nossos dados mostraram que o LPS elevou os níveis desta citocina no fluido do LBA quando avaliamos 1 e 3 dias após a indução. Por outro lado, após 7 dias os níveis desta citocina haviam retornado a valores basais. Com relação aos tratamentos com fotobiomodulação, nosso estudo mostrou que o LED foi capaz de reduzir os níveis de IL-17 em todos os períodos avaliados (1, 3 e 7 dias) ratificando seus importantes efeitos anti-inflamatórios. Tais dados refletem seu papel sobre o recrutamento de leucócitos para o fluido do LBA.

Já em relação a IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, nossos resultados revelaram aumento nos níveis de IL-10 após 3 dias. Muito provavelmente tal aumento decorra de uma maior expressão gênica a qual mostrou uma tendência de aumento em estudos anteriores<sup>65</sup>. Com relação ao tratamento com LED, foi intrigante observarmos redução na liberação de IL-10 após 7 dias. Pode ser que como os estímulos inflamatórios cessaram a citocina reduziu por não ser mais necessária para defender o organismo.

Mediadores especializados pró-resolução representam uma família chave de efetores de resolução da inflamação que inclui lipoxinas derivadas do ácido araquidônico e resolvinas derivadas do ácido eicosapentaenoico<sup>84-85</sup>.

Resolvina E2, assim como lipoxina A4, são uma classe de mediadores lipídicos endógenos que são gerados durante as fases de resolução de uma inflamação aguda. Ambos os mediadores inibem a progressão da inflamação aguda e induzem as fases de resolução em vários processos, tais como na eferocitose e nos reparos do tecido<sup>43</sup>.

Tentando elucidar o mecanismo de resolução da inflamação investigamos a liberação de resolvina E2 e lipoxina A4 no fluido do lavado broncoalveolar, entretanto, não encontramos quaisquer alterações nestes mediadores anti-inflamatórios nos períodos de 1 e 3 dias após a indução da SDRA, por outro lado, o tratamento com LED foi capaz de aumentar a liberação de lipoxina A4 no grupo avaliado 7 dias após a indução. Assim, esses dados podem refletir o elevado número de linfócitos no grupo LPS7 e fortalecer nossa hipótese sobre o fenótipo anti-inflamatório dos linfócitos.

A resposta inflamatória é criticamente controlada por uma variedade de mecanismos anti-inflamatórios, incluindo imunorregulação por células T reguladoras (Treg), um subconjunto de células T CD4+ que expressam o marcador de superfície

CD25 e Foxp3. Esse subconjunto de células T suprime a ativação e a diferenciação de várias células imunes e contribui para a regulação da ampla variedade de respostas imunes contra microrganismos, tumores, alérgenos e antígenos relacionados ao transplante. As células Treg exercem esses efeitos supressores secretando citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e são essenciais para a homeostase imunológica e prevenção da autoimunidade. Estudos recentes indicaram que as células T reguladoras, um subgrupo de linfócitos CD4<sup>+</sup>, estão envolvidas na transformação fenotípica dos macrófagos. Células T reguladoras podem reduzir a inflamação pulmonar, diminuindo a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos e aumentando a eferocitose de neutrófilos apoptóticos. O papel das células T na resolução está emergindo como um tópico criticamente importante, e a maioria dos estudos se concentra em como os mediadores de resolução afetam a biologia das células T. Por exemplo, as lipoxinas e a proteína D1 derivada da célula T helper 2 (Th2) suprimem as citocinas pró-inflamatórias das células T e a infiltração em locais inflamatórios. Atualmente, há evidências crescentes sugerindo que macrófagos, incluindo macrófagos alveolares residentes e macrófagos recrutados a partir do sangue, são fatores-chave na patogênese da SDRA. Existem dois tipos principais de macrófagos no alvéolo. O primeiro tipo é o residente de vida longa, localizado na interface ar-tecido, com uma densidade aproximada de sete por alvéolo. O fenótipo M2 é a principal forma desses macrófagos residentes. O segundo tipo é o macrófago recrutado. Quando ocorre um estímulo, como na SDRA, os monócitos do sangue periférico são recrutados para o lúmen alveolar, onde se diferenciam em macrófagos com o fenótipo M1. O papel dos macrófagos durante o desenvolvimento da resposta inflamatória é sutil. Em geral, eles exercem um efeito pró-inflamatório no estágio inicial e exibem um efeito anti-inflamatório no estágio tardio. Após estimulação na SDRA, os macrófagos residentes mudam imediatamente para o fenótipo M1 predominante em resposta à ativação induzida por infecção de receptores Toll-like (TLRs) ou outros receptores de reconhecimento<sup>86-87-88-89-90-91</sup>.

A hipótese foi reforçada pelos efeitos do LED no recrutamento de leucócitos para o fluido do lavado broncoalveolar, onde o tratamento com LED reduziu os neutrófilos, macrófagos e linfócitos no grupo LPS3. Em contraste, quando os parâmetros foram avaliados 7 dias após a indução, observamos um aumento na quantidade de linfócitos no grupo LPS7 em comparação ao grupo LPS7+LED, em contrapartida como citado anteriormente no recrutamento total de células inflamatórias para o LBA, o grupo

analisado 7 dias após o tratamento com LED apresentou um aumento no total destas células, em comparação aos outros grupos (dados não apresentados).

Mas, apesar do tratamento com LED ter causado um aumento no total de células no grupo BAL do LPS7, tal resultado, parece ser contraditório. No entanto, podemos considerar que o LED elevou apenas o número de linfócitos e, eventualmente, essas células poderiam ter um fenótipo anti-inflamatório, como T regulatório, contribuindo para o processo de resolução da inflamação. Esta é uma hipótese que analisa todos os resultados juntos, mas será testada no futuro.

Finalmente, mostramos que 1 dia após a indução o tratamento com LED foi capaz de reverter a reatividade traqueal à metacolina, embora esses resultados não se repitam 3 e 7 dias após a indução, assim podemos fortificar os efeitos do LED na fase inicial da inflamação.

Mesmo que exista uma literatura abundante sobre a fisiopatologia e o tratamento desta síndrome as implicações na prática clínica ainda são precárias. Assim, as direções futuras da pesquisa devem se concentrar em propor novas terapias direcionadas para esta condição tão devastadora, pois as intervenções farmacológicas se concentram apenas no ‘amortecimento’ da resposta inflamatória na fase inicial da SDRA, na diminuição do edema ou na melhoria dos mecanismos de reparação, contudo, nenhuma das intervenções farmacológicas aplicadas até agora em ensaios clínicos foi eficaz na redução da morbidade e mortalidade da SDRA. Nesse cenário a LED terapia vem se solidificando como uma alternativa de baixo custo, altamente eficaz e não invasiva para o tratamento da ARDS.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o tratamento com LED foi capaz de atenuar a inflamação pulmonar aguda induzida por sepse, interferindo sistemicamente na mobilização de células de seus compartimentos de reserva como sangue e principalmente medula. Importante que mesmo tendo sido realizadas duas irradiações, os efeitos do LED impactaram alterações até 7 dias após. Ainda, notamos que o LED modulou IL-17A, IL-6, lipoxina A4 e contribuiu para uma menor responsividade traqueal.

Assim, a fotobiomodulação vem mostrando importantes resultados embora ainda haja uma necessidade de explorar muitos aspectos da fototerapia na SDRA a fim de tornarmos esse tratamento disponível para uso clínico.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967; 7511: 319-23.
2. Lewandowski K and Lewandowski M. Epidemiology of ARDS. *Minerva Anestesiologica* 2006; 72: 473-7.
3. Cardinal-Fernández P, Correger E, Villanueva J, Rios F. Distrés respiratorio agudo: del síndrome a la enfermedad. *Med Intensiva*. 2016; 40: 168-174.
4. Raghavendran K. & Napolitano L. M. Definition of ALI/ARDS. *Crit Care Clin* 2011; 27: 429–437.
5. Schuster DP. What Is Acute Lung Injury? What is ARDS? *Chest* 1995; 107: 1721-6.
6. Bos LD, Martin-Loeches I, Schultz MJ. ARDS: challenges in patient care and frontiers in research. *Eur Respir Rev* 2018; 27: 170107
7. Confalonieri M, Salton F, Fabiano F. Acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir Rev* 2017; 26: 160116
8. Moss M and Manino DM. Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome deaths in the United States: an analysis of multiple cause mortality data. *Critical Care Medicine* 2002; 30: 1679-85.
9. Rao MH, Muralidhar A, Reddy AKS. Acute respiratory distress syndrome. *J Clin Sci Res* 2014; 3:114-34.
10. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen, J, Opal SM. et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Critical Care Medicine* 2000; 28: 232-35.
11. Barreto MFC, Gomes Dellaroza MS, Kerbauy G, Grion CMC. Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patient's hospitalization. *Rev Esc Enferm USP* 2016; 50: 299-305.
12. Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1995; 151: 293-301.
13. Beutler B and Rietschel et al. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 169-76.



14. Caroff, M. and Karibian, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 2003; 338: 2431-4.
15. Dong Et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells via the NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *BMC Veterinary Research* 2018; 14: 30
16. Zamyatina, A. Aminosugar-based immunomodulator lipid A: synthetic approaches. *Beilstein J Org Chem* 2018; 14: 25–53.
17. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 335-76.
18. Vaez H. Et al. Metformin Alleviates Lipopolysaccharide- induced Acute Lung Injury through Suppressing Toll-like Receptor 4 Signaling. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2016; 15: 498-507.
19. Janeway CA and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002; 20: 197-216.
20. Nagala M, McKenzie E, Richards H, Sharma R, Thomson S, Mastroeni P and Crocker PR. Expression of Siglec-E Alters the Proteome of Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Macrophages but Does Not Affect LPS-Driven Cytokine Production or Toll-Like Receptor 4 Endocytosis. *Front Immunol* 2018; 8: 1926.
21. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O. Et al. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 1998; 24: 340-55.
22. Levan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD. et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *Journal of Immunology* 2001; 167: 5838-44.
23. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 189: 1777-82.
24. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J. et al. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103: 351-61.
25. Olsen N, Spurlock C, Aune T. Methotrexate induces production of IL-1 and IL-6 in the monocytic cell line U937. *Arthritis Research & Therapy* 2014; 16:17

26. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-229.
27. Miller E, Cohen A, Nagao S, Griffith D, Maunder R, Martin T, Weiner-Kronis h J, Sticherling M, Christophers E, Matthay M. Elevated Levels of NAP- 1/Interleukin- 8 Are Present in the Airspaces of Patients with the Adult Respiratory Distress Syndrome and Are Associated with Increased Mortality. *All AJRCCM Issues* 1992; 146:2.
28. Pedrazza L, Lunardelli A, Luft C, Cruz CU, de Mesquita FC, Bitencourt S, Nunes FB, de Oliveira JR. Mesenchymal stem cells decrease splenocytes apoptosis in a sepsis experimental model. *Inflamm Res* 2014; 63: 719-28.
29. Brinkmann V, Cyster J, Hla T, FTY720: Sphingosine 1- Phosphate Receptor-1 in the Control of Lymphocyte Egress and Endothelial Barrier Function. *American Journal of Transplantation* 2004; 4: 1019-2
30. Fujii M, Miyagi Y, Bessho R, Nitta T, Ochi M, Shimizu K. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on acute lung injury after cardiopulmonary bypass. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 2010; 6: 859-862.
31. Wyche K, Wang S, Griendling K, Dikalov S, Austin H, Rao S, Fink B, Harrison D, Zafari A. C242T CYBA Polymorphism of the NADPH Oxidase Is Associated With Reduced Respiratory Burst in Human Neutrophils. *Hypertension* 2004; 43: 1246-1251
32. Carnesecchi S, Dunand-Sauthier I, Zanetti F, Singovski G, Deffert C, Donati Y, Cagarelli T, Pache J-C, Krause K-H, Reith W, Barazzone-Argiroffo C. NOX1 is responsible for cell death through STAT3 activation in hyperoxia and is associated with the pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 537-551.
33. Brigham KL and Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *The American Review of Respiratory Disease* 1986; 133: 913-27.
34. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008; 295: 379-99.
35. Shue-Fen L. Et al. Lipopolysaccharide enhances bradykinin-induced signal transduction via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK in canine tracheal smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 2000; 130: 1799-1808.

36. Eutamene H. Et al. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability: role of MLCK. *Eur Respir J* 2005; 25: 789-795.
37. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 2012; 120: 60–72.
38. Serhan CN, Hong S, Gronert K et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002; 196: 1025–1037.
39. Rowley AF, Lloyd-Evans P, Barrow SE, Serhan CN. Lipoxin biosynthesis by trout macrophages involves the formation of epoxide intermediates. *Biochemistry* 1994; 33: 856–863.
40. Duvall MG1, Levy BD2. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 2015; 785: 144-55
41. Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *The Biochemical journal* 2011; 437: 185–97.
42. Serhan, C.N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J* 2017; 31: 000–000.
43. Basil, Maria C. Levy, Bruce D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2016; 16: 51–67.
44. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015; 7: 2.
45. Livne-Bar, I. et al. Astrocyte-derived lipoxins A4 and B4 promote neuroprotection from acute and chronic injury. *Clin Invest* 2017; 127: 4403–4414.
46. Ringholz FC, Buchanan PJ, Clarke DT, Millar RG, McDermott M, Linnane B et al. Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. *The European respiratory journal* 2014; 44: 394–404.
47. Starosta V, Ratjen F, Rietschel E, Paul K, Griese M. Anti-inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal* 2006; 28: 581–7.
48. Roach K, Feghali-Bostwick C, Amrani Y, Bradding P. Lipoxin A4 Attenuates Constitutive and TGF- $\beta$ 1-Dependent Profibrotic Activity in Human Lung Myofibroblasts. *J Immunol* 2015; 195: 2852-2860.

49. Duvall M & Levy. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *European Journal of Pharmacology* 2015; 785: 144-155.
50. Serhan CN, Clish CB, Brannon J Et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000; 192: 1197–1204.
51. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002; 196: 1025–1037.
52. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol* 2010; 177: 1576–1591.
53. Eickmeier O, Seki H, Haworth O et al. Aspirin-triggered resolvins D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal Immunol* 2012; 6: 256–266.
54. Wang B, Gong X, Wan JY Et al. Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24: 434–441.
55. Kasuga K, Yang R, Porter TF *et al.* Rapid appearance of resolvin precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. *J Immunol* 2008; 181: 8677–8687.
56. Standiford T.J. & Ward P.A. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Translational Research* 2015; 1-9.
57. Petroni R.C. et al. Hypertonic saline (NaCl 7.5%) reduces LPS- induced acute lung injury in rats. *Inflammation* 2015; 38: 2026-35.
58. Ruthman C.A. & Festic E. Emerging therapies for the prevention of acute respiratory distress syndrome. *TherAdvRespir Dis* 2015; 9: 173-87.
59. Sharp C. Et al. Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 2015; 89: 420-34.
60. Oliveira, K.T. et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química* 2014; 7: 310-335.
61. Andreu, Nuria; Zelmer, Andrea; Willes, Siouxsie. Noninvasive Biophotonic Imaging for Studies of Infectious Disease. *FEMS Microbiology Reviews* 2011; 35: 360-394.

62. Issa, Maria Cláudia Almeida; Azulay, Mônica Manela. Terapia Fotodinâmica : Revisão da Literatura e Documentação Iconográfica. *An Bras Dermatol* 2010; 85: 501-11.
63. Cardoso Siqueira, VP, Silveira Evangelista, MI, dos Santos; A, Labat Marcos, R, Ligeiro-de-Oliveira, AP; Pavani, C; Damazo, AS, Lino-dos-Santos-Franco, A. Light-Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. *J of Biophotonics* 2017; [in press].
64. Brochetti, R. A., Leal, M. P., Rodrigues, R., da Palma, R. K. & de Oliveira, L. V. F. Horliana ACRT, Damazo AS, de Oliveira APL, Paula Vieira R, Lino-Dos- Santos-Franco A. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci* 2017; [Epub ahead of print].
65. Goes Costa, S. Barioni, E. Ignácio, A. Albuquerque, J. Saraiva, O. Niels, Pavani, C. Vitoretto, L. Damazo, S. Farsky, S. Lino-dos-Santos-Franco, Adriana. Beneficial effects of Red Light-Emitting Diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. *Scientific Reports* 2017;7: 12670.
66. Miranda da Silva C, Peres Leal M, Brochetti RA, Braga T, Vitoretto LB, Saraiva Câmara NO, et al. Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS ONE* 2015; 10:11.
67. Andrade, M D, Rastelli, ANS, Saad, RS, Saad, JRC. Avaliação da capacidade de polimerização de um novo dispositivo à base de LED à bateria. *J Am Dent Assoc* 2001; 4: 372-6.
68. Faria SL, Souhami L, Portelance L, Duclos M, Vuong T, Small D. Et al. Absence of toxicity with hypofractionated 3-dimensional radiation therapy for inoperable, early stage non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol* 2006; 1: 42.
69. Dall GF, Ohly NE, Ballantyne JA, Brenkel IJ. The influence of pre-operative factors on the length of in-patient stay following primary total hip replacement for osteoarthritis: multivariate analysis of 2302 patients. *J Bone Joint Surg Br* 2009; 91: 434-40.
70. Silva Ibrahim B, Miranda Da Silva C, Barioni ED, Correa-Costa M, Poliselli Farsky SH, Lino-dos-Santos-Franco A. Formaldehyde inhalation during pregnancy abolishes the development of acute innate inflammation in offspring. *Toxicol Lett* 2015; 235: 147-54.

71. De Lima WT, Sirois P, Jancar S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesion. *Eur J Pharmacol* 1992; 213: 63-70.
72. Nuala J. Meyer, et al. Myeloperoxidase-derived 2-chlorofatty acids contribute to human sepsis mortality via acute respiratory distress syndrome. *JCI Insight* 2017; 2: 23.
73. Machado FR, Assunção MS, Cavalcanti AB, Japiassú AM, Azevedo LC, Oliveira MC. Chegando a um consenso: vantagens e desvantagens do Sepsis 3 considerando países de recursos limitados. *Rev Bras Ter Intensiva* 2016; 28: 361-365
74. Kim WY and Hong SH. Sepsis and acute respiratory distress syndrome: recente update. *Tuberc Respir Dis* 2016; 79: 53-57.
75. LI JT, Melton AC, SU G, Hamm DE, Lafemina M, Howard J. et al. Unexpected Role for Adaptive  $\alpha\beta$ TH17 Cells in Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Immunol* 2015; 195: 87-95.
76. Wang H, Xu L, Zhao J, Wang D, Guo R, Wang J. Et al. Regulatory mechanism of pyrrolidine dithiocarbamate is mediated by nuclear factor- $\kappa$ B and inhibits neutrophil accumulation in ARDS mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2014; 8: 614-22.
77. Oliveira MC JR, Greiffo FR, Rigonato-oliveira NC, Custódio RW, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR. et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B* 2014; 4: 57-63.
78. Chen C, Shi L, Li Y, Wang X, Yang S. Disease-specific dynamic biomarkers selected by integrating inflammatory mediators with clinical informatics in ARDS patients with severe pneumonia. *Cell Biol Toxicol* 2016; 32: 169-84.
79. Reilly JP, Anderson BJ, Hudock KM, Dunn TG, Kazi A, Tommasini A. et al. Neutropenic sepsis is associated with distinct clinical and biological characteristics: a cohort study of severe sepsis. *Critical Care* 2016; 20: 222-31.
80. Mesquida M, Leszcynska V, Adán A. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *The Journal of Translational Immunology* 2014; 176, 301-309.
81. Normanton M, Marti LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein* 2013; 11:237-46.

82. Burnham EL, Janssen WJ, Riches DWH, Moss M, Downey GP. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *Eur Respir Journal* 2014; 43: 276-85.
83. Ferretti S, Bonneau O, Dubois G.R, Jones C.E, Trifilieff A. IL- 17, Produced by Lymphocytes and Neutrophils Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Airway Neutrophilia: IL-15 as a Possible Trigger. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 2106-2112.
84. Mai, J. Et al. The atheroprotective role of lipoxin A4 prevents oxLDL induced apoptotic signaling in macrophages via JNK pathway. *J. Atherosclerosis* 2018; 278: 259–268.
85. WU, Hui-sheng. Et al. Effects of Lipoxin A4 Pretreatment on Cognitive Function of Aged Rats after Global Cerebral Ischemia Reperfusion. *Current Medical Science* 2018; 38: 666-671.
86. Abdulnour, Raja-Elie. Et al. Phospholipase D isoforms differentially regulate leukocyte responses to acute lung injury. *Journal of Leukocyte Biology* 2018; 1-14.
87. Huang, X. Et al. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. *Hindawi Mediators of Inflammation* 2018; 8.
88. Toyama, M. Et al. Attenuated accumulation of Treg cells and reduced production of IL-10 lead to the exacerbation of tissue injury in a mouse model of ARDS. *Microbiology and Immunology* 2017; 62.
89. Zhang, R. Et al. B Cells Drive Autoimmunity in Mice with CD28-Deficient Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 2017; 201: 9.
90. Proto, J. Et al. Regulatory T Cells Promote Macrophage Efferocytosis during Inflammation Resolution. *Immunity* 2018; 49: 666-677.
91. WOJTAN, P. Et al. Macrophage polarization in interstitial lung diseases. *Cent Eur J Immunol* 2016; 41: 159-164.

## ANEXO 1: HISTÓRICO ESCOLAR

### HISTÓRICO ESCOLAR

Nome: MARLON DA PALMA CRUZ  
 Nacionalidade: BRASILEIRA  
 RG N°: 48.081.712-1

Naturalidade: SÃO PAULO  
 U.F.: SP

Data de Nascimento: 12/02/1992

Curso: MESTRADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE						
Área de Concentração: FOTOTERAPIA E DOSIMETRIA						
Início do Curso: 08/03/2017 Término do Curso: XX/XX/XXXX Carga Horária cursada: 810						
GRADUAÇÃO EM: BACHAREL EM BIOMEDICINA PELA UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE.						
SEMESTRE/ANO	DISCIPLINAS CURSADAS	CREDITO	C.H.	CONCEITO	SITUAÇÃO	
01 / 2017	DOENÇAS INFLAMATÓRIAS E REPARO TECIDUAL	6	90	A	Aprovado	
01 / 2017	METODOLOGIA DA PESQUISA CIENTÍFICA	4	60	A	Aprovado	
01 / 2017	PRINCÍPIOS DE BIOFOTÔNICA	6	90	A	Aprovado	
02 / 2017	BIOESTATÍSTICA	4	60	A	Aprovado	
02 / 2017	DIDÁTICA NO ENSINO SUPERIOR	4	60	A	Aprovado	
01 / 2018	PRÁTICA DO ENSINO DOCENTE (PED)	4	60	-	Cursando	
SEMESTRE/ANO	ATIVIDADES ACADEMICAS	CREDITO	C.H.	CONCEITO	SITUAÇÃO	
01 / 2017	ORIENTAÇÃO I	15	225	CUMPRIU	Aprovado	
02 / 2017	ORIENTAÇÃO II	15	225	CUMPRIU	Aprovado	
01 / 2018	ORIENTAÇÃO III	15	225	-	Cursando	
02 / 2018	MÓDULO INTERNACIONAL	4	60	-	Cursando	
02 / 2018	ORIENTAÇÃO IV	15	225	-	Cursando	
ORIENTADOR(A): ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO						
EXAME DE PROFICIÊNCIA: .....						
EXAME DE QUALIFICAÇÃO: .....						
Data: .....						
<b>DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>						
Título: " ....."						
Data: .....						Pendente
DATA DE EXPEDIÇÃO DO DIPLOMA: XX/XX/XXXX						
CONCEITOS: A - 9,0 a 10,0 (C/ direito a créditos) B - 8,0 a 8,9 (C/ direito a créditos) C - 7,0 a 7,9 (C/ direito a créditos) D - 0,0 a 6,9 (S/ direito a créditos) CUMPRIU - 7,0 a 10,0 (C/ direito a créditos) NÃO CUMPRIU - 0,0 a 6,9 (S/ direito a créditos)						
OBSERVAÇÕES:						
O presente documento não contém emendas ou rasuras. Ficam para todos os efeitos inválidos os espaços inutilizados.						



**ANEXO 2: PROTOCOLO APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Nº AN005/2017**

**UNINOVE**

Universidade Nove de Julho

CERTIFICADO

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Certificado que o projeto intitulado "Avaliação da fotobiomodulação e/ou tratamento farmacológico na resolução da inflamação pulmonar aguda induzida por sepse", protocolo nº **AN005/2017**, sob a responsabilidade de Adriana Lino dos Santos Franco que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Nove de Julho em reunião de 17/05/2017.

Vigência do Projeto: 01/06/2017 a 01/06/2019

Espécie/linhagem: Camundongo Balb c

Nº de animais 210

Peso/Idade: 20g

Sexo: Macho

Origem: UNINOVE

**Prof. Dra. Katia De Angelis**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Experimentação Animal - CEUA

**ANEXO 3: ARTIGO CIENTÍFICO**



## Photobiomodulation modulates the resolution of inflammation during acute lung injury induced by sepsis

Marlon da-Palma-Cruz<sup>1</sup> · Rodrigo Fernando da Silva<sup>1</sup> · Dhuane Monteiro<sup>1</sup> · Hassan Mohamed Mohamed Abdel Rehim<sup>1</sup> · Caren Cristina Grabulosa<sup>1</sup> · Ana Paula Ligeiro de Oliveira<sup>1</sup> · Adriana Lino-dos-Santos-Franco<sup>1</sup>

Received: 25 September 2018 / Accepted: 8 November 2018  
© Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2018

### Abstract

Sepsis is a big health problem and one of the most common causes of acute lung injury (ALI) leading to high mortality. Pro-resolving mediators play an important role in abrogating the inflammation and promoting tissue homeostasis restoration. ALI treatment is still a clinical health problem, so new therapies are needed. Here, we evaluated the effect of photobiomodulation treatment on the resolution process of ALI induced by lipopolysaccharide (LPS). Male Balb/c mice were submitted to LPS (ip) or vehicle and irradiated or not with light emitting diode (LED) 2 and 6 h after LPS or vehicle injection, and the parameters were investigated 3 and 7 days after the injections. Our results showed that after 3 days of LED treatment the blood and bronchoalveolar lavage (BAL) cells as well as interleukins (IL) including IL-6 and IL-17 were reduced. No differences were observed in the bone marrow cells, tracheal reactivity, and lipoxin A4 and resolvin E2. Indeed, after 7 days of LED treatment the bone marrow cells, lymphocytes, and lipoxin A4 were increased, while IL-6, IL-17, and IL-10 were decreased. No differences were observed in the blood cells and tracheal reactivity. Thus, our results showed that LED treatment attenuated ALI induced by sepsis by modulating the cell mobilization from their reserve compartments. In addition, we also showed later effects of the LED up to 7 days after the treatment. This study proposes photobiomodulation as therapeutic adjuvant to treat ALI.

**Keywords** Acute lung injury · Photobiomodulation · Lipoxins · Resolvins · Cytokines · Tracheal responsiveness

### Introduction

Sepsis is a big health problem often caused by Gram-negative bacteria (35% of cases) and one of the most common causes of acute lung injury (ALI), mostly in hospital settings. However, it can be also associated with a variety of non-infectious events such as multiple trauma, surgeries, and burns [1]. Sepsis is one of the main causes of hospital mortality, overcoming myocardial infarction and cancer [2]. Neutrophils are pivotal cells in the ALI, playing a relevant role through release of several inflammatory mediators including cytokines, elastase, and oxygen reactive species [3–5]. Still, neutrophils are considered as biomarker of severity of disease [6, 7]. Therefore,

some studies have proposed the induction of neutrophil apoptosis as a strategy of treatment [3, 4].

During ALI, several mediators have been identified in inflammatory site and play an important role in the resolution of the inflammatory response [8–10]. Such mediators are potent regulators of inflammatory cell infiltrates, cytokine and chemokine production, and clearance of apoptotic neutrophils, thus promoting tissue homeostasis restoration. Therefore, this process seems to be crucial for ALI. Resolution of inflammation is a biochemically active process, regulated, at least in part, by mediators derived from endogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which act as potent local resolution agonists [11, 12], including lipoxins, resolvins, and maresines [13]. Lipoxins as well as resolvins are important against oxidative injury and contribute to the reestablishment of vascular permeability, thereby reducing edema [14–16]. Recent studies have shown that resolvin D1 exerts anti-oxidant, anti-inflammatory, and pro-resolution effects in animal models of ALI [17–19].

The restoration of normal lung function is complicated and based on the reduction of edema, neutrophil clearance, and

✉ Adriana Lino-dos-Santos-Franco  
alsantosfranco@gmail.com

<sup>1</sup> Post Graduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, University Nove de Julho (UNINOVE), Rua Vergueiro, 239/245, São Paulo, SP CEP 01504-000, Brazil

alveolar barrier repair among others. In this context, the treatment of ALI is a clinical problem, since the available therapies are inefficient [20–23]. Additional approaches have been integrated into the therapy, such as mechanical ventilations with a low volume, prone position, and an extracorporeal membrane oxygenation. Nevertheless, these treatments require high costs and they are not sufficiently effective. Thus, new treatments are needed.

Photobiomodulation such as light-emitting diode (LED) is based on the effects of light on damage tissues, and has been pointed as promisor tool for the treatment of lung diseases including ALI [24–29]. Recently, we have shown that LED treatment reduced the influx of neutrophils induced by LPS; decreased the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A; and increased IFN-gamma levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL). In addition, LED treatment, increased IL-10 and IFN-gamma mRNA levels, partially reduced the high, oxidative burst, and increased the expression of annexin V contributing, to the lower migration of neutrophils. No differences were observed in the activation of NF-kappa B expression, TLR4, edema, and mucus production [30]. Thus, our data showed, for the first time, the beneficial effect of LED treatment on sepsis-induced ALI.

Despite of the important role of resolution process in ALI and based on the previous studies, we have hypothesized that the LED treatment could modulate the resolution of inflammatory process favoring the reestablishment of lung homeostasis. Using an experimental model of sepsis induced by lipopolysaccharide (LPS), we performed a timeline study focusing on leukocyte mobilization, secretion of cytokines, lipoxins, resolvins, and tracheal responsiveness.

## Materials and methods

### Animals

Male mice, Balb/c (~20 g, 60 days) obtained from: the University Nove de Julho were maintained in a light- and temperature-controlled room; (12/12-h light-dark cycle, 21  $\pm$  2  $^{\circ}$ C), with free access to food and water. The experiments were approved by the Animal Care Committee University Nove de Julho (CoEP-UNINOVE; AN005/2017).

### Acute lung injury induced by lipopolysaccharide

According to earlier studies [30], mice were submitted to injection of lipopolysaccharide (LPS; *Samonella abortus equi*, 5 mg/kg, ip) or vehicle (saline) to induction of ALI. It is well established that LPS is a good and widely model employed to induce ALI. It produces the main characteristics of disease including elevate neutrophils influx, diffuse alveolar damage, loss of alveolar epithelium, edema, and impaired gas exchange. Three and 7 days after the LPS or vehicle injection

the animals were euthanized by sectioning the abdominal aorta under with anesthesia (ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, ip).

### Photobiomodulation therapy

Mice were irradiated 2 and 6 h after LPS or vehicle injection in the respiratory tract (lungs and trachea) by direct contact with skin according to Costa et al. [30]. The parameters follow above:

Wavelength: 660 nm (full width at half maximum 20 nm)  
Potency: 100 mW  
Radiant exposure: 5 J/cm<sup>2</sup>  
Irradiance: 33.3 mW/cm<sup>2</sup>  
Area: 2.8 cm<sup>2</sup>  
Total energy: 15 J  
Time of irradiation: 150 s.

### Experimental groups

Mice were divided into five experimental groups:

- 1) Basal group: non-manipulated mice
- 2) LPS3 group: mice submitted to LPS, treated with placebo (light off), and euthanized 3 days after the LPS injection
- 3) LPS7 group: mice submitted to LPS, treated with placebo (light off), and euthanized 7 days after the LPS injection
- 4) LPS3 + LED group: mice submitted to LPS, treated with LED, and euthanized 3 days after the LPS injection
- 5) LPS7 + LED group: mice submitted to LPS, treated with LED, and euthanized 7 days after the LPS injection.

We also evaluated group of mice submitted to vehicle of LPS and treated with LED using the same protocol above. However, no differences were observed in relation to basal group. So, we showed basal group as control. In all experimental set, we used six animals per group.

### Experimental design

### Cell count in the blood, bone marrow, and lung

Considering, the important role of leukocytes in the development of ALI, the number of leukocytes was evaluated in different storage compartments. Global leukocyte count was evaluated through Neubauer chamber (Turk's solution), while differential count was quantified on blood smears stained.

The differential cells obtained from bronchoalveolar lavage (BAL) were evaluated by cytometry flux as described earlier [30].



### Quantification of cytokines and pro-resolving mediators in the bronchoalveolar lavage

Cytokines were investigated in the BAL fluid. The results were expressed as pg/ml. IL-17A, IL-6, and IL-10 were quantified using ELISA Kits purchased from Biolegend (San Diego, USA). Resolvin D1, E1, and lipoxin A4 were quantified using ELISA Kits purchased from MyBioSource (Vancouver, Canada). Determinations were made, in duplicate for every, sample using standard curves according to the manufacturer's specifications.

### Tracheal responsiveness to methacholine

In order to investigate the effects of LED on the tracheal contractile response, isometric force was quantified, in tracheal rings mounted, in a 15-ml organ bath by means of two steel hooks according to [31]. Force contraction was recorded using a force displacement transducer and a chart recorder (Powerlab®, Labchart, AD Instruments). Tracheal rings were suspended in organ bath filled with continuously aerated (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) Krebs-Hanseleit (KH) solution at 37 °C. After 40 min, the tracheal tension that was adjusted to 0.5 g e was added methacholine (MCh; 10<sup>-3</sup> M) in order to obtain maximum contractile response.

### Statistical analyses

Data were expressed as the means ± SEM, and comparisons among the experimental groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student's Newman-Keuls test for multiple comparisons using the GraphPad software v.5. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Effects of LED treatment on the resolution of cellular recruitment in the blood and in the bone marrow

Leukocyte mobilization is an initial hallmark for the development of acute injury. Our data showed that LED treatment in the LPS3 group reduced significantly the number of total cells, neutrophils, lymphocytes, and monocytes in the blood, while in the LPS7 group no differences were observed when compared to non-treated animals (Fig. 1, a, c). Moreover, we showed elevated number of total cells and neutrophils in LPS3 group when compared to the basal group.

In Fig. 1c, d, we can observe that both LPS3 and LPS7 groups had a decrease in the bone marrow cells when compared to the B group. The LED treatment only reversed the reduced number in LPS7 group. No effects of LED treatment were observed in LPS3 group.

### Effects of LED treatment on the resolution of cellular recruitment in the bronchoalveolar lavage

Figure 2a shows that LED treatment in the LPS3 group did not alter the elevated number of total cell into the BAL when compared to non-treated group. On the other hand, the LED treatment in the LPS7 group increased the number of total cells in the BAL when compared to non-treated group (Fig. 2b). We also showed that LPS3 group showed elevated number of cells in relation to B group, while LPS7 group did not present differences between B group (Fig. 2a, b).

In Fig. 2c, we can observe that LED treatment in the LPS3 group reduced the number of neutrophils, lymphocytes, and macrophages, while in the LPS7 group reduced only the number of lymphocytes when compared to non-treated mice.

### Effects of LED treatment on the cytokines released in the bronchoalveolar lavage fluid

Figure 3a–c shows that LED treatment in the LPS3 group reduced the level of IL-6 and IL-17 and did not alter IL-10 in the BAL fluid when compared to non-treated group. Elevated level of IL-17, but not IL-6 and IL-10, was found in LPS3 group in relation to B group. On the other hand, LED treatment in the LPS7 group decreased the level of IL-6, IL-17, and IL-10 in BAL fluid when compared to non-treated group (Fig. 3d–f). We also showed elevated level of IL-6 in the LPS7 group in relation to B group.

### Effects of LED treatment on the release of lipoxin A4 and resolvin E2 in the bronchoalveolar lavage fluid

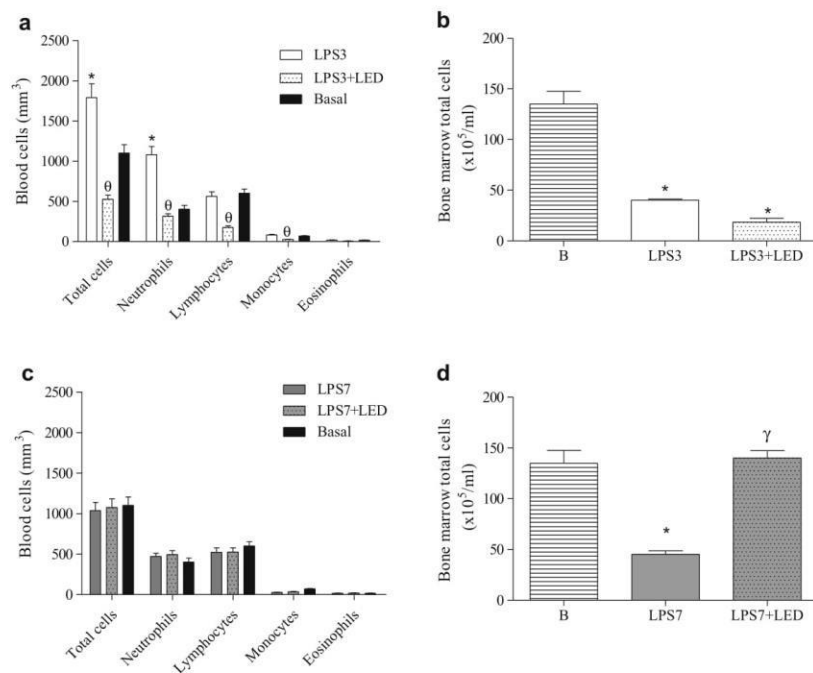
Figure 4a, b shows that no differences in the lipoxin A4 as well as resolving E2 were observed among the groups of study. Elevated level of lipoxin A4 was found in LPS7 group after LED treatment when compared to non-treated group. Indeed, no differences in the resolving E2 were observed among the groups of study (Fig. 4c, d).

### Effects of LED treatment on the maximum smooth muscle contractile response to cholinergic stimulus

As can be observed in Fig. 5a, b, LED treatment did not reverse the increased contractile response in both LPS3 and LPS7 groups. Indeed, we showed increased tracheal responsiveness in LPS3 and LPS7 groups in relation to B group.

## Discussion

ALI is one of the most devastating complications of sepsis and septic shock [32]. Lesion in the alveolar epithelium plays a critical role in the pathogenesis of ALI, which is



**Fig. 1** Effects of photobiomodulation in the cell mobilization from blood and bone marrow after acute lung injury. Groups of mice with acute lung injury induced by LPS were treated or not with LED. In parallel, non-manipulated animals were used as control (basal group). After 3 and

7 days of LPS injection, blood leukocytes as well as bone marrow cells were quantified. Data represent the mean  $\pm$  6 animals per group. Data mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group. \* $P < 0.05$  in relation to B group; <sup>θ</sup> $P < 0.05$  in relation to LPS3 group; <sup>γ</sup> $P < 0.05$  in relation to LPS7 group

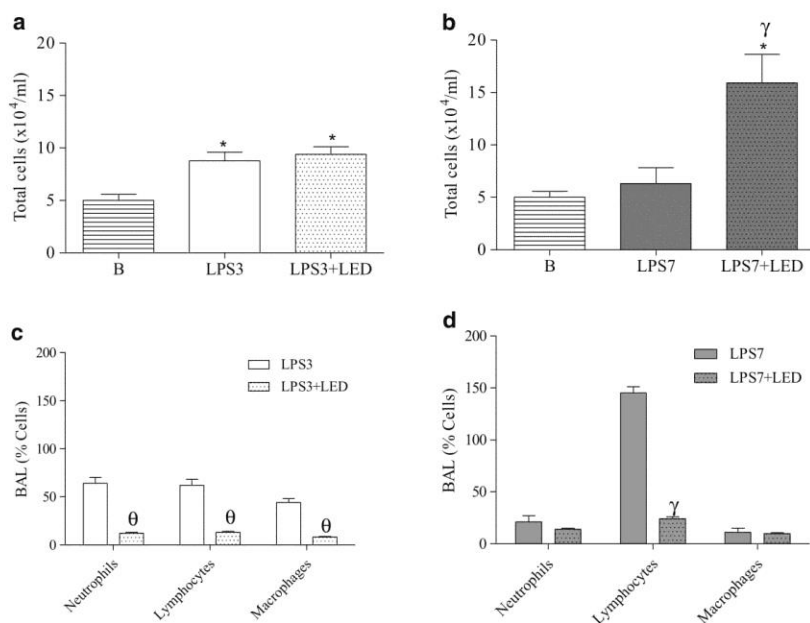
characterized by loss of junctions and alveolar barrier function leading to intense infiltration of innate immune cells, especially neutrophils. These cells contribute to alveolar injury through the secretion of oxidants and proteases in the alveolar epithelium and endothelium, leading to a higher surface tension, of the, alveoli and a greater propensity to collapse [33]. Considering the complications as well as high mortality of sepsis, new therapies are needed to be investigated. Here, we advance in our studies showing promising effects of photobiomodulation to treat ALI.

Recently, our group showed that LED treatment reversed the acute lung injury induced by sepsis by reducing not only the number of neutrophils but also their activation. These effects were modulated by the decreased levels of IL-1 $\beta$ , IL-17A, and TNF- $\alpha$ , concomitantly to elevated levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 expressions. Reduced production of reactive oxygen species (ROS) was also observed [30]. These data were promising and here we decided to investigate the resolution process during ALI and its modulation by LED treatment. In earlier study, we focused the role of LED in the acute phase of

ALI; for this purpose, the parameters were analyzed 24 h after the LPS injection. On the other hand, in the present study we aimed to investigate if LED can modulate the resolution process of inflammation increasing the release of resolution mediators such as resolvins and lipoxins. In addition, the approach used here allows us to evaluate the later repercussions of LED, since the parameters were analyzed 3 and 7 days after the LPS injection.

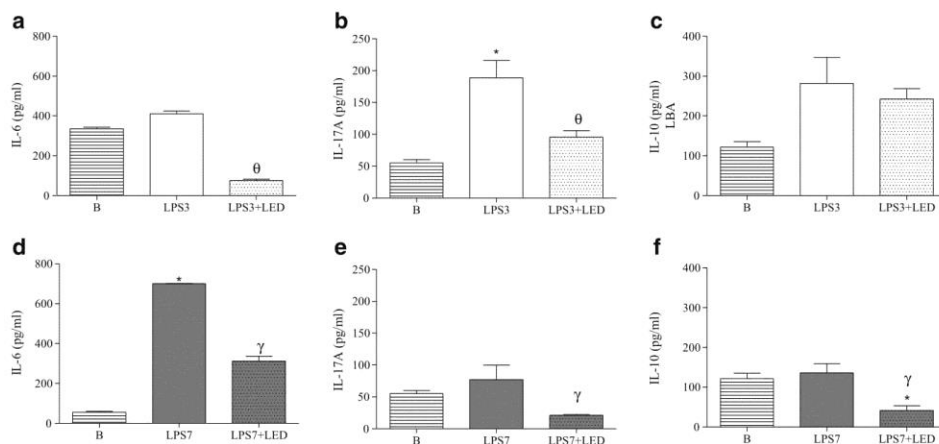
In order to evaluate the interference of LED on the resolution response of inflammation, the parameters were evaluated 3 and 7 days after the last LPS injection. This protocol aimed to evaluate if the treatment with LED during the development of the inflammation could interfere in the resolution process, eventually causing its facilitation or acceleration.

In an attempt to understand the dynamics of cell migration during the inflammatory process, we investigated the number of cells in the peripheral blood as well as in the bone marrow. Our data showed that monocytes were increased in the blood after 3 or 7 days of LPS induction, and neutrophils were increased only after 3 days returning to basal values after 7 days



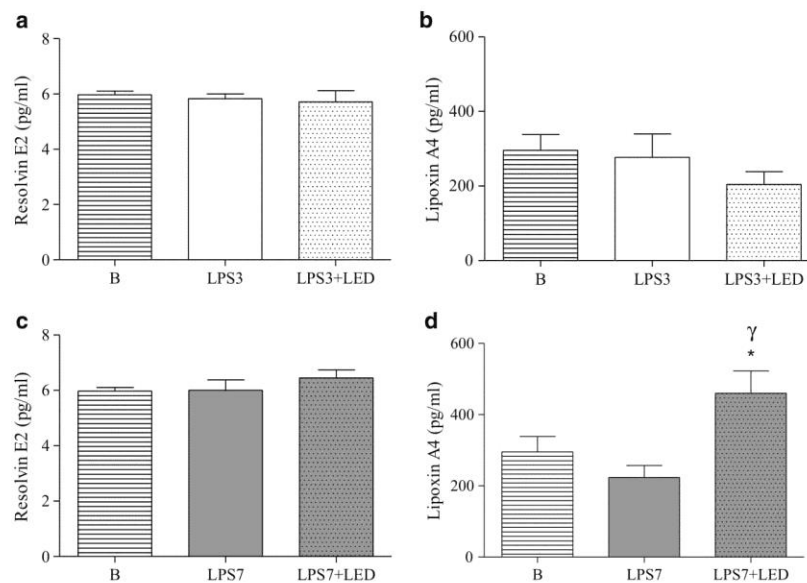
**Fig. 2** Effects of photobiomodulation in the migrated cells into BAL after acute lung injury. Groups of mice with acute lung injury induced by LPS were treated or not with LED. In parallel, non-manipulated animals were used as control (basal group). After 3 and 7 days of LPS injection, the

leukocytes present in the BAL were quantified. Data represent the mean  $\pm$  6 animals per group. Data mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group. \* $P < 0.05$  in relation to B group; <sup>θ</sup> $P < 0.05$  in relation to LPS3 group; <sup>γ</sup> $P < 0.05$  in relation to LPS7 group



**Fig. 3** Effects of photobiomodulation in the cytokines released in the BAL fluid after acute lung injury. Groups of mice with acute lung injury induced by LPS were treated or not with LED. In parallel, non-manipulated animals were used as control (basal group). After 3 and

7 days of LPS injection, the cytokines were quantified. Data represent the mean  $\pm$  6 animals per group. Data mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group. \* $P < 0.05$  in relation to B group; <sup>θ</sup> $P < 0.05$  in relation to LPS3 group; <sup>γ</sup> $P < 0.05$  in relation to LPS7 group



**Fig. 4** Effects of photobiomodulation in the levels of resolving and lipoxin released in the BAL fluid after acute lung injury. Groups of mice with acute lung injury induced by LPS were treated or not with LED. In parallel, non-manipulated animals were used as control (basal

group). After 3 and 7 days of LPS injection, the level of resolving E2 and lipoxin A4 were quantified. Data represent the mean  $\pm$  6 animals per group. Data mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group.  $*P < 0.05$  in relation to B group;  $\gamma P < 0.05$  in relation to LPS7 group

to sepsis-LPS induction. LED treatment reduced neutrophils, monocytes, and lymphocytes in the blood only in the LPS3 group without altering the number of cells in the LPS7 group. Despite of the LED treatment were performed directly in the respiratory tract, systemic effects were observed impacting in the modulation of blood cells. Indeed, late effects on the dynamic of blood migration were noted, when we consider that the LED irradiation was performed 2 and 6 h after the LPS injection and the parameters were investigated 3 days after. During the inflammation, mechanisms are triggered to blunt the inflammatory cell recruitment in order to restore lung homeostasis. This process is controlled by several mediators and characterizes the resolution process.

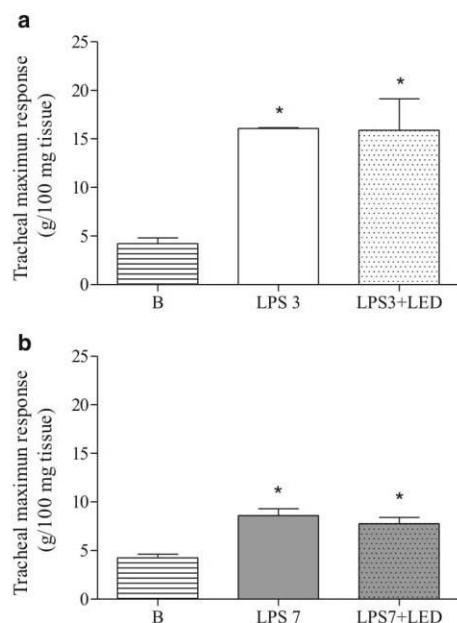
Still, we also investigated the cellularity in the bone marrow in order to understand the cell mobilization from the reserve compartment. Our data showed a marked reduction in the total number of cells present in the bone marrow in both groups LPS3 and LPS7. This reduction showed that the homeostasis was not established after 7 days, although many parameters had returned to basal values. On the other hand, LED treatment reversed the reduced number of cells in the bone marrow in LPS7 group, but did not alter in LPS3 group. Considering this difference in the bone marrow cell count between LPS3 and LPS7 after the LED treatment, we might

assume that the photobiomodulation here seems to contribute with resolution process during inflammation.

This hypothesis was reinforced by the effects of LED in the lung cell migration. LED treatment reduced neutrophils, macrophages, and lymphocytes in the LPS3 group. In contrast, when the parameters were evaluated 7 days after the induction, we observed increased influx of cells into the alveolar space after LED treatment. This result was surprising, considering that after 7 days of LPS induction, non-treated animals presented the number of cells in the BAL similar to basal group. Thus, our data showed that during 7 days the body itself was able to restore its lung homeostasis. But, despite of the LED treatment caused an increase in the total cells in the BAL of LPS7 group, such result, at the first time, seems to be contradictory. However, we must consider that LED elevated only the number of lymphocytes, and eventually, these cells could have an anti-inflammatory phenotype such as T regulatory, thus contributing to resolution process of inflammation. This is a hypothesis analyzing all of results together, but will be tested in the future.

Recognizing that the cell migration process is controlled by several factors including pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, we sequentially investigated the release of IL-6, IL-17, and IL-10 in BAL fluid. Our data





**Fig. 5** Effects of photobiomodulation in the tracheal maximum contractile response after acute lung injury. Groups of mice with acute lung injury induced by LPS were treated or not with LED. In parallel, non-manipulated animals were used as control (basal group). After 3 and 7 days of LPS injection, the tracheal responsiveness to methacholine was evaluated. Data represent the mean  $\pm$  6 animals per group. Data mean  $\pm$  SEM of 6 animals per group. \* $P < 0.05$  in relation to B group

showed elevated level of IL-6 in the LPS7 group, but no differences were observed in LPS3 group. Regarding the LED treatment, a significant reduction in IL-6 was observed in both LPS3 and LPS7 groups. This result contributes to facilitate the resolution process, since IL-6 is considered a pleiotropic cytokine, playing a central role in the pathophysiology of ALI. It is a biomarker of disease severity and is associated with poor prognosis and risk of death [34–36]. It also plays a central role in host defense against environmental stress, such as infection and injury, and may increase more than 100,000 times during the early stages of inflammation [37]. It also emphasized that neutrophils are key cells and large producers of IL-6 in this model.

Interleukin 17A (IL-17A) is a cytokine produced primarily by activated TCD4 cells, which stimulate the secretion of IL-6 and IL-8 by human fibroblasts, and plays an important role in protecting the body against bacteria and fungi, due to its potent ability to recruit neutrophils [38]. In addition to the ability to recruit neutrophils, IL-17A increases the permeability of the alveolar epithelium, favoring plasma

extravasation into the alveolar spaces, which, together with the elimination of damaged alveolar fluid, leads to edema alveolar [39]. Furthermore, neutrophils are also producers of IL-17 [40]. Our data showed that 3 days, but not 7 days after LPS injection, we found that elevated amounts of IL-17 and LED treatment reduced this cytokine. These data may reflect the lower lung inflammation after LED treatment.

An important anti-inflammatory cytokine, IL-10, was also evaluated and no differences were observed after LPS injection. On the other hand, LED treatment caused a reduction in the IL-10 level in LPS7 group. This data was intriguing and needs to be investigated in the future.

Resolvin E2 as well as lipoxin A4 are a class of endogenous lipid mediators that are generated during the resolution phases of an acute inflammation. Both mediators inhibit the progression of acute inflammation and induce the phases of resolution in various processes, such as in efferocytosis and in tissue repairs [41]. Here, we showed elevated level of lipoxin A4 in LPS7 group after LED treatment. Thus, this data can reflect the elevated number of lymphocytes in LPS7 group and strengthens our hypothesis about the anti-inflammatory phenotype of lymphocytes. Finally, we showed that LED treatment did not alter the tracheal responsiveness to methacholine despite of it reduced the lung inflammation. This data showed that LED did not act directly in the mechanisms that modulate the smooth muscle, including the mediators released by muscle cells, epithelium, and resident cells.

Studies in animal models are important in order to contribute with new approaches, which may be used in humans in the future. In this context, based on our recent and earlier studies, we believe that photobiomodulation seems to be a promising therapy to treat ALI. However, we still have much aspects to consider for its utilization in humans, including dosimetry, time of irradiation, barriers that the light need to penetrate, and skin color among others.

In mice, the visible red light in the range of 660 nm has a good penetration as we showed here and in other studies. However, in humans, this light could not penetrate easily, if we consider the area, and the thickness of tissues, including skin, thorax, and muscles. Perhaps in humans the most appropriate light is the infrared for penetrating more deeply. Despite of many differences between animals and humans, the importance of animal experimental models as a subsidy for the application in humans is indisputable.

Our results have shown that LED treatment was able to attenuate acute lung inflammation induced by sepsis, interfering systemically in the mobilization of cells from their reserve compartments as blood and mainly bone marrow. Importantly, even though two irradiations were performed after 2 and 6 h after LPS injection, the effects of the LED influence in changes up to 7 days after. Further, we note that the LED modulated IL-17A, IL-6, and lipoxin A4. Thus, this study may provide support for the understanding of the mechanisms involved in

the resolution of ALI, as well as propose the therapeutic adjuvant for this important condition.

**Funding** This study was sponsored by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/06444-9).

#### Compliance with ethical standards

**Competing interests** The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

- Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal SM et al (2000) Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Crit Care Med* 28:232–235
- Barreto MFC, Gomes Dellarozza MS, Kerbauy G, Grion CMC (2016) Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patient's hospitalization. *Rev Esc Enferm USP* 50:299–305
- Rao MH, Muralidhar A, Reddy AKS (2014) Acute respiratory distress syndrome. *J Clin Sci Res* 3:114–134
- Fujii M, Miyagi Y, Bessho R, Nitta T, Ochi M, Shimizu K (2010) Effect of a neutrophil elastase inhibitor on acute lung injury after cardiopulmonary bypass. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 6:859–862
- Wyche K, Wang S, Griendling K, Dikalov S, Austin H, Rao S, Fink B, Harrison D, Zafari A (2004) C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils. *Hypertension* 43:1246–1251
- Moss M, Manino DM (2002) Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome deaths in the United States: an analysis of multiple cause mortality data. *Crit Care Med* 30:1679–1685
- Miller E, Cohen A, Nagao S, Griffith D, Maunder R, Martin T, Weiner-Kronish J, Sticherling M, Christophers E, Matthay M (1992) Elevated levels of NAP-1/Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *All AJRCCM Issues* 146:2
- Dalli J, Serhan CN (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120:60–72
- Serhan CN, Hong S, Gronert K et al (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196:1025–1037
- Rowley AF, Lloyd-Evans P, Barrow SE, Serhan CN (1994) Lipoxin biosynthesis by trout macrophages involves the formation of epoxide intermediates. *Biochemistry* 33:856–863
- Fredman G, Serhan CN (2011) Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J* 437:185–197
- Serhan CN (2017) Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. *FASEB J* 31:000–000
- Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD (2015) Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(2)
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J et al (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192:1197–1204
- Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac RL (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196:1025–1037
- Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol* 177:1576–1591
- Eickmeier O, Seki H, Haworth O et al (2012) Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal Immunol* 6:256–266
- Wang B, Gong X, Wan JY et al (2011) Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 24:434–441
- Kasuga K, Yang R, Porter TF et al (2008) Rapid appearance of resolvin precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. *J Immunol* 181:8677–8687
- Standford TJ, Ward PA (2015) Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Transl Res* 167(1): 183–191
- Petroni RC et al (2015) Hypertonic saline (NaCl 7.5%) reduces LPS-induced acute lung injury in rats. *Inflammation* 38:2026–2035
- Ruthman CA, Festic E (2015) Emerging therapies for the prevention of acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 70:173–187
- Sharp C et al (2015) Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 89:420–434
- Miranda da Silva C et al (2015) Low level laser therapy reduces the development of lung inflammation induced by formaldehyde exposure. *PLoS One* 16:10–11
- Silva Macedo R et al (2016) Photobiomodulation therapy decreases oxidative stress in the lung tissue after formaldehyde exposure: role of oxidant/antioxidant enzymes. *Mediat Inflamm* 2016:9303126
- Landyshev I et al (2002) Efficacy of low-intensity irradiation and sodium nedocromil in the complex treatment of patients with bronchial asthma. *Ter Arkh* 74:25–28
- Aimbire F et al (2006) 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* 38:773–778
- Oliveira MC et al (2014) Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B* 4:57–63
- Silva VR et al (2014) Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 194:37–48
- Goes Costa S, Barioni E, Ignácio A, Albuquerque J, Saraiva ON, Pavani C, Vitoretto L, Damazo S, Farsky S, Lino-dos-Santos-Franco A (2018) Beneficial effects of red light-emitting diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. *Sci Rep* 7:2017, 12670
- Schepochnik A, da Silva MR, Leal MP, Esteves J, Hebeda CB, Sandri S, de Fátima Teixeira da Silva D, Farsky SHP, Marcos RL, Lino-dos-Santos-Franco A (2018) Vitamin D treatment abrogates the inflammatory response in paraquat-induced lung fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 355:60–67
- Kim WY, Hong SH (2016) Sepsis and acute respiratory distress syndrome: recent update. *Tuberc Respir Dis* 79:53–57
- LI JT, Melton AC, SU G, Hamm DE, Lafemina M, Howard J et al (2015) Unexpected role for adaptive  $\alpha\beta$ TH17 cells in acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 195:87–95
- Oliveira MCJR, Greiffo FR, Rigonato-oliveira NC, Custódio RW, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR et al (2014) Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model

- of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B* 4:57–63
35. Chen C, Shi L, Li Y, Wang X, Yang S (2016) Disease-specific dynamic biomarkers selected by integrating inflammatory mediators with clinical informatics in ARDS patients with severe pneumonia. *Cell Biol Toxicol* 32:169–184
  36. Reylly JP, Anderson BJ, Hudock KM, Dunn TG, Kazi A, Tommasini A et al (2016) Neutropenic sepsis is associated with distinct clinical and biological characteristics: a cohort study of severe sepsis. *Crit Care* 20:222–231
  37. Mesquida M, Leszcynska V, Adán A (2014) Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *J Transl Immunol* 176:301–309
  38. Normanton M, Marti LC (2013) Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein* 11:237–246
  39. Burnham EL, Janssen WJ, Riches DWH, Moss M, Downey GP (2014) The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *Eur Respir J* 43:276–285
  40. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170:2106–2112
  41. Basil MC, Levy BD (2016) Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 16:51–67