

Universidade Nove de Julho

Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

**RODRIGO SILVA MACEDO**

**Efeito do Laser de baixa intensidade (LBI) sobre  
o estresse oxidativo pulmonar induzido  
pela exposição ao formaldeído**

“Effect of Low Level Laser (LLL) on induced pulmonary  
oxidative stress by the exposure to formaldehyde”

São Paulo, 2016

Rodrigo Silva Macedo

**Efeito do Laser de baixa intensidade (LBI) sobre  
o estresse oxidativo pulmonar induzido  
pela exposição ao formaldeído**

“Effect of Low Level Laser (LLL) on induced pulmonary  
oxidative stress by the exposure to formaldehyde”

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

Orientadora: Dra Adriana Lino dos Santos Franco

São Paulo, 2016

Macedo, Rodrigo Silva.

Efeito do Laser de baixa intensidade (LBI) sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido pela exposição ao formaldeído. / Rodrigo Silva Macedo. 2016. 25 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof. Dra Adriana Lino dos Santos Franco.

1. Laser de baixa intensidade (LBI). 2. Formaldeído. 3. Estresse Oxidativo. 4. Enzimas antioxidantes. 5. Enzimas oxidantes.

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

CDU 615.831

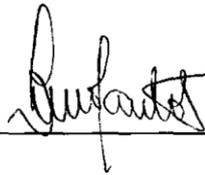
Sao Paulo, 01 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: RODRIGO SILVA MACEDO

Titulo da Dissertação: “Efeito do laser de baixa intensidade (LBI) sobre o estresse oxidativo pulmonar induzido pela exposição ao formaldeído“

Presidente: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>^</sup>. ADRIANA LINO SANTOS FRANGO



Membro: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>o</sup>. CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF<sup>^</sup>. DR<sup>o</sup>. CARLA MAXIMO PRADO

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho,  
tal como todos em minha  
vida aos meus pais  
Solange e Macedo**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sobre todas as coisas, pelo dom da vida, pelos talentos, pelas oportunidades e principalmente pela fé que me é regada gerando bons frutos.

À Universidade Nove de Julho, por ser a sede fomentadora deste trabalho.

Ao Departamento de Biofotônica aplicada às ciências da saúde e à professora Kristianne Porta pela oportunidade de cursar e por todo o direcionamento.

À minha orientadora Prof. Dra. Adriana Lino dos Santos Franco, por todo o apoio, ensinamento, conhecimento e por sempre estar disponível para nos auxiliar. Agradeço, além disto, pela pessoa humana e dedicada, pelo companheirismo, pela amizade, enfim, por ser uma mãe para todos nós, seus alunos.

Aos meus estagiários Felipe Gomes e Mayara Leal.

Aos colaboradores que possibilitaram a realização da parte prática deste trabalho: Éric Barioni, Tércio Braga, Niels Câmara, Sandra Farsky, Tânia Marcorausky. E aos seus respectivos departamentos na Universidade de São Paulo.

À minha família que me sustenta e me apoia em todos os grandes momentos da minha vida, que me aplaudem nas vitórias e me acolhem nas derrotas. Que me acompanharam em toda a trajetória do mestrado. A eles todo o meu amor incondicional que são sempre meus maiores exemplos: Macedo, Solange, Juliana, Junior e Maria Luiza.

À Elaine Silveira, que me apresentou a minha orientadora e muitas vezes me aconselhou com a experiência desta jornada.

Aos meus amigos da pesquisa científica: Cláudia, Cristiane, Vanessa, Kátia, Robson, Elineides, Silvia, Helenita. Às minhas amigas Joselaine, Letícia, Aline e Nicole.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Após a revolução industrial houve um grande aumento na produção de bens de consumo e insumos para a população mundial, e para o processo de obtenção desses produtos finais gera-se poluentes ambientais e ocupacionais, que expõe a população à poluentes tóxicos e acometem doenças. O Formaldeído (FA) é um agente químico amplamente utilizado em diversas indústrias, laboratórios, emitido pela queima de combustíveis e gás de cozinha, também expelido na fumaça do cigarro, o que o caracteriza como um poluente ambiental e ocupacional. O estresse oxidativo pulmonar induzido pela exposição ao FA constitui um importante modelo de problema respiratório. O reconhecimento global no crescimento de doenças inflamatórias pulmonares tem levado a esforços para o desenvolvimento de novas terapias, particularmente para o controle da inflamação. Dentre as terapias usadas para patologias pulmonares, a laserterapia tem destaque, por ser não invasiva, sem efeitos colaterais e com ações antiinflamatórias e antioxidantes. Estudos apontam para efeitos benéficos do laser de baixa intensidade (LBI) para o tratamento de doenças pulmonares, porém seus mecanismos necessitam ser melhor compreendidos. Assim, modelos de inflamação pulmonar são importantes ferramentas para ampliar os conhecimentos mecanicistas do LBI. Para tanto, investigamos os efeitos do LBI no modelo de estresse oxidativo pulmonar induzido pelo FA o qual já está bem estabelecido. Utilizou-se o Formaldeído para indução da inflamação das vias aéreas em ratos Wistar. Em seguida foi analisado as células presentes no pulmão, sangue e medula óssea; a expressão gênica das enzimas antioxidantes e oxidantes; atividade de enzimas glutatônicas; liberação de nitritos e peróxido de hidrogênio, além do *burst* oxidativo. Nosso trabalho demonstrou que o tratamento com laser de baixa intensidade aumentou a expressão gênica das enzimas antioxidantes com concomitante redução da expressão de enzimas oxidantes, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes glutatônicas peroxidase (GPx) e s-transferase (GST), diminuiu o nível de peróxido de hidrogênio e nitritos, além de aumentar o *burst* oxidativo das células inflamatórias. Sendo assim, este estudo pode fornecer subsídios importantes de uma possível terapia para minimizar os efeitos indesejáveis dos poluentes na saúde.

Palavras-chave: Laser de baixa intensidade (LBI), Formaldeído, Estresse Oxidativo, Enzimas antioxidantes, Enzimas oxidantes.

## ABSTRACT

After the industrial revolution there has been a large increase in the production of consumer goods and inputs for the world population, and the process of obtaining these end products is generated environmental and occupational pollutants, which exposes the population to toxic pollutants and affect disease. Formaldehyde (FA) is a chemical widely used in various industries, laboratories, issued by the burning of fuel and cooking gas also expelled in cigarette smoke, which characterizes it as an environmental and occupational pollutants. Lung oxidative stress induced by exposure to FA is a major respiratory disease model. The overall recognition on the growth of pulmonary inflammatory diseases has led to efforts to develop new therapeutics, particularly for the control of inflammation. Among the therapies used for lung diseases, LLLT has highlighted, being non-invasive, no side effects and anti-inflammatory actions and antioxidants. Studies show beneficial effects to low-intensity laser (LBI) for the treatment of lung disease, but their mechanisms need to be better understood. Thus, pulmonary inflammation models are important tools to extend mechanistic knowledge of LBI. Therefore, we investigated the effects of LLLT in the pulmonary oxidative stress model induced by FA which is already well established. Formaldehyde was used to induce airway inflammation in rats. Next it was examined the cells present in the lung, blood, and bone marrow; gene expression of antioxidant enzymes and oxidants; activity of glutathione enzymes; release of nitrite and hydrogen peroxide, besides the oxidative burst. Our work has shown that low-intensity laser treatment increased gene expression of antioxidant enzymes with concomitant reduction of expression of oxidative enzymes, increased the activity of antioxidant peroxidase glutathione enzymes (GPx) and s-transferase (GST), the level decreased from hydrogen peroxide and nitrite, in addition to increasing the oxidative burst of inflammatory cells. Thus, this study may provide important information of a possible therapy to minimize the undesirable effects of pollutants on health.

**Keywords:** Low Level Laser (LLL), Formaldehyde, Oxidative Stress, Antioxidants enzymes, Oxidants Enzymes.

## ABREVIATURAS

CAT – Catalase

cNOS – Óxido Nítrico Sintase Constitutiva

COX-2 – Ciclooxigenase-2

ERONs – Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

FA – Formaldeído

GPX – Glutationa Peroxidase

GR – Glutationa Redutase

Grupo FA – Grupo Formaldeído

Grupo FA + L – Grupo Formaldeído tratado com laser

Grupo L – Grupo tratado com laser

Grupo N – Grupo Naive

GST – Glutationa S-Transferase

HO-1 – Hemeoxigenase-1

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida

LBI – Laser de Baixa Intensidade

Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

Óxido Nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ )

Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

SOD – Superóxido Dismutase

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Poluição ambiental e ocupacional e doenças pulmonares	1
1.2. O estresse oxidativo e o balanço oxidante/antioxidantes	3
1.3. Fotobiomodulação	6
1.4. Laser de baixa intensidade (LBI)	7
1.5. Laser de baixa intensidade e inflamação pulmonar	9
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1. Animais	12
3.2. Indução da inflamação pulmonar pela exposição ao formaldeído (FA)	12
3.3. Tratamento com laser de baixa intensidade (LBI)	12
3.4. Delineamento Experimental	13
3.5. PCR em tempo real para determinação da expressão de enzimas oxidantes (COX, NOS) e antioxidantes (SOD e Catalase e HO-1) em tecido pulmonar	13
3.6. Quantificação de Glutathionas	14
3.7. Quantificação de peróxido de nitrogênio e de nitritos	15
3.8. Avaliação do burts oxidativo	16
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>16</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>34</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL E OCUPACIONAL E DOENÇAS PULMONARES

A poluição ambiental e ocupacional tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores devido as suas graves implicações em saúde pública. Crianças e adolescentes têm se mostrado bastante susceptíveis aos efeitos da poluição do ar. Nestes grupos etários, acréscimos no número de internações por doenças respiratórias têm sido associados à exposição a elevados níveis de poluentes atmosféricos urbanos. O mesmo se observa entre os idosos. Os efeitos à saúde da população devido à exposição a poluentes ambientais são diversos, exibindo diferentes intensidades e manifestando-se com tempos de latência distintos, a saber: efeitos comportamentais e cognitivos, inflamação pulmonar e sistêmica, alterações do calibre das vias aéreas, do tônus vascular e do controle do ritmo cardíaco, alterações reprodutivas, morbidade e mortalidade por doenças cárdio-respiratórias, aumento da incidência de neoplasias, entre outros (Sul *et al.*, 2007; Gulec *et al.*, 2006).

O formaldeído (FA) é um composto químico utilizado mundialmente, em diversas áreas desde a saúde até à produção de materiais. Sua presença no organismo é decorrente de absorção destas fontes exógenas e de metabolismo endógeno, uma vez que o FA é um metabólito resultante do metabolismo de aminoácidos e xenobióticos.

A maioria das aplicações do FA está relacionada à produção de resinas e agentes de ligação para derivados da madeira. Assim, o FA é utilizado na fabricação de resinas fenólicas, de uréia, de melamina e de poliacetal. As resinas fenólicas, de ureia e de melamina têm ampla utilização como adesivos e aglutinantes nas indústrias de produtos de madeira, pasta de papel, fibras vítreas sintéticas, na produção de plásticos, revestimentos e em acabamentos têxteis. O polímero de uréia-formaldeído é muito utilizado na produção de espuma de isolamento para habitações, que pode ser responsável pela liberação de FA em ambientes residenciais (Carlson *et al.*, 2004; Fló-Neyret *et al.*, 2001; Osha, 2001). É também utilizado na indústria de plásticos e resinas, na síntese de intermediários químicos, cosméticos, desinfetantes, produtos de higiene, fluidos de embalsamar e biocidas.

Profissionais da saúde (farmacêuticos, médicos, enfermeiros, dentistas, veterinários) estão expostos às ações do FA em decorrência de suas atividades (Mizuki & Tsuda, 2001). O mesmo pode ser considerado para indivíduos que utilizam técnicas de estudos em patologia, histologia e anatomia, uma vez que os tecidos são preservados em FA (Wantke *et al.*, 2000). Este agente é utilizado por grande parte dos estabelecimentos de saúde por ser um método tradicional de preservação de tecidos com resultados satisfatórios. Assim, sua substituição tende a ser difícil, (Tang *et al.*, 2009) sendo importante o gerenciamento de sua utilização, de seu reuso, bem como o descarte ambientalmente seguro do mesmo. Além disso, o FA também está presente em alimentos e é expelido na fumaça do cigarro.

É bem estabelecido o potencial efeito carcinogênico induzido pelo FA (Conolly *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos realizados com patologistas associaram a exposição ao FA com desencadeamento de tumores em vários locais, incluindo cavidade nasal (Luce *et al.*, 2002; Coggon *et al.*, 2003), pulmão (Coggon *et al.*, 2003), cérebro (Coggon *et al.*, 2003), pâncreas e sistema hematopoiético (Pinkerton *et al.*, 2004). Ainda, estudos mostram que o FA apresenta propriedades citotóxicas, imunotóxicas e genotóxicas em baixas concentrações, gerando dano no DNA, inibição do crescimento e um atraso no reparo do DNA (Cosma *et al.*, 1988; Emri *et al.*, 2004).

Há evidência que a exposição à poluição pode exacerbar a asma pré-existente (McCreanor *et al.*, 2007; Schildcrout *et al.*, 2006). Além disso, a morbidade e a mortalidade de doenças inflamatórias no trato respiratório tais como asma, enfisema e bronquite têm sido correlacionadas à exposição de indivíduos a poluentes ambientais, incluindo substâncias químicas como o FA (Ezratty *et al.*, 2007; Green-Mckenzie & Hudes, 2005).

Nos últimos anos nossos estudos têm sido focados na compreensão dos efeitos do FA no aparelho respiratório e suas consequências para o agravamento da asma (Lino dos Santos Franco *et al.*, 2013a, b; Lino dos Santos Franco *et al.*, 2011; Lino dos Santos Franco *et al.*, 2010 a, b; Lino dos Santos Franco *et al.*, 2009; Lino dos Santos Franco *et al.*, 2006).

A exposição ao FA *per se* causa inflamação pulmonar, verificada pelo acúmulo de células inflamatórias no espaço alveolar, pelo aumento na expressão de ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 no tecido pulmonar e hiperreatividade brônquica a metacolina. Tais efeitos são mediados por mastócitos, prostanóides, neuropeptídeos e óxido nítrico

(Lino dos Santos Franco *et al.*, 2006). A análise geral dos nossos estudos sugeriu potencial ação do FA sobre os mastócitos e sistema nervoso sensorial.

Ainda, outros estudos do nosso grupo mostraram que o estresse oxidativo gerado durante a exposição ao FA é responsável, em parte, tanto pelo aumento da inflamação pulmonar quanto da geração de IL-1 e IL-6 em cultura pulmonar. Nesses estudos observamos que o prévio tratamento dos ratos com apocinina, indometacina e L-NAME reduziu a inflamação pulmonar bem como a liberação de citocinas (Lino-dos-Santos-Franco *et al.*, 2011). Verificamos também que o aumento na geração de EROs durante a exposição ao FA deve-se a diminuição na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e aumento na expressão gênica das enzimas ciclooxigenase e óxido nítrico sintase (Lino-dos-Santos-Franco *et al.*, 2011).

Como visto acima, a inflamação pulmonar induzida pela exposição ao FA constitui um interessante e importante modelo de doença respiratória desencadeada pelo estresse oxidativo.

## 1.2 O ESTRESSE OXIDATIVO E O BALANÇO OXIDANTE/ANTIOXIDANTE

As espécies reativas derivadas do oxigênio ou do nitrogênio (ERONs) são sintetizadas a partir da atividade metabólica das células e em concentrações moderadas participam de processos fisiológicos incluindo inflamação, defesa contra microrganismos, controle do tônus vascular bem como na sinalização celular (Romanazzi *et al.*, 2013). Porém, em altas concentrações sua toxicidade afeta ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos gerando danos ao organismo contribuindo para o desencadeamento e/ou exacerbação de diversas doenças, incluindo a asma, câncer, arteriosclerose, diabetes, hipertensão entre outras (Matsuzawa & Ichijo, 2008; Lee *et al.*, 2007; Talati *et al.*, 2006; Blesa *et al.*, 2002).

As ERONs podem ser encontradas sob a forma de radicais livres, como moléculas altamente reativas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados ou os não-radicais, que são moléculas também reativas porém mais estáveis. As principais moléculas oxidantes são ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Birben *et al.*, 2012). Tais radicais podem ser gerados no organismo por diferentes fatores como poluição atmosférica, radiação ionizante, tabagismo entre outras.

Há evidências clínicas e experimentais que o desequilíbrio do sistema oxidante/antioxidante em favor ao oxidante, potencialmente causa danos a diversas estruturas biológicas. Ainda, a regulação do estado redox da célula é crítica para determinar sua viabilidade, ativação, proliferação e função do órgão (Yao *et al.*, 2007). Há de se considerar que ERONS não são apenas toxicantes, mas também podem funcionar como segundos mensageiros sinalizando várias vias intracelulares, tais como MAP quinases, JNK, ASK1 entre outras (Matsuzawa & Ichijo, 2008).

O estresse oxidativo pode ser regulado por mecanismos de defesa celular, os quais incluem a geração de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GSH) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Existem estudos relatando que os níveis de  $H_2O_2$  estão aumentados em condensados exalados de indivíduos asmáticos (Yemelyanov *et al.*, 2001). De fato, o envolvimento de radicais livres na asma e após exposição a substâncias químicas e poluentes está bem documentado.

O termo “espécies reativas derivadas do oxigênio e do nitrogênio” (ERONS) é proveniente do agrupamento de moléculas instáveis que podem ter seus elétrons desemparelhados ou não as tornando altamente reativas (Ribeiro *et al.*, 2005).

O oxigênio é uma molécula vital para os organismos aeróbios, possibilitando a vida humana através da respiração celular. No entanto, o oxigênio molecular ou triplete

( $O_2$ ) ao ser reduzido gera espécies reativas de oxigênio como o superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) (Halliwell & Gutteridge).

Apesar de estas espécies terem funções fisiológicas importantes como sinalização celular, ativação enzimática e expressão gênica de citocinas, o seu aumento descontrolado pode ser muito danoso ao organismo (Valavanidis *et al.*, 2013). Observamos a produção endógena de ERONS através das mitocôndrias e peroxissomos e sua produção exógena através da exposição a radiação ionizante e UV, por quimioterápicos e xenobióticos.

Essas espécies estão envolvidas no desenvolvimento bem como na evolução de várias doenças como asma, neoplasias, arteriosclerose, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, diabetes mellitus, anemia falciforme entre outras. Este fato se deve à reação com as organelas celulares tais como as membranas nucleares, lisossomais, golgiense e dos retículos através da reação com macromoléculas como o DNA, açúcares, proteínas e lipídeos (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Através de um radical centrado no carbono, o radical  $\cdot\text{OH}$  abstrai um  $\text{H}^+$  do açúcar levando a quebra da cadeia molecular; já nos ácidos nucleicos há um ataque à desoxirribose ou às bases nitrogenadas levando à mutações e apoptose celular; as proteínas são levadas à fragmentação das cadeias, oxidação dos aminoácidos e sinais de eliminação proteica por proteases; e os lipídeos sofrem lipoperoxidação, com diminuição da permeabilidade levando ao risco de ruptura da membrana plasmática e lise celular (Ribeiro *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2007)

Dentre as ERONS mais reativas podemos citar: Ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), formado pela redução parcial do  $\text{O}_2$  através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Sena & Chandel, 2012) e pela enzima NADPH oxidase; gera autooxidação e pode formar espécies reativas de nitrogênio; o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formado pela dismutação e pela redução parcial do  $\text{O}_2$ , e pelas enzimas dos peroxissomos e podem gerar lipoperoxidação; e o radical hidroxila  $\cdot\text{OH}$ , é o agente oxidante mais reativo, formado pela redução do  $\text{O}_2$  e catalisado por metais, tem um vasto poder redutor podendo reagir com DNA, proteínas e lipídeos, além de induzir a produção de ERONS; os radicais alcóxila e peróxila são formados durante a lipoperoxidação e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) pode ser gerado por transferência de energia via  $\text{O}_2$  e pode causar dano aos lipídeos de membrana (Vasconcelos *et al.*, 2007; Valavanidis *et al.*, 2013).

Considerando as ERONS, o óxido nítrico merece destaque. Ele é produzido pela enzima óxido nítrico sintase e tem várias funções fisiológicas como a vasodilatação e neurotransmissão, porém seu contato com o  $\text{O}_2$  pode formar espécies mais reativas como o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e o peróxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que causa dano a várias moléculas levando à apoptose celular (Valavanidis *et al.*, 2013).

Para controlar o estresse oxidativo, o organismo dispõe de uma série de enzimas antioxidantes que neutralizam as ERONS em radicais menos reativos e menos tóxicos.

Os mecanismos de ação não-enzimáticos atuam através da supressão da formação de radicais livres, por sua eliminação ou desativação, podendo-se citar os antioxidantes exógenos como os carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol e ascorbato (Ribeiro *et al.*, 2005).

Já a ação antioxidante enzimática ocorre pela prevenção da formação ou eliminação das ERONS pela transformação em moléculas menos reativas. Dentre as enzimas antioxidantes podemos citar: superóxido dismutase (SOD) a qual dismuta o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . Esta enzima está presente no citossol, lisossomos,

núcleo e mitocôndria. Já a catalase (CAT) neutraliza o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em  $2H_2O + O_2$ . A catalase é encontrada em peroxissomos e nas mitocôndrias do músculo cardíaco. Para diminuir a produção do radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) a catalase depende de ferro livre.

Outra importante fonte antioxidante é a enzima glutathiona peroxidase (GPx), que reduz  $H_2O_2$  com o uso da glutathiona reduzida (GSH) em  $H_2O$ , e pode ser catalisada por estímulo de selênio (Tokars *et al.*, 2013). A GPx é encontrada no revestimento celular do pulmão e no citossol. A glutathiona redutase (GR) mantém os níveis de glutathiona reduzida e controla o estado redox de NADP. É importante lembrar que o estresse oxidativo ocorre quando há diminuição celular de GSH. A glutathiona S-transferase (GST) remove hidroperóxidos orgânicos (Sena & Chandel, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2007).

É importante mencionar que as enzimas antioxidantes atuam sinergicamente para evitar ou reduzir a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, atenuando o estresse oxidativo que é responsável pelo desencadeamento de diversas doenças (Godic *et al.*, 2014).

### 1.3 FOTOBIMODULAÇÃO

O reconhecimento global no crescimento de doenças inflamatórias pulmonares tem levado a esforços para o desenvolvimento de novas terapias, particularmente para o controle da inflamação. Sendo assim, terapias que melhoram o desconforto respiratório do paciente e também reduzam os custos despendidos com doenças pulmonares são de grande importância. Dentre as terapias usadas para patologias que acometem o pulmão, como a asma, a fotobimodulação tem merecido destaque, uma vez que é uma terapia não invasiva, sem efeitos colaterais e com ações antiinflamatórias e antioxidantes importantes (Landyshev *et al.*, 2002; Aimbire *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Contudo, os mecanismos operantes na fotobimodulação precisam ser melhor explorados, sobretudo no que tange doenças respiratórias.

O termo LASER (“light amplification by stimulated emission radiation”) é um acrônimo da versão em inglês de “amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação”. As características que diferem a emissão laser da luz de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência (Karu *et al.*, 1987). A emissão laser representa um dispositivo constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou

gasosa que produz um feixe de luz (Barros *et al.* 2008; Maluf *et al.* 2006). Chavantes (2008) menciona em seus estudos que tal dispositivo pode ser classificado em duas categorias, a saber: I – Laser de Alta Potência ou Cirúrgico: pode denotar distintas ações no tecido biológico, tais como, efeito fotoablativo, capaz de remover substâncias tatuadas na pele, efeito fotoionizante capaz de quebrar a ligação quaternária do DNA, efeito fotomecânico-acústico utilizando altas energias em um determinado tecido alvo, produzindo pertuitos no miocárdio, facilitando a nutrição e oxigenação tissular deficiente, efeito fototérmico apresentando a possibilidade de cortar com precisão sem tocar o tecido, ou mesmo vaporizar tumor e coagular tecido altamente vascularizado, possibilitando excelente hemostasia; II – Laser de Baixa Intensidade (LBI): possui a capacidade de biomodular a resposta de células e tecidos evidenciando propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, anti-edematosa, auxiliando na reparação tecidual, bem como, revelando uma ação analgésica.

Cita-se como exemplos de Laser de Baixa Intensidade o laser de hélio-neônio (He-Ne), cujo comprimento de onda é 632,8nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha), como também todos os lasers de diodo, como laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (Ga-As-Al) ou laser de Arseneto de Índio-Gálio (Ga-In-As), cujos comprimentos de onda situam-se desde o vermelho até o infravermelho, sendo de aproximadamente, 630-930nm e por fim o laser combinado do diodo de Hélio-Neônio (Barros *et al.*, 2008; Camelo, 2007).

A terapia a laser ou fotobiomodulação, quando utilizada nos tecidos e nas células, produz um efeito fotofísico-químico, fotofísico e/ou fotobiológico, sem emissão de calor (Chavantes, 2009; Catão, 2004). A emissão laser interage com as células e tecidos, estimulando fagócitos, ativando macrófagos, aumentando a produção de ATP mitocondrial e atuando diretamente na proliferação de vários tipos celulares, promovendo assim, efeitos antiinflamatórios (Rocha Junior *et al.*, 2007). O laser pode proporcionar ao organismo uma melhor resposta à inflamação, com consequente redução de edema, minimização da sintomatologia dolorosa e bioestimulação celular. Estes fazem da Fotobiomodulação uma alternativa para processos que apresentem reação inflamatória, dor e necessidade de regeneração tecidual (Maluf *et al.*, 2006).

#### 1.4 LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)

O histórico da terapia por LBI, ou a fotobiomodulação teve seu primórdio em 1917 quando Albert Einstein descobriu os princípios físicos da emissão estimulada da radiação, mas somente em 1960, Mainman utilizou um cristal de rubi para produzir a primeira luz laser. Sua primeira aplicação na Medicina foi em 1961 por meio de um Laser Cirúrgico realizado pelo Prof. Leon Goldmann em Dermatologia. Neste mesmo ano Javan e colaboradores desenvolveram o laser Hélio-Neônio e sequencialmente Stern e Sognaes (1964) e Goldman e colaboradores (1965) começaram com as primeiras aplicações do laser rubi em Odontologia. Em 1968 Mester foi pioneiro no uso do LBI em Biomedicina com pesquisas promissoras no processo cicatricial (Camelo, 2007).

As propriedades terapêuticas dos lasers vêm sendo estudadas desde o seu desenvolvimento por Mainman (1960), entretanto ocorreu um hiato de mais de 25 anos para que o tratamento com Lasers se tornasse viável no cotidiano de dermatologistas ao redor do mundo. Somente na década de 80 a russa Tina Karu descobriu o mecanismo de ação para a bioestimulação da Laserterapia.

O princípio da bioestimulação promovida pelo laser foi introduzido a mais de 30 anos, sendo aplicado primariamente na dermatologia, especialmente, em processos de reparo de feridas cutâneas. Logo em seguida, foi sugerido que a bioestimulação também poderia ser útil para acelerar a cicatrização de feridas produzidas dentro do laser passou a ser amplamente utilizado para tratamento de aftas, herpes labial, queilite angular, trismo, parestesias, hipersensibilidade dentária e no pós-operatório (Camelo, 2007; Catão, 2004).

O mecanismo de ação clínico para fotobiomodulação promovida pelo LBI ainda não está totalmente esclarecido. A fotorrecepção, ocorrendo em nível mitocondrial pode intensificar o metabolismo respiratório e as propriedades eletrofisiológicas da membrana, promovendo assim, alterações na fisiologia celular durante o processo de reparo (Genovese, 2000; Posten *et al.* 2005).

O LBI provoca efeitos biológicos nos tecidos por meio de energia luminosa, produzindo então, efeitos primários (diretos), secundários (indiretos) e terapêuticos gerais, os quais promovem ações de natureza analgésica, antiinflamatória e cicatrizante. Para o LBI promover um efeito biológico é necessário que ocorra absorção do feixe de luz pelo tecido-alvo (Camelo, 2007; Karu, 1999).

A absorção molecular da luz laser permite um incremento do metabolismo celular pela estimulação de fotorreceptores, por meio da monocromaticidade da luz, agindo na cadeia respiratória das mitocôndrias. O LBI age especificamente no citocromo C oxidase, facilitando um incremento nos níveis de ATP celular, liberação de fatores de crescimento e citocinas, como também na síntese de colágeno, auxiliando na reparação tecidual (Posten *et al.* 2005; Kreisler *et al.* 2003; Genovese, 2000; Smith, 2005; Desmet *et al.* 2006; Karu, 1999).

As ações antiinflamatórias e anti-edematosas exercidas pelo laser ocorrem mediante a aceleração da microcirculação, resultando em alterações na pressão hidrostática capilar, promovendo assim a reabsorção do edema e a eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários (Camelo. 2007). A fotobiomodulação também atua como um importante agente antiálgico, minimizando a sintomatologia dolorosa, além de favorecer de maneira eficaz a reparação tecidual da região lesada mediante a bioestimulação celular (Maluf *et al.*, 2006; Pugliese *et al.*, 2003; Smith. 2005; Almeida-Lopes *et al.*, 2001).

Em nível celular, a fotobiomodulação provoca modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, aumentando o metabolismo, a proliferação e a maturação celular e diminuindo a produção e liberação de mediadores inflamatórios (Silva *et al.*, 2007; Bourguignon *et al.*, 2005). Em virtude destes efeitos já bem estabelecidos do LBI, há necessidade de aprofundamento dos conhecimentos sobre outros possíveis efeitos benéficos para a ampliação do seu uso. Por isso, estudos que visem a compreensão do tipo de sinalização celular desencadeada pela fotobiomodulação são pertinentes.

## **1.5 LASER DE BAIXA INTENSIDADE E INFLAMAÇÃO PULMONAR**

Como dito anteriormente, o LBI tem sido estudado para sua aplicação em processos inflamatórios, na cicatrização de feridas, no tratamento de lesões na boca e no alívio da dor. Estudos utilizando o LBI para o tratamento de doenças pulmonares têm sido realizados mais recentemente. Trabalhos do nosso grupo mostram que o tratamento com LBI reduziu a inflamação pulmonar após exposição ao FA por mecanismos relacionados com a redução da desgranulação de mastócitos e de citocinas inflamatórias (Miranda da Silva *et al.*, 2015).

Outros autores também observaram benefícios do LBI sobre doenças pulmonares. Nesse sentido, Mikhailov *et al.* (1998) observaram que a terapia com LBI duas vezes ao

dia aumentou a complacência pulmonar e a eficiência de trocas gasosas em pacientes asmáticos. Ainda, Pidaev (1997) demonstrou que o LBI quando irradiado sobre a pele na região acima do brônquio principal em indivíduos asmáticos reduz a migração celular para o pulmão. Apesar de a terapia medicamentosa ainda ser muito usada e necessária, a terapia com LBI mostrou-se útil em condições de hipercapnia, hipóxia e disfunção de trocas gasosas.

Silva *et al.* (2014) demonstraram que o tratamento com LBI em modelo murino de asma foi capaz de diminuir a hiperreatividade brônquica via RhoA, o número de eosinófilos, bem como a secreção de citocinas Th2. Similarmente, o LBI reduziu a inflamação pulmonar em modelo de síndrome da angústia respiratória aguda induzida por LPS (Oliveira *et al.*, 2014). Outros modelos de inflamação pulmonar também apontam para o efeito antiinflamatório do LBI. De Lima *et al.* (2010) observaram que a fototerapia com laser em animais submetidos a isquemia e reperfusão intestinal reduziu TNF- $\alpha$ , o edema, o influxo de neutrófilos e, paralelamente aumentou os níveis de IL-10. Ainda, Aimbire *et al.* (2007) mostraram que a fototerapia também reduziu a síntese de TNF- $\alpha$  após a indução da inflamação pulmonar por imunocomplexos. Esses dados em conjunto, sugerem papel supressor do LBI sobre a inflamação pulmonar desencadeada por estímulos alérgicos ou não. Corroborando com os achados *in vivo*, estudos *in vitro* mostraram que a Terapia com LBI em macrófagos alveolares estimulados com LPS ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) intracelular bem como a expressão de MIP-2. A redução de NF-kB também foi observada nas mesmas condições.

Esses estudos apontam para efeitos benéficos do LBI como monoterapia para doenças pulmonares, no entanto, os mecanismos operantes necessitam ser melhor compreendidos. Nesse sentido, modelos de inflamação pulmonar são importantes ferramentas para ampliar os conhecimentos mecanicistas da laserterapia.

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista que o FA é um potente indutor do estresse oxidativo das vias aéreas e o modelo de doença pulmonar induzido pela sua exposição já está bem estabelecido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento do LBI sobre parâmetros do estresse oxidativo após exposição ao FA. Para isso foram investigados os parâmetros abaixo:

- Avaliação da Expressão gênica das enzimas oxidantes como Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS), Óxido Nítrico Sintase constitutiva (cNOS) e Ciclooxigenase 2 (COX- 2) no tecido pulmonar;
- Avaliação da atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase(GST) no tecido pulmonar;
- Avaliação da Expressão gênica das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase 1 e 2 (SOD-1 e 2), Catalase (CAT) e Hemeoxigenase 1 (HO-1) no tecido pulmonar;
- Avaliação da Liberação de Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pelas células do lavado broncoalveolar;
- Avaliação do *Burst* oxidativo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos (160-180g) provenientes do biotério de criação da Universidade Nove de Julho, mantidos no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Nove de Julho com protocolo nº AN0029.2014.

#### **3.2 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR PELA EXPOSIÇÃO AO FORMALDEÍDO (FA)**

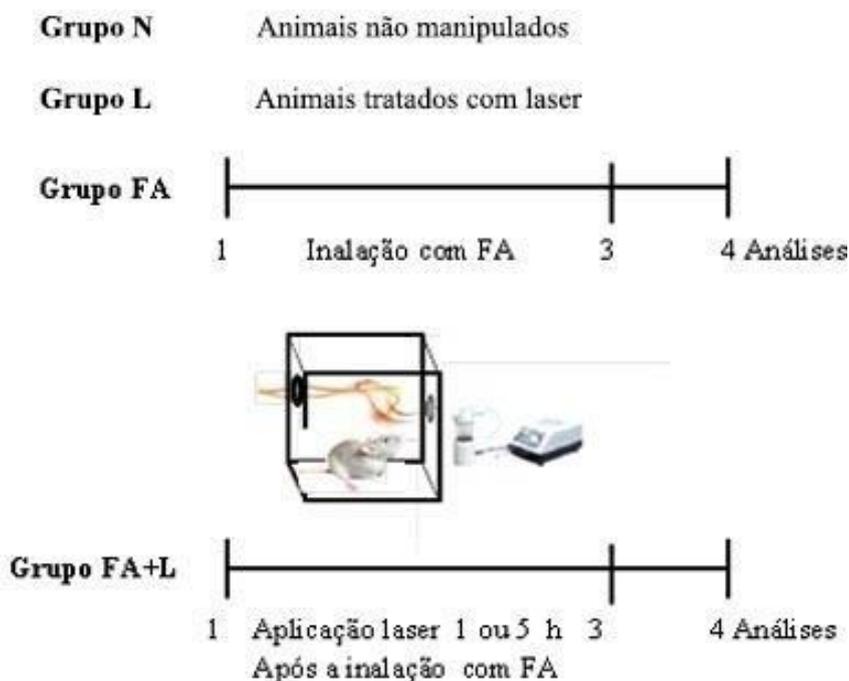
Grupos de ratos foram expostos a inalação de uma solução de FA (1%) ou seu veículo (água destilada) por 90 min/dia, durante 3 dias consecutivos. Foram colocados cinco ratos por sessão em compartimento de vidro com capacidade de 20 litros, acoplado a um nebulizador ultrassônico (Icel<sup>®</sup>) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 a 1,0 micron. O sistema gerador de gás formaldeído apresenta fluxo contínuo de forma a evitar problemas secundários a hipóxia, interferências pela amônia ou excesso de umidade com o FA. Para isto, foram realizados dois orifícios em lados opostos na caixa de vidro, sendo um para a entrada do gás e outro para a saída (Lino dos Santos Franco et al., 2006).

#### **3.3 TRATAMENTO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)**

Grupos de ratos foram irradiados com laser de diodo com potência de 30 mW, comprimento de onda de 660 nm, com densidade de energia (12,86 J/cm<sup>2</sup>) 1 h e 5 h após cada exposição ao FA em nove regiões: três aplicações na traqueia e três aplicações em cada lobo pulmonar (direito e esquerdo) irradiando uma área de 0.785 cm<sup>2</sup>, com um tempo de 60s em cada ponto, totalizando 540s de exposição duas vezes ao dia.

### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 4 grupos experimentais conforme esquema abaixo: Grupo N, consistiu de animais não manipulados para a obtenção de valores basais; Grupo L, consistiu de animais não manipulados e tratados com LBI. Grupo FA, consistiu de animais expostos ao FA e Grupo FA+L, consistiu de animais submetidos a exposição ao FA e tratados com LBI.



### 3.5 PCR EM TEMPO REAL PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS OXIDANTES (COX, NOS) E ANTIOXIDANTES (SOD, CATALASE E HO-1) EM TECIDO PULMONAR

Para realização do PCR em tempo real foram utilizados fragmentos de pulmão obtidos dos animais após os protocolos mostrados acima. Tais fragmentos foram colocados em tubos eppendorfs DNase RNase *free* e mantidos em Trizol até a extração do RNA. Nas amostras foram adicionadas 200 µl de clorofórmio e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Esta solução foi centrifugada (12.000g, 15 min. a 4°C) e o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,5 ml de isopropanol. Em seguida, esta solução foi incubada por 1 hora e então

centrifugada novamente (12.000g, 15 min. a 4°C). O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foi adicionado 1 ml de etanol 75% e centrifugado (7500g, 5 min a 4°C). O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em 25 µl de água livre de RNase e DNase. A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para cada amostra, foram feitas soluções contendo 100 µg/ml de RNA total, e 10 µl dessa solução foi adicionada de 1 µl de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (50 µM) e 1 µl de água livre de RNase, sendo incubados em seguida por 10 minutos à 70°C. Foram então adicionados a cada tubo 4 µl de tampão específico para a reação (5X), 1µl de dNTP (10 µM) e 2 µl de DTT (0,1 M) seguindo-se de incubação a 42°C. Foi adicionado 1 µl da enzima SuperScript III (200 U/µl) por tubo, seguindo nova incubação a 42°C por 50 minutos. A reação foi bloqueada por uma incubação por 15 minutos a 70°C. Para a realização do PCR em tempo real foi utilizado o kit Taqman Fast Universal Master Mix, também da Applied Biosystems®. Para tanto, 1µL de cada primer específico para cada enzima, 4 µL de amostra contendo o cDNA, 5µL de água e juntamente com 10µL de *master mix* Taqman® foram colocados em placas de 96 poços seladas. As placas foram levadas ao termociclador Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System®.

### 3.6. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS GLUTATIONAS

A atividade da Glutathione peroxidase (GPx) foi determinada usando tert-butilhidroperóxido como substrato, e a formação de glutathione oxidada (GSSG) foi monitorada indiretamente através do consumo de NADPH (5min, 34nm a 37°C). A atividade da Glutathione redutase foi determinada pela redução do GSSH em GSH mensurada através do consumo de NADPH (10min, 340nm a 37°C). A atividade da Glutathione S-transferase foi determinada pela conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com redução da glutathione (5min, 340nm a 25°C). Todas as avaliações das glutathionas foram realizadas por espectrofotometria em um Power Wave x340 espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments INC, software KC4v3.0).

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE NITROGÊNIO E DE NITRITOS

Decorridas 24 h da última exposição ao FA os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina (100 e 20mg/kg, ip) e 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).

A produção de nitritos foi determinada em sobrenadante de cultura de células do fluido do LBA utilizando a técnica de Griess. O ensaio foi realizado pela adição de 50 µl de sobrenadante de cultura em placas de 96 poços contendo o mesmo volume do reagente de Griess em temperatura ambiente por 10 min. Como grupo controle foram utilizados sobrenadante de cultura celular de animais não manipulados (basal). A densidade óptica (540 nm) foi obtida utilizando leitor ELISA automático (Bio-Tek Instruments®) e os níveis de nitritos foram determinados utilizando curva padrão previamente estabelecida de NaNO<sub>2</sub> (5µM -60µM).

Nesta série de experimentos foi avaliada também a produção peróxido de hidrogênio pelo método de Pick & Mizel (1981). Para tanto, o sobrenadante de cultura de células do LBA foi diluído em PBS glicosado (NaCl 140M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM; glicose 5mM), contendo 0,56 mM do indicador vermelho de fenol acrescido de peroxidase de rabanete (20 UI/ml) e superóxido dismutase (2 mg/ml). O ensaio consistiu da adição de 100 µl da solução de sobrenadante da cultura pulmonar em 8 poços da placa de 96 poços. Em quatro dos poços foram adicionados 10 µl (20nM) do estimulante forbol 12 acetato 13 miristato (PMA; 20 ng/poço- Sigma Chemical Co). A placa foi mantida por 1 h em estufa de CO<sub>2</sub>, quando então a reação foi paralisada adicionando-se 10 µl de NaOH 1N. A densidade óptica dos poços foi determinada em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 620 nm. Para controle da reação a densidade óptica foi obtida em solução contendo vermelho de fenol e NaOH 1N. Os resultados obtidos em densidade óptica foram transformados em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2,0x10<sup>5</sup> células, mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão que foi feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (5,10,20 e 40 nmoles).

### 3.8 AVALIAÇÃO DO *BURST* OXIDATIVO

A avaliação de *burst* oxidativo foi feita com células do LBA utilizando o método fluorescente com diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) como descrito em Lino dos Santos Franco et al, 2010.

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

## 5 RESULTADOS

Research Article

### **Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes**

Rodrigo Silva Macedo, Mayara Peres Leal, Tarcio Teodoro Braga, Éric Diego Barioni, Stephanie de Oliveira Duro, Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, Niels Olsen Saraiva Câmara, Tânia Marcourakis, Sandra Helena Poliselli Farsky, and Adriana Lino-dos-Santos-Franco

Mediators of Inflammation

Volume 2016 (2016), Article ID 9303126, 9 pages

<http://dx.doi.org/10.1155/2016/9303126>

<https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/9303126/abs/>

## 6 DISCUSSÃO

Considerando que em estudos anteriores demonstramos que a exposição ao FA causa um desequilíbrio fisiológico das espécies oxidantes e antioxidantes no tecido pulmonar, favorecendo a via oxidante, e modulando assim positivamente a inflamação do pulmão, investigamos os mecanismos envolvidos nos efeitos antioxidantes do LBI.

O modelo de inflamação pulmonar induzido pela exposição ao FA está bem estabelecido e desencadeia estresse oxidativo no tecido pulmonar por aumentar a expressão gênica de enzimas oxidantes e reduzir a de antioxidantes (Lino-dos-Santos-Franco *et al.*, 2013). Desta forma, avaliamos o efeito do tratamento com LBI sobre a expressão de importantes genes de enzimas que controlam a geração e também a defesa de espécies reativas derivadas do oxigênio e do nitrogênio no tecido pulmonar. No presente trabalho mostramos que o tratamento com LBI foi eficaz em reduzir o estresse oxidativo no tecido pulmonar após exposição FA, uma vez que diminuiu a expressão gênica de enzimas oxidantes concomitantemente ao aumento na expressão gênica de enzimas antioxidantes.

Inicialmente fomos investigar a expressão de enzimas oxidantes como NOS e COX. Os nossos dados mostraram que o tratamento com LBI reverteu a expressão aumentada das isoformas tanto constitutiva quanto induzida de óxido nítrico sintase (NOS).

Sabe-se que o óxido nítrico é um mediador inflamatório que exerce importantes efeitos deletérios nos tecidos e que pode gerar compostos extremamente tóxicos e reativos como o peroxinitrito. É bem estabelecido que pacientes asmáticos bem como fumantes exalam quantidades significativas de NO, sendo ele considerado um biomarcador da inflamação das vias aéreas e indicador da gravidade da doença (Lakey *et al.*, 2016; Horvath *et al.*, 1998).

Experimentalmente podemos também avaliar a geração de NO através da quantificação de nitritos. Nossos dados mostraram que a exposição ao FA aumentou a liberação de nitritos em células do LBA e que o tratamento com LBI reverteu este aumento. Assim, estes dados estão congruentes com os observados em relação à expressão gênica de NOS. Podemos inferir que o LBI reduziu a liberação de NO por reduzir a e expressão gênica da NOS.

Similarmente, notamos também redução na expressão gênica da isoforma induzida da COX, que é uma enzima oxidante importante e que gera potentes mediadores inflamatórios incluindo eicosanóides. A redução destas duas enzimas impacta não apenas na redução de espécies reativas, como observado em relação ao peróxido de hidrogênio, mas também de mediadores inflamatórios contribuindo assim para a redução do recrutamento celular pulmonar observado em estudos anteriores (Miranda da Silva *et al.*, 2015).

Como mencionado acima, também avaliamos as enzimas antioxidantes incluindo SOD, CAT, HO-1, GPX, GR e GST. O aumento na expressão gênica de SOD e HO-1 mostrou que o LBI protege o tecido pulmonar não apenas por reduzir enzimas oxidantes, mas também por aumentar os mecanismos de defesa contra estresse oxidativo. A percepção de que dispomos é a de que o LBI age restabelecendo a homeostasia no tecido pulmonar.

Assim, podemos inferir que a expressão aumentada de SOD e HO-1 após LBI é um mecanismo compensatório impedindo dano oxidativo induzido pelo FA. Deste modo, neste modelo podemos inferir que os mecanismos operantes do LBI envolvem alterações translacionais.

Sabe-se que tanto a SOD quanto a HO-1 são importantes mecanismos de defesa pulmonar contra estresse oxidativo. A HO-1 é uma enzima do catabolismo do grupo heme, produzindo ferro livre, biliverdina e monóxido de carbono. Apesar de sua importância fisiológica, o acúmulo excessivo de heme livre (dissociado de proteínas) pode ser nocivo para o organismo, por sua capacidade de gerar estresse oxidativo e lesar diretamente membranas lipídicas e organelas celulares. Ainda, o heme livre é um potente estímulo deflagrador de processos, pois atua diretamente como um sinalizador endógeno de alerta para o sistema imune (Figueiredo, 2000). A indução da HO-1, por sua vez, é capaz de conferir citoproteção nessas situações através de efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e antiapoptóticos (Otterbein *et al.*, 2003). A deficiência de HO-1 resulta em inflamação crônica e morte prematura, caracterizando a importância desta enzima para a sobrevivência do organismo.

A SOD, por sua vez promove a degradação do íon superóxido em peróxido de hidrogênio e a Catalase degrada o peróxido de hidrogênio. Ambas são vias importantes de detoxificação de moléculas oxidantes, sobretudo no microambiente pulmonar.

Outra fonte antioxidante no pulmão é a glutathiona, que é essencial para uma resposta defensiva a oxidantes e agentes inflamatórios, por reparar as moléculas

oxidadas e danificadas, e ajudando a regular uma variedade de funções celulares (Lino-dos-Santos-Franco *et al* 2010). Nosso estudo mostrou que as atividades de GST e GPX foram aumentadas após tratamento com LBI. A GPX é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio assim como a catalase. Corroborando com nossos resultados, outros estudos também mostraram efeitos do LBI sobre a enzima glutathione. Utilizando um modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por isquemia e reperfusão intestinal, Blankenberg e colaboradores (2003) mostraram que o LBI reduziu a enzima glutathione (GSH) e conseqüentemente aumentou a produção de ERONs.

Podemos sugerir, então, uma correlação entre o aumento da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devida ao estresse oxidativo gerado pela inalação ao FA com o aumento da atividade da enzima GPX na tentativa de reduzir os danos teciduais que geralmente são atribuídas à presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células. De fato, Gurel *et al.* (2005) relataram que o FA é um potente indutor da produção de peróxido de hidrogênio.

Os neutrófilos são células fagocitárias cuja função é defender o organismo contra agentes agressores. A ativação leucocitária pode gerar *burst* oxidativo com a intenção de neutralizar o agente agressor.

Nesse sentido, fomos investigar o estado funcional de neutrófilos, uma vez que a inflamação pulmonar induzida pelo FA é neutrofílica (Lino-dos-Santos-Franco *et al.*, 2006). Como esperado, os animais expostos ao FA apresentaram aumento no *burst* oxidativo (Lino-dos-Santos-Franco *et al.*, 2010) que é um mecanismo importante que induz ao estresse oxidativo. No entanto, o tratamento com LBI causou um aumento adicional no *burst* oxidativo sendo este um efeito contraditório aos efeitos antioxidantes observados nos demais parâmetros analisados. Porém, entendemos que apesar de contraditório, tal efeito do LBI pode ser explicado pelas suas ações antimicrobianas. O *burst* oxidativo é um importante mecanismo de defesa do organismo contra patógenos e deste modo, o LBI aumentando o *burst* está exercendo efeitos protetores no aparelho respiratório.

Alguns autores relataram que a nicotina (Sasagawa *et al.*, 1985) e o monóxido de carbono (Fukushima *et al.*, 1995) diminuem o *burst* oxidativo aumentando a vulnerabilidade do pulmão ao desenvolvimento de infecções. Ainda, Sorensen *et al.* (2004) observaram correlação do tabagismo com *burst* oxidativo, evidenciado pela diminuição do *burst* em pacientes fumantes.

Tomados em conjunto, o presente estudo mostrou a importância do estresse oxidativo gerado pela exposição a poluentes na indução e/ou desenvolvimento de

doenças pulmonares como a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose pulmonar (Abraham & Kappas, 2008; Moore *et al.*, 2015; Liu & Desai, 2015). Neste contexto, o LBI pode ser um tratamento promissor para doenças pulmonares mediadas por estresse oxidativo. Além disso, este tratamento não tem efeitos colaterais, apresenta baixo custo, além de ser uma terapia não invasiva.

## 7 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o tratamento com LBI diretamente no tecido pulmonar reduz o estresse oxidativo por diminuir a expressão gênica de enzimas oxidantes concomitantemente ao aumento na expressão de enzimas antioxidantes impactando em uma reduzida geração de ERONs. Ainda, o LBI parece proteger o ambiente pulmonar de agentes agressores por aumentar o *burst* oxidativo. Assim, o LBI mostrou-se promissor para tratamento de doenças pulmonares moduladas por estresse oxidativo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAN, N. G. & KAPPAS, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase, **Pharmacological Reviews**, vol. 60, no.1, pp.79–127. 2008.

AIMBIRE F.; LOPES-MARTINS R. A.; CASTRO-FARIA-NETO H. C.; ALBERTINI R.; CHAVANTES M. C.; PACHECO M. T. T.; LEONARDO, P. S. L. M.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-alpha levels in rat diaphragm muscle. **Lasers Med Sci.**, 21(4):238–44. 2006.

ALMEIDA-LOPES, L., RIGAU, J., AMARO ZÂNGARO, R., GUIDUGLI-NETO, J., & MARQUES JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in surgery and medicine**, 29(2), 179-184. 2001.

BARROS, F. C.; ANTUNES, S. A.; DA SILVA FIGUEREDO, C. M.; & FISCHER, R. G. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 7(1), 85-89. 2008.

BIRBEN, E., SAHINER, U. M., SACKESEN, C., ERZURUM, S., & KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, 5(1), 1. 2012.

BLESA, S., CORTIJO, J., MARTINEZ-LOSA, M., MATA, M., SEDA, E., SANTANGELO, F., & MORCILLO, E. J. Effectiveness of oral N-acetylcysteine in a rat experimental model of asthma. **Pharmacological research**, 45(2), 135-140. 2002.

BLANKENBERG, S., RUPPRECHT, H. J., BICKEL, C., TORZEWSKI, M., HAFNER, G., TIRET, L., SMIEJA, M., CAMBIEN, F., MEYER, J & LACKNER, K. J. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, 349(17), 1605-1613. 2003.

BOURGUIGNON-FILHO, A. M., FEITOSA, A. C. R., & BELTRAO, G. C. (2005).

Use of low level laser therapy on wound healing. Literature review. **Rev. Port. Estomatol. Med. Dent. Cir. Maxilofac**, 46(1), 37-43. 2005.

CAMELO, F. P. "Avaliação clínica do efeito da irradiação pós-operatória do laser de baixa intensidade na cicatrização de gengivoplastias em humanos." 2007.

CARLSON, R.M., SMITH, M.C. NEDOROST, S.T. Diagnosis and treatment of dermatitis due to formaldehyde resins in clothing. **Dermatitis**. 15, 169-175, 2004.

CATÃO, M. H. C. DE V. Avaliação da eficácia do laser arseneto de gálio de alumínio 830 nm no controle da radiomucosite. **Diss. Universidade Federal da Bahia**. Faculdade de Odontologia, 2004.

CHAVANTES, M. C., & CHAVANTES, M. C. Princípios básicos do laser; laser no coração e pulmão. **Laser em biomedicina**. São Paulo: Atheneu. 2008.

CHAVANTES MC. Principios Laser. Capitulo 1-5. In: CHAVANTES, M. C. Laser em Bio-Medicina: Princípios e Prática. Atheneu (ed), São Paulo. p. 5-41. 2009.

COGGON D, HARRIS EC, POOLE J, PALMER KT.. Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. **J Natl Cancer Inst** 95:1608–1615, 2003.

COSMA GN, MARCHOK AC. Benzo[a]pyrene-and formaldehyde- induced DNA damage and repair in rat tracheal epithelial cells. **Toxicol** 51:309–320, 1988.

CONOLLY R.B.; KIMBELL J.S.; JANSZEN D.; SCHLOSSER P.M.; KALISAK D.; PRESTON J.; MILLER F.J. Human respiratory tract cancer risks of inhaled formaldehyde: Dose-response predictions derived from biologically-motivated computational modeling of a combined rodent and human data-set. **Toxicol**, 2004.

DE LIMA, F. M.; VILLAVERDE, A. B.; ALBERTINI, R.; DE OLIVEIRA, A.P.; FARIA NETO, H. C.; AIMBIRE, F. Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) mRNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. **Photomed Laser Surg.** Dec;28(6):763-71. 2010.

DESMET, K. D.; PAZ, D. A.; CORRY, J. J.; EELLS, J. T.; WONG-RILEY, M. T.; HENRY, M. M.; BUCHMANN, E. V.; CONNELLY, M.P.; DOVI, J.V.; LIANG, H.L.; HENSHEL, D.S.; YEAGER, R.L.; MILSAP, D.S.; LIM, J.; GOULD, L. J.; DAS, R.; JETT, M.; HODGSON, B.D.; MARGOLIS, D. & WHELAN, H.T. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Therapy**, 24(2), 121-128. 2006.

EMRI G, SCHAEFER D, HELD B, HERBST C, ZIEGER W, HORKAY I, BAYERL C. Low concentrations of formaldehyde induce DNA damage and delay DNA repair after UV irradiation in human skin cells. **Exp Dermatol** 13:305–315, 2004.

EZRATTY V, BONAY M, NEUKIRCH C, ORSET-GUILLOSSOU G, DEHOUX M, KOSCIELNY S, CABANES PA, LAMBROZO J, AUBIER M. Effect of formaldehyde on asthmatic response to inhaled allergen challenge. **Environ Health Perspect**; 115: 210-214; 2007.

FIGUEIREDO, R. T., FERNANDEZ, P. L., MOURAO-SA, D. S., PORTO, B. N., DUTRA, F. F., ALVES, L. S., OLIVEIRA, M. F., OLIVEIRA, P. L., GRAÇA-SOUZA, A. V., & BOZZA, M. T. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, 282(28), 2007.

FLÓ-NEYRET, C.; LORENZI FILHO, G.; MACCHIONE, M.; GARCIA M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 639–643, 2001.

FUKUSHIMA, T.; OKINAGA, S.; SEKIZAWA, K.; OHRUI, T.; YAMADA, M. & SASAKI, H. The role of carbon monoxide in lucigenin-dependent chemiluminescence

of rat alveolar macrophages. **European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology**. Vol. 289 no.1. 1995.

GENOVESE, W. J. *Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia*. Lovise. 2000.

GODIC, A.; POLJSAK, B.; ADAMIC, M. & DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Vol.2014. 2014.

GREEN-MCKENZIE, J., HUDES, D. Latex-induced occupational asthma in a surgical pathologist. **Environ Health Perspect**, 113: 888-893, 2005.

GUIMARAES, M.A.; MAZARO, R. Princípios éticos e práticas do uso de animais de experimentação. São Paulo: Unifesp, 80-119, 2004.

GÜLEC M, SONGUR A, SAHIN S, OZEN OA, SARSILMAZ M, AKYOL O. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation products in heart tissue of subacute and subchronic formaldehyde-exposed rats: a preliminary study. **Toxicol Ind Health**, 22(3):117-24, 2006.

GUREL, A.; COSKUN, O.; ARMUTCU, F.; KANTER, M. & OZEN, O. A. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. **Journal of chemical neuroanatomy**. Vol.29 n.3. 2015.

HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, ageing and disease. **Free radicals in biology and medicine**, 2, 446-493. 1989.

HORVÁTH, I.; DONELLY, L. E.; KISS, A.; KHARITONOV, S. A.; LIM, S.; CHUNG, K. F. & BARNES, P. J. Combined use of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide in monitoring asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. Vol: 158. n.04. 1998.

KARU, TIINA. "Photobiological fundamentals of low-power laser therapy." **IEEE Journal of Quantum Electronics** 23.10: 1703-1717. 1987.

KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Science**; v.2, n. 1, 53-74. 1988.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; WILLERSHAUSEN, B. & D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of clinical periodontology**, 30(4), 353-358. 2003.

LAKEY, P. S. J.; BERKEMEIER, T.; TONG, H.; ARANGIO, A. M.; LUCAS, K.; PÖSCHL, U. & SHIRAIWA, M. Chemical exposure-response relationship between air pollutants and reactive oxygen species in the human respiratory tract. **Sci. Rep.** Vol.6. 2016.

LANDYSHEV I.U.S.; AVDEEVA N.V.; GOBOROV N.D.; KRASAVINA N.P.; TIKHONOVA G.A.; TKACHEVA S.I. Efficacy of low intensity laser irradiation and sodium nedocromil in the complex treatment of patients with bronchial asthma. **Ter Arkh**, 74 (3): 25–28. 2002.

LEE, H. C., & WEI, Y. H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. **Experimental biology and medicine**, 232(5), 592-606. 2007.

LINO DOS SANTOS FRANCO A, DAMAZO AS, BERALDO DE SOUZA HR, DOMINGOS HV, OLIVEIRA-FILHO RM, OLIANI SM, COSTA SK, TAVARES DE LIMA W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicol Appl Pharmacol.** 1;214(1):35-42, 2006.

LINO DOS SANTOS FRANCO, A., DOMINGOS, H.V., DAMAZO, AS, BREITHAUPF-FALOPPA, A.C., LIGEIRO DE OLIVEIRA, A.P., COSTA, S.K.P., OLIANI, S.M., OLIVEIRA-FILHO, R.M., VARGAFTIG, B.B., TAVARES DE LIMA,

W. Reduced allergic lung inflammation in rats following formaldehyde exposure: long-term effects on multiple effector systems. **Toxicology**. 27;256(3):157-63, 2009.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A, DOMINGOS HV, OLIVEIRA AP, BREITHAUPT-FALOPPA AC, PERON JP, BOLONHEIS S, MUSCARÁ MN, OLIVEIRA-FILHO RM, VARGAFTIG BB, TAVARES-DE-LIMA W. Differential effects of formaldehyde exposure on the cell influx and vascular permeability in a rat model of allergic lung inflammation. *Toxicol Lett*. 2010 Sep 1;197(3):211-8 (b).

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A, SHIA MK, DOMINGOS HV, BREITHAUPT-FALOPPA AC, DE OLIVEIRA AP, OLIVEIRA-FILHO RM, VARGAFTIG BB, TAVARES-DE-LIMA W. Connective tissue mast cells are the target of formaldehyde to induce tracheal hyperresponsiveness in rats: putative role of leukotriene B4 and nitric oxide. *Toxicol Lett*. 2010 Feb 1;192(2):85-90 (a).

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A.; CORREA-COSTA M.; DURÃO A.C.; DE OLIVEIRA A.P.; BREITHAUPT-FALOPPA A. C.; BERTONI JDE A.; OLIVEIRA-FILHO R.M.; CÂMARA N.O.; MARCOURAKIS T.; TAVARES-DE-LIMA W.; Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. **Toxicol Lett.**; 207(3):278–85. 2011.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; AMEMIYA, R.M.; OLIVEIRA, A.P.; DAMAZO, A.S.; BREITHAUPT-FALOPPA, A.C.; VITORETTI, L.B.; ACCETURI, B.G.; TAVARES-DE-LIMA W. The putative role of ovary removal and progesterone when considering the effect of formaldehyde exposure on lung inflammation induced by ovalbumin. **Clinics** (Sao Paulo). Dec;68(12):1528-36. 2013. (A)

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A.; GIMENES-JÚNIOR J.A.; LIGEIRO-DE-OLIVEIRA A.P.; BREITHAUPT-FALOPPA A.C.; ACCETURI B.G.; VITORETTI L.B.; MACHADO I.D.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; FARSKY, S. H. P.; MORIYA, H.T.; TAVARES-DE-LIMA, W. Formaldehyde inhalation reduces respiratory mechanics in a rat model with allergic lung inflammation by altering the nitric

oxide/cyclooxygenase-derived products relationship. **Food Chem Toxicol.**, 59:731–8. 2013.

LIU J, BALLANEY M, AL-ALEM U, QUAN C, JIN X, PERERA F, CHEN LC, MILLER RL. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Toxicol Sci.*, 102(1):76-81, 2008.

LIUAND, R. M. & DESAI, L. P. Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis. **Redox Biology** vol.6, pp.565–577. 2015.

LUCE, D., LECLERC, A., B'EGIN, D., DEMERS, P.A., G'ERIN, M., ORLOWSKI, E., KOGEVINAS, M., BELLI, S., BUGEL, I., BOLM-AUDORFF, U., BRINTON, L.A., COMBA, P., HARDELL, L., HAYES, R.B., MAGNANI, C., MERLER, E., PRESTON-MARTIN, S., VAUGHAN, T.L., ZHENG, W., BOFFETTA, P. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. **Cancer Causes Control** 13, 147–157, 2002.

MALUF, A. P.; UGHINI, G. C.; MALUF, R. P. & PAGNONCELLI, R. M. Utilização de laser terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores. **RGO (Porto Alegre)**, 54(2), 182-184. 2006.

MATSUZAWA, A., & ICHIJO, H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1780(11), 1325-1336. 2008.

MCCREANOR, J.; CULLINAM, P.; NIEUWENHUIJSEN, M.J.; et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. **N. Engl. J. Med.**, 357:2348-58, 2007.

MIKHAĬLOV, V. A.; ALEKSANDROVA, O., & GOL'DINA, E. M. The immunomodulating action of low-energy laser radiation in the treatment of bronchial

asthma. **Voprosy kurortologii, fizioterapii, i lechebnoï fizicheskoi kulturei**, (4), 23. 1998.

MIRANDA-DA-SILVA. C.; PERES LEAL, M.; BROCHETTI, A. et al., 2015. Low level laser therapy reduces the development of lung inflammation induced by formaldehyde exposure. *Plos One*, vol. 10, no. 11.

MIZUKI, M., TSUDA, T. Relationship between atopic factors and physical symptoms induced by gaseous formaldehyde exposure during an anatomy dissection course. *Arerugi*, 50, 21-28, 2001.

MOORE, T. A., SCHMID, K. K., ANDERSON-BERRY, A., & BERGER, A. M. Lung disease, oxidative stress, and oxygen requirements in preterm infants. **Biological Research For Nursing** 2015.

OLIVEIRA M.C. JR.; GREIFFO F.R.; RIGONATO-OLIVEIRA N.C.; CUSTÓDIO R.W.; SILVA V.R.; DAMACENO-RODRIGUES N.R.; ALMEIDA, F. M.; ALBERTINI, R.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; DE OLIVEIRA, L. V. F.; CARVALHO, P. T. C.; DE OLIVEIRA, A. P. L.; LEAL JR, E. C. P.; VIEIRA, R. P. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS, **J Photochem Photobiol B.**, 5(134):57–63. 2014.

OSHA, 2001 (Occupational Safety & Health Administration).

OTTERBEIN, L. E., SOARES, M. P., YAMASHITA, K., & BACH, F. H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends in immunology**, 24(8), 449-455. 2013.

PICK, E. & MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**. Vol.46 n.02. 1981.

PIDAEV, A. V. A mathematical assessment of the efficacy of the methods for treating patients with chronic nonspecific lung diseases at a health resort. *Lik Sprava*. Nov-Dec;(6):168-72. Russian. 1997.

PINKERTON LE, HEIN MJ, STAYNER LT. Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: An update. **Occup Environ Med** 61:193–200, 2004.

POSTEN, W.; WRONE, D. A.; DOVER, J. S.; ARNDT, K. A.; SILAPUNT, S.; & ALAM, M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatologic surgery**, 31(3), 334-340. 2005.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. D. A. & ANDRADE, Z. D. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, 17(4), 307-313. 2003.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e o efeito das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.** Vol.21. n.03. 2005.

ROCHA JÚNIOR, A. M., VIEIRA, B. J., ANDRADE, L. C. F. D., & AARESTRUP, F. M. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. **Jornal Vascular Brasileiro**, 6(3), 257-265. 2007.

ROMANAZZI, V.; PIRRO, V.; BELLISARIO, V.; MENGOZZI, G.; PELUSO, M.; PAZZI, M.; BUGIANI, M; VERLATO, G. & BONO, R. 15-F 2t isoprostane as biomarker of oxidative stress induced by tobacco smoke and occupational exposure to formaldehyde in workers of plastic laminates. **Science of the Total Environment**, 442, 20-25. 2013.

SASAGAWA, S.; SUZUKI, T.; SAKATANI, T. & FUJIKURA, T. Effects os nicotine on the functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. **Journal of Leukocyte Biology**. Vol. 37 no. 5. 1985.

SCHILDCROUT, J.S.; SHEPPARD, L.; LUMLEY, T.; SLAUGUTER, J.C.; KOENIG, J.Q.; SHAPIRO, G.G. Ambient air pollution and asthma exacerbations in children: an eight-city analysis. **Am. J. Epidemiol**, 164:505-517, 2006.

SENA, L. A. & CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell**. Vol.48 n.02. 2012.

SILVA V. R.; MARCONDES P.; SILVA M.; VILLAVERDE A. B.; CASTRO-FARIA-NETO H. C.; VIEIRA R. P.; AIMBIRE, F. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. **Respir Physiol Neurobiol.**; 194:37–48. 2014.

SMITH, K. C. Laser (and LED) therapy is phototherapy. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 1, p. 78-80, 2005.

SORENSEN, L. T.; NIELSEN, H. B.; KHARAZMI, A. & GOTTRUP, F. Effect of smoking and abstention on oxidative burst and reactivity of neutrophils and monocytes. **Surgery**. Vol.136 n.05. 2004.

SUL D, KIM H, OH E, PHARK S, CHO E, CHOI S, KANG HS, KIM EM, HWANG KW, JUNG WW. Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde. *Arch Toxicol*, 81(8):589-97, 2007.

TALATI M, MEYRICK B, PEEBLES RS JR, DAVIES SS, DWORSKI R, MERNAUGH R, MITCHELL D, BOOTHBY M, ROBERTS LJ 2ND, SELLER JR. Oxidant stress modulates murine allergic airway responses. *Free Radic Biol Med*. 40(7):1210-9, 2006.

TANG, X., BAI, Y., DUONG, A., SMITH, M. T., LI, L., & ZHANG, L. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. **Environment international**, 35(8), 1210-1224. 2009.

TOKARS, E. J.; QU, W.; PERSON, R. J.; NGLAME, O. N. & WAALKES, M.P. Oxidative stress and the inorganic carcinogens. **Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology**. 2013.

TUNER, J.; HODE, L. Medical Indications. Chapter 4. Cardiac Conditions - Clinical Studies. In: The New Laser Therapy Handbook. - TUNER, J.; HODE, L. (eds.). **Prima Books, Graengesberg**, Sweden. pag. 206-208. 2010.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, K. & LORIDAS, S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. **Int J. Environ. Res. Public Health**. Ed.10(9). 2013.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. G.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. & KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**. Vol.30 n.05. 2007.

WANTKE, F.; FOCKE, M.; HEMMER, W.; BRACUN, R.; WOLF-ABDOLVAHAB, S.; GÖTZ, M.; JARISCH, R. Exposure to formaldehyde and phenol during na anatomy dissecting course: sensitizing potency of formaldehyde in medical students. **Allergy**, v. 55, p.84–87, 2000.

YAO, P., NUSSLER, A., LIU, L., HAO, L., SONG, F., SCHIRMEIER, A., & NUSSLER, N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. **Journal of hepatology**, 47(2), 253-261. 2007.

YEMELYANOV, A. Y., KATZ, N. B., & BERNSTEIN, P. S. Ligand-binding characterization of xanthophyll carotenoids to solubilized membrane proteins derived from human retina. **Experimental eye research**, 72(4), 381-392. 2001.

TANG, X., BAI, Y., DUONG, A., SMITH, M. T., LI, L., & ZHANG, L. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. **Environment international**, 35(8), 1210-1224. 2009.

## 9 ANEXOS

- Protocolo de ética dos experimentos