



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NICOLE CRISTINE RIGONATO DE OLIVEIRA

**“EFEITO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI) EM
MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR
INDUZIDA POR *HOUSE DUST MITE (HDM)* - ESTUDO DE DOSIMETRIA”**

SÃO PAULO, SP

2018

NICOLE CRISTINE RIGONATO DE OLIVEIRA

**“EFEITO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI) EM
MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR
INDUZIDA POR *HOUSE DUST MITE (HDM)* - ESTUDO DE DOSIMETRIA”**

Tese apresentada à Universidade Nove de
Julho, para obtenção do título de Doutorado em
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira

SÃO PAULO, SP

2018

Oliveira, Nicole Cristine Rigonato de.

Efeito da terapia com laser de baixa intensidade (LBI) em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar induzida por house dust mite (HDM) – estudo de dosimetria. / Nicole Cristine Rigonato de Oliveira. 2018.

96 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Dr^a. Prof^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira.

1. Asma. 2. Resposta imune. 3. Remodelamento. 4. Laser de baixa intensidade. 5. Citocinas

I. Oliveira, Ana Paula Ligeiro de.

II. Titulo.

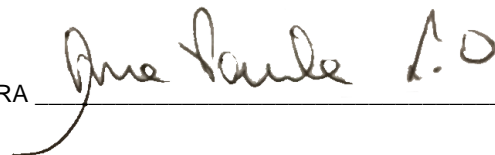
CDU 615.831

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Nicole Cristine Rigonato de Oliveira

Título da Tese: "Efeito da terapia com laser de baixa intensidade (LBI) em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar induzida por *House Dust Mite* (HDM): Estudo de dosimetria".

Presidente: PROF^a. DR^a. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



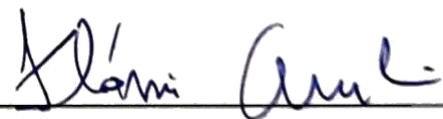
Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



Membro: PROF^a. DR^a. BEATRIZ MAGUEIRA SARAIVA ROMANHOLO



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, com todo carinho e em especial ao meu companheiro querido, Diego, que esteve presente em todos os momentos dessa jornada, sempre muito paciente e persistente. Também ao meu filho Enzo, por ser uma fonte de determinação para eu continuar e alcançar mais essa vitória em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A realização dessa nova conquista só se tornou possível pela presença de pessoas maravilhosas em minha vida, as quais tenho a alegria de mencionar nesse texto e levar para sempre comigo essa gratidão.

Agradeço imensamente e em primeiro lugar à Deus pelo dom da vida e sabedoria, bem como por me proporcionar a realização desse maravilhoso sonho. Também ao meu querido Santo Expedito, por sempre estar ao meu lado em situações difíceis.

Com um grande carinho, quero deixar meu agradecimento especial à minha mãe Helena e minha irmã Ana Carolina, que são pessoas que tenho um amor e cumplicidade incondicional, e que mesmo estando distante, sempre encontraram uma maneira de orientar e dar forças para eu continuar.

Agradecer à paciência, cumplicidade, auxílio emocional e financeiro do meu noivo Diego.

Agradecer ao meu filho Enzo, que em menos de 1 ano de vida já me proporcionou tantas sabedorias e têm sido minha inspiração.

Gostaria também de agradecer à minha querida orientadora Prof^a Dr^a Ana Paula Ligeiro de Oliveira, que nesses 3 anos e meio, teve um carinho materno para comigo, sempre esteve disposta a me ouvir, me orientar, me aconselhar, enfim, somente contribuiu de forma a agregar para o meu crescimento profissional e pessoal. Minha eterna gratidão pela oportunidade e confiança.

Minha gratidão também ao Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira, que contribuiu de forma muito significativa para o meu crescimento e para o desenvolvimento desse trabalho.

Também aos meus professores de graduação, que contribuíram meu ingresso na área acadêmica de pós-graduação, minha eterna gratidão ao Prof. Dr. Nelson Francisco Serrão Júnior e Prof^a Dr^a Aline Roberta Danaga.

Também gostaria de agradecer às minhas colegas de laboratório, Auriléia Brito, Tawany Gonçalves, Karine Zanela e Cintia Alves que sempre estiveram dispostas a ajudar em tudo o que fosse necessário. Por me ajudarem especialmente durante o momento de licença maternidade. Também agradecer à minha colega Luana Vittoretti, pelos ensinamentos e palavras amigas, aos estagiários da biologia Nataly Bezerra e Guilherme Jonas, que me auxiliaram com o último protocolo experimental.

Agradecer também aos técnicos dos laboratórios de pesquisa e laboratório de imunologia pulmonar, bem como à Universidade Nove de Julho pela concessão da bolsa de estudos no programa de pós-graduação strictu sensu em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde. Agradeço também todos os funcionários inseridos no programa.

Por fim, agradecer a aprovação da bolsa de estudos (2015/23152-6) e apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EPÍGRAFE

“Quando aceitamos nossos limites, conseguimos ir além deles”

Albert Einstein

RESUMO

A asma é caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. Apresenta alta prevalência, custo econômico e social. Vários modelos têm sido propostos, objetivando a descoberta de novas terapias. A terapia com Laser de Baixa Intensidade (LBI) é relativamente nova e eficaz, de baixíssimo custo, sem efeitos colaterais. Quanto à laserterapia, ainda não existe um consenso sobre a dose ideal a ser utilizada. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do LBI com diferentes energias sobre a inflamação pulmonar crônica em modelo experimental de asma induzida por *House Dust Mite (HDM)*. Utilizamos camundongos Balb/c, divididos em 10 grupos: Basal, *HDM*, Laser (1J, 3J, 5J e 7,5J) e *HDM*+Laser (1J, 3J, 5J e 7,5J). O LBI utilizado foi o de diodo (660 nm, 100 mW) e para cada energia, utilizamos diferentes tempos (10s, 30s, 50s e 75s), em três pontos: traquéia, lobo esquerdo e direito. Para o modelo experimental, os animais receberam administração orotraqueal de 100ug/animal de *HDM* nos dias 0, 14, seguidos de 3 administrações semanais até o dia 56. Após 24 horas, estudamos parâmetros funcionais e estruturais, como a inflamação pulmonar através do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA), contagem de células totais e diferenciais, quantificação de CD11b, LY6G, Siglec-F, CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ no pulmão, a porcentagem de 7AAD e ANEXINA V, bem como de linfócitos CD4⁺, STAT6⁺, GATA3⁺ e IL-4⁺ no FLBA por citometria de fluxo, citocinas no FLBA e homogenato pulmonar (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) por ELISA, análise morfológica do infiltrado peribrônquico eosinofílico (LUNA), de muco (PAS), colágeno (PSR), índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e muscular (HE), mecânica pulmonar (elastância pulmonar) e reatividade pulmonar pelo método Power Lab. Os resultados evidenciaram que o LBI foi capaz de modular a inflamação pulmonar observado pela redução do número de células no FLBA, bem como reduziu a porcentagem de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺). Além disso, diminuiu os linfócitos CD4⁺STAT 6⁺ e GATA3⁺, bem como apoptose e necrose celular. Por outro lado, a laserterapia aumentou a porcentagem de macrófagos e de IL-10 e reduziu os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no FLBA e homogenato pulmonar. O LBI foi capaz de reduzir a produção de muco. Com relação às alterações estruturais, observamos importante redução na quantificação de eosinófilos peribrônquicos, deposição de

colágeno, índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e muscular nas vias aéreas, após o tratamento com LBI. Por fim, em análise funcional, a avaliação da reatividade traqueal frente à metacolina e avaliação da mecânica pulmonar apresentou diminuição em todos os grupos submetidos à laserterapia. Concluímos assim, que o uso da laserterapia no tratamento da inflamação crônica das vias aéreas, atenuou o processo inflamatório, os parâmetros funcionais e estruturais pulmonares. Destacamos de maneira geral que o laser com 3J, apresentou melhores resultados. Dessa maneira, a fotobiomodulação pode ser considerada uma ferramenta promissora para o tratamento da inflamação alérgica pulmonar crônica, observada na asma.

Palavras-chave: asma, laser de baixa intensidade, dosimetria, imunologia, citocinas

ABSTRACT

Asthma is characterized by chronic inflammation in the airways. It presents high prevalence, economic and social cost. Several models have been proposed aiming the discovery of new therapies. Low Level Laser Therapy (LLLT) is relatively new and effective, of very low cost, with no side effects. As for laser therapy, there is still no consensus on the optimal dose to be used. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the effect of LLLT with different energies on chronic lung inflammation in an experimental model of asthma induced by House Dust Mite (HDM). We used Balb/c mice, divided into 10 groups: Basal, HDM, Laser (1J, 3J, 5J and 7,5J) and HDM+Laser (1J, 3J, 5J and 7,5J). The LLLT used was diode (660 nm, 100 mW) and for each energy, we used different times (10s, 30s, 50s and 75s) in three points: trachea, left lobe and right. For the experimental model, the animals received orotracheal administration of 100ug/animal HDM on days 0, 14, followed by 3 weekly administrations by day

56. After 24 hours, we studied functional and structural parameters, such as pulmonary inflammation through bronchoalveolar lavage fluid (BALF), total and differential cell count, quantification of CD11b, LY6G, Syglec F, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in the lung, the percentage of 7AAD and ANEXINA V, as well as CD4⁺, STAT6⁺, GATA3⁺ and IL-4⁺ lymphocytes in BALF by flow cytometry, cytokines in BALF and pulmonary homogenate (IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13) by ELISA, morphometric analysis of eosinophilic peribronchial infiltrate (LUNA), mucus (PAS), collagen (PSR), bronchoconstriction index, bronchial and muscular thickening (HE), pulmonary mechanics (pulmonary elastance) and pulmonary reactivity by the Power Lab method. Results showed that LLLT was able to modulate observed pulmonary inflammation by reducing the number of cells in the BALF, as well as reducing the percentage of neutrophils, eosinophils and T

lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺). In addition, it decreased CD4⁺ STAT6⁺ and GATA3⁺ lymphocytes, as well as apoptosis and cell necrosis. On the other hand, laser therapy increased the percentage of macrophages and IL-10 and reduced levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in the BALF and pulmonary homogenate. LLLT was able to reduce mucus production. Regarding the structural alterations, we observed a significant reduction in the quantification of peribronchial eosinophils, collagen deposition, bronchoconstriction index, bronchial and muscular

thickening in the airways, after LLLT treatment. Finally, in functional analysis, the evaluation of tracheal reactivity to methacholine and evaluation of pulmonary mechanics presented a decrease in all groups submitted to laser therapy. We conclude that the use of laser therapy in the treatment of chronic inflammation of the airways attenuated the inflammatory process, functional parameters and pulmonary structure. We emphasize in general that the 3J laser presented better results. Thus, photobiomodulation can be considered a promising tool for the treatment of chronic pulmonary allergic inflammation observed in asthma.

Keywords: asthma, low intensity laser, dosimetry, immunology, cytokines.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	22
1.1. Asma - Definição	22
1.2. Asma – Dados Epidemiológicos	22
1.3. Asma: Mecanismos Celulares e Moleculares	23
1.4. Asma - Intervenções Terapêuticas	27
1.4.1 Laser de Baixa Intensidade	27
1.4.1.1. Laser de Baixa Intensidade em Doenças Pulmonares	31
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Animais	37
3.2. Protocolo Experimental	37
3.2.1. Grupos Controles e Experimentais	38
3.2.2.. Modelo experimental – Inflamação Alérgica com <i>HDM</i>	38
3.2.3. Terapia com LBI	39
3.3. Coleta e Avaliação da inflamação pulmonar no FLBA	40
3.4. Citometria de Fluxo	41
3.4.1. Identificação de células recrutadas para o pulmão e análise de atividade funcional	41
3.4.2. Fenotipagem	41

3.4.3. Morte celular	42
3.5. Avaliação dos níveis de citocinas no FLBA por ELISA	42
3.6. Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas por histologia	42
3.7. Índice de broncoconstrição	43
3.8. Avaliação da mecânica pulmonar para avaliação da elastância pulmonar	43
3.9. Análise da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico	45
3.10. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	46
4.1. Quantificação das células totais presente no FLBA	46
4.2. Quantificação das células diferenciais presentes no FLBA	47
4.3. Perfil e viabilidade celular através de citometria de fluxo no FLBA	50
4.4. Quantificação de Citocinas no sobrenadante do FLBA	61
4.5. Quantificação de Citocinas no homogenato de tecido pulmonar	64
4.6. Quantificação peribrônquica de eosinófilo	67
4.7. Quantificação de Muco nas vias aéreas	69
4.8. Quantificação de Colágeno nas vias aéreas	71
4.9. Índice de broncoconstrição	73
4.10. Avaliação da Mecânica Pulmonar	76
4.11. Análise da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico	78
5. DISCUSSÃO	79

6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8. ANEXOS	97
8.1. Aprovação CEUA	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-IgE – Anti-ImunoglobulinaE

APC - Alococianina

β 2 – beta 2

BSA – do inglês, “*Bovine Serum Albumin*”

CD – do inglês, “*Cluster Differentiation*”

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

°C – graus Celsius

cm² – centímetro quadrado

Der p - “*Dermatophagoides pteronyssinus*”

DNase I - desoxirribonuclease I

DP – Desvio Padrão

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ECP – Proteína Catiônica eosinofílica

EDTA – do inglês, “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”

Edyn – elastância pulmonar dinâmica

EGF – do inglês, “epidermal growth factor”

ELISA - do inglês, “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”

Est - elastância pulmonar estática

FA - Formaldeído

Fc - Fragmento Cristalizável

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FGF – do inglês, *“fibroblast growth factor”*

FLBA- Fluido do Lavado Broncoalveolar

GINA – do inglês, *“Global Initiative for Asthma”*

GPX – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

h – Horas

HBSS – solução balanceada de Hank's

He-Ne- Hélio-Neônio

HDM – do inglês, *“House Dust Mite”*

Hz – Hertz

ICAM-1 – do inglês, *“Intercellular Adhesion Molecule 1”*

IgE - imunoglobulinas do tipo E

IL - Interleucina

IFN- - Interferon gamma

i.p. – Intraperitoneal

IR – Isquemia Reperfusão

J – Joules

KH - solução de Krebs-Hanseleit

LASER – do inglês, *“Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”*

LBI – Laser de Baixa Intensidade

LED - diodo emissor de luz

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB4 – Leucotrieno B4

LTC4 – Leucotrieno C4

MASER – do inglês, “*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”

MAPK - do inglês, “*Mitogen-Activated Protein Kinase*”

MCh - Metacolina

MBP – proteína básica principal

MIP- 1 α – do inglês, “*Macrophage Inflammatory Protein*”

mg/kg - miligrama/kilograma

ml – mililitros

MPO- Mieloperoxidase

mW - miliwatts

NFAT – do inglês, “*Nuclear Factor of Activated T-cells*”

NF-kB – do inglês, “*Factor Nuclear kappa B*”

nm - nanômetros

NO – do inglês, “*Nitric Oxide*”

OVA - Ovalbumina

o.t. – orotraqueal

P2X7 – Um tipo de Receptor Purinérgico PAS –

do inglês, “*Periodic Acid-Schiff*” PAF – do inglês,

“*Platelet Activating Factor*” PerCP – do inglês,

“*peridinin-chlorophyll-protein*” PBS – do inglês,

“*Phosphate Buffered Saline*” PSR – do inglês,

“*Picrosirius red*”

PGE₂ – Prostaglandina E2

Pel-Po – Pressão de Platô

Pi-Po- Ponto de Inflexão ajustada

Po – Pressão pré-inspiratória

RANTES – do inglês, “*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*”

ROS – do inglês, “*Reactive oxygen species*”

rpm – rotações por minuto s - Segundos

SARA - Síndrome da Angústia Respiratória Aguda

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido Dismutase

SIT – do inglês, “*Specific Immunotherapy*”

STAT – do ingles, “*Signal Transducer and Activator of Transcription*”

TCR – do inglês, “*T cell receptor*”

TE – tempo de expiração

TGF-β – do ingles, “*transforming growth factor beta*”

Th1 – do inglês, “*Thelper1*”

Th2 – do inglês, “*Thelper2*”

TNF- - do inglês, “*Tumor Necrosis Factor - alpha*”

TR – tempo de relaxamento ug - micrograma

uL – microlitros

um - micrômetros

VCAM -1 – do inglês, “*Vascular cell adhesion molecule-1*”

VEGF – do inglês, “*Vascular Endothelial Growth Factor*”

VLA-1 – do inglês, “*Very Late Activation antigen 1*”

VIP – do inglês, “*Vasoactive Intestinal Peptide*”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta Imune de Células T nas Vias Aéreas Asmáticas.....	24
Figura 2. Subpopulações de Células T helper e Perfis de Citocinas.....	26
Figura 3. Representação das vias de sinalização celular após LBI.....	30
Figura 4. Protocolo Experimental.....	37
Figura 5. Demonstração de administração o.t. de <i>HDM</i>.....	39
Figura 6. LBI utilizado no Protocolo Experimental.....	40
Figura 7. Pontos de aplicação do LBI.....	40
Figura 8. Curvas Fluxo e Pressão Traqueal em Relação ao Tempo.....	45
Figura 9. Efeito da terapia com LBI sobre o número total de células recuperadas do FLBA.....	46
Figura 10. Efeito da terapia com LBI sobre o número de macrófagos (A) e linfócitos (B) recuperadas do FLBA.....	48
Figura 11. Efeito da terapia com LBI sobre o número de neutrófilos (C) e eosinófilos (D) recuperadas do FLBA.....	49
Figura 12. Efeito da terapia com LBI sobre a quantificação de Macrófagos (CD11b) no FLBA.....	50
Figura 13. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Neutrófilos (LY6G) no FLBA.....	51
Figura 14. Efeito da terapia com LBI sobre a quantificação de Eosinófilos (SyglecF) no FLBA.....	52
Figura 15. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Linfócitos Totais (CD3⁺) no FLBA.....	53
Figura 16. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Linfócitos T (CD4⁺) no FLBA.....	54

Figura 17. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Linfócitos T (CD8⁺) no FLBA.....	55
Figura 18. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Necrose Celular (Anexina V) no FLBA.....	56
Figura 19. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Apoptose Celular (7AAD) no FLBA.....	57
Figura 20. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem do fator de transcrição STAT 6 no FLBA.....	58
Figura 21. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem do fator de transcrição GATA 3 no FLBA.....	59
Figura 22. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de CD4⁺ IL-4⁺ no FLBA.....	60
Figura 23. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-4 (A) e IL-5 (B) no sobrenadante do FLBA.....	62
Figura 24. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-10 (C) e IL-13 (D) no sobrenadante do FLBA.....	63
Figura 25. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-4 (A) e IL-5 (B) no homogenato de tecido pulmonar.....	65
Figura 26. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-10 (C) E IL-13 (D) no homogenato de tecido pulmonar.....	66
Figura 27. Efeito da terapia com LBI sobre a quantificação de eosinófilos peribrônquicos.....	68
Figura 28. Efeito da terapia com LBI sobre a produção de muco nas vias aéreas.....	70
Figura 29. Efeito da terapia com LBI sobre a produção de colágeno nas vias aéreas.....	72
Figura 30. Efeito da terapia com LBI sobre o índice de broncoconstrição	74

Figura 31. Efeito da terapia com LBI sobre o espessamento brônquico e espessamento do músculo liso das vias aéreas.....	75
Figura 32. Efeito da terapia com LBI sobre a mecânica pulmonar com tórax fechado.....	77
Figura 33. Efeito da terapia com LBI sobre a resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico.....	78

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Parâmetros utilizados para a irradiação com laser.....	39
---	-----------

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Asma - Definição

A asma é uma das doenças crônicas mais comuns em âmbito mundial. É definida como uma doença heterogênea, pois apresenta muitas variações, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas. A asma provoca sintomas como chiados, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam ao longo do tempo na sua ocorrência, frequência e intensidade. Estes sintomas estão associados com o fluxo de ar expiratório variável, ou seja, dificuldade para respirar devido ao broncoespasmo (estreitamento das vias aéreas), espessamento da parede das vias aéreas e aumento da produção de muco.¹

1.2. Asma – Dados Epidemiológicos

Atualmente apresenta uma crescente prevalência na população mundial. Segundo relatório publicado pela iniciativa *Global Initiative for Asthma* (GINA), em 2018, declarou que aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo atualmente têm asma.¹ A estimativa é que poderá haver um adicional de 100 milhões pessoas com asma no ano de 2025. Dados atualizados mostram que a asma causa 346.000 mortes a cada ano, tratando-se de âmbito mundial.²

O aumento na prevalência da tem sido associada ao contato direto com fatores que podem desencadear ou piorar os sintomas presentes na asma, tais como: infecções virais, alérgenos ocupacionais e domésticos (*house dust mite* e pólen principalmente), estresse e fumo do tabaco. Outro fator importante e que apresenta correlação direta é a elevação mundial da população urbana, de 45% para 59%, favorecendo dessa maneira um aumento no número de asmáticos em todo o mundo ao longo das próximas duas décadas.¹

A asma retrata significativamente conseqüências econômicas, em termos de custos médicos diretos, seja com uso de medicamentos ou com internação hospitalar, ou com importante agravamento se adicionarmos aos valores despendidos com os seus efeitos secundários, como o absentismo escolar e

no trabalho, além da piora na qualidade de vida dos pacientes asmáticos e morte prematura.¹

1.3. Asma – Mecanismos Celulares e Moleculares

O ácaro da poeira doméstica, conhecido amplamente por “*House Dust Mite*” é a fonte doméstica mais importante para doenças alérgicas, como rinite alérgica, asma e dermatite atópica. Dentre as espécies de ácaros existentes, o *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) é o principal alérgeno ambiental, encontrado principalmente em ambientes úmidos e quentes, fatores que são considerados favoráveis para o seu crescimento.³ O *HDM* tem sido usado com sucesso para induzir asma em modelos animais. Três características deste alérgeno torna-o adequado: atividade enzimática intrínseca, imunogenicidade e ativação direta através do receptor de Dectina-2 de células imunes inatas que promovem inflamação alérgica.⁴

O envolvimento de citonas perfil THelper 2 (Th2) na fisiopatologia da inflamação das vias aéreas, eosinofilia e produção excessiva de muco é bastante conhecida.⁵⁻⁶ Os asmáticos têm linfócitos T ativados em respostas a alérgenos (fungos, pólen, pêlos de animais, ácaros de poeira doméstica), com perfil Th2 de liberação de citocinas. Na fisiopatologia da asma, o alérgeno interage com as células dendríticas e linfócitos T (CD4+, levando ao desenvolvimento de linfócitos Th naive, que dão origem a um clone de linfócitos Th2. Estes secretam grandes quantidades de Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5), Interleucina-9 (IL-9) e Interleucina-13 (IL-13), demonstrados na inflamação alérgica em humanos asmáticos, modelos animais de inflamação alérgica das vias respiratórias e cultura de células epiteliais.⁷⁻⁹

Em adição a esses fatores, podemos citar os fatores de contribuição representados pela poluição atmosférica, fumaça do cigarro, infecção viral e alterações hormonais femininas.¹⁰⁻¹² Embora existam subtipos de asma, alérgica e não alérgica, a inflamação é desencadeada por respostas imunes inatas e/ou adquiridas.

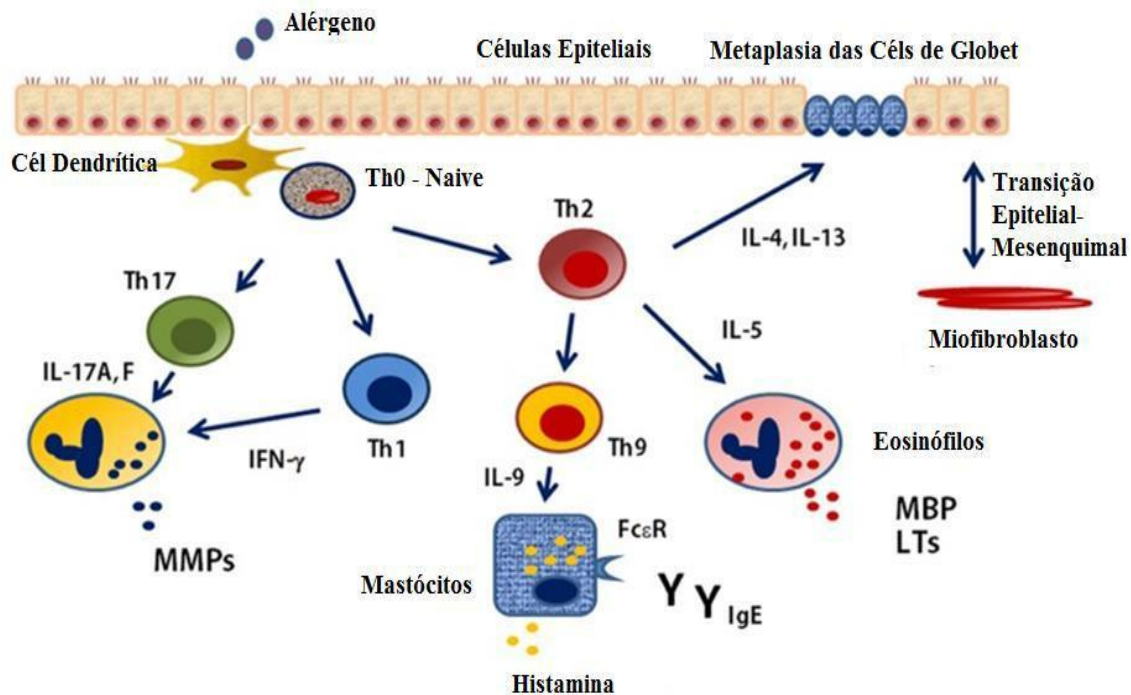


Figura 1. Resposta Imune de células T nas vias aéreas asmáticas.

Adaptado de (Kudo, 2013) ⁶

Estudos da literatura mostram que IL-4 e IL-13 são responsáveis pela estimulação e maturação de linfócitos B e a síntese de Imunoglobulina-E (Ig-E), além de juntamente com a IL-9, ajudar no desenvolvimento de mastócitos. ¹³

A IL-5 leva ao crescimento e diferenciação dos eosinófilos. A IgE liga-se aos receptores do fragmento cristalizável (Fc) nos mastócitos e eosinófilos. Quando a IgE ligada aos receptores faz ligação cruzada com o antígeno, as células são ativadas e liberam mediadores como histamina, leucotrienos, citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, "Tumor Necrosis Factor-alpha" TNF), prostaglandinas, proteases, que causam broncoconstrição, obstrução do fluxo aéreo, aumento na produção de muco, aumento da permeabilidade e edema – esta fase é caracterizada como fase imediata da asma. ¹⁴

Depois desses efeitos rápidos segue-se a reação de fase tardia, sendo uma reação inflamatória progressiva caracterizada por infiltrado de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, onde esses últimos têm particular importância. Com o início da fase tardia, o ambiente inflamatório é caracterizado pela presença de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13), quimiocinas (eotaxina, RANTES e MIP-1α),

moléculas de adesão e seus receptores (VLA-1, VLA-4, ICAM-1, VCAM-1), mediadores lipídicos (PAF, LTB₄, LTC₄ e PGE₂) e diversas substâncias secretadas por eosinófilos como a MBP (proteína básica principal), a ECP (proteína catiônica eosinofílica). Através de seus mediadores as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico (substância P, neurocinina A) e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea. ¹⁵

Finalmente, em alguns indivíduos, há uma maior progressão da inflamação levando ao remodelamento das vias aéreas. O remodelamento leva a alterações na arquitetura das vias aéreas de tal forma que a obstrução do fluxo de ar pode ser irreversível. O que acontece é que a lesão epitelial encontrada na asma deve ser reparada. Ocorre então a liberação de várias citocinas e fatores de crescimento como EGF (epidermal), TGF- β , o FGF (fibroblastos), o VEGF (endotelial vascular). O dano epitelial também ativa as próprias células epiteliais, além dos leucócitos em geral e de outras células estruturais, como os fibroblastos e miofibroblastos, resultando em proliferação e estímulo do depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal, o que explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes com asma. ¹⁶

Importante destacar que o fator de transcrição GATA3 é crucial para a diferenciação de células T *naive* em células Th2. ^{17,18} Há um aumento no número de células T GATA3⁺ nas vias aéreas dos indivíduos asmáticos estáveis. ¹⁹ Após a ligação do receptor de célula T (TCR) e CD28 pelas células apresentadoras de antígeno, o GATA3 é fosforilado e ativado por p38 MAPK, resultando na translocação do citoplasma para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes característicos de células Th2. ²⁰

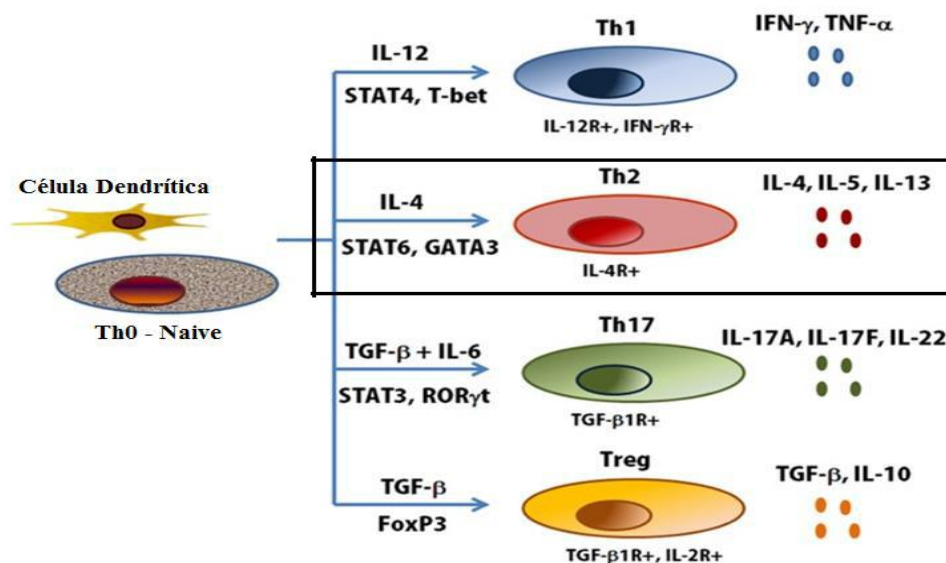


Figura 2. Subpopulações de Células T helper e Perfis de Citocinas

Adaptado de (Kudo, 2013) ⁶

A expressão de GATA3 é regulada pelo STAT6 via ativação do receptor de IL-4. Na asma o STAT6 rege a secreção de IL-4 durante uma resposta Th2. ²¹ Nas respostas Thelper 1 (Th1) o STAT1 e STAT4 induzem a síntese de Interferon-gamma (IFN-) através da ativação de T-bet, o qual suprime a resposta Th2. ²² As células que expressam GATA3 estão correlacionadas com o aumento da resistência e hiperreatividade das vias aéreas em asmáticos.

Na asma, todas as características da inflamação pulmonar e da desregulação fisiológica são o resultado final dos eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização, na ativação de células Th2 e na ativação dos mecanismos efetores dessas citocinas.

O reconhecimento global desta doença evidencia o crescente aumento de sua prevalência e mortalidade, bem como o importante impacto sócio-econômico que ela ocasiona o que têm levado a esforços para o desenvolvimento de novas terapias, estas que atuem a fim de contribuir para o controle do processo inflamatório, melhora do desconforto respiratório, com consequente redução da mortalidade e dos custos.

1.4. Asma- Intervenções Terapêuticas

Têm-se investido muito em pesquisa na procura de novos fármacos para o tratamento dessa afecção. Em consequência dos seus efeitos, vários agonistas adrenérgicos seletivos para os receptores β_2 foram desenvolvidos para tratamento sintomático da asma. As xantinas são usadas como fármaco de 2ª escolha em conjunto com os corticóides em pacientes que não respondem bem aos agonistas beta2 (β_2), sendo os glicocorticóides os principais fármacos anti-inflamatórios usados no tratamento dessas enfermidades.

Além do tratamento com broncodilatadores, glicocorticóides, antagonista de leucotrienos e terapia anti-ImunoglobulinaE (anti-IgE), novas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas para o tratamento da asma, como a SIT (Imuno-terapia específica), terapias específicas para citocinas, VIP (Peptídeo intestinal vasoativo), antagonista de endotelina, inibidores de NO (óxido nítrico), inibidores de triptase, entre outras. Embora a terapia medicamentosa seja classicamente a primeira opção para o tratamento das doenças pulmonares crônicas, essa opção ainda desencadeia alguns efeitos colaterais indesejados.

Em busca de terapia alternativa que beneficiem o paciente asmático, esta que não apresente efeito colateral, seja de fácil acesso, baixo custo, têm-se investigado o uso da laserterapia como alternativa no tratamento de doenças pulmonares, entretanto, ainda não há estabelecido em literatura a sua utilização em modelo experimental de asma alérgica induzida por *HDM*, nem definida qual a melhor dose.

1.4. 1. Laser de Baixa Intensidade

Apesar da terapia com laser de baixa intensidade ser amplamente utilizada na redução da dor, inflamação, edema e cicatrização, ainda não há um entendimento e concordância quanto a melhor dose a ser utilizada. A teoria estabelecida pela Lei de Arnold Shultz, sugere que estímulos fracos são capazes de acelerar ligeiramente a atividade vital, enquanto estímulos mais fortes irão atingir um pico máximo e suprimir a resposta. A utilização da curva bifásica pode ilustrar a resposta dose esperada à luz em nível subcelular, celular, tecido ou

clínico. Resumidamente, sugere que se houver aplicação suficiente de energia, não haverá resposta, porque o limite mínimo não foi atingido. Em segundo momento, se mais energia for aplicada, então um limiar é cruzada e ocorre a bioestimulação. Por último, quando muita energia é aplicada, a estimulação por sua vez desaparece e então será substituída pela bioinibição.²³

O laser foi teorizado por Albert Einstein no início do século XX, mais precisamente no ano de 1916, que propôs inicialmente o fenômeno de emissão estimulada. A palavra LASER é uma sigla, originada de "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*", em sua tradução "Amplificação da luz por emissão estimulada".²⁴

No ano de 1951, Charles Hard Townes, baseado no postulado de Albert Einstein desenvolveu o "*Maser*" (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), traduzido em "Amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação".²⁵ No ano de 1964, Townes juntamente com dois colegas de trabalho, receberam o prêmio Nobel de Física pela construção de osciladores e amplificadores baseados no princípio maser-laser. Mas somente em 1960, Theodore Harold Maiman construiu o primeiro laser de sucesso a partir de um cristal de rubi.²⁶ Seguido no mesmo ano, foi criado também o laser de estado sólido de urânio por Peter Sorokin e Mirek Stevenson e o laser He-Ne (Ali Javan, William Bennett Jr. e Donald Herriott).

A utilização do laser operando em baixa intensidade é estudada desde os anos sessenta. Vários trabalhos estão sendo desenvolvidos para se avaliar a dose ideal de aplicação em amostras *in vitro* (células), *in vivo* (modelos experimentais) e até mesmo na área clínica, bem como quais os reais efeitos dessa irradiação sobre os tecidos. A terapia com LBI ou fototerapia é caracterizada por sua capacidade de induzir processos fotobiológicos nas células.²⁷ A laserterapia emprega normalmente o uso da luz visível, geralmente a vermelha ou até mesmo a infravermelha, que são geradas por um sistema de laser ou diodo emissor de luz (LED), com variações ajustáveis de largura espectral estreita, densidade de energia e densidade de potência.²⁸

Vale ressaltar que a absorção dos fótons emitidos depende da quantidade de fotorreceptores moleculares ou cromóforos (principalmente hemoglobina e

melanina) presentes no tecido alvo.²⁹ O alvo da laserterapia é um tecido alterado, onde a radiação restabelece a homeostase energética fazendo com que as células voltem a proliferar, diferenciar e secretar citocinas. Além disso, pode-se observar modulação da inflamação, redução da dor e edema e cicatrização de feridas acelerada nos pacientes irradiados.³⁰⁻³²

O efeito fotoquímico ocorre devido à presença de moléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por moléculas intracelulares específicas pode alterar suas atividades e assim, produzir estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Existe no organismo uma fotorregulação, com alterações nos fotorreceptores provocando assim, mudanças na atividade funcional e metabólica da célula. Estas mudanças fotodinâmicas podem alterar processos fisiológicos com conotações terapêuticas. Karu et al. (1999, 2004) demonstrou alguns desses efeitos associados à terapia com laser de baixa intensidade tais como: estimulação de crescimento celular, reparação celular, efeito antiinflamatório, redução de edema/revascularização, redução da formação de tecido fibroso, maior atividade tissular e estimulação nervosa.^{33,34}

Em recente estudo realizado por Passarella et al (2014), mostraram que as mitocôndrias desempenham um papel importante na interação entre a célula e a luz. Sendo assim, as mitocôndrias são consideradas células essenciais na fotobiomodulação celular. Além disso, também relataram que uma grande variedade de biomoléculas localizadas nas mitocôndrias e / ou em outros compartimentos celulares incluindo citocromo c oxidase, algumas proteínas, ácidos nucleicos e os nucleótidos de adenina são sensíveis à luz com grandes alterações na sua bioquímica. Todas as investigações relatadas mostram que o mecanismo da interação da luz com alvos biológicos ainda precisa ser estudado para uma melhor elucidação.³⁵

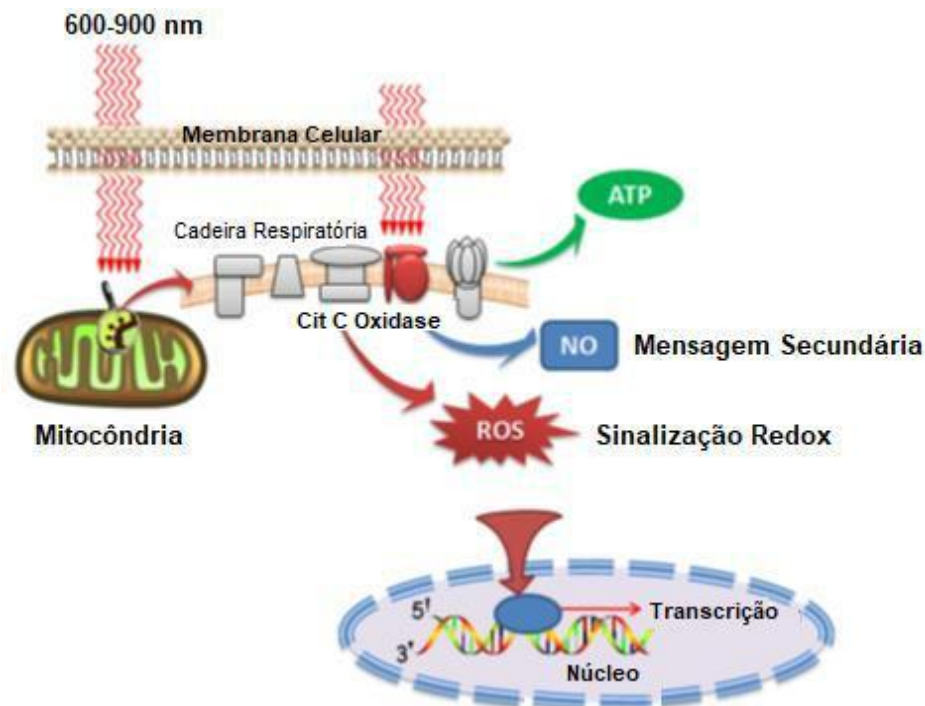


Figura 3. Representação das vias de sinalização celular após LBI

Adaptado de Huang et al (2011) ²⁸

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos do LBI sobre células em diferentes situações metabólicas, é importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do LBI sobre tecidos biológicos não estão bem estabelecidas. Por isso, estudos que permitam compreender qual o tipo de sinalização celular desencadeada pelo laser, se fazem pertinentes e extremamente necessários. A partir da compreensão da sinalização celular do LBI e de sua respectiva dosimetria, foi possível estabelecer de fato a eficácia da terapia laser para diferentes doenças.

Assim, parece-nos razoável que o sucesso dessa terapia depende de um maior entendimento de processos biológicos associados a seus efeitos anti-inflamatórios, tanto no tratamento de doenças pulmonares como no tratamento de outras doenças. Por outro lado, até o momento, trabalhos na literatura investigando os efeitos e possíveis mecanismos de ação do LBI e a dosimetria mais eficaz em modelos experimentais de asma, em especial em modelo utilizando a administração de *HDM*, ainda são pouco estabelecidos e publicados.

Nesse sentido, esse projeto buscou estabelecer uma pesquisa cujo principal foco é a terapia com LBI para o tratamento de um modelo experimental de a inflamação alérgica pulmonar crônica em modelo experimental de asma induzida por *HDM*. Portanto, a pergunta inicial do projeto foi: Quais os reais efeitos e possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios do LBI na asma? Seguido de uma questão importante e que foi abordada na realização desse projeto: Qual a melhor energia a ser utilizada nesse modelo experimental?

1.4.1.1 Laser de Baixa Intensidade em Doenças Pulmonares

Apesar de a terapia medicamentosa apresentar uma maior eficácia, pois possui em sua composição agentes broncodilatadores, antibióticos e corticóides, alguns autores recomendam a utilização da terapia com LBI em condições de determinadas especificidades, tais como as condições de hipercapnia, hipóxia e disfunção de trocas gasosas. Porém, vale ressaltar que o LBI representa uma “ferramenta” não farmacológica no tratamento de afecções pulmonares. Assim, parece-nos razoável que o sucesso dessa terapia com LBI depende de um maior entendimento de processos biológicos associados a seus efeitos anti-inflamatórios no tratamento de doenças pulmonares.

Alguns autores já mostraram o efeito do LBI em doenças que acometem as vias aéreas. Mikhailov et al. (1998) observaram que a terapia com LBI duas vezes ao dia atuou de forma a auxiliar na atividade funcional pulmonar, evidenciando o aumento da complacência pulmonar e a eficácia de trocas gasosas em pacientes asmáticos.³⁶ Pidaev (1997) avaliando o efeito do LBI em indivíduos acometidos por inflamação pulmonar crônica observou que o LBI irradiado sobre a pele na região acima do brônquio principal apresentou um efeito anti-inflamatório, observado pela redução na migração celular para o pulmão.³⁷

Um crescente número de estudos vem demonstrando que a terapia com LBI pode ser uma opção de baixo custo e eficaz no auxílio do tratamento de doenças inflamatórias e fibróticas em geral. Nesse sentido, diversos trabalhos já têm demonstrado a eficácia do LBI em modelos experimentais de lesão pulmonar aguda induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)^{38,39} e por Isquemia e Reperusão

(IR) ^{40,41}, Inflamação Pulmonar induzida por formaldeído (FA) ^{42,43}, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ^{44,45} Fibrose pulmonar induzida por bleomicina ⁴⁶ e asma experimental utilizando ovalbumina (OVA). ⁴⁷⁻⁵¹

Na literatura, trabalhos apontam para um papel anti-inflamatório da terapia com LBI sobre a inflamação pulmonar desencadeada pela aplicação de LPS. Aimbire et al (2008) utilizaram o LBI (660 nanômetros (nm), 30 miliwattz (mW), 7,5 Joules/centímetro² (J/cm²) e área 0,785 centímetro² (cm²)) aplicado 1 hora após a aplicação de LPS. Como resultados, observaram a atenuação na permeabilidade pulmonar, com redução do influxo de neutrófilos, atividade de Mieloperoxidase (MPO) e redução de IL-1 beta no FLBA e Pulmão. ³⁸

Em modelo experimental de Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA), os autores observaram que a aplicação do LBI (830nm laser, 9J / cm², 35mW, 80 segundos (s) por ponto, 3 pontos por aplicação) aplicado em contato direto com a pele, 1h após a administração de LPS, foi capaz de reduzir a inflamação pulmonar e extrapulmonar, demonstrado pelo número reduzido de células totais e neutrófilos no FLBA, níveis reduzidos de IL-1beta, IL-6, KC e TNF - α no FLBA e soro, bem como o número de neutrófilos no parênquima pulmonar.

³⁹

Sobre a inflamação pulmonar desencadeada pela isquemia e reperfusão intestinal. A fototerapia com LBI (laser de diodo 660nm, 30 mW, área de saída da ponteira de 0,08 cm, com dose de irradiação crescente de (1, 3, 5 e 7.5J), aplicada pontualmente no brônquio 30 minutos após a reperfusão). O Laser reduziu edema, bem como o influxo de neutrófilos, reduzindo a produção de TNF- α e aumentando os níveis de IL-10. ⁴⁰

Em segundo trabalho utilizando a técnica de isquemia e reperfusão, os autores observaram que o uso do Laser de diodo 660nm, 30mW, 0,08 cm², 5.4J, diminuiu a atividade de MPO e a permeabilidade vascular pulmonar, reduziu o edema e a hemorragia alveolar, bem como diminuiu significativamente o infiltrado de neutrófilos. Notou-se uma regulação negativa na produção da quimiocina IL-8, bem como uma regulação positiva de citocina IL-10. ⁴¹

Em publicação utilizando modelo de inflamação pulmonar neutrofílica induzida por FA, os autores utilizaram o laser (660nm, 30mW, 60s por ponto, 0.14 cm², resultando em densidade de potência de 210mW e densidade de energia 12.86 J/cm²), aplicado 1h e 5h após a aplicação de FA. Após as análises, observaram redução no número de leucócitos, mastócitos desgranulados e atividade de MPO no pulmão. Além disso, a terapia com laser reduziu a permeabilidade microvascular no parênquima pulmonar e nos brônquios intrapulmonares. As alterações no perfil das citocinas inflamatórias foram evidenciadas pelos níveis reduzidos de IL-6 e TNF- α e pelos níveis elevados de IL-10 no pulmão. ⁴²

Em continuação à esse modelo experimental com FA, Macedo e colaboradores (2016), utilizaram a laserterapia (660nm, 30mW, 60s por ponto, 0.14 cm², resultando em densidade de potência de 210mW e densidade de energia 12,86 J/cm²), aplicado 1h e 5h após a aplicação de FA, observaram redução de nitritos e peróxido de hidrogênio e aumento do burst oxidativo nas células pulmonares. Observou-se também redução de enzimas oxidantes que estavam concomitantemente relacionadas com um aumento de antioxidantes. ⁴³

Em segundo momento, se tratando de doenças pulmonares crônicas, especificamente em modelo experimental de DPOC, Peron et al (2015) observaram que o uso do LBI (660nm, 30mW, 3J), associado ou não à aplicação de células tronco reduz a inflamação pulmonar, diminuindo o infiltrado celular e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e KC), seguidos por diminuição da produção de muco, acúmulo de colágeno e dano tecidual. Esses achados pareciam ser secundários à redução da ativação de NF- κ B e NF-AT em tecidos pulmonares com um aumento concomitante de IL-10. ⁴⁴

Em trabalho recente publicado também em modelo de DPOC, o grupo tratado com laserterapia (laser de diodo, 660 nm, 30 mW e 3 J / cm²) por 15 dias. Como resultado, observaram que o LBI reduziu significativamente o número de células inflamatórias e a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α no FLBA, bem como diminuiu a deposição de colágeno e a expressão do receptor purinérgico P2X7. Por outro lado, aumentou a liberação de IL-10. ⁴⁵

Em modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, os animais foram tratados com LBI aplicado ao tórax 1x/dia por 8 dias. (comprimento de onda 660 \pm 20nm, potência 100 mW, exposição radiante 5J/cm², irradiância 33,3 mW/cm², tamanho do ponto 2,8cm², energia total 15J, tempo de irradiação: 150 s). Os resultados mostraram que o LBI reduziu significativamente o número de células inflamatórias no espaço alveolar, produção de colágeno, espessamento intersticial e elastância pulmonar estática e dinâmica. Além disso, observaram níveis reduzidos de IL-6 e CXCL1/KC liberados por pneumócitos em cultura, bem como redução do nível de CXCL1/KC liberado pelos fibroblastos em cultura. ⁴⁶

Já para os próximos 5 trabalhos que serão descritos posteriormente, especificamente em modelos de asma experimental induzida por OVA, tais publicações evidenciaram melhora significativa nos parâmetros inflamatório, estruturais e funcionais com o uso da laserterapia.

O primeiro estudo utilizando LBI (658nm, 30mW, 15x10⁻² W/cm², 1J/cm² e 2J/cm²) observou com os resultados obtidos a efetividade do laser em inibir significativamente IgE total, expressão de quimiocinas reguladoras e IL-4 no timo e baço. ⁴⁷

Em trabalho de Silva et al (2014), o laser atuando em baixa intensidade (660nm, 30mW, 0.08 cm², 375 mW/cm², 5,4J, 180s) mostrou redução da hiperreatividade brônquica que coincidiu com menor expressão de RhoA no músculo brônquico, bem como redução nos eosinófilos, eotaxina, expressão de ICAM e as citocinas Th2, bem como os níveis de STAT6 nos pulmões. ⁴⁸

A aplicação do LBI (810nm, 80mW, 8J/cm²), evidenciou redução no número total de células e eosinófilos no FLBA, atenuação nos níveis de IL-4 e aumento nos níveis de IFN- γ no FLBA e soro. ⁴⁹

Em trabalho de Costa-Carvalho (2016), utilizando LBI (660nm, 30mW, 0,08cm², 112,5J/cm², 0.375 W/cm², os autores observaram que o laser é capaz de antagonizar eosinófilos a contagem de leucócitos, ROS e nitrito/nitrato, RANTES, CCL3, CCL8 também como as eotaxinas no FLBA. No pulmão, observaram redução do ICAM-1 como eosinófilos pulmonares, RANTES, CCL8, CCL3 e eotaxinas. Laser diminuiu a peroxidação lipídica, SOD, GPx e GR. ⁵⁰

Por fim, em recente trabalho publicado, os autores evidenciaram que o LED (660nm, 100 mW, 5 J/cm², 33,3 mW/cm², área: 2,8 cm², 15 J, 150s), reduziu o infiltrado celular, a produção de muco, o edema e a resposta contrátil da traquéia. Também aumentou os níveis de IL-10 e IFN-gama.⁵¹

Esses trabalhos demonstram de maneira geral que a aplicação transcutânea do LBI alcança os pulmões e interfere de maneira positiva nos processos inflamatórios/imunológicos da lesão pulmonar aguda, seja a induzida por administração de LPS, por isquemia e reperfusão intestinal ou inflamação pulmonar induzida por FA, bem como no modelo de DPOC utilizando a inalação ativa, fibrose pulmonar com o uso de bleomicina e no modelo de asma desenvolvido com a sensibilização e administração de OVA.

Em um estudo recente realizado em nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado em um modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar, particularmente a asma induzida por *HDM*, que o LBI (660nm, 3J e 30mW), foi capaz de reduzir o número total de células no FLBA, bem como favoreceu a redução na contagem de células diferenciais, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos.⁵²

Importante ressaltar que o modelo experimental desenvolvido em nosso grupo de pesquisa e publicado por Cipriani⁵¹, utilizou parâmetros do LBI distintos aos que foram estabelecidos para serem utilizados no presente trabalho, tornando-se dessa maneira essencial o desenvolvimento do mesmo modelo experimental com *HDM*, associado aos parâmetros e 4 diferentes energias estabelecidas. Espera-se com os resultados identificar parte de um mecanismo celular e molecular acerca dos efeitos anti-inflamatórios da terapia com LBI na asma. Com isso, vislumbramos contribuir para o aumento do conhecimento científico no campo da biofotônica, o que resultará em maior credibilidade médica e científica a respeito dos efeitos benéficos da laserterapia em doenças pulmonares. Podendo futuramente obter benefícios com o LBI para o indivíduo asmático, possibilitando inclusive a aplicação de uma terapia eficiente ou pelo menos auxiliar do tratamento farmacológico, diminuindo assim tanto os efeitos colaterais medicamentosos, como os gastos hospitalares despendidos com essa doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar qual a melhor dose - energia (J) para promover o melhor efeito anti-inflamatório no pulmão em modelo de inflamação alérgica pulmonar induzida por *HDM*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a inflamação pulmonar através do FLBA (contagem de células totais e diferenciais) após a terapia com LBI;

Avaliar os níveis de macrófagos (CD11b), neutrófilos (LY6G), eosinófilos (Syglec F), linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺), necrose (7AAD), apoptose (ANEXINA V), bem como de linfócitos CD4⁺, STAT6⁺, GATA3⁺ e IL-4⁺ no FLBA por citometria de fluxo;

Avaliar os níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 pelas células do FLBA e homogenato de tecido pulmonar pelo método ELISA;

Analisar morfometricamente a inflamação pulmonar através da quantificação do infiltrado peribrônquico eosinofílico por análise histológica (lâminas coradas com LUNA);

Analisar morfometricamente a inflamação pulmonar através da quantificação de muco na via aérea por análise histológica (lâminas coradas com PAS);

Analisar morfometricamente o remodelamento pulmonar através da quantificação de colágeno por análise histológica (lâminas coradas com PSR);

Analisar morfometricamente o índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e espessamento muscular da via aérea através de análise histológica (lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE));

Avaliar a mecânica pulmonar (elastância pulmonar estática e dinâmica);

Avaliar a reatividade pulmonar brônquica pelo método Power Lab.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho é parte integrante de um projeto Jovem Pesquisador atualmente em execução, o qual foi submetido para análise e teve aprovação pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) sob nº AN006.2013 (Anexo 10.1).

3.1. Animais

Os animais foram obtidos do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12 h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho. Foram alimentados com ração para camundongos (NUTRILAB CR-1[®]) e água *ad libitum*.

Utilizamos para o projeto atual 50 Camundongos (Balb/C), machos, pesando aproximadamente 20-25 gramas, com idade de 6 semanas.

3.2. Protocolo Experimental

O protocolo foi dividido em duas etapas, utilizando 50 camundongos em cada etapa, porém ambas com o mesmo protocolo experimental. Para a primeira parte do trabalho, separamos os animais de modo que fossem 10 grupos experimentais, com 05 animais cada (Figura 3).

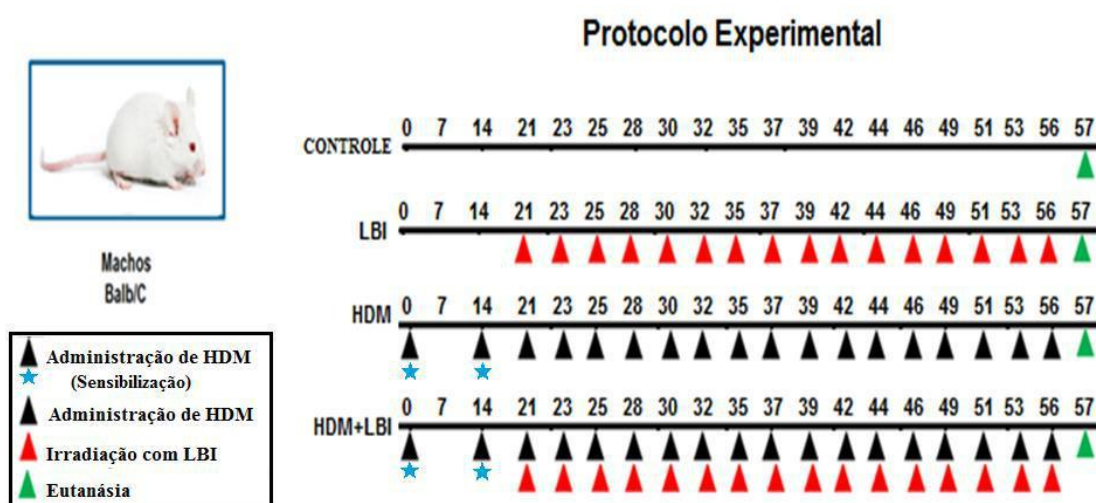


Figura 4. Protocolo Experimental

3.2.1. Grupos Controles e Experimentais

Basal (animais não manipulados);

HDM (animais somente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com *HDM* a partir do dia 21 até o dia 56. Desafio realizado 3x/semana, durante 5 semanas);

Laser (1, 3, 5 e 7,5 J) (animais somente submetidos à laserterapia, por 16 dias. Início no dia 21 e término no dia 56, realizado 3x/semana, durante 5 semanas. Parâmetros: 660nm, 100mW, 3 pontos de aplicação: abaixo da traquéia, lobo pulmonar esquerdo e lobo pulmonar direito. Tempos: 10s, 30s, 50s e 75s respectivamente);

HDM+Laser (1, 3, 5 e 7,5 J) (animais sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com *HDM* a partir do dia 21 até o dia 56. Desafio realizado 3x/semana, durante 5 semanas. Aplicação da laserterapia foi realizada 1 hora após cada desafio, 3x/semana, durante 5 semanas. Parâmetros: 660nm, 100mW, 3 pontos de aplicação: abaixo da traquéia, lobo pulmonar esquerdo e lobo pulmonar direito. Tempos: 10s, 30s, 50s e 75s respectivamente).

3.2.2. Modelo experimental - Inflamação pulmonar alérgica com *HDM*

Embora o modelo com OVA seja mais utilizado para indução da inflamação pulmonar alérgica, ele requer a sensibilização com injeções subcutâneas o que faz com que ele seja um modelo artificial, que não reproduz o mecanismo natural da asma. Assim, de maneira complementar

então, utilizaremos o modelo de administração orotraqueal (o.t.) de *HDM*, no qual a sensibilização ocorre diretamente através do contato com a mucosa nasal/brônquica, aproximando-se da patogênese da asma – modelo natural da asma.⁵³ Para isso, primeiramente, os animais foram anestesiados com ketamina (100 miligramas/kilograma (mg/kg)) e xilazina (10mg/kg) e então 100 microgramas (ug) do extrato de *Der p* (Greer Laboratories, Lenoir, NC) foram dissolvidos em 30 µl de PBS e administrados por via orotraqueal nos dias 0, 14, seguidos de 3 administrações semanais até o dia 56 (Figura 4).

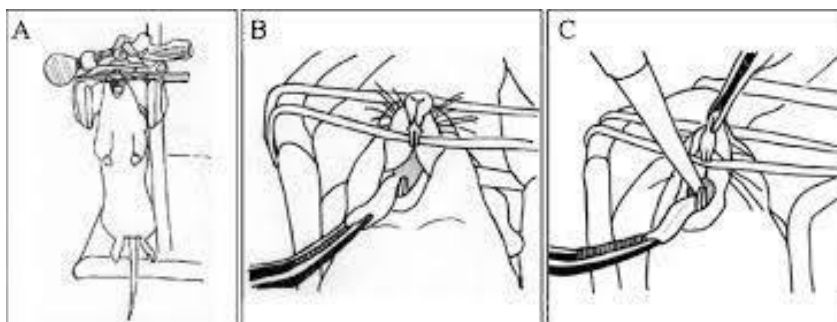


Figura 5. Demonstração de administração o.t. de *HDM*

Arquivo pessoal

3.2.3. Terapia com LBI

Os animais foram irradiados com um laser de diodo (Figura 5), com potência de 100 mW e comprimento de onda de 660nm irradiando uma área de 0,045 J/cm² com diferentes energias (1, 3, 5, 7,5 J). Uma hora após cada desafio (Grupo *HDM*+Laser) e Grupo Laser, os animais receberam aplicação pontual em três regiões: uma abaixo da traquéia, e as outras duas em cada lobo pulmonar (direito e esquerdo – Figura 6). Cada grupo teve um tempo de irradiação diferente de acordo com a energia estabelecida previamente, sendo eles respectivamente 10s, 30s, 50s e 75s, conforme a tabela 1.

Grupo	λ	Área	Tempo	Energia
Laser (1J)	660 nm	0,045 J/cm²	10s/ponto	1J
Laser(3J)	660 nm	0,045 J/cm²	30s/ponto	3J
Laser (5J)	660 nm	0,045 J/cm²	50s/ponto	5J
Laser (7,5J)	660 nm	0,045 J/cm²	75s/ponto	7.5J

Tabela 1. Parâmetros utilizados para a irradiação com laser



Figura 6. LBI utilizado no protocolo experimental
Marca: MMO Optics/ Modelo: TF Premier PLUS



Figura 7. Pontos de aplicação do LBI
Arquivo pessoal

3.3. Coleta e avaliação da inflamação pulmonar no FLBA

Após anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) fizemos a traqueotomia, os animais foram canulados e os pulmões foram lavados com 1,5 mililitros (ml) de Tampão fosfato-salino (PBS) (3 x de 0,5ml). O volume do lavado

recuperado foi centrifugado a 1000 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para posterior análise das citocinas por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA). O botão celular foi ressuscitado em 1 ml de PBS e a determinação do número de células totais no FLBA foi realizada por meio de contagem na Câmara de *Neubauer*.^{10,12,53} Alíquotas do material ressuscitado foram utilizadas para preparação de lâminas de *cytospin* as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa (onde 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial).^{10,12,53}

3.4. Citometria de Fluxo

3.4.1. Identificação de células recrutadas para o pulmão e análise de atividade funcional

O tecido pulmonar foi fragmentado em pequenos pedaços e incubado com colagenase IV e desoxirribonuclease I (DNAse I) (Sigma) 2 mg/ml e 1 mg/ml, respectivamente, por 30 minutos a 37° C sob agitação contínua. Após este período, adicionaremos a solução balanceada de Hank's (HBSS) acrescido de EDTA para breçar a digestão o material. Os fragmentos de pulmão foram masserados e filtrados em peneira de 40um e o conteúdo centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e então ressuscitado em tampão PBS.

3.4.2. Fenotipagem

As células do pulmão foram incubadas com anticorpos monoclonais de superfície anti-CD3 PercP, anti-CD11b FITC, anti-Ly6G APC e anti-SyglecF PE (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA) para caracterização fenotípica dos linfócitos, macrófagos e grânulos (neutrófilos e eosinófilos) respectivamente. Também foram feitas a fenotipagem para caracterização dos linfócitos T (anti-CD3 PercP, anti-CD4 APC e anti-CD8 FITC). Também fizemos a análise de fenotipagem para os seguintes fatores de transcrição (anti-STAT6 PE e anti-GATA3 FITC, bem como caracterização de IL-4 (anti-IL-4 APC). As células foram incubadas por 20 minutos a 4o C. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 0,01% de Albumina de Soro Bovino (BSA) e azida sódica e ressuscitadas em 200 µl do mesmo tampão. As

amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri e analisadas no software CSampler (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA).

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) e ressuspensas em 300 µl do mesmo tampão. Após duas lavagens com Permwash as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo.

3.4.3. Morte celular

Avaliação da morte celular das células de pulmão foi com o marcador de necrose celular 7AAD e Anexina V marcador de apoptose celular (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA). As células foram incubadas por 20 minutos a 4º C. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 0,01% de Albumina de Soro Bovino BSA e azida sódica e ressuspensas em 200 µl do mesmo tampão. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri analisadas no software CSampler (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA).

3.5. Avaliação dos níveis de citocinas no FLBA por ELISA

Os níveis de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) no sobrenadante do FLBA e homogenato de tecido pulmonar foram avaliados através dos kits RD Standard Sets e Biolegend conforme instrução do fabricante. Para a leitura da placa, foi utilizado o equipamento SpectraMax i3 (Molecular Devices), com absorbância ajustada de 450nm.

3.6. Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas por histologia

Amostras de pulmão foram guardados em formalina 10% por até 7 dias e então cortados no seu maior eixo e submetidos ao processamento histológico de rotina. As lâminas foram coradas com o corante **Luna** para detecção dos eosinófilos e por exclusão os neutrófilos, **PAS** para avaliação do muco e com **PSR** para detecção das fibras de colágeno. A análise quantitativa foi realizada através da técnica morfométrica descrita por Vieira *et al.* (2007).⁵⁵ Os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software Image Pro Plus (versão 4.5, NIH, Maryland, EUA).

3.7. Índice de broncoconstricção

Amostras de pulmão foram guardados em formalina 10% por até 7 dias e então cortados no seu maior eixo e submetidos ao processamento histológico de rotina. As lâminas foram coradas com o corante **HE** para avaliação do índice de broncoconstricção, espessamento brônquico e espessamento do músculo liso da via aérea. Foram analisadas 5 vias aéreas de cada animal. O índice de espessura do músculo liso e da camada epitelial brônquica foi calculada como o número de pontos que incidiram sobre o músculo liso ou camada epitelial brônquica, dividido pelo número de interceptos que cruzaram a membrana basal epitelial. O índice de broncoconstricção foi calculado como a raiz quadrada do número de interceptos que cruzaram a membrana basal, dividida pelo número de pontos que incidiram sobre a luz da via aérea. Os índices do músculo liso e camada epitelial e o índice de broncoconstricção foram realizadas em aumento de 400x.⁵⁵

3.8. Avaliação da mecânica pulmonar para avaliação da elastância pulmonar

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

A entrada pneumotacógrafo foi conectada à uma peça em Y de um ventilador mecânico volumétrico (MV215, Montevideo, UY) projetado para a ventilação artificial de roedores. Os pulmões foram submetidos à ventilação

mecânica convencional com um padrão quasi-sinusoidal de fluxo com um volume corrente de 10 ml/kg de peso do camundongo, uma frequência respiratória de 100 ciclos/min e uma pressão expiratória positiva final de 2 cmH₂O quando o animal terá sua parede torácica anterior removida cirurgicamente (caixa torácica aberta), para contrabalançar a ausência da pressão pleural fisiológica negativa em repouso. Os sinais de fluxo e de pressão dos transdutores foram analogicamente filtrados (Butterworth, 8 pólos, 32 Hertz (Hz)), amostrados 100 Hz (PCI-6036, National Instruments) e armazenados para posterior análise (LabView).

As propriedades mecânicas do pulmão foram analisadas por meio do comportamento da elastância pulmonar dinâmica (Edyn) e estática (Est).

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

A Edyn foi mensurada dividindo-se a pressão do ponto de inflexão ajustada (P_i-P_o) pelo volume corrente. Para cada pulmão nativo e descelularizado, as Est e Edyn foram obtidas a partir de cinco oclusões ao final da inspiração, cada uma realizada depois de 1 min de ventilação mecânica normal. Podemos observar as curvas de fluxo e pressão traqueal em relação ao tempo de acordo com o protocolo de cálculo através do método da pausa inspiratória na Figura 7. ⁵⁶

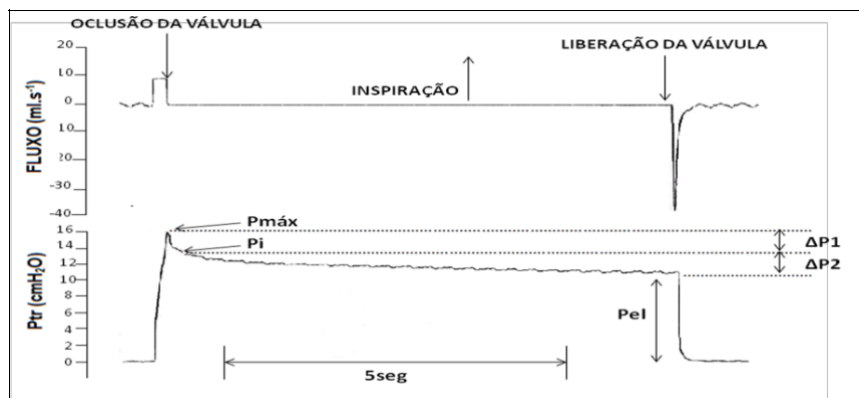


Figura 8. Curvas Fluxo e Pressão Traqueal em Relação ao Tempo.

3.9. Análise da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico

A fim de investigar os efeitos do tratamento com vitamina D na contração da musculatura lisa, o desenvolvimento da força isométrica foi quantificado nos anéis traqueais montados em um banho do 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 preenchido com solução de Krebs-Hanseleit (KH) continuamente aerada (95% O² e 5% CO²) a 37°C. Após 40 min, a tensão traqueal foi ajustada para 0,5 g e metacolina (MCh, 10-3M) foi adicionada para obter a resposta contrátil máxima.

3.10. Análise estatística

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

4. RESULTADOS

4.1. Quantificação das células totais presentes no FLBA

Os resultados relacionados à contagem total de células no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo no número total de células no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Para os grupos que somente receberam o tratamento com LBI, observamos uma redução significativa comparada ao grupo asmático (*HDM*). Quando comparamos todos os grupos asmáticos submetidos ao tratamento com laser (*HDM*+Laser 1J, 3J, 5J e 7,5J), observamos diminuição significativa do número total de células em relação ao grupo asmático (*HDM*).

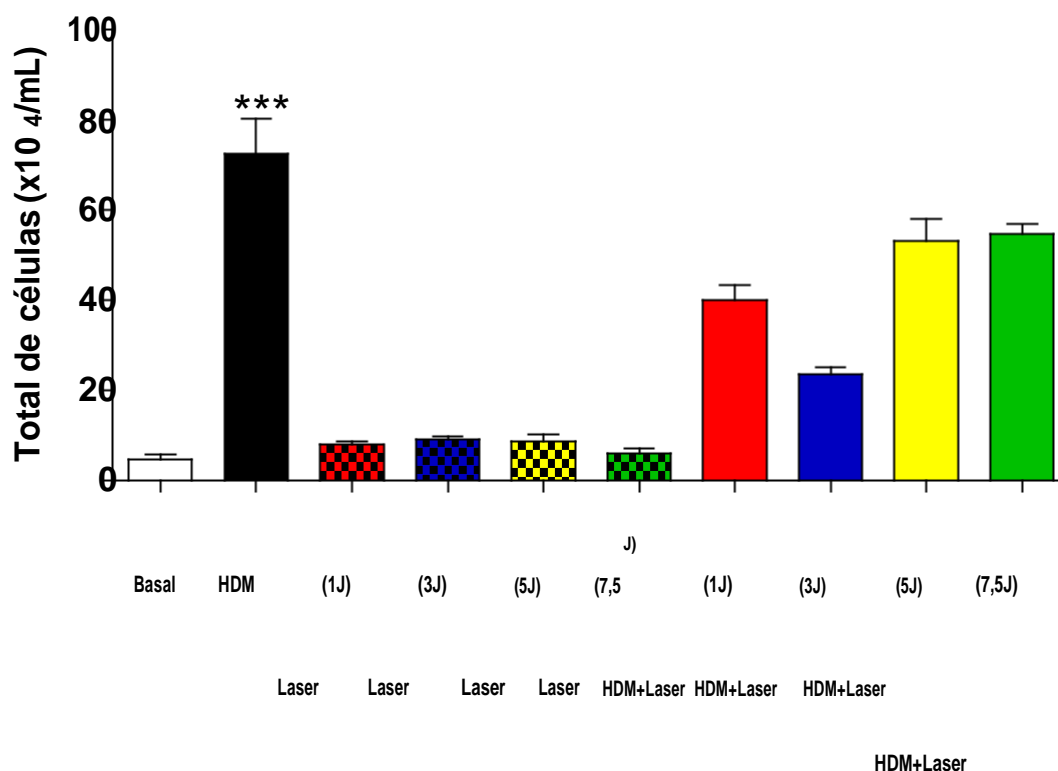


Figura 9. Efeito da terapia com LBI sobre o número total de células recuperadas do FLBA. Os grupos utilizados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), asmático (*HDM*) (animais imunizados e desafiados com *HDM*), Laser (animais somente tratados com laser) e *HDM*+Laser (animais sensibilizados e desafiados com *HDM* e posteriormente tratados com laser). Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (*HDM*).

4.2. Quantificação das células diferenciais presentes no FLBA

Os resultados relacionados à contagem diferencial de células: macrófagos (A), linfócitos (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D) estão apresentados na figura a seguir. Verificamos aumento significativo no número de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos recuperados no FLBA no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Para os grupos que somente receberam o tratamento com LBI, observamos uma redução significativa comparada ao grupo asmático (*HDM*) para todos os tipos celulares estudados. Somente para a contagem de macrófagos (A) pudemos observar um aumento significativo no grupo asmático (*HDM*) submetido ao tratamento com laser 3J e 7,5J (*HDM*+Laser 3J e 7,5J); Já para a contagem de linfócitos (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D) quando comparamos todos os grupos asmáticos submetidos ao tratamento com laser (*HDM*+Laser 1J, 3J, 5J e 7,5J), observamos diminuição significativa do número diferencial de células em relação ao grupo asmático (*HDM*).

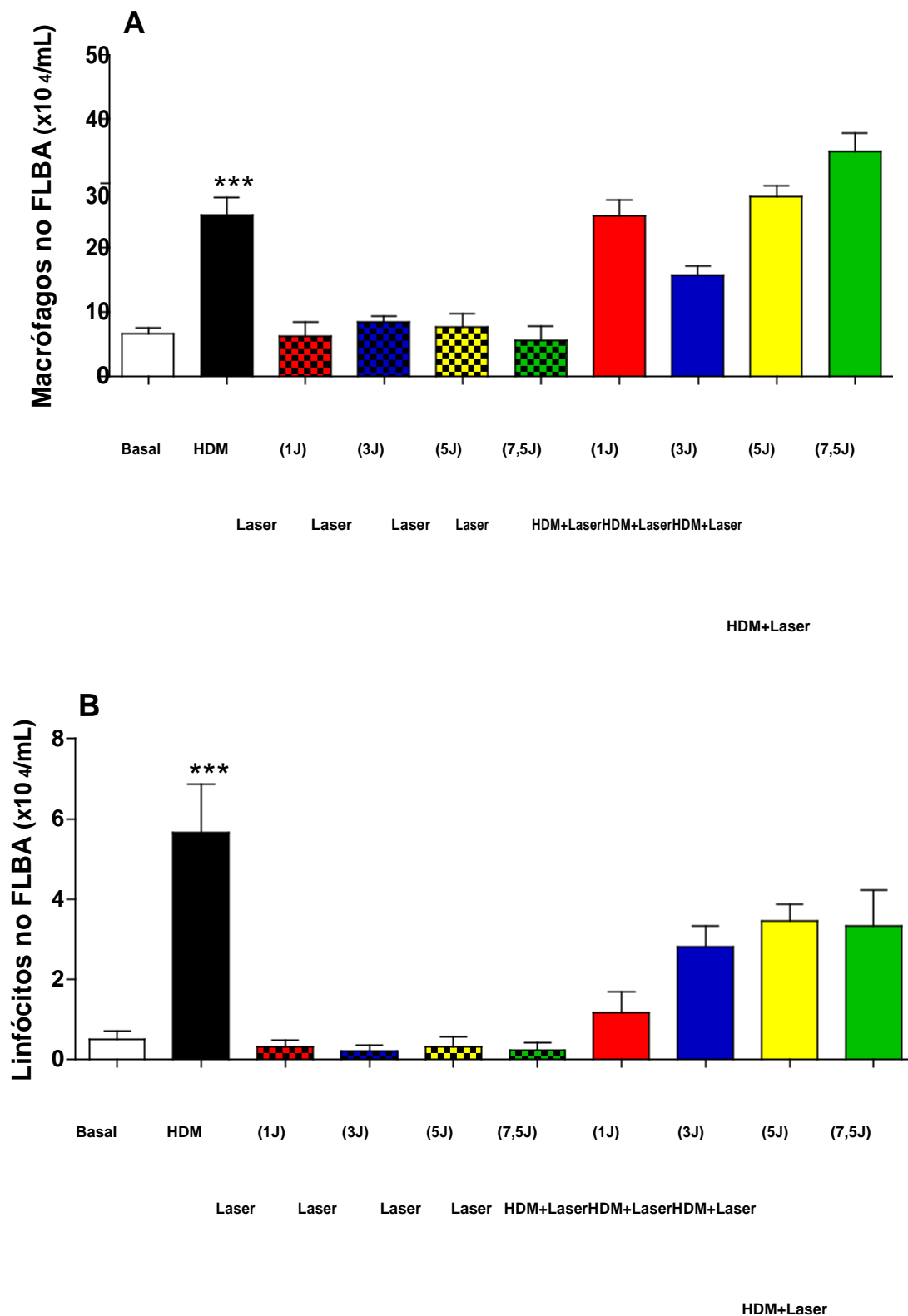


Figura 10. Efeito da terapia com LBI sobre o número de macrófagos (A) e linfócitos (B) recuperadas do FLBA. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

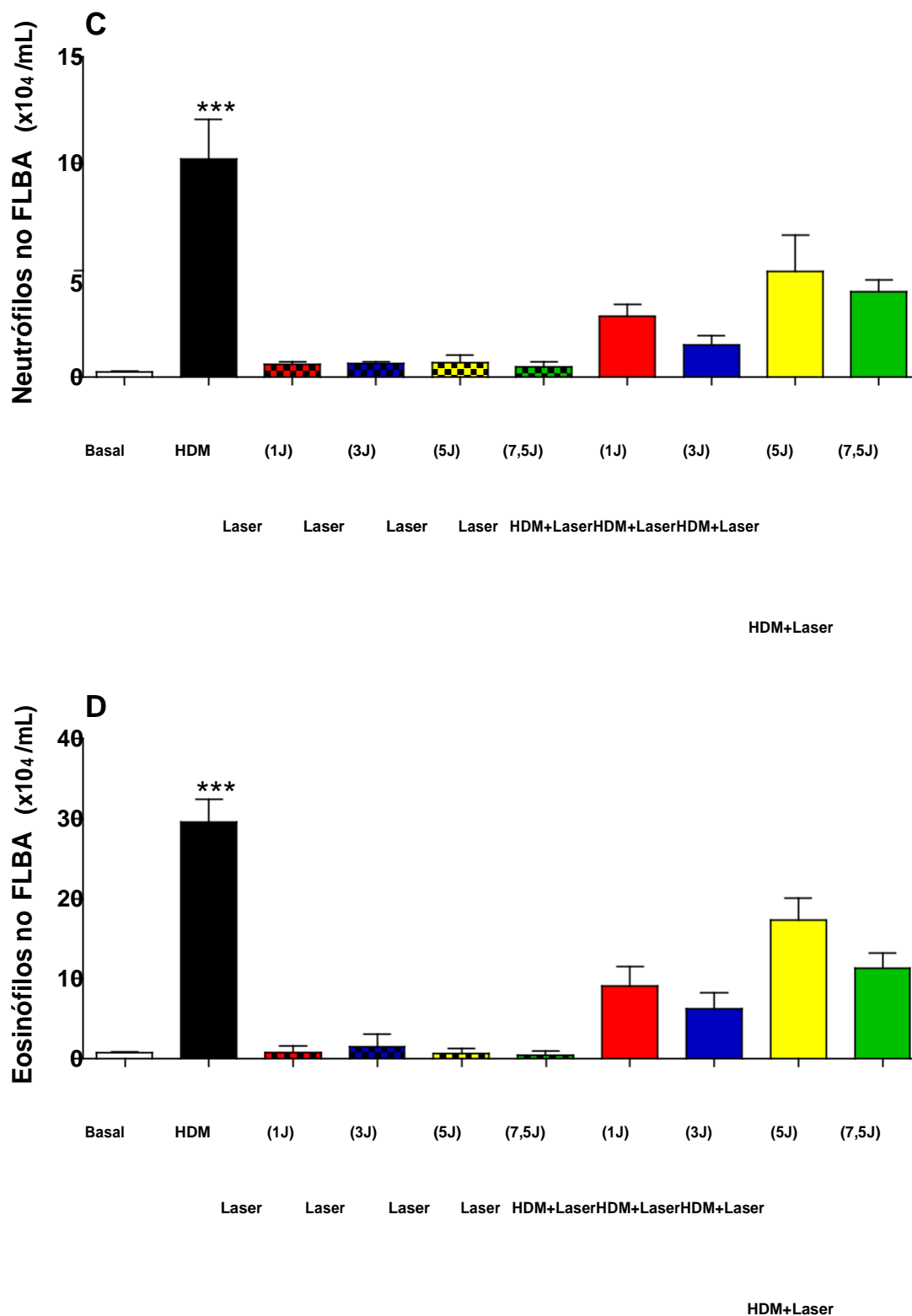


Figura 11. Efeito da terapia com LBI sobre o número de neutrófilos (C) e eosinófilos (D) recuperadas do FLBA. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

4.3. Perfil e viabilidade celular através de citometria de fluxo no FLBA

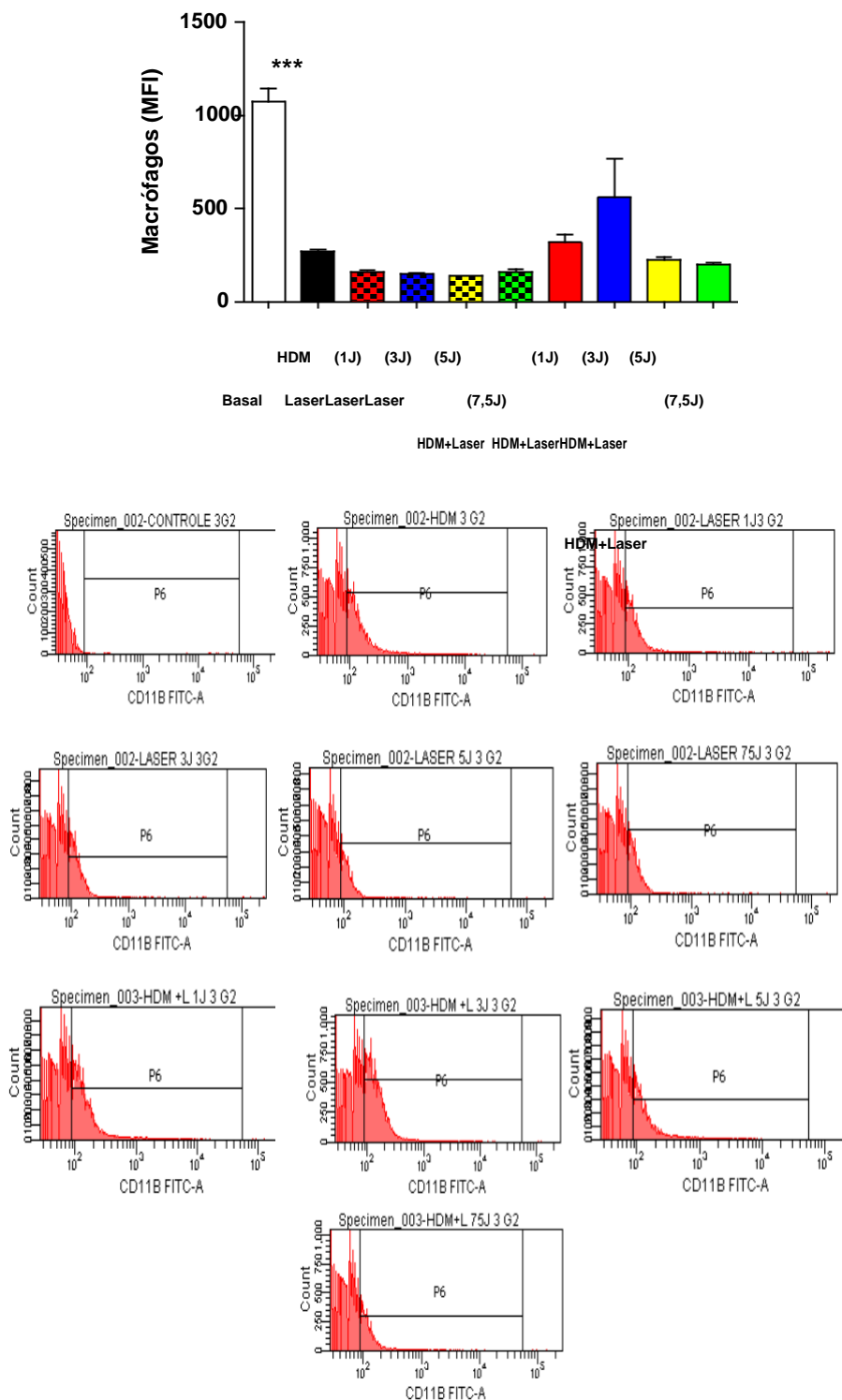


Figura 12. Efeito da terapia com LBI sobre a quantificação de Macrófagos (CD11b) no FLBA. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

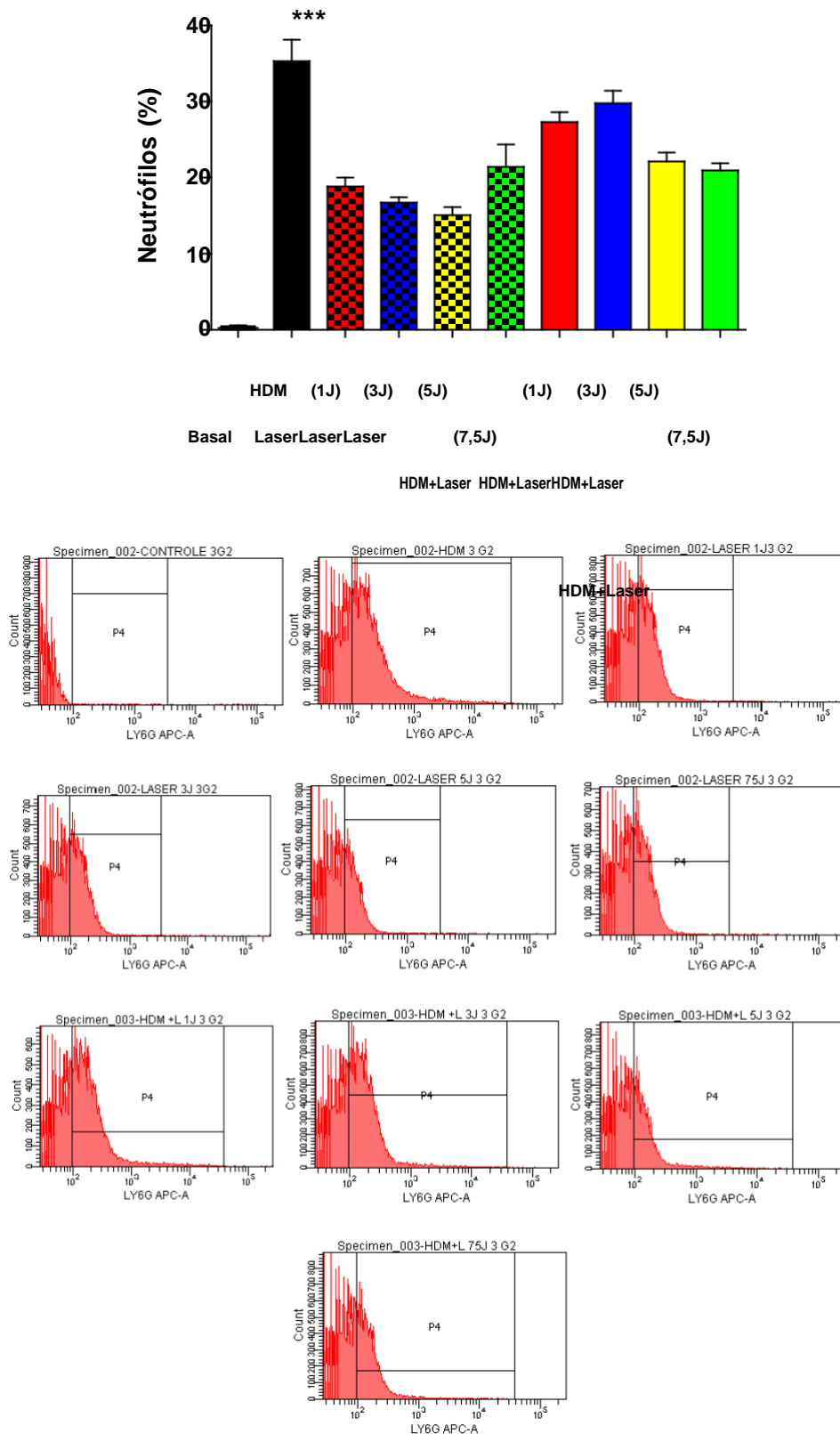


Figura 13. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Neutrófilos (LY6G) no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

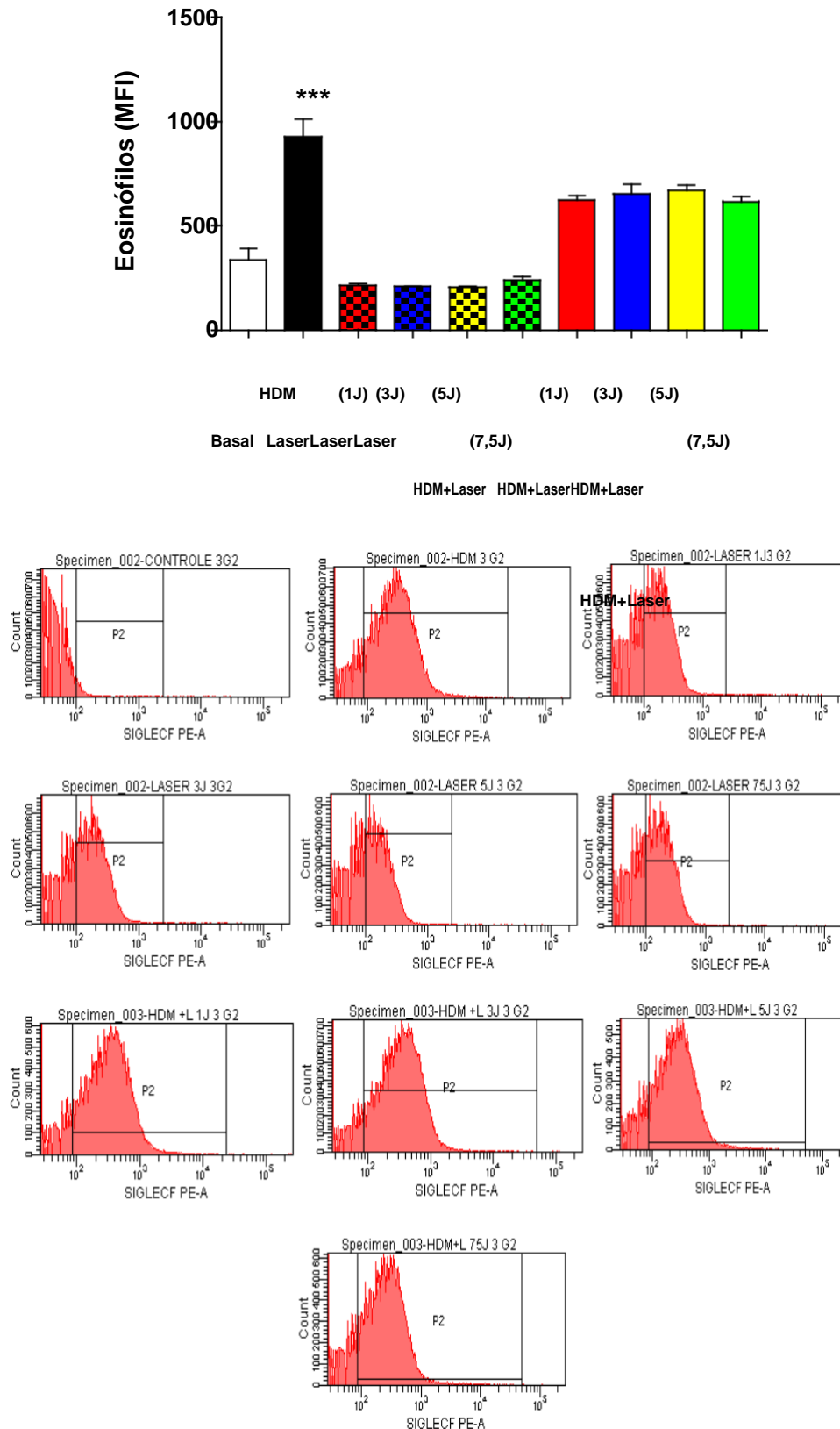


Figura 14. Efeito da terapia com LBI sobre a quantificação de Eosinófilos (SyglecF) no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

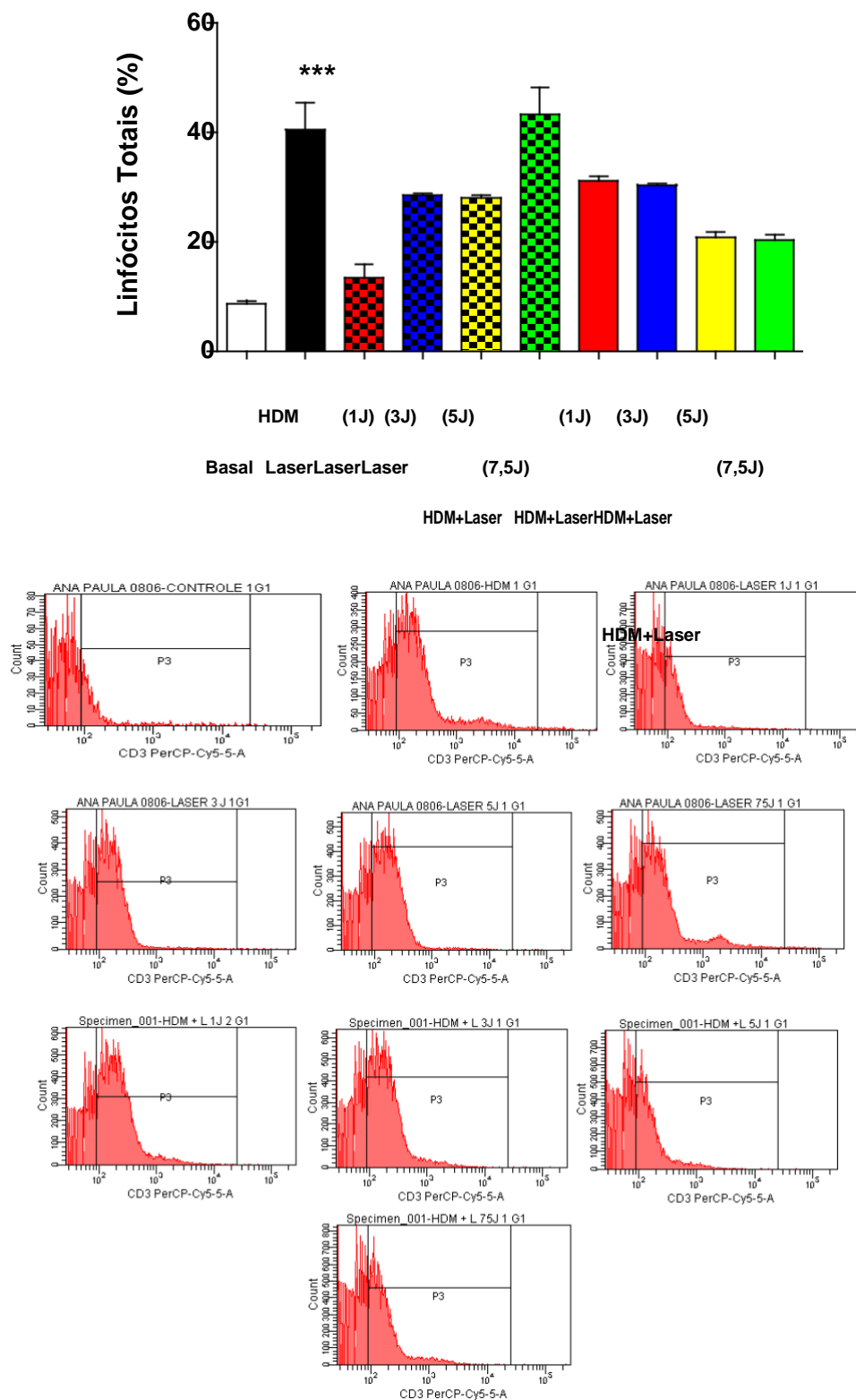


Figura 15. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Linfócitos Totais (CD3⁺) no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ e Δ $p < 0,01$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

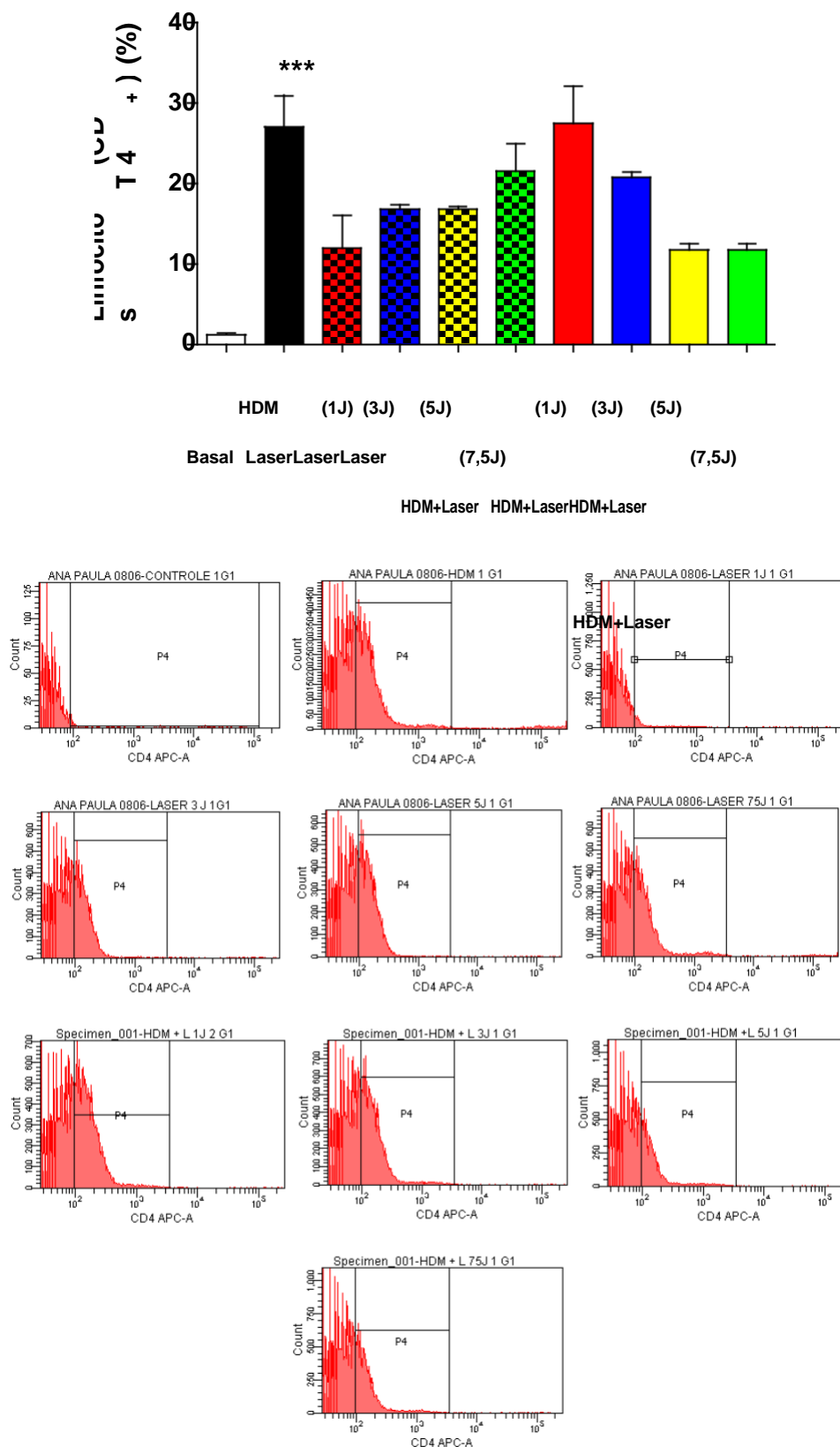


Figura 16. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Linfócitos T (CD4⁺) no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** p<0,001 quando comparado ao grupo Basal; Ø p<0,001 quando comparados ao grupo asmático (HDM).

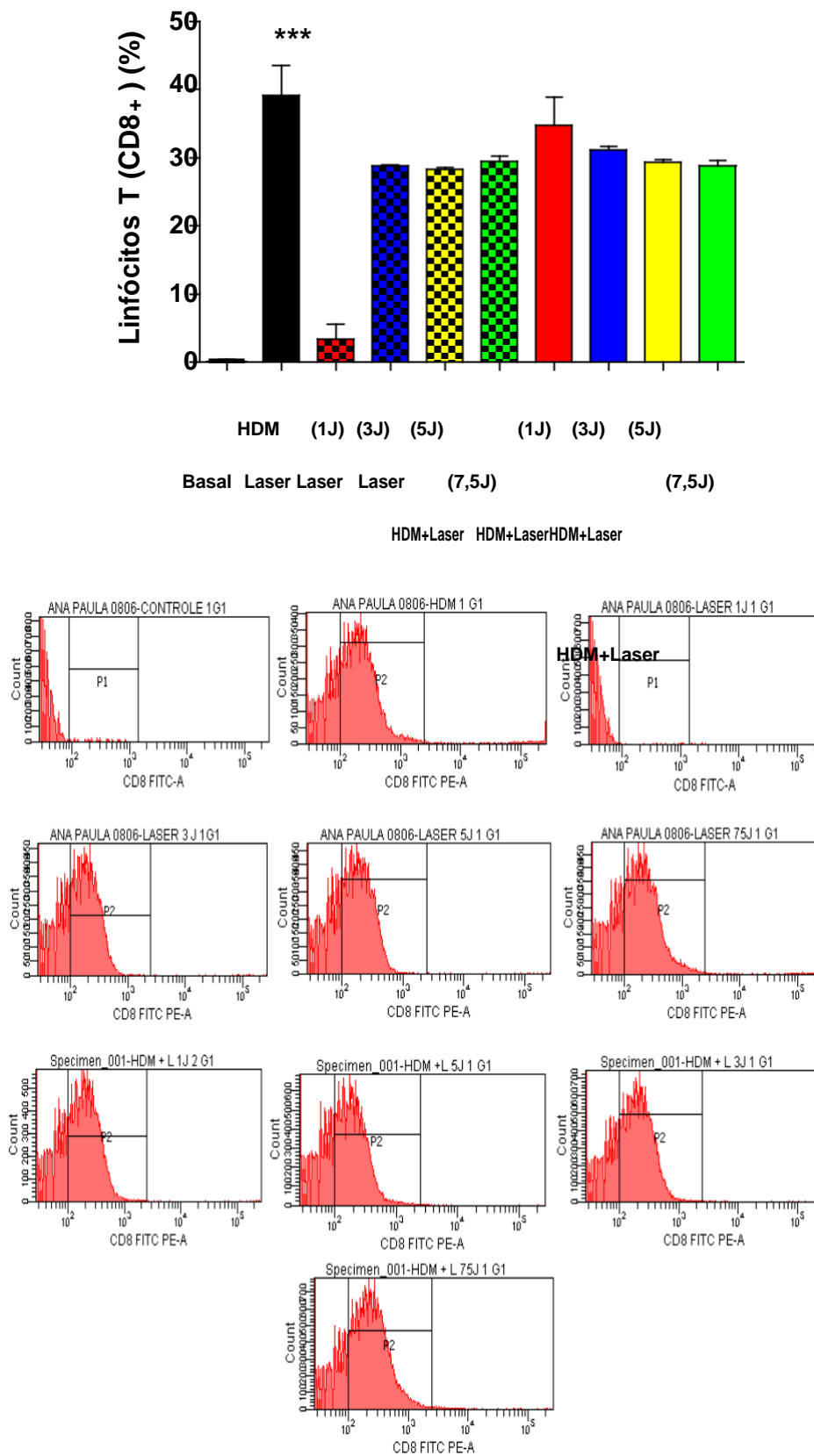


Figura 17. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Linfócitos T (CD8⁺) no FLBA.

Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão.

*** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

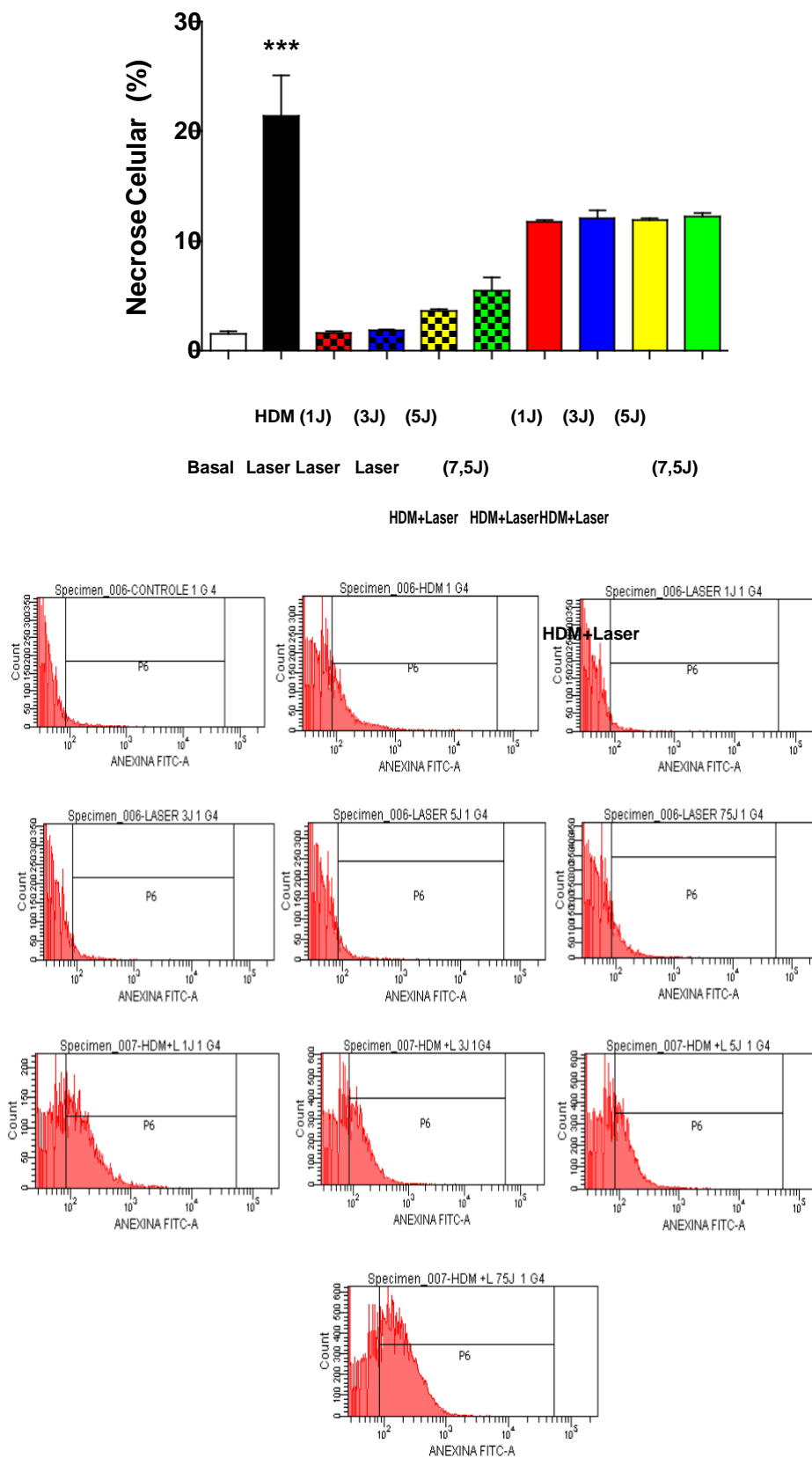


Figura 18. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Necrose Celular (Anexina V) no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

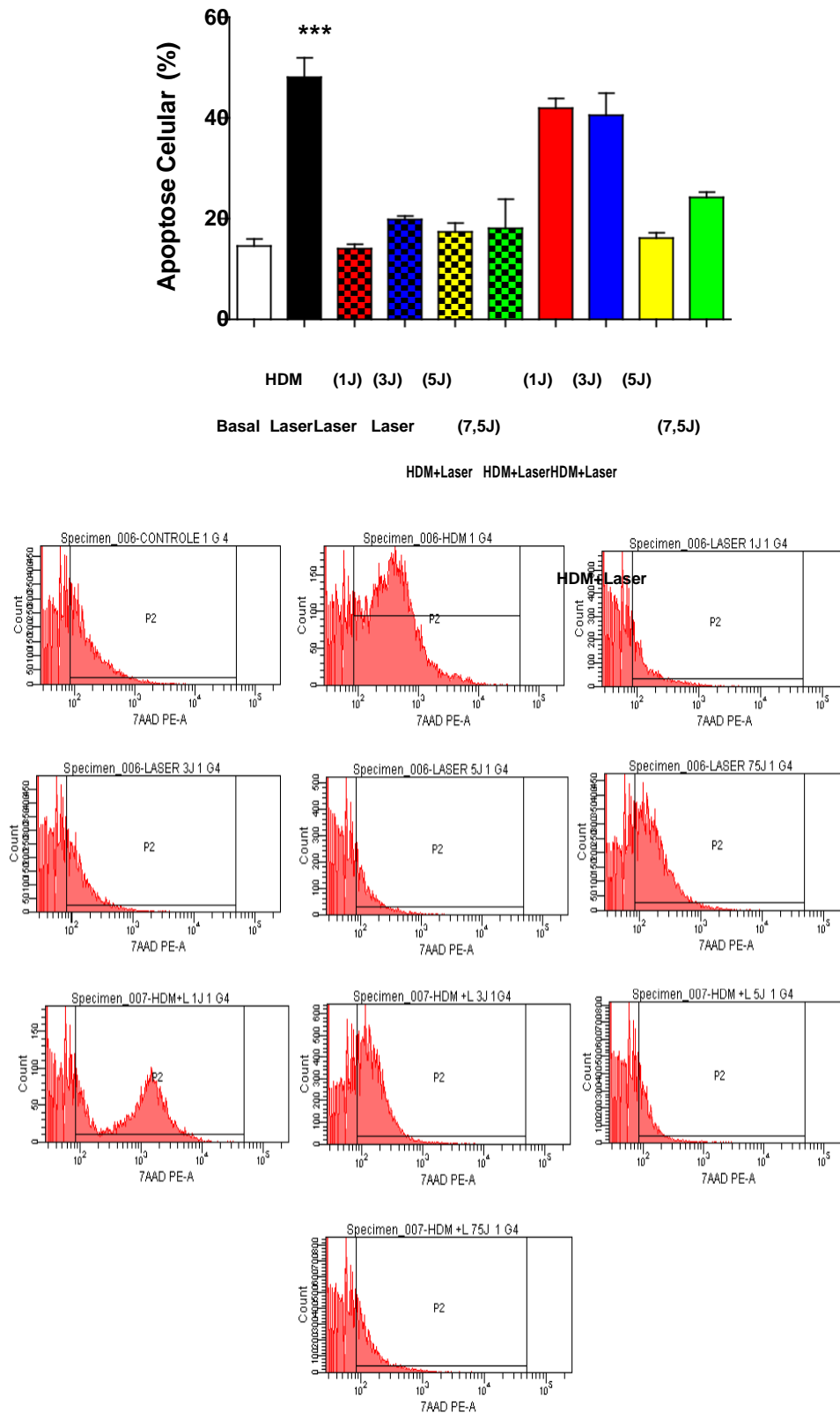


Figura 19. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de Apoptose Celular (7AAD) no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

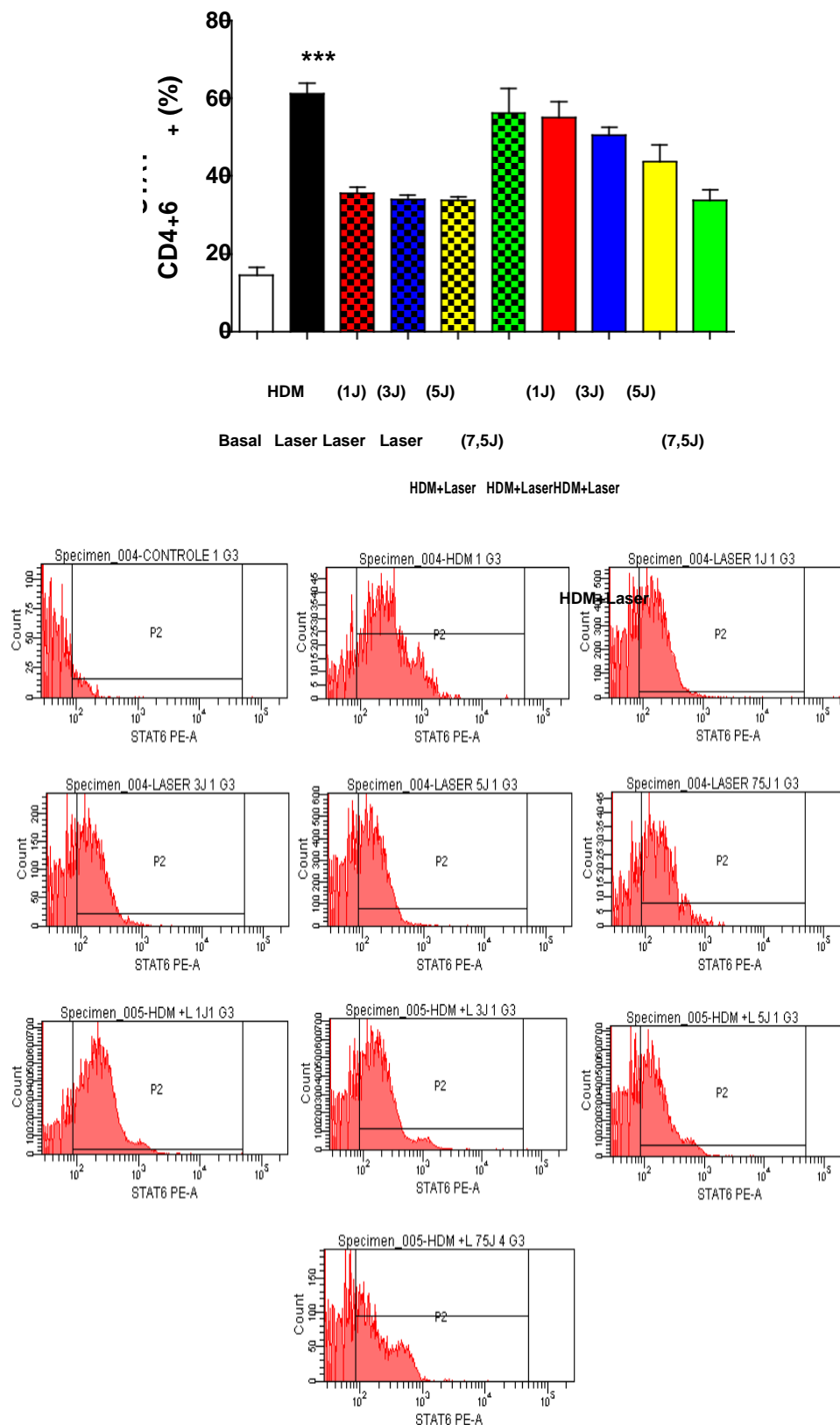


Figura 20. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem do fator de transcrição STAT 6 no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ e Δ $p < 0,01$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

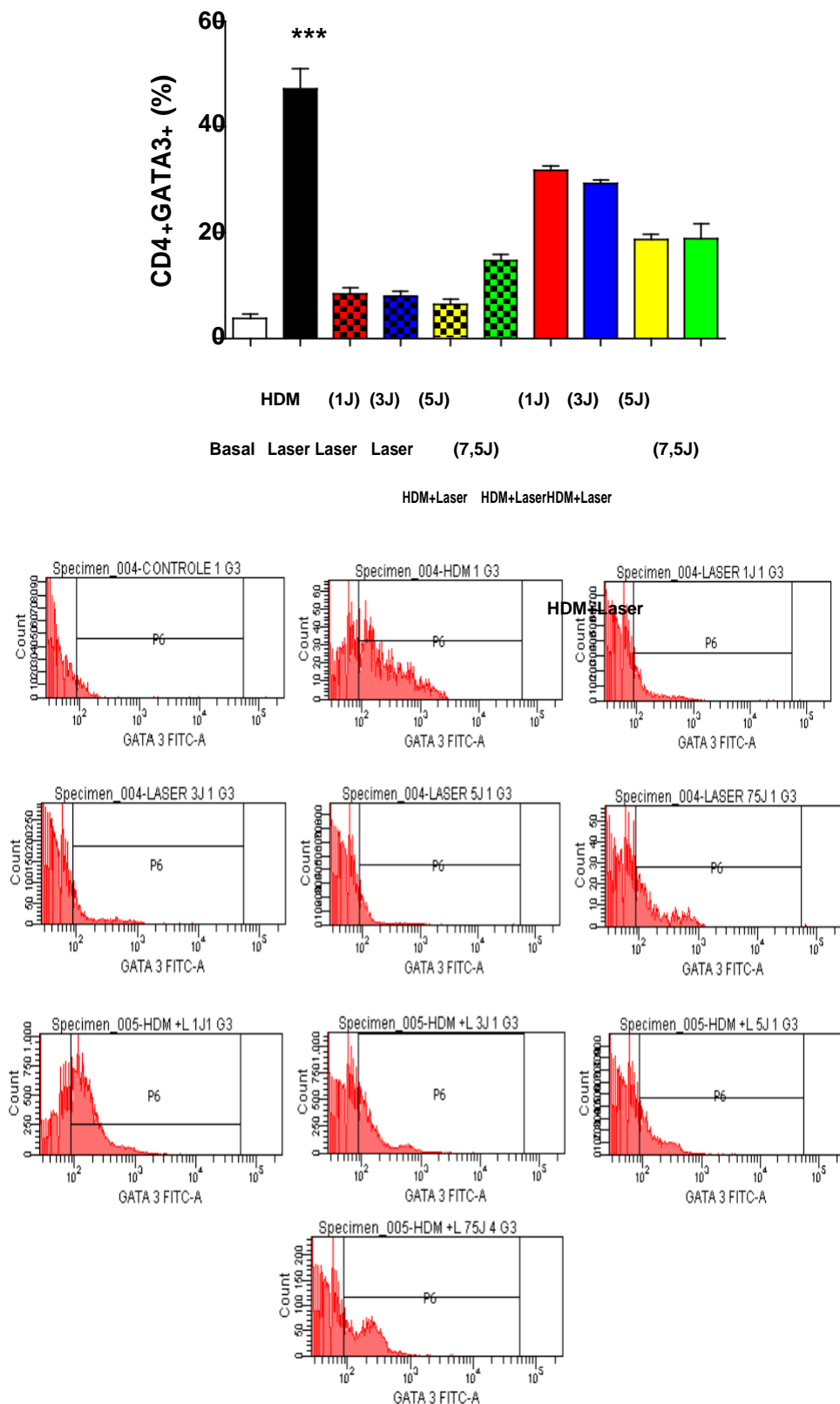


Figura 21. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem do fator de transcrição GATA 3 no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

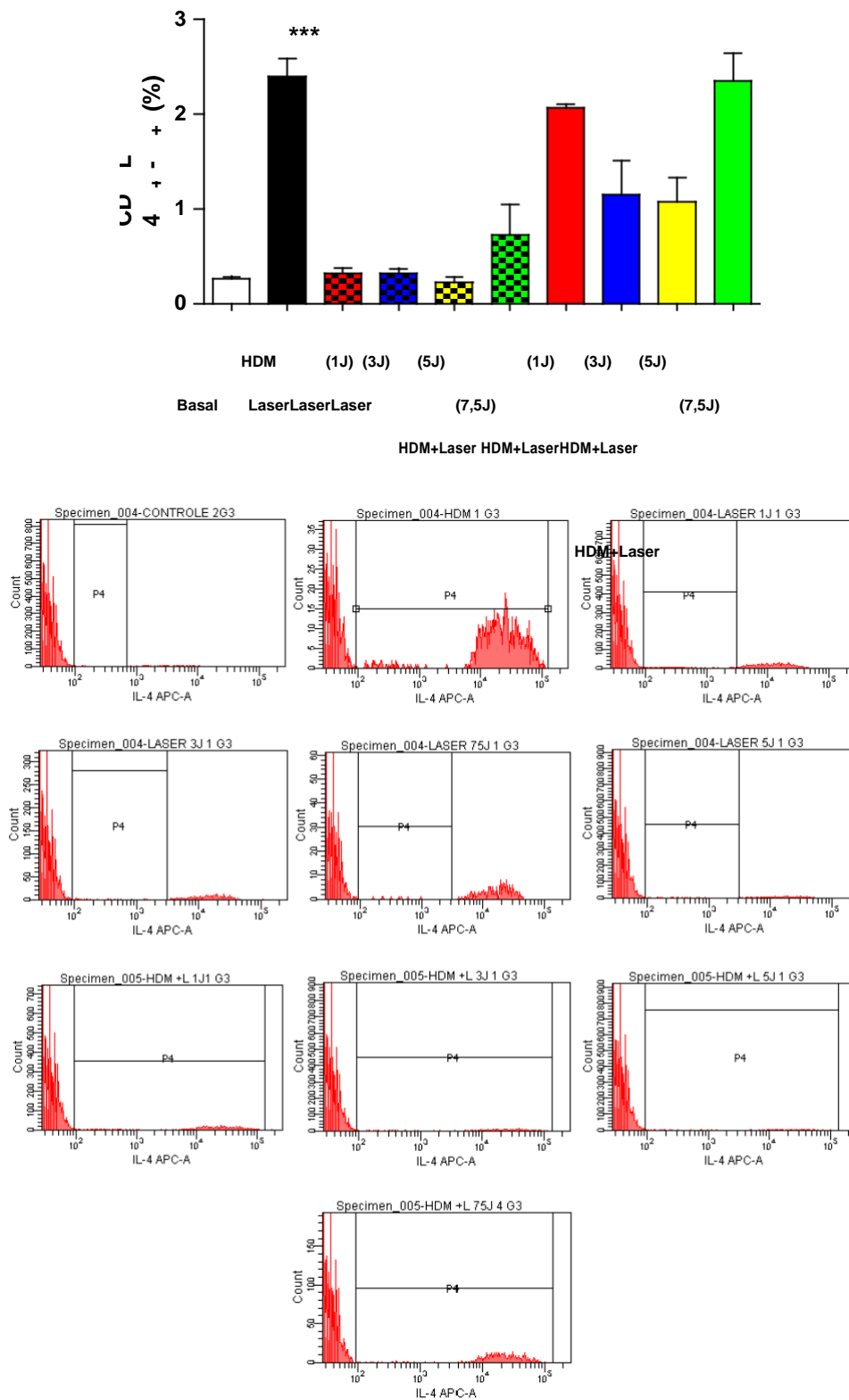


Figura 22. Efeito da terapia com LBI sobre a porcentagem de CD4⁺ IL-4⁺ no FLBA. Os grupos utilizados estão descritos na figura 9. Valores expressos como média e desvio padrão. *** p<0,001 quando comparado ao grupo Basal; Θ p<0,001 quando comparados ao grupo asmático (HDM).

4.4. Quantificação das citocinas no sobrenadante do FLBA

Os resultados referentes à quantificação dos níveis das citocinas no FLBA: IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) estão apresentados na figura a seguir. Observamos o acréscimo significativo dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (D) no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Observamos também redução significativa em todos os grupos asmáticos submetidos ao tratamento com laser (*HDM*+Laser 1J, 3J, 5J e 7,5J) quando comparado ao grupo somente asmático (*HDM*). Por outro lado, houve um acréscimo de citocina anti-inflamatória IL-10 (C) em todos os grupos asmáticos submetidos à laserterapia (*HDM*+Laser 1J, 3J, 5J e 7,5J) quando comparado ao grupo somente asmático (*HDM*).

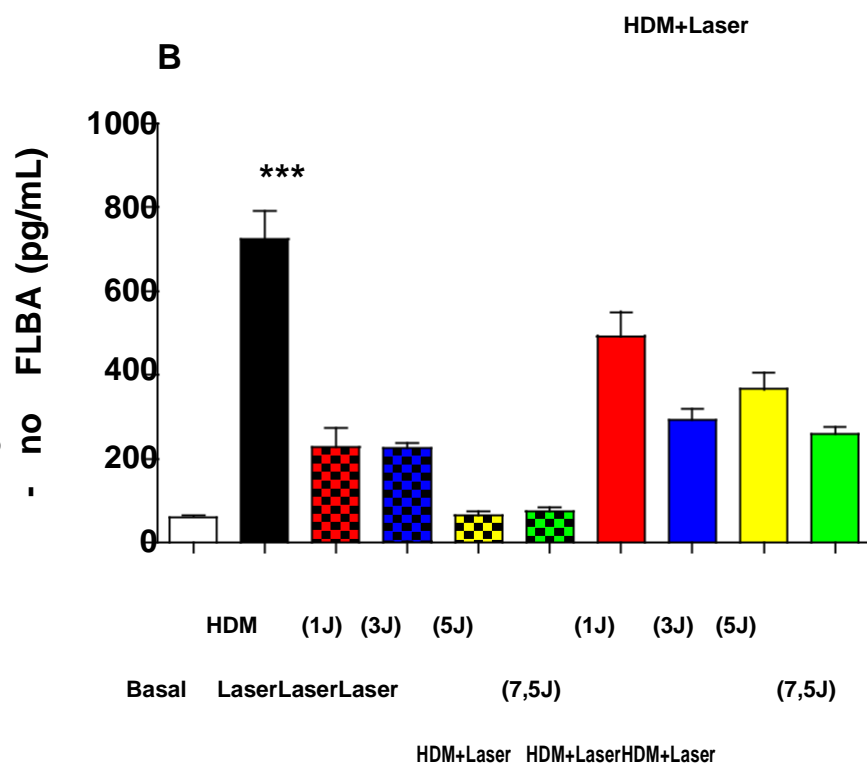
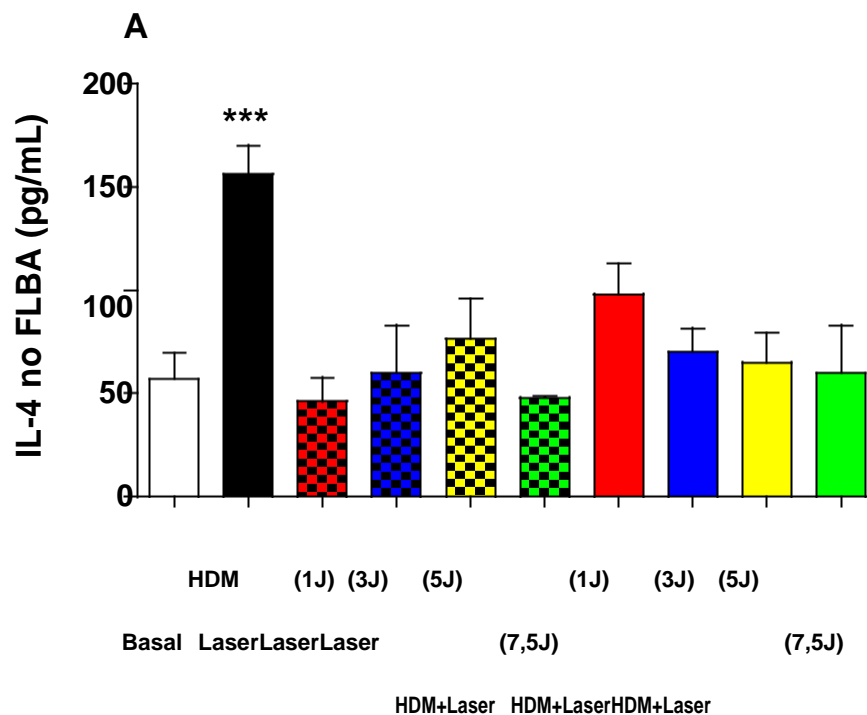


Figura 23. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-4 (A) e IL-5 (B) no sobrenadante do FLBA. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

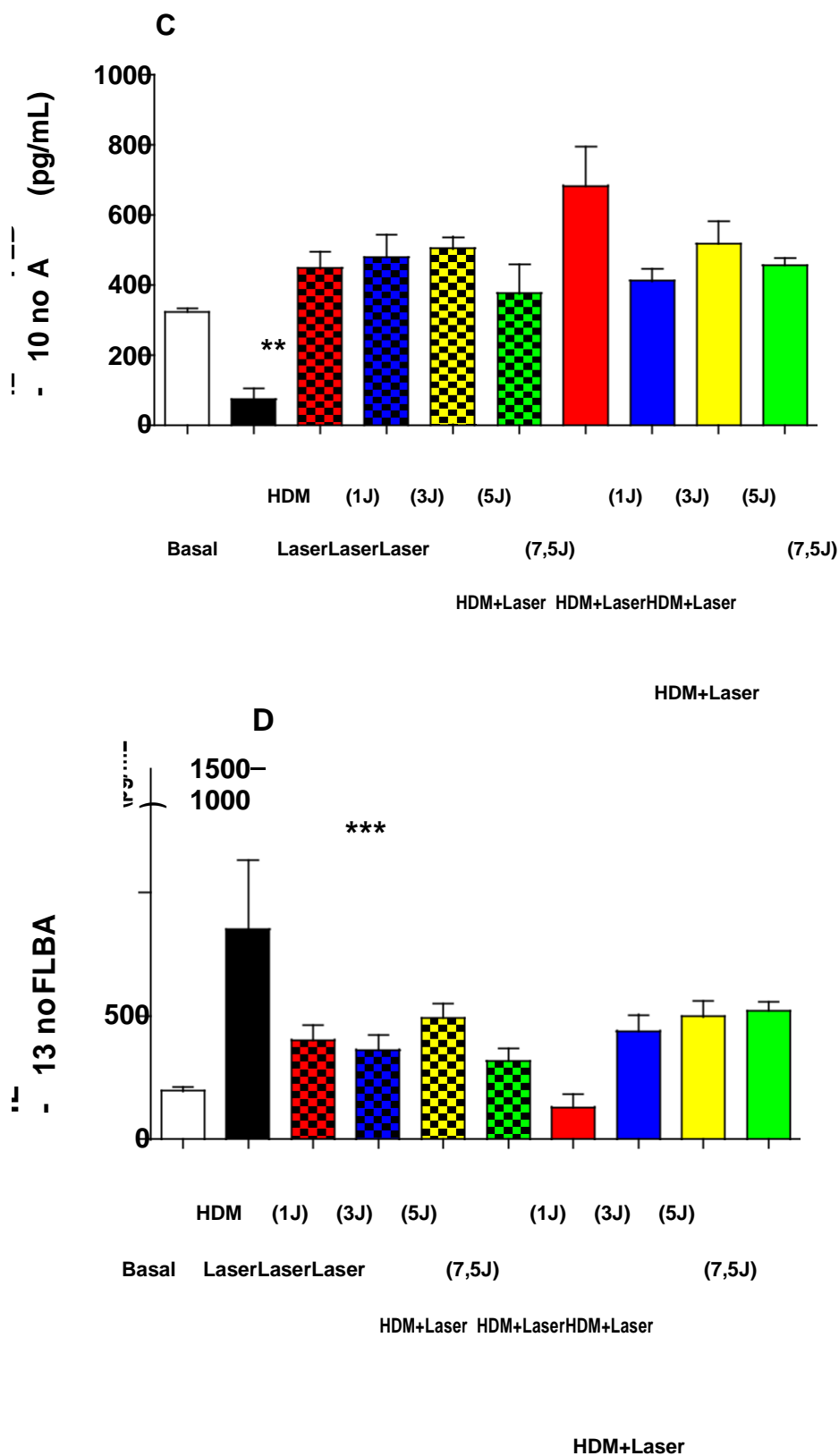


Figura 24. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-10 (C) e IL-13 (D) no sobrenadante do FLBA. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

4.5. Quantificação das citocinas no homogenato de tecido pulmonar

Os resultados referentes à quantificação dos níveis das citocinas no homogenato de tecido pulmonar: IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) estão apresentados na figura a seguir. Observamos o acréscimo significativo dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C) no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Observamos também significativa redução do nível da citocina IL-4 (A) e IL-5 (B) em todos os grupos asmáticos submetidos ao tratamento com LBI (*HDM*+Laser 1J, 3J, 5J e 7,5J) quando comparado ao grupo somente asmático (*HDM*). Para nível de IL-13 (D), observamos significativa redução somente no grupo submetido ao tratamento com laserterapia de 3J (*HDM*+Laser 3J). Por outro lado, houve um acréscimo de citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos submetidos ao tratamento com LBI 1J, 5J e 7,5J (*HDM*+Laser 1J, 5J e 7,5J) quando comparado ao grupo somente asmático (*HDM*).

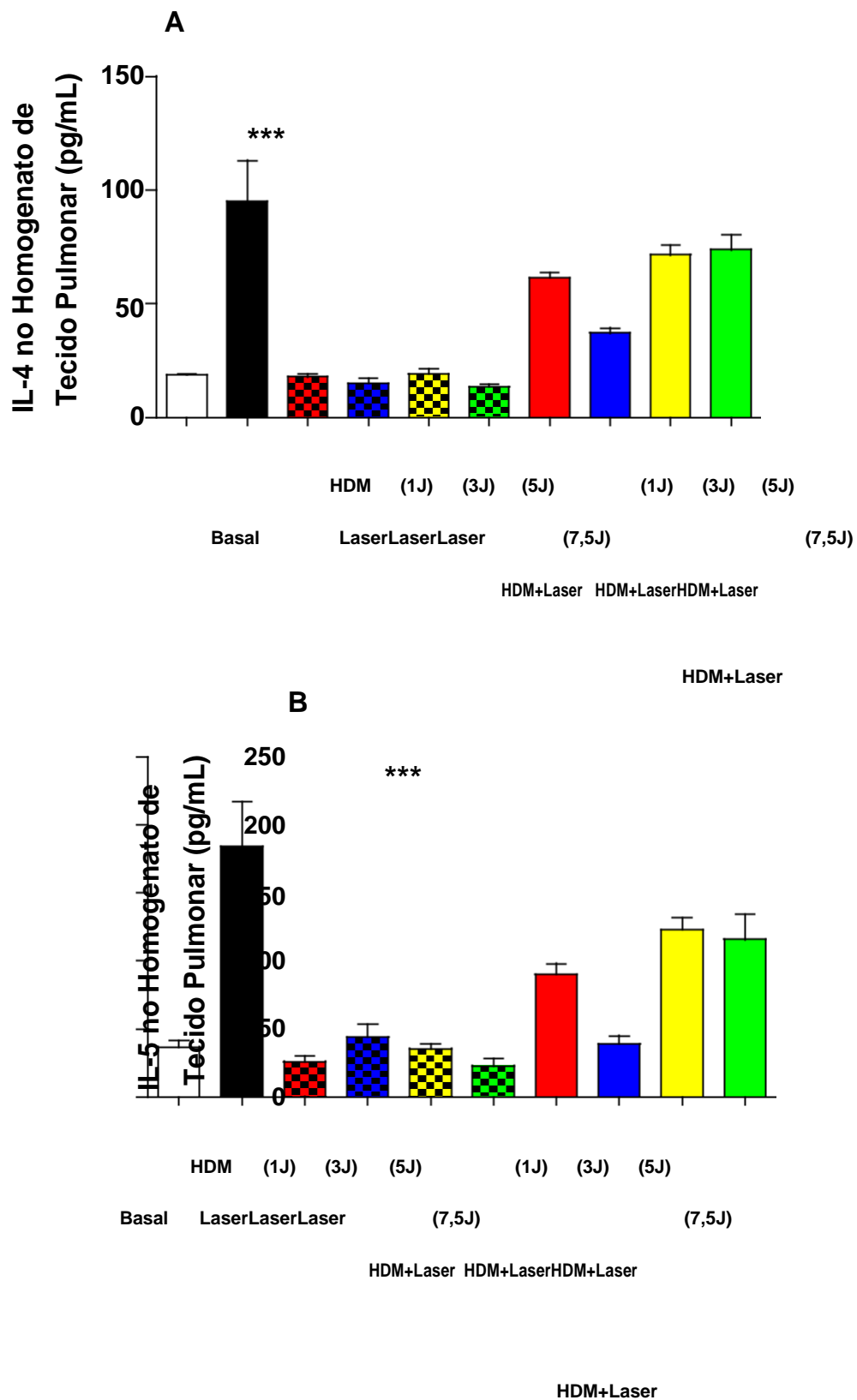


Figura 25. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-4 (A) e IL-5 (B) no homogenato de tecido pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ e Δ $p < 0,01$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

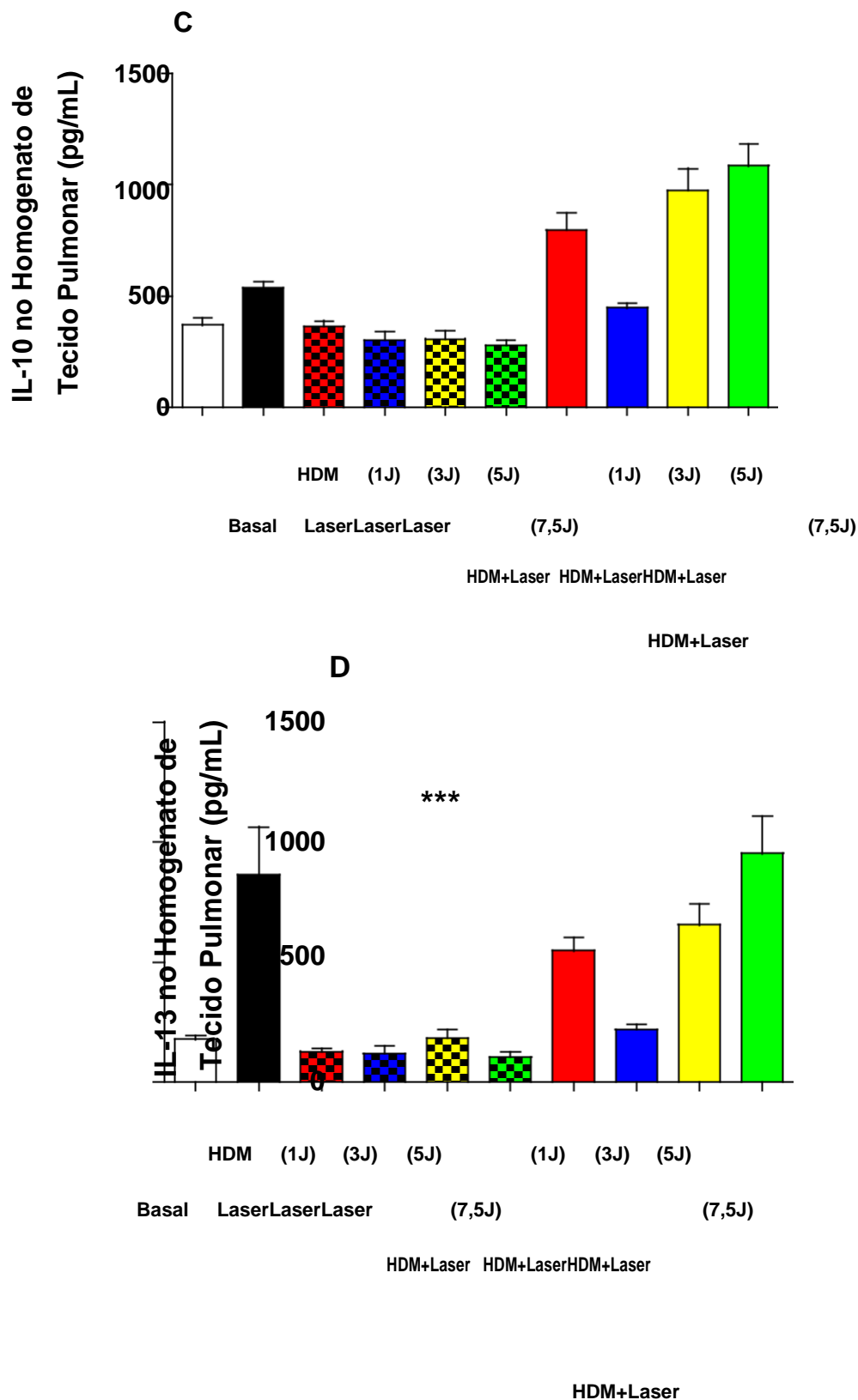


Figura 26. Efeito da terapia com LBI sobre os níveis de IL-10 (C) E IL-13 (D) no homogenato de tecido pulmonar. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal; Θ $p < 0,001$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

4.6. Quantificação peribrônquica de eosinófilos

Os resultados relacionados à quantificação peribrônquica de eosinófilos estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo na quantificação de eosinófilos no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Quando comparamos todos os grupos asmáticos que foram submetidos ao tratamento com o laser 1J, 3J e 5J (*HDM+Laser* 1J, 3J e 5J) observamos um efeito significativo na redução da quantificação de eosinófilos peribrônquicos.

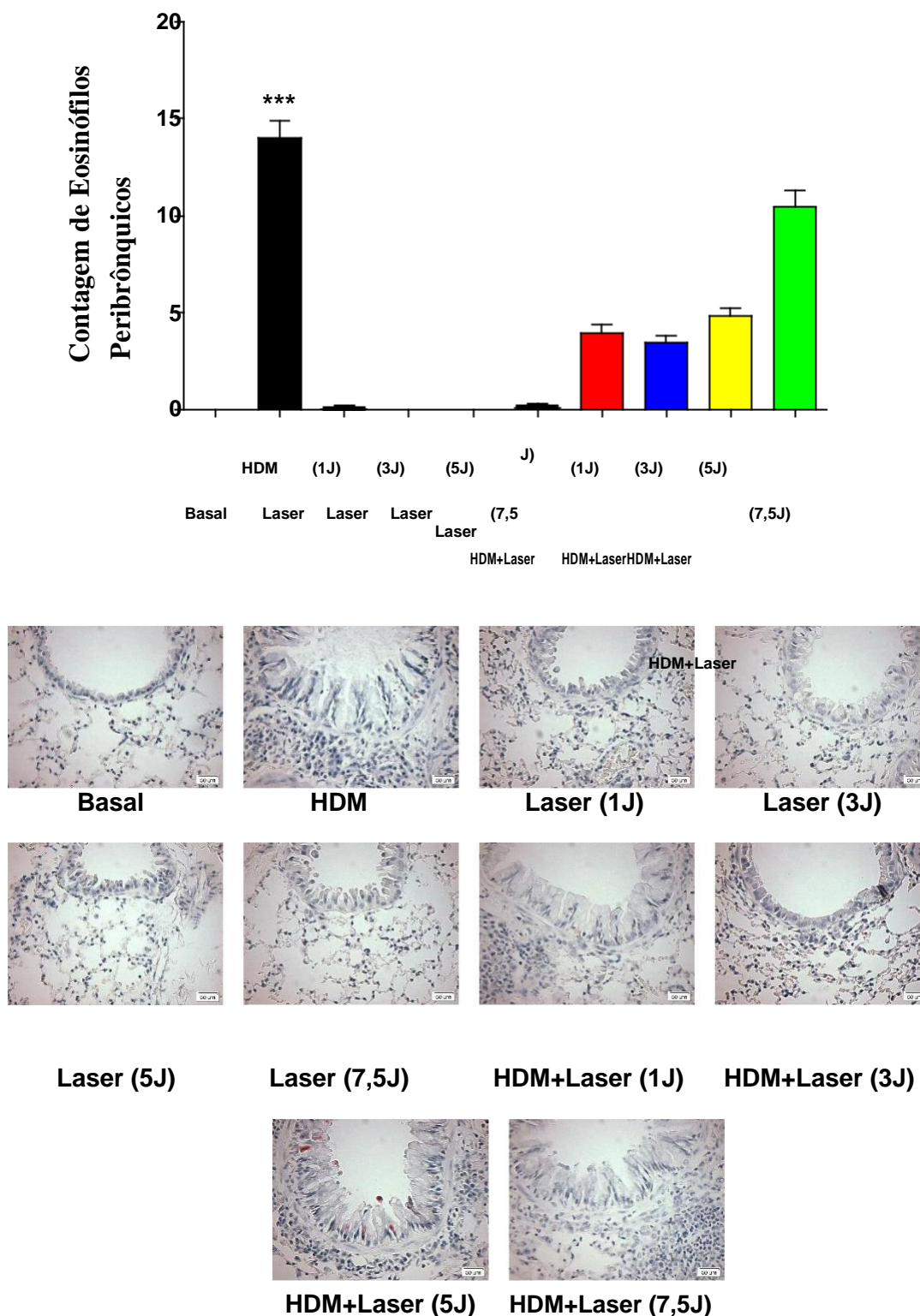


Figura 27. Efeito da terapia com LBI sobre a quantificação de eosinófilos peribrônquicos. Os pulmões foram fixados, preparados e corados com LUNA para a análise de eosinófilos nas vias aéreas. Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com *HDM*. Aumento de $\times 400$. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e θ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo asmático (*HDM*).

4.7. Quantificação de muco nas vias aéreas

Os resultados relacionados à quantificação de muco nas vias aéreas estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo na deposição de muco no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Quando comparamos todos os grupos asmáticos que foram submetidos ao tratamento com o laser 1J, 3J, 5J e 7,5J (*HDM+Laser* 1J, 3J, 5J e 7,5J) observamos um efeito significativo na redução de muco nas vias aéreas.

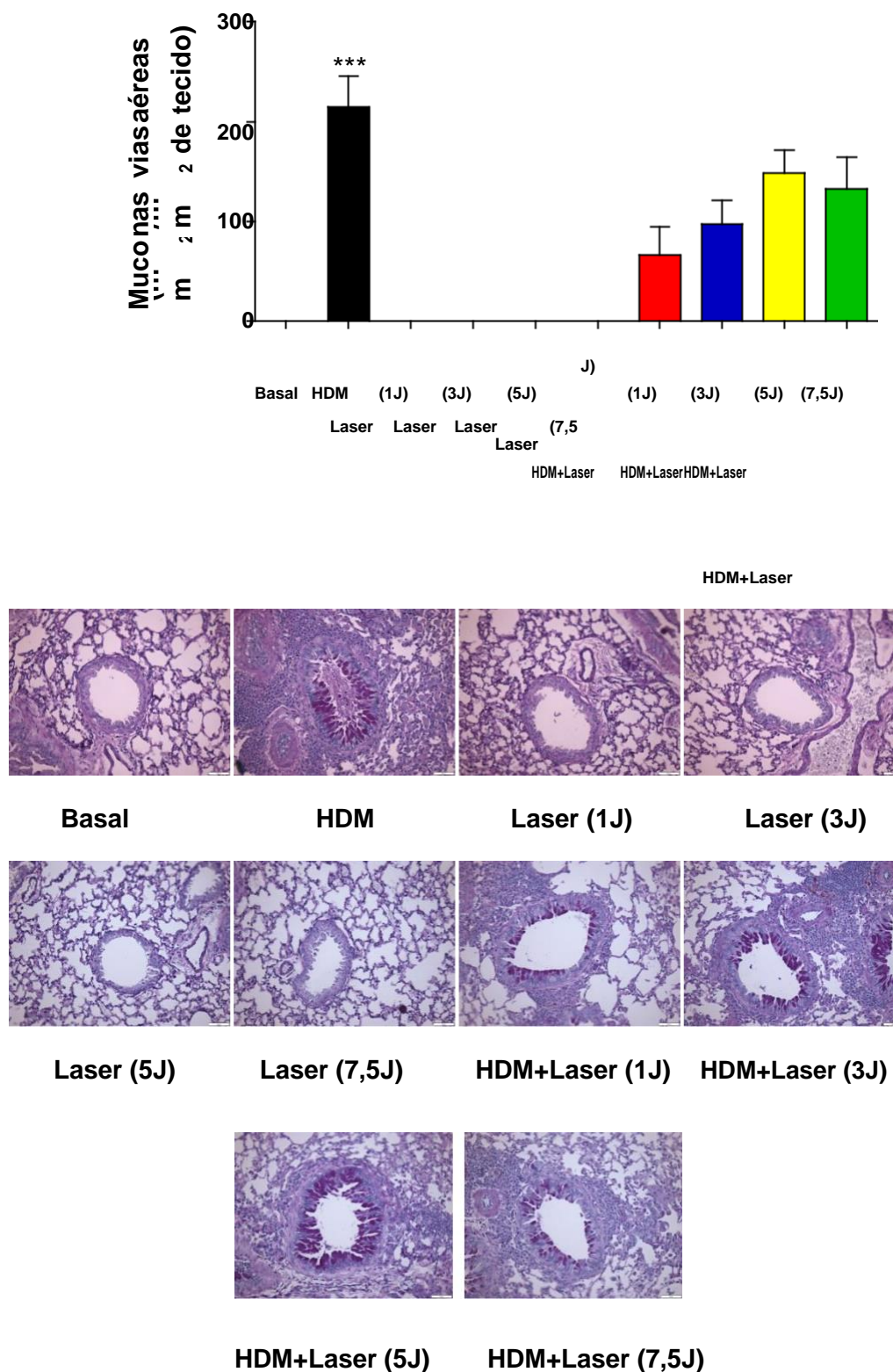


Figura 28. Efeito da terapia com LBI sobre a produção de muco nas vias aéreas. Os pulmões foram fixados, preparados e corados com PAS (Periodic Acid Schiff) para a análise do muco nas vias aéreas. Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com *HDM*. Aumento de $\times 200$. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e $\Delta p < 0,01$ quando comparado ao grupo asmático (*HDM*).

4.8. Quantificação de colágeno nas vias aéreas

Os resultados relacionados à quantificação de colágeno nas vias aéreas estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo na deposição de colágeno no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Quando comparamos todos os grupos asmáticos que foram submetidos ao tratamento com o laser 1J, 3J, 5J e 7,5J (*HDM+Laser* 1J, 3J, 5J e 7,5J) observamos um efeito significativo na redução da deposição de fibras de colágeno nas vias aéreas

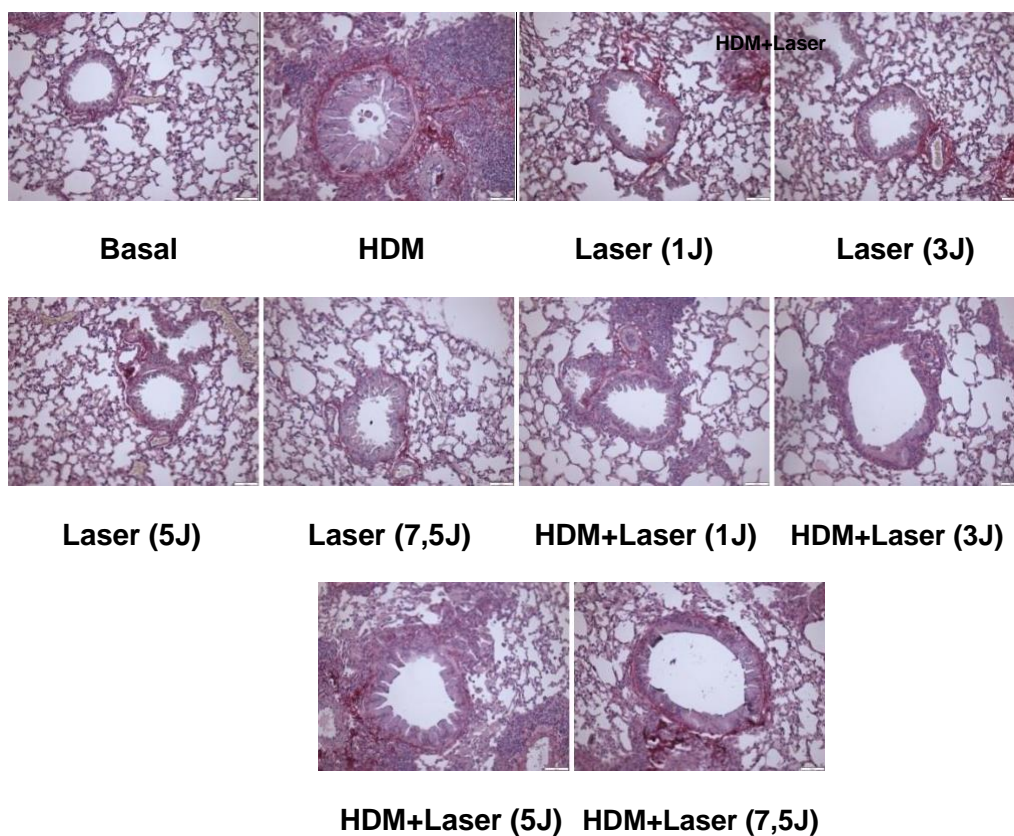
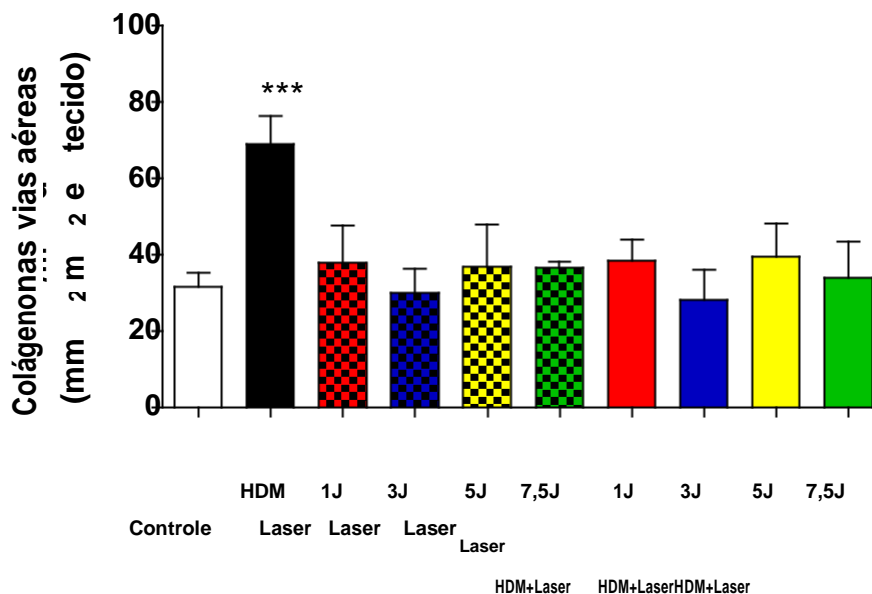


Figura 29. Efeito da terapia com LBI sobre a produção de colágeno nas vias aéreas. Os pulmões foram fixados, preparados e corados com PSR para a análise do colágeno nas vias aéreas. Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com *HDM*. Aumento de $\times 200$. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e $\Delta p < 0,01$ quando comparado ao grupo asmático (*HDM*).

4.9. Índice de broncoconstrição

Os resultados relacionados ao índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e espessamento do músculo liso das vias aéreas estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo no índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e espessamento do músculo liso no grupo asmático (*HDM*) quando comparado ao grupo Basal. Quando comparamos todos os grupos asmáticos que foram submetidos ao tratamento com o laser 1J, 3J, 5J e 7,5J (*HDM*+Laser 1J, 3J, 5J e 7,5J) observamos um efeito significativo na redução do no índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e espessamento do músculo liso da via aérea.

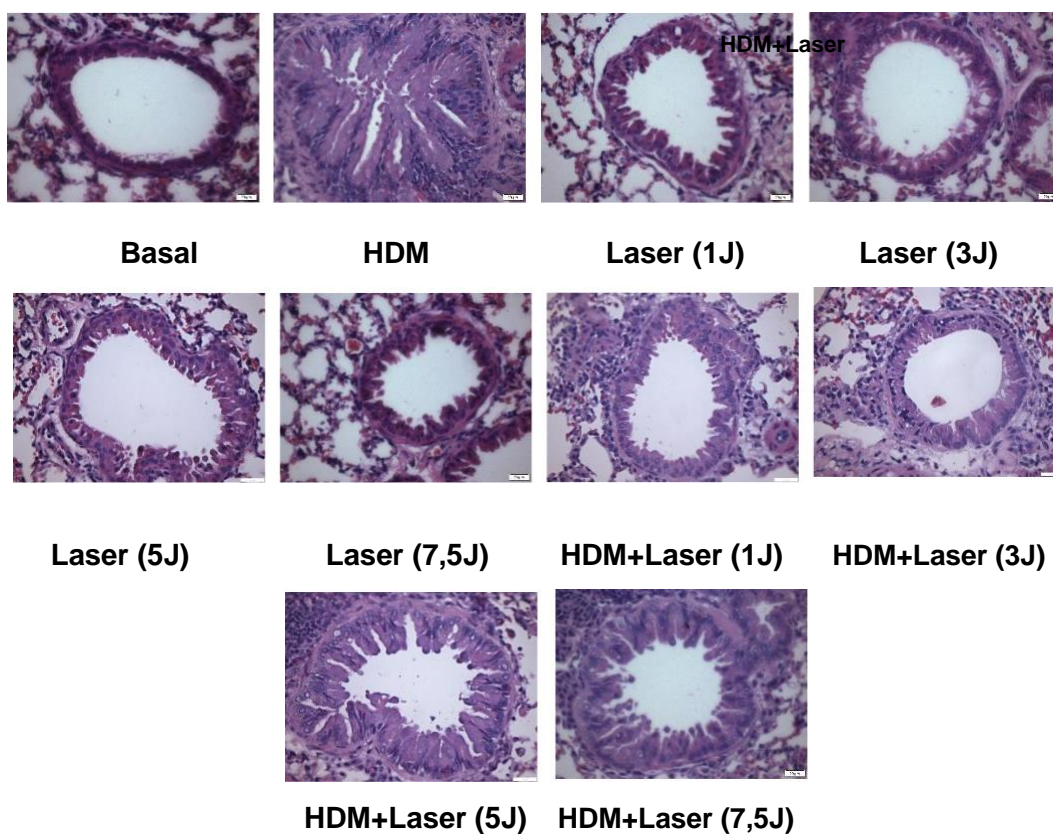
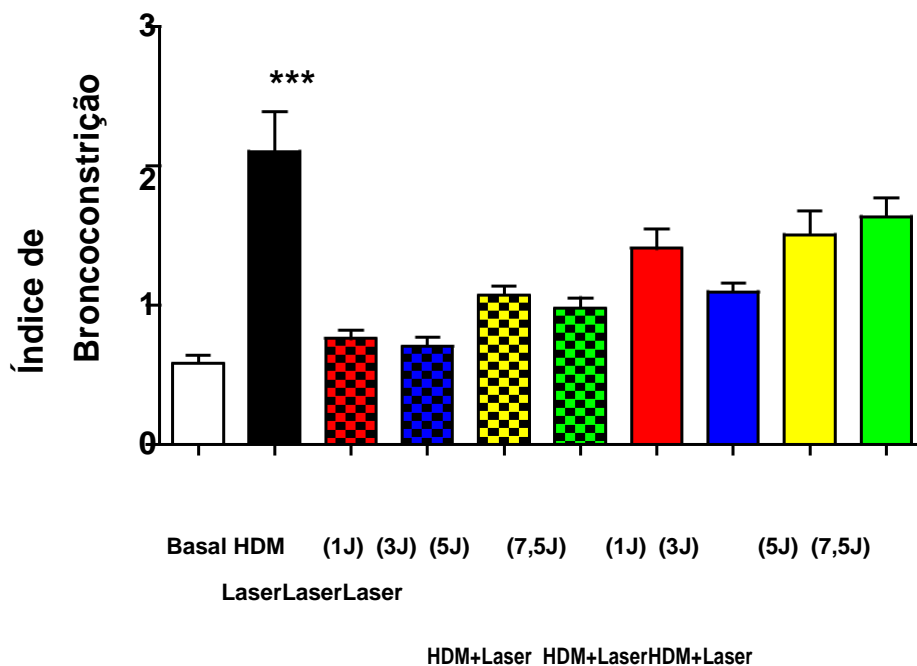


Figura 30. Efeito da terapia com LBI sobre o índice de broncoconstrição. Os pulmões foram fixados, preparados e corados com HE para a análise do índice de broncoconstrição nas vias aéreas. Aumento de $\times 400$. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e θ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (HDM).

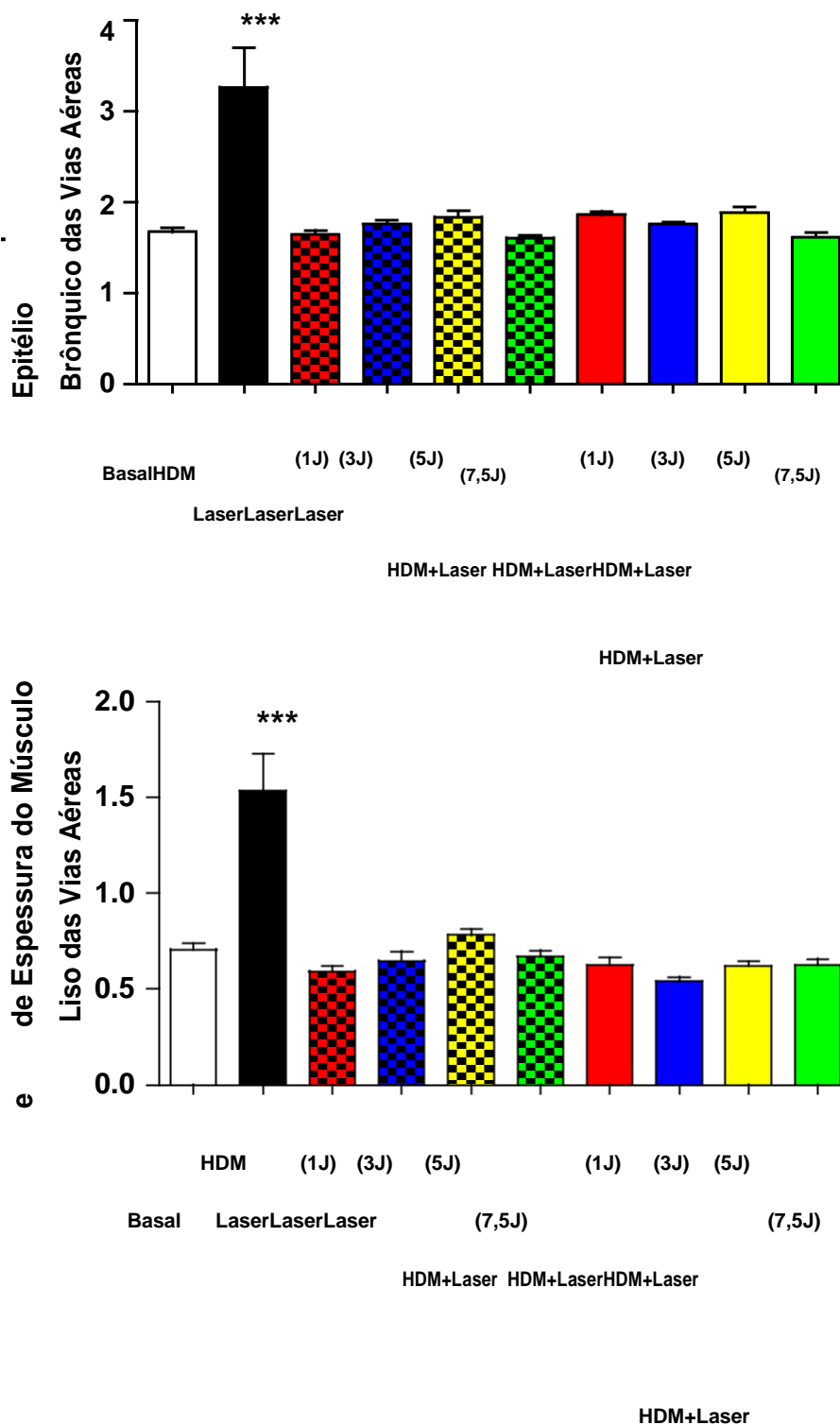


Figura 31. Efeito da terapia com LBI sobre o espessamento brônquico e espessamento do músculo liso das vias aéreas. Os pulmões foram fixados, preparados e corados com HE para as análises acima. Aumento de $\times 400$. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e $\theta p < 0,001$ quando comparado ao grupo asmático (HDM).

4.10. Avaliação da Mecânica Pulmonar

Os resultados para a análise de mecânica pulmonar, para a elastância dinâmica e estática, realizada com a caixa torácica fechada estão apresentados a seguir. Quanto aos dados, foi possível observar que os animais do grupo asmático (*HDM*) apresentaram um aumento na elastância dinâmica e estática, quando comparado ao grupo Basal. Quanto aos resultados para a elastância estática fechada, observamos uma redução significativa em todos os grupos submetidos ao tratamento com laser ($p < 0,01$). Para a elastância dinâmica fechada, os grupos (1J), (5J) e (7,5J) que receberam a laserterapia apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$).

Elastância Estática Fechada

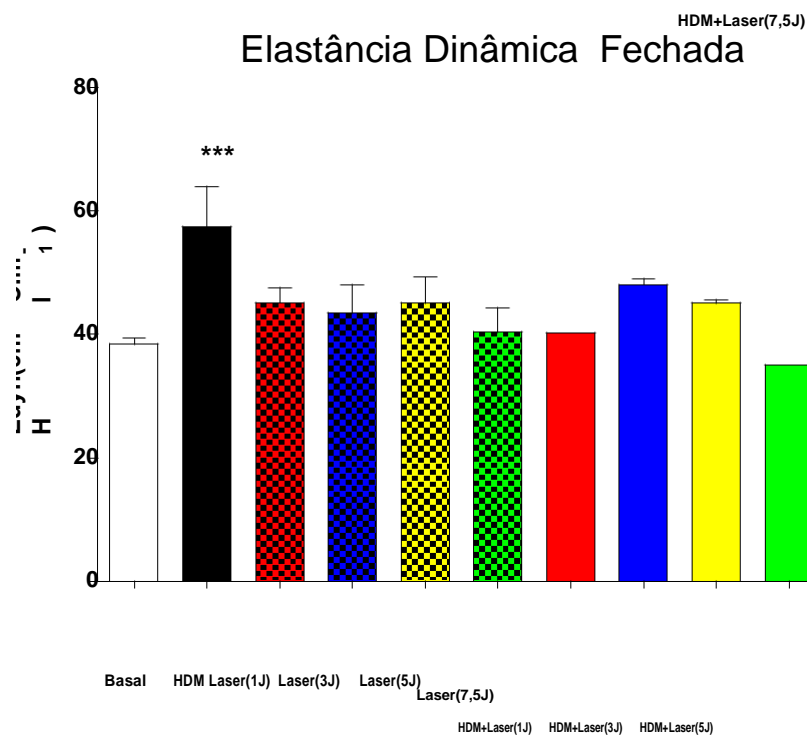
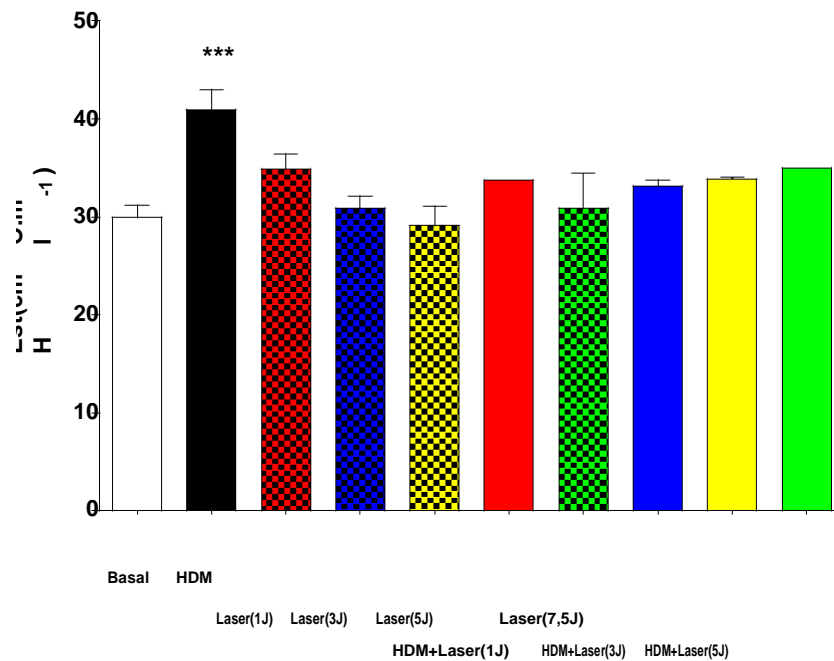


Figura 32. Efeito da terapia com LBI sobre a mecânica pulmonar com tórax fechado. Os animais foram anestesiados e submetidos à incisão anterior da traquéia, seguido de canulação da mesma. Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com *HDM*. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no experimento estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e θ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ e $p < 0,05$, quando comparado ao grupo asmático (*HDM*).

4.11. Análise da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico

Os resultados para a análise da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico estão apresentados a seguir. Quanto aos dados obtidos, foi possível observar que os animais do grupo asmático (*HDM*) apresentaram um aumento significativo quando comparado ao grupo Basal. Quando comparamos todos os grupos asmáticos que foram submetidos ao tratamento com o laser 1J, 3J, 5J e 7,5J (*HDM+Laser* 1J, 3J, 5J e 7,5J) observamos um efeito significativo na redução da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico.

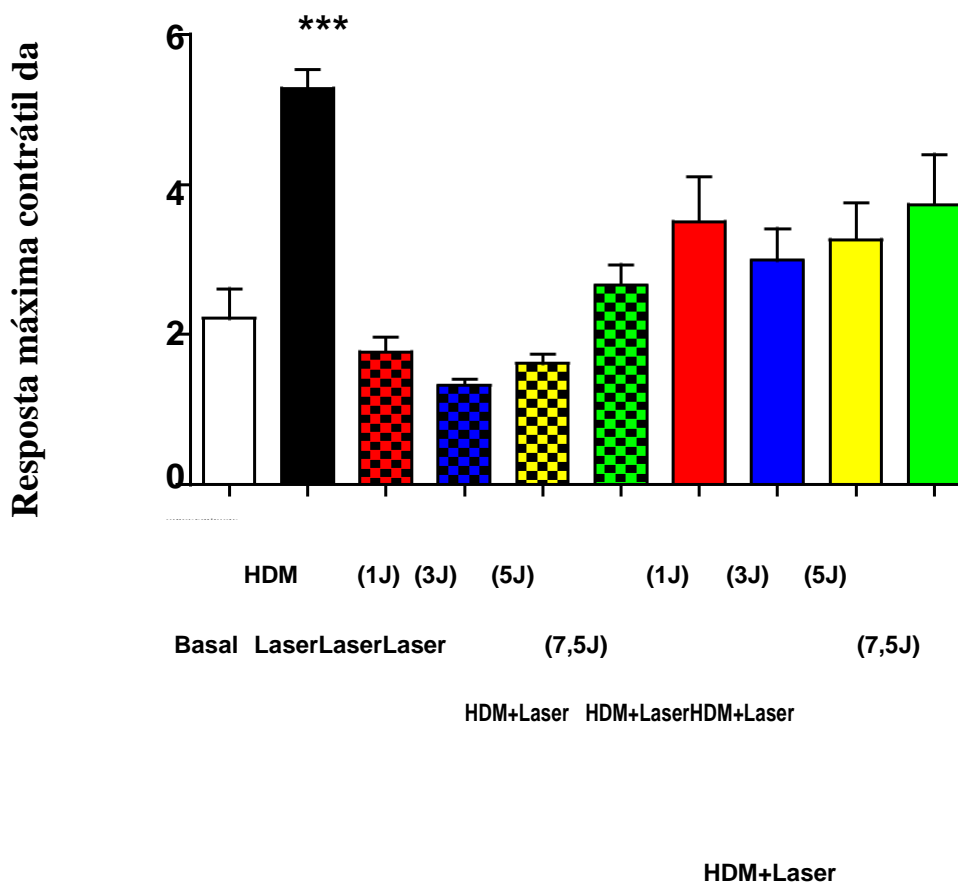


Figura 33. Efeito da terapia com LBI sobre a resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico. Os animais foram anestesiados e submetidos à incisão anterior da traquéia, seguido de remoção da mesma. Valores expressos como média e desvio padrão. Os grupos utilizados no estão descritos na Figura 9. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Basal e θ $p < 0,001$ e Δ $p < 0,05$ quando comparados ao grupo asmático (*HDM*).

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram a efetividade da utilização da terapia com Laser de Baixa Intensidade na redução do perfil celular inflamatório, citocinas pró-inflamatórias, infiltrado eosinofílico peribrônquico, redução de muco na via aérea, melhora estrutural avaliado em análise do índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e muscular da via aérea, bem como na quantificação de colágeno. Em análise funcional, o LBI atuou na melhora da mecânica pulmonar e reatividade da traquéia *in vitro*. Tais análises foram avaliadas em modelo experimental de doença pulmonar alérgica crônica induzida por *House Dust Mite*.

Tais achados sugerem que o LBI pode exercer um papel importante no tratamento da asma, atuando de maneira a modular e inibir o processo inflamatório e atuar também no processo de remodelamento, encontrado em uma fase mais tardia da doença. O laser se trata de uma opção terapêutica que não apresenta efeitos colaterais, é de baixo custo e não invasiva, podendo apresentar efeitos importantes e benéficos nas diferentes fases da doença.

A asma é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente as estruturas de maior calibre, como as vias aéreas. Vários estudos publicados evidenciam que as células inflamatórias desencadeiam uma reação inflamatória progressiva caracterizada principalmente por infiltrado de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺, estando de forma bem presente nessa doença. As células exercem um papel importante em ambos os processos apresentados, seja no processo inflamatório ou de remodelamento e ainda se associam diretamente ao processo obstrutivo encontrado na asma.⁵⁷⁻⁵⁹ Na fisiopatologia da asma, todas as características da inflamação pulmonar e da desregulação fisiológica são resultado final dos eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização, na ativação de células Th2 e dos mecanismos efetores desses mediadores.

Os resultados evidenciaram incremento no perfil celular no FLBA. Em particular aumento no número de eosinófilos no FLBA e no espaço peribrônquico. Tal achado corrobora com dados obtidos por outros autores, sendo característico do modelo de inflamação pulmonar crônica induzida por *HDM*.⁶⁰⁻⁶⁹ O infiltrado eosinofílico aumentado no pulmão do grupo asmático,

60, 63-67, 70

está correlacionado com o seu crescimento, desenvolvimento e aumento de sobrevivência favorecido pela citocina IL-5. Os eosinófilos, uma vez ativados, irão migrar para o local da inflamação e darão início a secreção de várias substâncias inflamatórias.

Ainda, observamos nesse modelo experimental, acréscimo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺, indo ao encontro dos dados da literatura. Desse modo, em asmáticos, os linfócitos T são ativados

65, 71

mediante a estímulo alérgico, irão originar um clone de linfócitos com perfil Th2 e desencadear a liberação de várias citocinas pró-inflamatória, tornando dessa maneira o quadro inflamatório e alérgico ainda mais agravado.

62, 64-66, 68, 69, 72

A citocina IL-4 apresenta múltipla e importante participação na asma, tais como: modulação do crescimento, na diferenciação e na migração das mastócitos, regulação da síntese de IgE pelas células B, diferenciação e proliferação das células TH2, estimulação das células produtoras de muco, inibição do desenvolvimento TH1. Por outro lado, a IL-13 participa da estimulação e maturação de linfócitos B e a síntese de Ig E e a IL-6 está diretamente envolvida no recrutamento de eosinófilos e em seu maior tempo de sobrevivência.¹⁷ Assim como atua promovendo o recrutamento, proliferação e diferenciação das células inflamatórias presentes na inflamação alérgica.¹⁷ Em nossos resultados, observamos aumento nos níveis das principais citocinas pró-inflamatórias encontradas na asma crônica (IL-4, IL-5 e IL-13), corroborado com estudos anteriores utilizando NCM para induzir a doença.

Novas evidências constataram a importância do GATA3 (GATA-binding protein 3), um fator de transcrição pleiotrópico expresso em células T, eosinófilos, mastócitos e basófilos. O GATA-3 pertence à família de fatores de transcrição expresso nas células TH2, o que não acontece com células TH1. A expressão GATA-3 nas células T é regulada pelo fator de transcrição STAT 6 (signal transducer and activator transcription) via ativação^{64, 66, 69} do receptor IL-4.^{17,18} Os resultados obtidos para os fatores de transcrição GATA3 e

STAT6, evidenciaram aumento significativo no grupo asmático. Tais achados foram

encontrados e publicados previamente por demais autores.

O número de

células que expressam transcrições GATA-3 tem correlação significativa com o aumento da resistência e hiperresponsividade das vias aéreas em asmáticos.

57, 63-64, 67, 70, 74-75

Além disso, a análise de apoptose e necrose celular no FLBA se mostraram elevadas no grupo de animais submetidos à administração de HDM. Notamos por vez significativo aumento na quantificação de muco ao redor da via aérea avaliada por análise histológica. Dessa maneira, observamos uma piora na inflamação nesse grupo experimental. Em publicações anteriores, os autores também quantificaram a deposição de muco e notaram aumento importante em animais submetidos à mesma indução da doença.

Para avaliação do índice de broncoconstrição, espessamento do epitélio brônquico e espessamento do músculo liso das vias aéreas, notamos aumento acentuado em tais análises, essas características apresentam-se tipicamente na asma, observadas por Viera et al (2007) ⁵⁵, Em decorrência ao processo evolutivo da doença, haverá uma variedade de fatores presentes, tais como: liberação de mediadores que irão desencadear lesões e alterações na integridade do epitélio brônquico, anormalidades no tônus muscular da via aérea, mudanças na função mucociliar e aumento no espessamento do músculo da via aérea, bem como em sua resposta reativa aos estímulos. ¹⁵

Nessa fase mais tardia da doença é possível observar o processo de remodelamento das vias aéreas. Essa etapa caracteriza-se pela liberação de diversos fatores de crescimento e deposição de fibras colágenas na tentativa de reparar o dano epitelial sofrido. Em análise histológica, evidenciamos maior quantificação na deposição de fibras de colágeno ao redor da via aérea no grupo asmático sensibilizado com o alérgeno, característica observada na fase de cronificação da doença, evidenciado por Zoltowska et al, (2016). ⁶⁷

Ainda, ao analisarmos a avaliação da mecânica pulmonar, especificamente para as respostas para a elastância estática e dinâmica, verificamos o aumento de tais capacidades no grupo asmático. ⁸¹ Em análise da reatividade traqueal *in vitro*, notamos que o grupo submetido ao desafio com ácaro de poeira doméstica, apresentou resultados de respostas elevados comparados ao grupo basal. Tal achado evidencia o aumento local para a

Levando em consideração todos os resultados obtidos para os animais submetidos à administração orotraqueal crônica de *HDM*, verificamos a eficácia da utilização do ácaro (*Der p1*) para desenvolver o modelo experimental de asma proposto no presente trabalho. Apesar dos dados estatísticos apontarem elevada incidência populacional de pacientes asmáticos, pouco se conhece na literatura acerca do uso da fotobiomodulação em modelos experimentais utilizando o *HDM* como agente sensibilizador ou evidência quanto ao seu uso como uma terapia alternativa na área clínica.

Evidências anteriores em modelos experimentais, certificaram que a terapia com o LBI em outras doenças^{32, 76.} pulmonares já atuou principalmente de

forma a diminuir o infiltrado inflamatório. Resultados importantes e significativos também foram observados em modelo de asma experimental utilizando a Ovalbumina (OVA)^{47-51, 77.} Em estudo clínico recentemente publicado, evidenciou a utilização do laser em crianças asmáticas, o qual resultou em redução nos níveis de óxido nítrico exalado e melhora nos parâmetros espirométricos.⁷⁸⁻⁷⁹

Dessa maneira consideramos extremamente relevante estudar a utilização do LBI em modelos experimentais com *HDM*, bem como buscar evidências que demonstrem a sua via de atuação e a melhor dose a ser utilizada, de forma a contribuir na aplicação de uma terapia eficiente ou pelo menos auxiliar do tratamento farmacológico, diminuindo assim tanto os efeitos colaterais medicamentosos, como os gastos hospitalares despendidos com essa doença

Como ainda não há relatos na literatura sobre a utilização da terapia com LBI de diodo em modelo experimental de asma induzida por *HDM*, os dados comparativos foram realizados em modelos experimentais de inflamação alérgica crônica pulmonar desenvolvidos utilizando a OVA. OVA é o alérgeno mais utilizado. No entanto, o OVA não induz a inflamação das vias aéreas em humanos e tem sido questionado como um bom alérgeno para estudar asma.

O *HDM* tem sido usado com sucesso para induzir asma em modelos animais. Três características deste alérgeno torna-o adequado: atividade enzimática intrínseca, imunogenicidade e ativação direta através do receptor de Dectina-2 de células imunes inatas que promovem inflamação alérgica.⁴

Os resultados obtidos em todos os grupos asmáticos que receberam o tratamento com laser, destacaram a efetividade da fotobiomodulação na redução do perfil inflamatório, melhora estrutural e funcional, encontrados na doença pulmonar alérgica crônica estabelecida no atual modelo experimental.

A nível inflamatório, os efeitos podem ser observados na redução do perfil celular avaliado no FLBA através de contagem total e diferencial, bem como por citometria de fluxo (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺), bem como no infiltrado eosinofílico peribrônquico e deposição de muco avaliado por histologia. Além disso, verificamos diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13 no FLBA e homogenato de tecido pulmonar. Por outro lado, a utilização da laserterapia aumentou o número de macrófagos avaliados por citometria de fluxo e os níveis de IL-10 no FLBA bem como no homogenato pulmonar.

Adicionando aos benefícios obtidos com o uso da terapia com LBI, notamos a atenuação dos fatores de transcrição (STAT 6 e GATA 3) bem como da citocina IL-4, nos linfócitos T CD4⁺ no FLBA, também avaliados por citometria de fluxo. O LBI também preveniu o aumento de apoptose e necrose celular das células pulmonares (7AAD e Anexina V, respectivamente). A broncoconstrição das vias aéreas evidenciou melhora significativa nos grupos tratados com laserterapia, bem como para as análises de espessamento do músculo liso e espessamento do epitélio brônquico das vias aéreas. Por fim, a resposta contrátil máxima da traquéia, após estímulo colinérgico, reduziu significativamente nos grupos que realizaram o tratamento com o laser

Quanto a avaliação de linfócitos totais (CD3⁺) e neutrófilos (LY6G) observamos redução em todos os grupos submetidos ao tratamento com laserterapia. Tal achado também foi evidenciado em trabalho recentemente publicado.⁵¹ Para a porcentagem de CD4⁺, observamos diminuição para os

grupos tratados com laser (5J e 7,5J). Já para os valores de linfócitos CD8⁺, os resultados só não foram significativos para o grupo *HDM+Laser* (1J).

Particularmente para a avaliação de eosinófilos, observamos redução em todos os grupos submetidos à laserterapia, demonstrados em dados obtidos⁴⁸⁻⁵¹ Dados complementares à atenuação da migração de eosinófilos podem ser observados nas análises de citocinas. Especificamente nos níveis de IL-5, que estão diretamente ligadas a esse tipo celular, notamos melhores resultados para o grupo *HDM+Laser* (3J), a nível local e sistêmico. Para o infiltrado eosinofílico, nos grupos submetidos à laserterapia com menor dose de aplicação, notamos melhor resultado para o uso da energia de 3J, corroborando com dados obtidos por Wang et al (2014), Silva et al (2014) e Costa-Carvalho (2016).⁴⁸⁻⁵⁰ Tenho em vista esse achado, os atuais resultados sugerem que o LBI pode ter papel importante na redução da migração eosinofílica, entretanto esse mecanismo não é bem elucidado.

Os níveis de IL-4 apresentaram-se atenuados nos grupos submetidos à laserterapia, com melhores resultados para os grupos (*HDM+Laser* 5J e 7,5J). Tais achados são complementados pela avaliação de linfócitos T CD4⁺ STAT6 e GATA 3, que estão diretamente ligados à essa citocina e apresentaram resultados iguais quando comparados entre si. A avaliação da produção de IL-4 por essas células no FLBA confirma com dados obtidos.⁴⁷⁻⁴⁹

Especificamente GATA 3 está relacionada ao aumento da reatividade traqueal e brônquica. Em análise realizada para o índice de broncoconstrição e resposta máxima contrátil da traquéia (hiperreatividade traqueal) após estímulo colinérgico com metacolina, os resultados evidenciaram redução em todos os grupos submetidos ao tratamento com LBI. Tais resultados podem ser observados também para as análises de espessamento brônquico e espessamento do músculo liso da via aérea. Tais achados também foram observados por Choi (2013).⁴⁷

Vários estudos relataram que o fator de transcrição STAT6 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de eosinofilia pulmonar, hiperresponsividade das vias aéreas e hipersecreção de muco⁸⁰. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, descobrimos que o LBI reduziu a

expressão de STAT6 no tecido pulmonar em animais sensibilizados e desafiados com OVA, bem como a concentração de IL-5, que atraem principalmente os eosinófilos. Sugerindo que o efeito anti-inflamatório da irradiação com laser sobre as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina, e consequentemente na diminuição da migração celular para o pulmão, poderia ser devido a redução da expressão de STAT6 ⁴⁹.

Assim, verificamos nesse estudo a quantidade de linfócitos T CD4⁺STAT6⁺GATA3⁺IL-4⁺ após a laserterapia nos animais alérgicos e observamos redução quando comparamos ao grupo sem tratamento. Então, sendo o STAT 6 e GATA 3 importantes na sinalização de IL-4 e na diferenciação celular de linfócitos TCD4⁺ (Th2), camundongos STAT 6 knock-out não apresentam resposta a IL-4, não desenvolvem células Th2, não produzem IgE ou apresentam hiperreatividade brônquica.

Em adição aos resultados anteriores, a avaliação da morte celular, especificamente para a porcentagem de células em apoptose (7AAD), foi possível observar atenuação para os grupos tratados com laser (5J e 7,5J). Já para a necrose das células (Anexina V), todos os grupos apresentaram resultados significativos. Finalizando as análises, níveis de IL-10 no FLBA apresentaram-se elevados em todos os grupos tratados com laser, da mesma maneira foi evidenciado por Siqueira et al (2017). ⁵¹ Já em homogenato pulmonar, os melhores resultados foram observados com Laser 1J e 5J. Esses resultados mostram que a utilização do Laser de Baixa Intensidade apresentou efeito benéfico com preservação da viabilidade celular, bem como na estimulação da produção de IL-10, que apresenta caráter anti-inflamatório.

Bem como importante redução da deposição de muco na via aérea para os grupos submetidos à terapia com LBI com as energias de 1J e 3J, e aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 para o grupo *HDM*+Laser (1J), que apresenta evidência científica de perfil Th2. Esses achados vão ao encontro com dados obtidos em estudos prévios, os quais apontam os benefícios da utilização do LBI em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar ^{49, 52}. A redução da deposição de muco na via aérea pode contribuir de forma a

justificar a diminuição do processo inflamatório pulmonar através da modulação do LBI, constatando com dados apresentados previamente na literatura.⁴⁹

A deposição de colágeno na via aérea evidencia uma fase mais tardia, a fase de remodelamento pulmonar. Com a intervenção terapêutica com o LBI, principalmente para o grupo *HDM+Laser* (3J), pudemos observar uma atuação positiva e que reduziu a deposição das fibras colágenas na via aérea, bem como evidenciado em outro trabalho publicado.⁴⁹ Dessa maneira, o LBI foi capaz de atuar positivamente na prevenção das alterações estruturais ocasionadas a partir da inflamação crônica pulmonar.

Quanto aos dados obtidos para mecânica pulmonar, foi possível observar que os animais tratados com LBI apresentaram os resultados significativos para a elastância estática fechada em todos os grupos, com melhores resultados para os grupos *HDM+Laser* (1J) e (3J). Já a análise para a elastância dinâmica fechada, somente não notamos redução significativa para o grupo tratado com Laser (3J). Em conclusão às análises, observamos redução da resposta contrátil máxima traqueal ao estímulo colinérgico em todos os grupos submetidos à laserterapia, entretanto, o melhor resultado foi evidenciado no grupo *HDM+Laser* (3J).

Após finalizarmos todas as análises dos resultados, pudemos observar e concluir a efetividade na utilização da terapia com LBI em menor dose, especificamente 3J, apresentou resultados significativos e melhor efeito sobre o perfil celular, redução da inflamação, melhora estrutural e funcional na doença pulmonar alérgica crônica. Dessa maneira, parece-nos razoável a utilização da fotobiomodulação atuando em menores doses para o tratamento da asma.

Ressaltamos por fim, a importância da utilização da terapia com laser, uma vez que pudemos acrescentar novas evidências, estas que podem contribuir para elucidar a melhor o efeito e a dose anti-inflamatória a ser utilizada em modelo experimental de asma utilizando *HDM*. Sendo assim, esperamos que num futuro próximo, possamos realizar um estudo translacional utilizando a laserterapia no tratamento de pacientes asmáticos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a efetividade da utilização da laserterapia no tratamento da inflamação alérgica pulmonar crônica. Vale destacar que o laser atuando em dose mais baixa, especificamente 3J, foi o que apresentou melhores resultados no estudo dosimétrico. Tais achados evidenciam que o LBI é capaz de atuar no processo inflamatório pulmonar, bem como apresentou resultados positivos sobre os parâmetros funcionais e estruturais, avaliados por análise histológica, análise da elastância pulmonar e resposta contrátil da traquéia ao estímulo colinérgico.

Desse modo, observamos significativa redução no perfil celular no FLBA, bem como atenuação das citocinas pró-inflamatórias e fatores de transcrição avaliados. O LBI também foi capaz de inibir a apoptose e necrose celular. Em contrapartida, favoreceu o aumento de macrófagos no FLBA e da citocina anti-inflamatória a IL-10 no FLBA e homogenato de tecido pulmonar.

Ainda a fotobiomodulação foi capaz de atenuar o índice de broncoconstrição, espessamento brônquico e muscular das vias aéreas atuando também na redução da reatividade *in vitro* da traquéia.

Dessa maneira, consideramos que o uso da terapia com laser de baixa intensidade pode ser considerado uma ferramenta promissora para o tratamento dos sintomas apresentados por pacientes portadores da inflamação pulmonar crônica, possibilitando uma terapia alternativa eficiente ou pelo menos auxiliar do tratamento farmacológico, de modo a favorecer a redução dos efeitos colaterais apresentados com a utilização de medicamentos, bem como os gastos hospitalares despendidos com essa doença e ainda na redução no absenteísmo escolar e no trabalho. Conseqüentemente, essa terapia pode melhorar a qualidade de vida, bem como favorecer a diminuição da morbi-mortalidade desses pacientes.

Cronograma de Execução do Projeto (período de 01/2018 a 07/2018)

Início: Janeiro de 2015

Término: Julho de 2018

Atividade/Semestre	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X
Estabelecimento do Protocolo de LBI	X						
Estabelecimento do Protocolo de <i>HDM</i>		X					
Desenvolvimento do Protocolo Experimental			X	X			
Análise da Fenotipagem e Morte Celular			X	X			
Análise da Reatividade Traqueal			X				X
Análise da Mecânica Pulmonar			X	X			
Quantificacao de Citocinas (ELISA)				X			X
Realização da Citometria de Fluxo				X			X
Confeccao e Analise das Lâminas de Histologia				X	X		X
Análise do Índice de Broncocontrição (HE)							X
Análise do Espessamento Brônquico							X
Análise do Espessamento Muscular							X
Submissão dos Artigos para Publicação							X

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- GINA - Global Initiative for Asthma [Strategy for Asthma management and prevention] [online] Ed. 2018. (Acessado em junho, 2018. Disponível em: <http://www.ginaasthma.org>).
- 2- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2013; 380:2095-128
- 3- Huang, FL, Liao EC, YU SJ. House dust mite allergy: Its innate immune response and immunotherapy. *Immunobiology*. 2017 Oct 16. [Epub ahead of print]
- 4- Clarke DL, Davis NH, Champion CL, Foster ML, Heasman SC, Lewis AR, Anderson IK, Corkill DJ, Sleeman MA, May RD, Robinson MJ. Dectin-2 sensing of house dust mite is critical for the initiation of airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2014 May;7(3):558-67.
- 5- Finkelman FD, **Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M.** Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):1663-74.
- 6- Kudo M, **Ishigatsubo Y, Aoki I.** **Pathology** of asthma. *Front Microbiol*. 2013 Sep 10;4:263.
- 7- Potter PC, **Baker S, Fenemore B, Nurse B.** **Clinical** and cytokine responses to house dust mite sublingual immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015 Apr; 114(4):327-34.
- 8- Piyadasa H, **Altieri A, Basu S, Schwartz J, Halayko AJ, Mookherjee N.** Biosignature for airway inflammation in a house dust mite-challenged murine model of allergic asthma
- 9- Grosse-Onnebrink J, **Werner C, Loges NT, Hörmann K, Blum A, Schmidt R, et al.**, Effect of Th2 cytokines and interferon gamma on beat frequency of human respiratory cilia. *Pediatr Res*. 2016 Jan 13.
- 10- Ligeiro de Oliveira AP, **Oliveira-Filho RM, da Silva ZL, Borelli P, Tavares de Lima W.** Regulation of Allergic Lung Inflammation in Rats: Interaction between Estradiol and Corticosterone. *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(1):20-7.
- 11- Riffo-Vasquez Y, **Ligeiro de Oliveira AP, Page CP, Spina D, Tavares-de-Lima W.** Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2007 Mar;37(3):459-70.

- 12-** de Oliveira AP, **Peron** JP, **Damazo** AS, **Franco** AL, **Domingos** HV, **Oliani** SM., et al. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung E-selectin in rats. *Respir Res.* 2010 Aug 24; 11:115.
- 13-** Bosnjak B, **Stelzmueller** B, **Erb** KJ, **Epstein** MM. **Treatment** of allergic asthma: Modulation of Th2 cells and their responses. *Respir Res.* 2011 Aug 25; 12:114.
- 14-** Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3546-56
- 15-** Bax HJ, Keeble AH, Gould HJ. Cytokinergic IgE Action in Mast Cell Activation. *Front Immunol.* 2012 Aug 6;3:229.
- 16-** Al-Muhsen S, **Johnson** JR, **Hamid** Q. **Remodeling** in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Sep;128(3):451-62;
- 17-** Ho, I-C, Tai, T-S, Pai, S-Y. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009 February; 9(2): 125–135.
- 18-** Hegazy, A. N., Peine, M., Helmstetter, C., Panse, I., Frühlich, A., Bergthaler, A., Flatz, L., Pinschewer, D. D., Radbruch, A., and Lohning, M. 2010. Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3+Tbet+ Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions. *Immunity* 32:116.
- 19-** Carriere V, **Roussel** L, **Ortega** N, **Lacorre** DA, **Americh** L, **Aguilar** L, et al., IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 2;104(1):282-7.
- 20-** Maneechotesuwan K, **Xin** Y, **Ito** K, **Jazrawi** E, **Lee** KY, **Usmani** OS, **Barnes** PJ, Adcock IM. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol.* 2007 Feb 15;178(4):2491-8.
- 21-** Antczak A, Domańska-Senderowska D, **Górski** P, **Pastuszek**-Lewandoska D, Nielepkowicz-Goździńska A, Szewczyk K, Kurmanowska Z, Kiszalkiewicz J, Brzezińska-Lasota E. Analysis of changes in expression of IL-4/IL-13/STAT6 pathway and correlation with the selected clinical parameters in patients with atopic asthma. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016 Jan 18. [Epub ahead of print].
- 22-** Persky ME, Murphy KM.; Farrar JD. IL-12, but not IFN- α , promotes STAT4 activation and Th1 development in murine CD4+ T cells expressing a chimeric murine/human Stat2 gene. *The Journal of Immunology.*, 2005.174;294-301.

- 23** - Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001; 19:29–33. [PubMed]
- 24**- The Quantum Theory of Radiation, 1917. Albert Einstein
- 25**- Townes, C. H. 1999. *How the Laser Happened: adventures of a scientist*. New York: Oxford University Press.
- 26**- Maiman, T. 2000. *The Laser Odyssey: Creator of the world's first laser*. Vancouver, Canada: Laser Press.
- 27**- Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23:355–61. [PubMed]
- 28**- Huang YY¹, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose response*. 2011;9(4):602-18.
- 29**- Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol*. 2002;76:164–70.[PubMed].
- 30**- Albertini R, **Aimbire** FS, **Correa** FI, **Ribeiro** W, **Cogo** JC, **Antunes** E, **Teixeira** SA, et al., Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J Photochem Photobiol B*. 2004 May 27;74(2-3):101-7.
- 31**- Aim bire F, **Bjordan** JM, **Iversen** VV, **Albertini** R, **Frigo** L, **Pacheco** MT, **Castro-Faria-Neto** HC, et al. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers Surg Med*. 2006 Sep;38(8):773-8.
- 32**- Mafra de Lima F, **Villaverde** AB, **Salgado** MA, **Castro-Faria-Neto** HC, **Munin** E, Albertini R, et al., Low intensity laser therapy (LILT) *in vivo* acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* in rat. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Dec 2;101(3):271-8.
- 33**- Karu, T. Pyatibrat, L.V. Kalendo, G. 1999. Thiol reactive agents eliminate stimulation of possible involvement of cellular redox status into low power laser effects. *Laser Therapy.*, v.11, p.177–187.
- 34**- Karu TI, **Pyatibrat** LV, **Afanasyeva** NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol*. 2004 Sep-Oct;80(2):366-72.

35- Passarella S, **Karu T.** **Absorption** of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J Photochem Photobiol B.* 2014 Nov; 140:344-58.

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

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

38- Aimbire F, **Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, Corrêa JC, Ladeira de Campos CB, Lyon JP, et al.** Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 β Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. *Inflammation.* 2008 Jun;31(3):189-97.

39- Oliveira MC Jr, **Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Custódio RW, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR, Almeida FM, Albertini R, Lopes-Martins RÁ, de Oliveira LV, de Carvalho Pde T, Ligeiro de Oliveira AP, Leal EC Jr, Vieira RP.** Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B.* 2014 May 5; 134:57-63.

40- de Lima FM, **Aimbire F, Miranda H, Vieira RP, de Oliveira AP, Albertini R.** Low-level laser therapy attenuates the myeloperoxidase activity and inflammatory mediator generation in lung inflammation induced by gut ischemia and reperfusion: a dose-response study. *J Lasers Med Sci.* 2014 Spring;5(2):63-70.

41- Carvalho JL, **Britto A, de Oliveira AP, Castro-Faria-Neto H, Albertini R, Anatriello E, Aimbire F.** Beneficial effect of low-level laser therapy in acute lung injury after i-I/R is dependent on the secretion of IL-10 and independent of the TLR/MyD88 signaling. *Lasers Med Sci.* 2017 Feb;32(2):305-315.

42- Miranda da Silva C, **Peres Leal M, Brochetti RA, Braga T, Vitoretti LB, Saraiva Câmara NO, Damazo AS, Ligeiro-de-Oliveira AP, Chavantes MC, Lino-Dos-Santos-Franco A.** Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS One.* 2015 Nov 16;10(11):e0142816.

43- Silva Macedo R, **Peres Leal M, Braga TT, Barioni ÉD, de Oliveira Duro S, Ratto Tempestini Horliana AC, Câmara NO, Marcourakis T, Farsky SH, Lino-Dos-Santos-Franco A.** Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in

the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:9303126.

44- Peron JP, de Brito AA, Pelatti M, Brandão WN, Vitoretti LB, Greiffo FR, et al., Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke–Induced COPD in C57BL/6 mice. *PLoS One.* 2015 Sep 25;10(9).

45- da Cunha Moraes G, Vitoretti LB, de Brito AA, Alves CE, de Oliveira NCR, Dos Santos Dias A, Matos YST, Oliveira-Junior MC, Oliveira LVF, da Palma RK, Candeo LC, Lino-Dos-Santos-Franco A, Horliana ACRT, Gimenes Júnior JA, Aimbire F, Vieira RP, Ligeiro-de-Oliveira AP. Low-Level Laser Therapy Reduces Lung Inflammation in an Experimental Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Involving P2 X7 Receptor. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Mar 4;2018:6798238.

46- Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, da Palma RK, de Oliveira LVF, 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 Nov;32(8):1825-1834

47- Choi B, Chang MS, Kim HY, Park JW, Ryu B, Kim J. Effects of Low Level Laser Therapy on Ovalbumin-Induced Mouse Model of Allergic Rhinitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, 1-8.

48- Wang XY, Ma WJ, Liu CS, Li YX. Effect of low-level laser therapy on allergic asthma in rats. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):1043-50.

49- Silva VR, Marcondes P, Silva M, Villaverde AB, Castro-Faria-Neto HC, et al., Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014 Apr 1;194:37-48.

50- Costa-Carvalho JL, Brito AP, Oliveira APL, Faria Neto HCC, Pereira TM, Carvalho RA, Anatriello E, Aimbire F. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J. Biophotonics* 1–14, 2016.

51- Siqueira VPC, Evangelista MIS, Dos Santos A, 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 Biophotonics.* 2017 Dec;10(12):1683-1693

52- Cipriani, F., Efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) Sobre a Inflamação Pulmonar em Modelo de Asma Experimental Induzida por *House Dust Mite* (Hdm). São Paulo, Universidade Nove de Julho, 2014.

- 53-** Vieira RP, **Toledo AC, Ferreira SC, Santos AB, Medeiros MC, Hage M, et al.**, Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011 Mar 15;175(3):383-9.
- 54-** Ligeiro de Oliveira, A.P., et al., Role of female sex hormones (FSH) on modulation of adhesion molecules expression in a model of allergic lung inflammation (ALI). *Inflammation Research*, 2007; 56: S416-S416.
- 55-** Vieira RP, **Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, et al.**, Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Nov 1;176(9):871-7.
- 56-** Farre R, **Granell S, Rotger M, Serrano-Mollar A, Closa D, Navajas D.** **Animal** model of unilateral ventilator-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 2005 Mar;31(3):487-90.
- 57-** Debeuf, N., Haspeslagh, E., van Helden, M., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. Mouse models of asthma. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 6:169-184, 2016.
- 58-** Fritzsching B, Hagner M, Dai L, Christochowitz S, Agrawal R., Van Bodegom C, Schmidt S, Schatterny J, Hirtz S, Brown R, Goritzka M, Duerr J, Zhou-Suckow Z, Mall MA. Impaired mucus clearance exacerbates allergen-induced type 2 airway inflammation in juvenile mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2016.
- 59-** Zhou-Suckow Z, **Duerr J, Hagner M, Agrawal R, Mall MA.** **Airway** mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res.* Mar;367(3):537-550, 2017.
- 60-** Hawkshaw C, Scott JA, Chow C-W, Fish EN. LAPCs contribute to the pathogenesis of allergen-induced allergic airway inflammation in mice. *Allergy* 2014; 69: 924–935.
- 61-** Sivapalan N, Wattie J, Inman MD, Sehmi R (2014) Lung-Homing of Endothelial Progenitor Cells and Airway Vascularization Is Only Partially Dependant on Eosinophils in a House Dust Mite-Exposed Mouse Model of Allergic Asthma. *PLoS ONE* 2014; 9 (10).
- 62-** Liravi B, **Piedrafita D, Nguyen G, Bischof RJ.** **Dynamics** of IL-4 and IL-13 expression in the airways of sheep following allergen challenge. *BMC Pulm Med.* 2015 Sep 11;15:101.
- 63-** Mishra A, **Brown AL, Yao X, Yang S, Park SJ, Liu C, Dagur PK, McCoy JP, Keeran KJ, Nugent GZ, Jeffries KR, Qu X, Yu ZX, Levine SJ, Chung JH.** Dendritic cells induce Th2-mediated airway inflammatory responses to house dust mite via DNA-dependent protein kinase. *Nat Commun.* Feb 18;6:6224, 2015.
- 64-** Choi J, **Choi BK, Kim JS, Lee JW, Park HA, Ryu HW, Lee SU, Hwang KW, Yun WK, Kim HC, Ahn KS, Oh SR, Lee HJ.** Picroside II Attenuates Airway

Inflammation by Downregulating the Transcription Factor GATA3 and Th2-Related Cytokines in a Mouse Model of HDM-Induced Allergic Asthma. *PLoS One*. Nov 21;11(11): e0167098, 2016.

65- Piyadasa H, **Altieri A, Basu S, Schwartz J, Halayko AJ, Mookherjee N.** Biosignature for airway inflammation in a house dust mite-challenged murine model of allergic asthma

66- Zaffini R , Di Paola R , Cuzzocrea S , Menegazzi M . PARP inhibition treatment in nonconventional experimental mouse model of chronic asthma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2016 Dec;389(12):1301-1313.

67- Zoltowska AM, **Lei Y, Fuchs B, Rask C, Adner M, Nilsson GP.** The interleukin-33 receptor ST2 is important for the development of peripheral airway hyperresponsiveness and inflammation in a house dust mite mouse model of asthma. *Clin Exp Allergy*. Mar;46(3):479-90, 2016.

68- Doras C, Petak F, Bayat S, Baudat A, Von Garnier C, Eigenmann P, Habre W.

Lung responses in murine models of experimental asthma: Value of house dust mite overovalbumin sensitization. *Respir Physiol Neurobiol*. 2018 Jan;247:43-51.

69- Nagaraj C, **Haitchi HM, Heinemann A, Howarth PH, Olschewski A, Marsh LM.** Increased Expression of p22phox Mediates Airway Hyperresponsiveness in an Experimental Model of Asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Dec 20;27(18):1460-1472.

70- Sisiva JE, **Hoffman SM, Lahue KG, Nolin JD, Anathy V, Lundblad LK, Daphtary N, Aliyeva M, Black KE, Dixon AE, Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YM.** Epithelial Nuclear Factor- κ B orchestrates house dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, and fibrotic remodeling. *J Immunol*. Dec 15;191(12):5811-21, 2013.

71- Potter PC, **Baker S, Fenimore B, Nurse B.** Clinical and cytokine responses to house dust mite sublingual immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015 Apr; 114(4):327-34.

72- Johnson JR¹, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Ellis R, Inman MD, Jordana M.

Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Feb 1;169(3):378-85.

73- Webb DC, **McKenzie AN, Koskinen AM, Yang M, Mattes J, Foster PS.** Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *J Immunol*. Jul 1;165(1):108-13, 2000.

74- Kelada SN, **Wilson MS**, **Tavarez U**, **Kubalanza K**, **Borate B**, **Whitehead GS**, Maruoka S, Roy MG, Olive M, Carpenter DE, Brass DM, Wynn TA, Cook DN, Evans CM, Schwartz DA, Collins FS. Strain-Dependent Genomic Factors Affect Allergen-Induced Airway Hyperresponsiveness in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Oct;45(4):817-24, 2011.

75- Canbaz D, **Utsch L**, **Logiantara A**, **van Ree R**, **van Rijt LS**. IL-33 promotes the induction of immunoglobulin production after inhalation of house dust mite extract in mice. *Allergy.* May;70(5):522-32, 2015.

76- Aimbire F, **Lopes-Martins RA**, **Albertini R**, **Pacheco MT**, **Castro-Faria-Neto HC**, **Martins PS**, et al. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr; 25(2): 112-7

77- Jung JH, Kang IG, Kim DY, Kim DY, Hwang YJ, Kim ST. The effect of Korean red ginseng on allergic inflammation in a murine model of allergic rhinitis. *J Ginseng Res.* 2013 Apr;37(2):167-75.

78- Elseify MY , Mohammed NH , Alsharkawy AA , Elseoudy ME. Laser acupuncture in treatment of childhood bronchial asthma. *J Complement Integr Med.* Jul 9;10, 2013.

79- Dabbous OA , **Soliman MM** , **Mohamed NH** , **Elseify MY** , Elsheikh MS , Alsharkawy AA , Abd Al Aziz MM . Evaluation of the improvement effect of laser acupuncture biostimulation in asthmatic children by exhaled inflammatory biomarker level of nitric oxide. *Lasers Med Sci.* Jan;32(1):53-59, 2017.

80- Hoshino A, **Tsuji T**, **Matsuzaki J**, **Jinushi T**, **Ashino S**, **Teramura T**, **Chamoto K**, Tanaka Y, Asakura Y, Sakurai T, Mita Y, Takaoka A, Nakaike S, Takeshima T, Ikeda H, Nishimura T. STAT6-mediated signaling in Th2-dependent allergic asthma: critical role for the development of eosinophilia, airway hyper-responsiveness and mucus hypersecretion, distinct from its role in Th2 differentiation. *Int Immunol.* 2004 Oct;16(10):1497-505.

81- Aristoteles LR¹, Righetti RF, Pinheiro NM, Franco RB, Starling CM, da Silva JC, Pigati PA, Caperuto LC, Prado CM, Dolhnikoff M, Martins MA, Leick EA, Tibério IF. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. *BMC Pulm Med.* 2013 Aug 15;13:52.

8. ANEXOS

8.1. Aprovação CEUA



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN006 2013

Título do Projeto: ***Efeito da terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) em modelos experimentais de doenças pulmonares crônicas***

Orientador: Ana Paula Ligeiro de Oliveira

Aluno: não consta

Objetivos: Avaliar o efeito da terapia com LBP sobre mecanismos moleculares e celulares da inflamação pulmonar em modelo de asma e DPOC.

Método: No presente projeto visamos estudar alguns parâmetros em animais com asma e DPOC submetidos à terapia com LBP. O protocolo utilizado para a indução da asma será administrar OVA subcutânea (dias 0 e 14) e OVA intranasal (3 vezes/semana, por 5 semanas) ou *House Dust Mite* intranasal (dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42). Nos dias 43 (OVA) e 50 (HDM), os animais serão sacrificados para análise funcional e morfológica do pulmão. O protocolo utilizado para a indução da DPOC será submeter camundongos C57BL/6 por 60 dias (2 vezes/dia) à inalação de fumaça de cigarro. No dia 61, os animais serão sacrificados para análise funcional e morfológica do pulmão. Em ambos os modelos, serão estudados parâmetros funcionais e estruturais, como a liberação de citocinas e quimiocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10) e acúmulo de muco e colágeno. Ainda, será avaliado a participação dos fatores de transcrição STAT6, GATA3 e STAT4 e NF- κ B (intacto e fosforilado), das MMP-9 e MMP-12, TIMP-1 e TIMP-2, bem como, a avaliação da mecânica pulmonar e hiperresponsividade das vias aéreas, em ambos modelos experimentais.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Camundongo	isogênico	Balb/C	8 sem	20g	560	Macho	
Camundongo	isogênico	C57BL/6	8 sem	20 g	356	Macho	
					TOTAL:		916

O uso de Balb/c para a indução do modelo de asma com OVA e HDM vêm sendo amplamente utilizado. Já para o modelo experimental de DPOC, utilizaremos camundongos C57BL/6, pois trabalhos na literatura mostram que esse animal responde muito melhor para fumaça de cigarro.

Divisão ods animais nos grupos experimentais

Asma Experimental

Basal (não manipulados; n=5), 2. OVA (sensibilizados e desafiados com OVA - 4 μ g e 10 μ g; n=5), 3. OVA + Laser antes (sensibilizados e submetidos à laserterapia e posteriormente desafiados com OVA; n=5), 4. OVA + Laser depois (sensibilizados e desafiados com OVA e submetidos à laserterapia; n=5). O grupo basal e OVA não se repetirão em todos os experimentos (10 animais), os grupos OVA+laser antes e OVA+laser depois, n= 10 x 6 tempos experimentais = 60 + 10 (Basal e OVA) = 70 x 4 tipos de experimento (LBA, histologia, citometria de fluxo e mecânica pulmonar) = 280 animais

.1. Aprovação CEU

Eutanásia: anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) via ip seguida da exsanguinação pela aorta abdominal

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

Data de Início: 20/08/2014

Data de Término: 20/08/2018

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

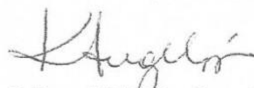
Não-Aprovado

Comentário:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

- Solicitamos o envio anual de informação ao CEUA com relação ao número de animais utilizados.

São Paulo, 24 de junho de 2014



Prof. Dra. Kátia De Angelis

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
UNINOVE

Retirado 06/08/14

