

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

SILVIA GOES COSTA

Avaliação dos efeitos do tratamento com LED  
em modelo experimental de síndrome do  
desconforto respiratório agudo

São Paulo, SP  
2016

Silvia Goes Costa

Avaliação dos efeitos do tratamento com LED  
em modelo experimental de síndrome do  
desconforto respiratório agudo

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho, para obtenção de título de  
Mestre em Biofotônica Aplicada às  
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Adriana Lino dos Santos Franco

São Paulo, SP  
2016

Costa, Silvia Goes.

Avaliação dos efeitos do tratamento com LED em modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório agudo. / Silvia Goes Costa 2016. 43 f.

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

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

1. Síndrome do desconforto respiratório agudo. 2. Diodo emissor de luz.  
4. Inflamação pulmonar. 5. Fotobiomodulação. 6. Lipopolissacarídeo.

I. Franco, Adriana Lino dos Santos.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 05 de dezembro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

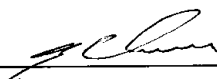
Aluna: SILVIA GOES COSTA

Título da Dissertação: "Avaliação dos efeitos do tratamento com LED em modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório agudo"

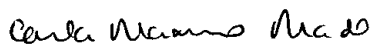
Presidente: PROFª. DRª. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROFª. DRª. CARLA MAXIMO PRADO



## **AGRADECIMENTOS**

*Durante esses dois anos só tenho a agradecer as pessoas que passaram pelo meu caminho e que dedicaram alguns minutos de seu precioso tempo para contribuir com o meu conhecimento.*

*Meus sinceros votos de agradecimento,*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Lino dos Santos Franco, minha orientadora, por dedicar seu tempo, pela paciência, compreensão e apoio durante esse longo percurso de aprendizado e crescimento profissional. Agradeço, sinceramente, por tornar tudo isso possível;*

*À Universidade Nove de Julho, pela oportunidade, pelas novas experiências e pelos excelentes professores que tive ao longo do curso;*

*Ao Eric Diego Barione – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP por me ensinar e ajudar na realização das análises da minha pesquisa;*

*À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Poliselli Farsky – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, por disponibilizar o seu departamento para a realização dos meus experimentos;*

*À Juliana Albuquerque, minha aluna de Iniciação Científica (UNINOVE), por ter me ajudado com todos os meus experimentos;*

*Aos Bioteristas e Técnicos de Laboratório, UNINOVE;*

*À CAPES pela Bolsa PROSUP (taxa);*

*Ao Auxílio FAPESP que contribuiu financeiramente para as minhas análises.*

## RESUMO

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma patologia pulmonar grave, de causa multifatorial, caracterizada por lesão alveolar difusa, infiltrado de células inflamatórias, ruptura na barreira do epitélio alveolar, edema alveolar e comprometimento da troca gasosa pulmonar, com alto índice de mortalidade e sem cura até os dias atuais, sendo a sepse sua causa mais comum. Os mecanismos subjacentes à inflamação pulmonar aguda decorrente da inflamação sistêmica são investigados experimentalmente pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) por via sistêmica. Esse modelo desenvolve lesão inflamatória com infiltração neutrofílica pulmonar e é potencializada por diversas citocinas, entre as quais se destacam IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Fotobiomodulação vem apresentando bons resultados para diversas doenças com caráter inflamatório, porém, ainda não existem muitos estudos relacionando o uso do LED no tratamento de doenças pulmonares. Considerando que a SDRA é uma importante patologia, estudamos o efeito do LED sobre o seu desencadeamento. Para tanto, grupos de camundongos foram submetidos a SDRA através da injeção de LPS (ip) e tratados ou não com LED na região da traquéia e pulmão 2 e 6 h após a indução de SDRA com LPS. Paralelamente, grupos de camundongos não manipulados e grupo de camundongos apenas tratados com LED foram utilizados para a obtenção dos valores basais. Após 24 h da indução de SDRA foram analisados o número de células em diferentes compartimentos (lavado broncoalveolar (LBA), sangue e medula óssea), expressão e quantificação e de citocinas, avaliação da enzima mieloperoxidase (MPO), burst oxidativo, fagocitose e histologia. Nossos resultados apontam para os efeitos benéficos do tratamento com LED sobre modelo de SDRA induzida por LPS, uma vez que reduziu significativamente o número de neutrófilos recrutados para o pulmão, a atividade de MPO e burst oxidativo, também reduziu a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , concomitantemente ao aumento de IFN- $\gamma$  e a expressão de IL-10. Assim, este estudo pode fornecer subsídios importantes de um possível tratamento para a SDRA.

**PALAVRAS-CHAVE:** Síndrome do desconforto respiratório agudo, Diodo Emissor de Luz, Inflamação pulmonar, Fotobiomodulação, Lipopolissacarídeo.

## ABSTRACT

The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a severe lung disease, multifactorial, characterized by diffuse alveolar damage, infiltration of inflammatory cells, disruption of barrier of the alveolar epithelium, alveolar edema and impaired pulmonary gas exchange with high index of mortality and absence of efficient treatment and also, sepsis is the most common cause. The mechanisms involved in acute lung disease induced by systemic inflammation are investigated experimentally by administration of LPS systemically. This model develops inflammatory lesion with pulmonary neutrophilic infiltration and increased release of cytokines, including IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . The photobiomodulation has shown good results for various diseases with inflammatory character; however, there are few studies related with lung diseases. Considering that ARDS is an important pathology, we studied the effects of LED treatment on the development of ARDS. For this purpose, groups of mice were treated with LPS for ARDS induction and treated or not with LED (trachea and lungs) 2 and 6 h after the LPS injection. In parallel, non-manipulated group as well as treated only with LED were used as control. After 24h of LPS administration, we investigated the number of cells recruited in bronchoalveolar lavage (BAL), blood and bone marrow, quantification of cytokines in the BAL supernatant as well as evaluation of myeloperoxidase enzyme (MPO), oxidative burst, phagocytosis and histology. Our results indicated the beneficial effects of LED treatment on the ARDS model induced by LPS, since the treatment with LED significantly reduced the number of neutrophils recruited to the lung, MPO activity, oxidative burst, and also reduces the release of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  concomitantly with the increased levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 gene expression. Therefore, this study may provide important information to treatment of ARDS.

**KEYWORDS:** Acute respiratory distress syndrome, Light Emitting Diode, Lung inflammation, Photobiomodulation, Lipopolysaccharide.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.....	1
1.2 DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	3
1.3 FOTOBIMODULAÇÃO .....	6
1.4 TRATAMENTO COM LED .....	7
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1 ANIMAIS .....	10
3.2 INDUÇÃO DA SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (SDRA) PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	10
3.3 TERAPIA COM LED.....	10
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	11
3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LBA.....	11
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES E CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	11
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ANTIINFLAMATÓRIOS NO FLUIDO DO LBA .....	12
3.8 PCR EM TEMPO REAL PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL- 1B, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ E TLR4 EM TECIDO PULMONAR.....	12
3.9 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) PULMONAR.....	13
3.10 AVALIAÇÃO DE FAGOCITOSE E BURST OXIDATIVO.....	13



## SUMÁRIO

3.11 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO DO NF- $\kappa$ B.....	13
3.12 HISTOLOGIA .....	14
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	14
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
4.1 TRATAMENTO COM LED REDUZ RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O PULMÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS.....	15
4.2 TRATAMENTO COM LED REDUZ NEUTRÓFILO NO SANGUE PERIFÉRICO, MAS NÃO INTERFERE NO NÚMERO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS	17
4.3 TRATAMENTO COM LED INTERFERE NA LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E ANTI-INFLAMATÓRIO NO FLUIDO DO LBA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS	19
4.4 TRATAMENTO COM LED INTERFERE NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NO TECIDO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS.....	21
4.5 TRATAMENTO COM LED REDUZ O BURST OXIDATIVO NAS CÉLULAS RECUPERADAS NO LBA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS .....	23
4.6 TRATAMENTO COM LED NÃO INTERFERE NA FAGOCITOSE NAS CÉLULAS RECUPERADAS NO LBA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS.....	24
4.7 TRATAMENTO COM LED NÃO INTERFERE NA TRANSLOCAÇÃO DO NF- $\kappa$ B NO TECIDO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS .....	25
4.8 TRATAMENTO COM LED REDUZ INFILTRADO LEUCOCITÁRIO, MAS NÃO INTERFERE NO ACÚMULO DE MUCO E NA ATIVIDADE DE MASTÓCITOS NO TECIDO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS.....	26

<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>SUMÁRIO</b>	<b>28</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>		<b>34</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>35</b>
<b>10 ANEXOS .....</b>		<b>40</b>
10.2 TERMOS DE APROVAÇÃO DA APROVAÇÃO PELO COEP E/OU CEUA...		
.....		<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BASES	Brazilian Sepsis Epidemiological Study
CD14	(Cluster of differentiation 14) Cluster de diferenciação 14
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
ECMO	Oxigenação por membrana extracorpórea
FiO2	Fração de oxigênio inspirado
ICAM-1	(Intercellular adhesion molecule-1) Molécula de adesão intercelular-1
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17A	Interleucina 17A
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	(Inducible nitric oxide synthase) xido nítrico-sintase induzida
IP	Intraperitoneal
J	Joules
Kg	Quilograma
LASER	(Light amplification by stimulated emission of radiation) Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LBA	Lavado broncoalveolar
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LBP	(Lipopolysaccharide binding protein) Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LED	(Light emitting diode) Diodo emissor de luz
LPS	Lipopolissacarídeo
mA	Miliampre
MD-2	Myeloid differentiation protein-2
Mg	Miligrama
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico de sangue
MMPs	Meteloprotenases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
Mw	Milivolts

NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Nuclear factor kappa B
Nm	Nanômetros
PaCO <sub>2</sub>	Pressão parcial de gás carbônico
PAF	(Platelet-activating fator) Fator de ativação de plaquetas
PAMPs	(Pathogen-associated molecular pattern) Padrões moleculares associados a patógenos
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	(Phosphate buffered saline) Tampão fosfato-salino
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reação em cadeia da polimerase
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRS	(Systemic Inflammatory Response Syndrome) Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TLR4	Toll-like receptor 4
TLRs	Toll-like receptors
TNF-α	(Tumor necrosis factor alpha) Fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCAM-1	(Vascular cell adhesion molecule-1) Molécula de adesão de células vasculares

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenvolvimento da resposta imunológica.....	6
<b>Figura 2.</b> Papel do LED sobre o recrutamento celular pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.....	16
<b>Figura 3.</b> Papel do LED sobre o processo de mobilização celular em diferentes compartimentos: sangue periférico (A) e medula óssea (B) em modelo experimental de SDRA induzido por LPS .....	18
<b>Figura 4.</b> Papel do LED sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$ , e citocinas anti-inflamatórias: IL-10 e IFN- $\gamma$ em fluido do LBA em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.....	20
<b>Figura 5.</b> Papel do LED na expressão de IL-1 $\beta$ e IL-17A, IL-10 e IFN- $\gamma$ e TLR4 no tecido pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.....	22
<b>Figura 6.</b> Papel do LED sobre o burst oxidativo nas células recuperadas no LBA em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.....	23
<b>Figura 7.</b> Papel do LED sobre a fagocitose nas células recuperadas no LBA em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.....	24
<b>Figura 8.</b> Papel do LED sobre a translocação do NF-kB no tecido pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.....	25
<b>Figura 9.</b> Papel do LED sobre o tecido pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS .....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fatores de risco comuns para a síndrome do desconforto respiratório agudo/ lesão pulmonar aguda .....	2
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros do tratamento com LED .....	11

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) foi descrita pela primeira vez por ASHBAUGH e colaboradores em 1967 é uma patologia grave, de causa multifatorial, caracterizada por infiltrado bilateral pulmonar na ausência de hipertensão atrial esquerda e  $PaO_2/FiO_2$  abaixo de 200 mmHg (BERNARD et al., 1994). No tecido pulmonar de pacientes com SDRA pode ser observado lesão alveolar difusa, infiltrado de células inflamatórias, ruptura na barreira do epitélio alveolar, exsudação de plasma para os espaços alveolares, edema alveolar e comprometimento da troca gasosa pulmonar (SCHUSTER, 1995; BURNHAM et al., 2014). A SDRA é uma síndrome grave, associada a índices de mortalidade superiores a 40% (LEWANDOWSKI e LEWANDOWSKI, 2006) e apresenta duas fases, uma exsudativa e uma fibroproliferativa.

Na fase exsudativa ocorre a ativação do sistema de coagulação, produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas induzindo influxo de neutrófilos, monócitos / macrófagos e linfócitos para a lesão pulmonar. A liberação desregulada de mediadores citotóxicos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enzimas proteolíticas tal com a elastase e metaloproteinases de matriz (MMPs), resultam em lesão no endotélio pulmonar e nas células epiteliais, e se esses danos forem persistentes, prejudicam o funcionamento do pulmão (BURNHAM et al., 2014; STANDIFORD e WARD, 2015).

A fase fibroproliferativa ocorre aproximadamente 3 dias após a lesão e temporalmente se sobrepõe aos eventos inflamatórios que caracterizam a fase exsudativa. Os espaços alveolares se tornam ingurgitados com a proliferação das células mesenquimais (fibroblastos, miofibroblastos e células pluripotentes geradas localmente), células do epitélio alveolar do tipo II se proliferam para substituir células do tipo I necróticas e apoptóticas, e novos vasos sanguíneos são formados dentro da matriz provisória. Uma resposta fibroproliferativa exuberante em pacientes com SDRA está associada com o prolongamento da ventilação mecânica e aumento da mortalidade (SHARP et al., 2015; STANDIFORD e WARD, 2015).

Pacientes internados em hospitais, principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão, de forma geral, sob potencial redução da competência imune. Nesse contexto, estímulos secundários como infecções bacterianas presentes no ambiente hospitalar constituem importante fator de risco para o desencadeamento da

SDRA (MOSS e MANINO, 2002). A sepse, que frequentemente é ocasionada por bactérias Gram-negativas (cerca de 35% dos casos) é uma das causas mais comuns de desenvolvimento da SDRA em ambientes hospitalares e representa um subgrupo da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer em associação com uma grande variedade de eventos não infecciosos, como politraumatismos, cirurgias e queimaduras (ABRAHAM et al., 2000). MODRYKAMIEN e GUPTA (2015), e STANDIFORD e WARD (2015) citam os fatores de risco diretos e indiretos mais comuns que se encontram associados com a SDRA:

<b>Tabela 1. Fatores de risco comuns para a síndrome do desconforto respiratório agudo/ lesão pulmonar aguda</b>	
<b>Direto</b>	<b>Indireto</b>
• Pneumonia	• Sepse não pulmonares
• Aspiração do conteúdo gástrico	• Traumas grandes
• Lesão por inalação	• Pancreatite
• Contusão pulmonar	• Queimaduras graves
• Vasculite pulmonar	• Choque não cardiogênico
• Afogamento	• Overdose de drogas
• Embolia gordurosa	• Transfusões múltiplas (> 15 unidades de sangue em 24 h) ou transfusão relacionada a lesão pulmonar aguda.
• Edema pulmonar de reperfusão após transplante de pulmão ou embolectomia pulmonar	• Edema pulmonar neurogênico;
	• Embolia por líquido amniótico;
	• Pós transplante de medula óssea.

MODRYKAMIEN e GUPTA (2015).

A sepse é uma condição clínica, definida pela Sociedade de Terapia Intensiva Americana, como uma resposta sistêmica à infecção manifestada por dois ou mais sintomas, tais como: a) alteração da temperatura corporal (acima de 38 °C ou abaixo de 36 °C); b) aumento da frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto; c) aumento da frequência respiratória acima de 20 respirações por minuto ou PaCO<sub>2</sub> menor que 32 mmHg e d) número de leucócitos no sangue acima de 12000/mm<sup>3</sup> (leucocitose) ou menor que 4000/mm<sup>3</sup> (leucopenia) (ABRAHAM et al., 2000). De modo geral, a sepse induz a SDRA em aproximadamente 40% dos pacientes e essa associação aumenta consideravelmente os índices de mortalidade quando comparada



com outras etiologias da SDRA (HUDSON et al., 1995; STANDIFORD e WARD, 2015).

No Brasil, dados do estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study) revelaram que a sepse está entre as principais doenças geradoras de altos custos no setor público e privado. Os gastos financeiros com pacientes mantidos em UTI no ano de 2003 somaram R\$ 17,34 bilhões, o que representa aproximadamente entre 30 a 35% dos gastos com a área da saúde (SILVA E et al., 2004). Atualmente, o tratamento da sepse reside principalmente no controle da infecção por antibioticoterapia e correção dos distúrbios hemodinâmicos. Embora avanços no desenvolvimento de novos antibióticos venham acontecendo, a sepse ainda é uma das causas mais comuns de morte em UTIs (DELLINGER et al., 2008).

É importante ressaltar que pacientes internados com sepse, no Brasil, apresentam maior gravidade e mais tempo de internação em relação a outros lugares do mundo (SALES-JÚNIOR et al., 2006). Esses resultados podem justificar dados de estudos recentes que revelaram que entre médicos, somente 27% sabem reconhecer a sepse. É possível que a dificuldade de diagnóstico justifique, ao menos em parte, o alto índice de mortes ocasionadas pela evolução da doença. Nesse sentido, o Brasil lidera o ranking de morte por sepse grave (COLLUCCI, 2009; SALES-JÚNIOR et al., 2006). Portanto, a sepse representa um atual e significativo problema de saúde pública. Como a doença inflamatória está intimamente associada à sepse, estudos que visem a compreender os mecanismos moduladores da disfunção pulmonar nesses pacientes, revestem-se de importância adicional.

## **1.2 DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

A resposta imune se desenvolve por meio de uma sucessão de mecanismos que visam à proteção do organismo contra patógenos que incluem bactérias, vírus, fungos e protozoários. O sistema imune detecta e elimina os microorganismos patogênicos pela discriminação entre as substâncias próprias (*self*) e estranhas (*non-self*) do organismo (TAKEDA et al., 2003). Esses mecanismos de defesa são atribuídos ao organismo pelo sistema imune inato e adaptativo.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra os patógenos, os quais necessitam de reconhecimento pelo organismo. Para tanto, existem receptores que incluem as famílias dos TLRs (*Toll-like receptors*) cuja principal função é o reconhecimento de patógenos ou seus produtos em diferentes compartimentos

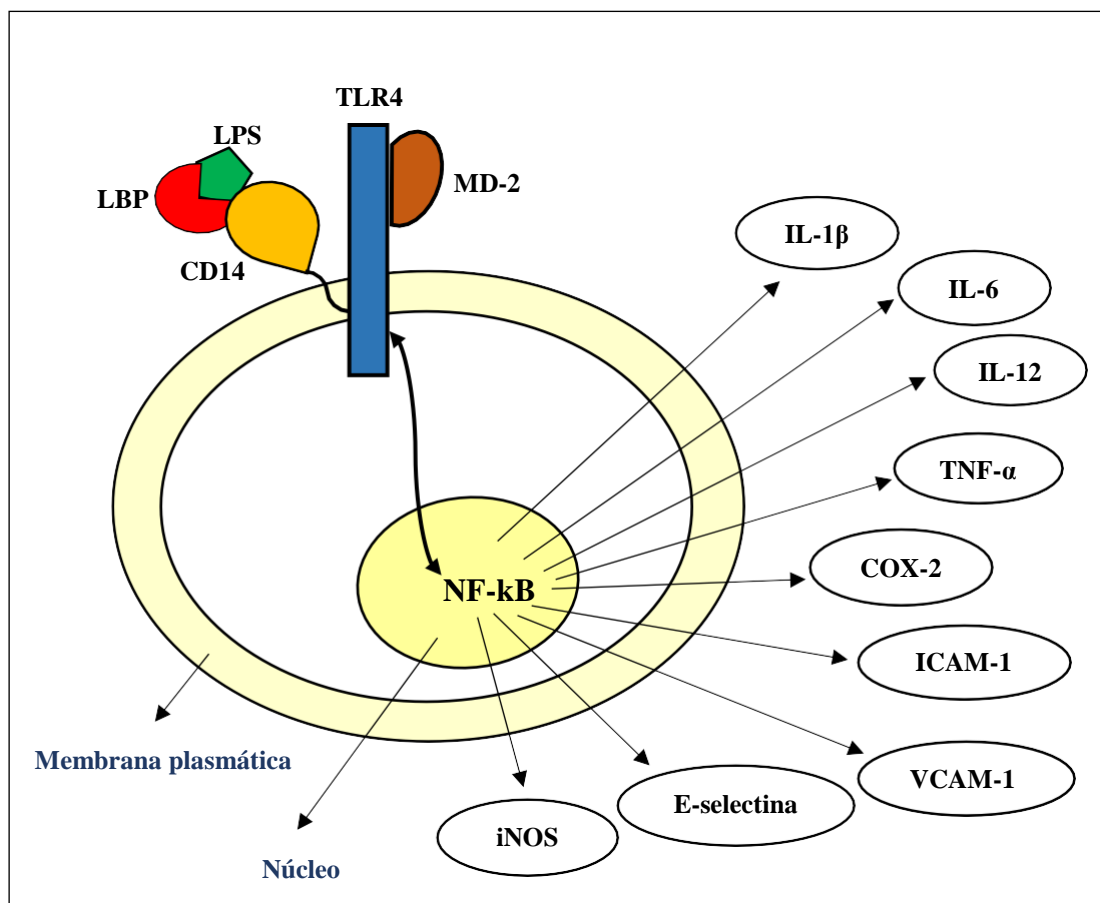
celulares, tais como membrana plasmática, endossomo ou citoplasma. A partir desse reconhecimento então ocorre a indução da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras a fim de eliminar esses agentes (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002).

O lipopolissacarídeo (LPS - *lipopolysaccharide*), descrito por Richard Pheiffer em 1982 e então denominado também como endotoxina (BEUTLER e RIETSCHER, 2003) pode ser classificado como um dos principais PAMPs (moléculas presentes em bactérias e vírus capazes de induzir resposta inflamatória) e é parte constituinte da parede de bactérias Gram-negativas (CAROFF e KARIBIAN, 2003). É um composto glicolípídico formado por um polissacarídeo hidrofílico (Antígeno-O) bastante variável e um domínio hidrofóbico altamente conservado, conhecido como lipídio A, que parece ser o responsável por sua atividade biológica. Para que o LPS desencadeie seus efeitos no organismo é necessário que haja sua ligação em sítios receptivos sobre a membrana das células. Nesse contexto, o *Toll-like receptor 4* (TLR4) foi descrito por POLTORAK et al. (1998) como o receptor para o LPS.

No entanto, para que o LPS acione a cascata de sinalização via TLR4 é necessária a participação de outras moléculas no processo. Estudos mostram que o LPS se liga a uma proteína sérica denominada LBP (*lipopolysaccharide binding protein*) e este complexo se acopla aos receptores CD14, os quais são proteínas localizadas na membrana de células do sistema imune e fundamental no reconhecimento do LPS (LEVAN, 2001). É interessante notar que o CD14 não possui domínio intracelular e, portanto, não pode induzir ativação celular sem que um receptor de sinal transmembranar seja acionado. Nesse contexto, estudos demonstram que o TLR4 desempenha esta função. O TLR4, juntamente com a proteína MD-2 (*myeloid differentiation protein-2*) aumenta a resposta celular ao LPS (SHIMAZU et al., 1999). A partir da ativação do TLR4 (pelo complexo LPS + LBP + CD14 + TLR4 + MD2) inicia-se uma cascata de sinalização que vai desencadear a ativação de um indutor da inflamação denominado fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*).

O NF- $\kappa$ B exerce importante papel em doenças inflamatórias como a asma, a artrite reumatóide, a sepse e a síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA). Este fator de transcrição, quando ativado, parece ser responsável pela expressão de diversos genes pró-inflamatórios (DENG et al., 2000). Dentre os genes regulados pelo NF- $\kappa$ B, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ), IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), a enzima COX-2 (*cyclooxygenase-2*), as moléculas de adesão,

tais como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e E-selectina, além de enzimas envolvidas na atividade microbicida, como a iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) (KAWAI et al., 1999).



**Figura 1.** Desenvolvimento da resposta imunológica.

Os mecanismos subjacentes à inflamação pulmonar aguda decorrente da inflamação sistêmica podem ser investigados experimentalmente pela administração de LPS por via sistêmica a animais de laboratório (BRIGHAM e MEYRICK, 1986). Esse modelo desenvolve lesão inflamatória principalmente por infiltração neutrofílica pulmonar e é potencializada por diversas citocinas, entre os quais destacam-se IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  e mediadores lipídicos, tais como eicosanóides e PAF (*platelet-activating factor*). Ocorre também aumento da pressão arterial pulmonar, hipoxemia e edema alveolar e intersticial (MATUTE-BELLO et al., 2008). Estes efeitos observados nos modelos experimentais são similares aos sinais apresentados por pacientes quando acometidos da síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA).

Com respeito ao LPS, está bem estabelecido que sua inalação ou sua administração sistêmica induz inflamação pulmonar. O LPS causa febre, tosse, sensação de aperto no peito, dispnéia, sibilos e diminuição da capacidade de perfusão pulmonar (RYLANDER et al., 1989). Além disso, o LPS leva ao desencadeamento de hiperreatividade brônquica e neutrofílica no espaço alveolar.

O LPS administrado sistemicamente em dose séptica induz inflamação pulmonar aguda e é um modelo de síndrome do desconforto respiratório agudo. Diversos estudos têm possibilitado uma melhor compreensão a respeito das diversas facetas da síndrome do desconforto respiratório agudo. Um grande número de intervenções são descritas na literatura atual com a intenção de bloquear a inflamação pulmonar utilizando antioxidantes, antiproteases, aspirina, heparina, inalação de beta agonistas e corticosteroides (ou a associação dos dois), estatinas, esteroides sistêmicos, solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) e inibidores de transdução de sinal (HOOPER e BERNARD, 2011; PETRONI et al. 2015; RUTHMAN e FESTIC, 2015; STANDIFORD e WARD, 2015). Entretanto, até os dias atuais as únicas intervenções com efeitos comprovados é a utilização de ventilação mecânica com baixo volume a fim de evitar o estiramento alveolar, a posição prona (bruços) para aumentar a área ventilada com baixo volume de oxigênio e a oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO), porém esses tratamentos demandam um alto custo, um tempo prolongado de internação em UTIs e não são tão efetivos no combate à doença (SHARP et al., 2015; STANDIFORD e WARD, 2015).

À medida que o conhecimento se acumula, há também um aumento de possíveis alvos terapêuticos. Além da busca por novos alvos, há também pesquisas buscando novos tratamentos que possam ser mais eficientes, com menor custo e menor efeito colateral. Sendo assim, terapias que melhorem o desconforto respiratório de pacientes com doenças respiratórias e também reduzam os custos despendidos são de grande importância.

### **1.3 FOTOBIMODULAÇÃO**

A fotobiomodulação emerge como um tratamento auxiliar, que vem apresentando bons resultados para diversas doenças com caráter inflamatório, incluindo doenças pulmonares. Dentre os tratamentos utilizados nas patologias que acometem o pulmão, o laser de baixa intensidade (LBI) tem se destacado devido suas ações antiinflamatórias e antioxidantes, ao baixo custo e a ausência de efeitos colaterais

(LANDYSHEV et al., 2002; AIMBIRE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014; SILVA V et al., 2014). Outro tratamento promissor que tem sido pouco estudado é o tratamento com luz LED.

#### **1.4 TRATAMENTO COM LED**

LED (light emitting diode) são diodos semicondutores que estão sendo utilizados na prática fisioterapêutica para acelerar os processos cicatriciais em estudos experimentais. A emissão de luz é monocromática, não coerente e não colimada, o que a difere da luz LASER (ANDRADE et al., 2001). Entretanto, o tratamento com o LED tem se mostrado tão eficiente quanto o tratamento com o laser, já que a coerência da luz do LASER não é responsável pelos efeitos da terapia, haja vista que esta propriedade se perde nas primeiras camadas de tecido biológico (DALL et al., 2009).

A luz LED possibilitou uma alternativa eficaz ao laser, uma vez que pode ser produzida através de múltiplos arranjos em forma de cluster, abrangendo desta forma, áreas maiores, com a mesma potência, mas com um menor custo.

O tratamento com LED gera efeitos semelhantes ao LBI. Estudos comprovam que o tratamento com luz de baixa intensidade (LED ou LBI) quando aplicados em doses baixas produzem uma melhor resposta quando comparado com a mesma luz em doses elevadas, e, esses tratamentos apresentam vários resultados benéficos como: inibição da apoptose de células de interesse, melhora na proliferação celular (fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, linfócitos, entre outros), aumentam a liberação de fatores de crescimento, modulação da atividade de metaloproteinases de matriz e também a ativação de células satélites do músculo esquelético, melhorando a sua proliferação, inibindo sua diferenciação e regulando a síntese de proteínas (DALL et al., 2009; HUANG et al., 2009; FARIA, 2006; ANDRADE et al., 2001).

A foto estimulação da luz LED atua sobre as células interferindo na sua permeabilidade, atua nas mitocôndrias, na síntese de ATP e em proteínas como colágeno e elastina. Age ainda como antimicrobiano e anti-inflamatório. A interação da luz no tecido depende da sua absorção pelas estruturas específicas nas células que são conhecidas como cromóforos. Após a absorção da luz pelos cromóforos ocorre uma alteração química chamada de biomodulação. O efeito da biomodulação dependerá do comprimento de onda e conseqüentemente da quantidade de energia que chega ao tecido, podendo exercer efeito estimulante ou inibitório (FERRARESI et al., 2016; HUANG et al., 2009).

Apesar de o tratamento com LED ainda ser pouco estudado, alguns trabalhos já mostram algumas vantagens em relação aos tratamentos com laser. No entanto, em doenças pulmonares não existem ainda estudos usando LED como forma de tratamento. Considerando que a SDRA é uma importante patologia pulmonar com alta mortalidade, pretendeu-se estudar o efeito do tratamento com LED sobre seu desencadeamento. Nesse contexto, o estudo proposto pode fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos que medeiam a SDRA, bem como permitir uma nova alternativa terapêutica para esta importante doença. Contribuímos ainda, para a compreensão dos mecanismos operantes do tratamento com LED.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Tendo em vista que a SDR é uma importante patologia com alta mortalidade e que o LED é uma ferramenta de tratamento promissora, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com LED sobre o desencadeamento da inflamação pulmonar aguda.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para a avaliação do desenvolvimento da inflamação pulmonar e a sua intensidade realizamos a contagem do número de células recuperadas no lavado broncoalveolar (LBA), atividade da enzima mieloperoxidase, liberação e expressão gênica de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$ ) e antiinflamatórios (IL-10, e IFN- $\gamma$ ) no fluido do LBA e análises histológicas. Ainda, investigamos o efeito do LED sobre o estado funcional de fagócitos, sobretudo neutrófilos tais como: fagocitose e burst oxidativo.

As alterações sistêmicas foram avaliadas através da contagem do número de células presentes no sangue periférico e na medula óssea. Por fim, considerando que a inflamação aguda pulmonar desencadeada por LPS depende de sua interação com TLRs bem como ativação de fatores de transcrição como NF-kB, nós também avaliamos a expressão gênica de TLR4 e a translocação do NF-kB do citoplasma para o núcleo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Balb/c machos adultos (~ 20g) provenientes do biotério de criação da Universidade Nove de Julho, após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA – AN0006.2015). Os animais foram mantidos no biotério de experimentação da mesma Universidade sob condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C).

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

Camundongos Balb/c machos adultos (~ 20g) receberam por via intraperitoneal 5mg/kg de LPS (*Salmonella abortus equi*). A dose escolhida baseou-se em trabalho anterior (SILVA IBRAHIM et al., 2015) levando em consideração que a dose utilizada é uma dose sub-séptica (CLARK et al., 2015). Após 24 h da administração de LPS as análises foram realizadas. Os animais foram eutanasiados com anestesia (quetamina+xilazina 100 e 10 mg/Kg; IP) seguida de exsanguinamento da aorta abdominal.

#### 3.3 TERAPIA COM LED

Os camundongos foram irradiados 2 e 6 horas após a indução com LPS na região da traqueia e tórax e os parâmetros utilizados foram os seguintes:

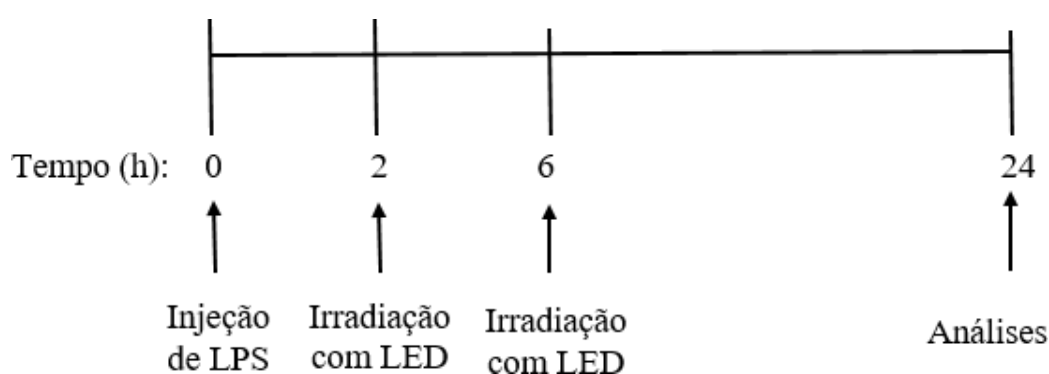
<b>Tabela 2. Parâmetros do tratamento com LED</b>	
<b>Comprimento de onda (□)</b>	660 nanômetros (nm)
<b>Potência</b>	100 miliwatts (mW)
<b>Energia</b>	15 joules (J)
<b>Densidade de energia</b>	5 joules/cm <sup>2</sup>
<b>Corrente elétrica</b>	148,3 miliamperes (mA)
<b>Área de feixe</b>	2,8cm <sup>2</sup>
<b>Distância</b>	Contato direto com a pele
<b>Tempo de exposição</b>	150 segundos (s)



### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados em nosso estudo 4 grupos experimentais com 5 animais cada grupo (n=5):

- ✓ **Grupo Basal:** consistiu de camundongos não manipulados;
- ✓ **Grupo LPS:** consistiu de camundongos submetidos a injeção com LPS;
- ✓ **Grupo LPS + LED:** Consistiu de camundongos submetidos a injeção com LPS e tratados com LED;
- ✓ **Grupo LED:** Apenas tratados com LED.



### 3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS PRESENTES NO LBA

Decorridas 24 h da administração com LPS os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina (100 e 10mg/kg, ip) e as células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no espaço broncoalveolar foram obtidas pela técnica de lavado broncoalveolar (LBA) de acordo com DE LIMA et al. (1992).

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES E CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

A quantificação das células do sangue foi feita em analisador hematológico automático Mindray BC 2800 VET. Já a quantificação de células da medula óssea foi realizada através da lavagem do canal medular com 2 mL de PBS seguido de centrifugação, ressuspensão e contagem em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

### **3.7 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ANTIINFLAMATÓRIOS NO FLUIDO DO LBA**

Os mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$ ) e antiinflamatórios (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) foram quantificados por ELISA em amostras de fluido do LBA. Para tanto, foram utilizados Kits Duo Set disponíveis comercialmente R & D System<sup>®</sup>. Os ensaios foram conduzidos de acordo com as normas do fabricante. Os fluidos do LBA foram coletados e armazenados a -80°C até a análise.

### **3.8 PCR EM TEMPO REAL PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ E TLR4 EM TECIDO PULMONAR**

Para realização da PCR em tempo real foram utilizados fragmentos de pulmão obtidos dos animais após os protocolos mostrados acima. Tais fragmentos foram colocados em tubos eppendorfs DNase RNase *free* e mantidos em Trizol até a extração do RNA. Nas amostras foram adicionadas 200  $\mu$ l de clorofórmio e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Esta solução foi centrifugada (12.000g, 15 min. a 4°C) e o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,5 ml de isopropanol. Em seguida, esta solução foi incubada por 1 hora e então centrifugada novamente (12.000g, 15 min. a 4°C). O sobrenadante foi removido cuidadosamente e novamente centrifugado (7500g, 5 min a 4°C) após a adição de 1 ml de etanol 75%. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuscitado em 25  $\mu$ l de água livre de RNase e DNase. A síntese de cDNA foi feita através de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado. Para cada amostra, foram feitas soluções contendo 100  $\mu$ g/ml de RNA total, e a cada 10  $\mu$ l dessa solução foi adicionada 1  $\mu$ l de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (50  $\mu$ M) e 1  $\mu$ l de água livre de RNase, e incubadas em seguida por 10 minutos à 70°C. Foram então adicionados a cada tubo 4  $\mu$ l de tampão específico para a reação (5X), 1 $\mu$ l de dNTP (10  $\mu$ M) e 2  $\mu$ l de DTT (0,1 M) seguindo-se de incubação a 42°C. Foi adicionado 1  $\mu$ l da enzima SuperScript III (200 U/ $\mu$ l) por tubo, seguindo nova incubação a 42°C por 50 minutos. A reação foi bloqueada por uma incubação por 15 minutos a 70°C. Para a realização do PCR em tempo real foi utilizado o kit Taqman Fast Universal Master Mix, também da Applied Biosystems<sup>®</sup>. Para tanto, 1 $\mu$ L de cada primer específico para cada citocina e enzima, 4  $\mu$ L de amostra contendo o cDNA, 5 $\mu$ L de água e juntamente com 10 $\mu$ L de *master mix* Taqman<sup>®</sup> foram colocados

em placas de 96 poços seladas. As placas foram levadas ao termociclador Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System®.

### **3.9 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO) PULMONAR**

A atividade de mieloperoxidase pulmonar foi quantificada de acordo com CAVRIANI *et al.* (2005). Após 24 horas da indução à SDRA com LPS, os animais foram anestesiados, submetidos à laparotomia mediana e dessangrados pela secção da aorta abdominal. A cavidade torácica foi aberta e o leito vascular pulmonar perfundido com 10 ml de PBS através de uma cânula inserida na artéria pulmonar. O tecido pulmonar foi pesado e homogeneizado em 1 ml de tampão fosfato pH 6 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-tri-metil-amônio (HTAB) e 5 ml de EDTA. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos à 4° C e o sobrenadante obtido foi utilizado para determinar a atividade de MPO. O ensaio da atividade de MPO foi conduzido pipetando 10 µl da amostra diretamente em uma placa de 96 poços. A seguir foi adicionado 200 µl de tampão substrato. Decorridos 5 minutos, a reação foi interrompida adicionando 50 µl de azida sódica (1,3 %). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm.

### **3.10 AVALIAÇÃO DE FAGOCITOSE E BURST OXIDATIVO**

A avaliação de fagocitose e burst oxidativo foi feita pela medida de iodeto de propídio (PI) marcado com *Staphylococcus aureus* e células fluorescentes com diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA), respectivamente, como descrito em Lino dos Santos Franco et al, 2010.

### **3.11 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO DO NF-κB**

Para avaliar a translocação do fator de transcrição NF-κB do citoplasma para o núcleo, extratos nucleares de tecido pulmonar foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) e a concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford. A quantificação de NF-κB (p65) presente na fração nuclear foi realizada por ensaio imunoenzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). As leituras das densidades ópticas foram obtidas por leitor de microplaca (PowerWave X 340; BioTek Instruments, Winooski, VT) e os resultados

foram expressos como densidade óptica de NF- $\kappa$ B obtida no extrato nuclear pela concentração de proteína presente em cada poço.

### **3.12 HISTOLOGIA**

A análise histológica foi realizada a fim de determinar a produção de muco e o edema nos pulmões. Partes do tecido pulmonar foram corados com hematoxilina/eosina, azul de toluidina e PAS (Ácido Periódico de Schiff), para análise de edema e muco respectivamente. Os dados de pontuação foram baseados em estudos anteriores.

### **3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

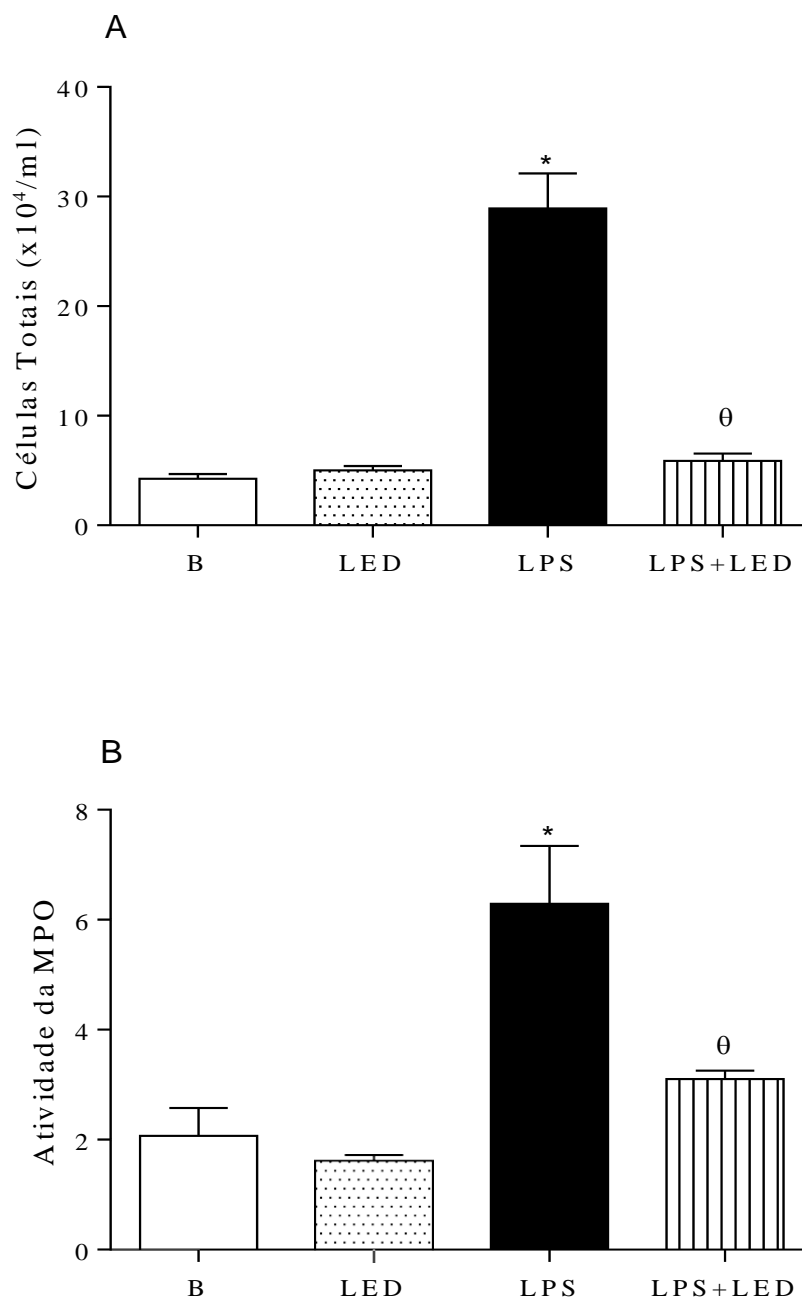
Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida do pós-teste Student Newman-Keuls para comparação de todos pares de colunas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Software V.2.01, GraphpadInstat-TM (1990-1993). Os resultados foram expressos como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

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 TRATAMENTO COM LED REDUZ RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA O PULMÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS**

A figura 1 (Painel A) mostra que o tratamento com LED reduziu o número de células inflamatórias recuperadas no LBA do grupo tratado (LPS+LED) em relação ao grupo não tratado (LPS) e não apresentou diferenças em relação ao grupo basal (B) e nem em relação ao grupo tratado com LED sem indução (LED). Ainda, no grupo LPS, o número de células inflamatórias recuperadas no LBA aumentou em relação ao grupo B. O número de células inflamatórias no grupo B não apresentou diferenças em relação ao grupo LED.

O painel B mostra a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Notamos que os animais tratados com o LED (LPS+LED) apresentaram uma redução significativa da atividade de MPO em relação ao grupo LPS e não diferiram do grupo B. Mostramos ainda, que a indução a SDRA no grupo LPS, resultou no aumento da atividade de MPO em relação ao grupo B. A atividade da MPO no grupo B não apresentou diferença entre o grupo LED.

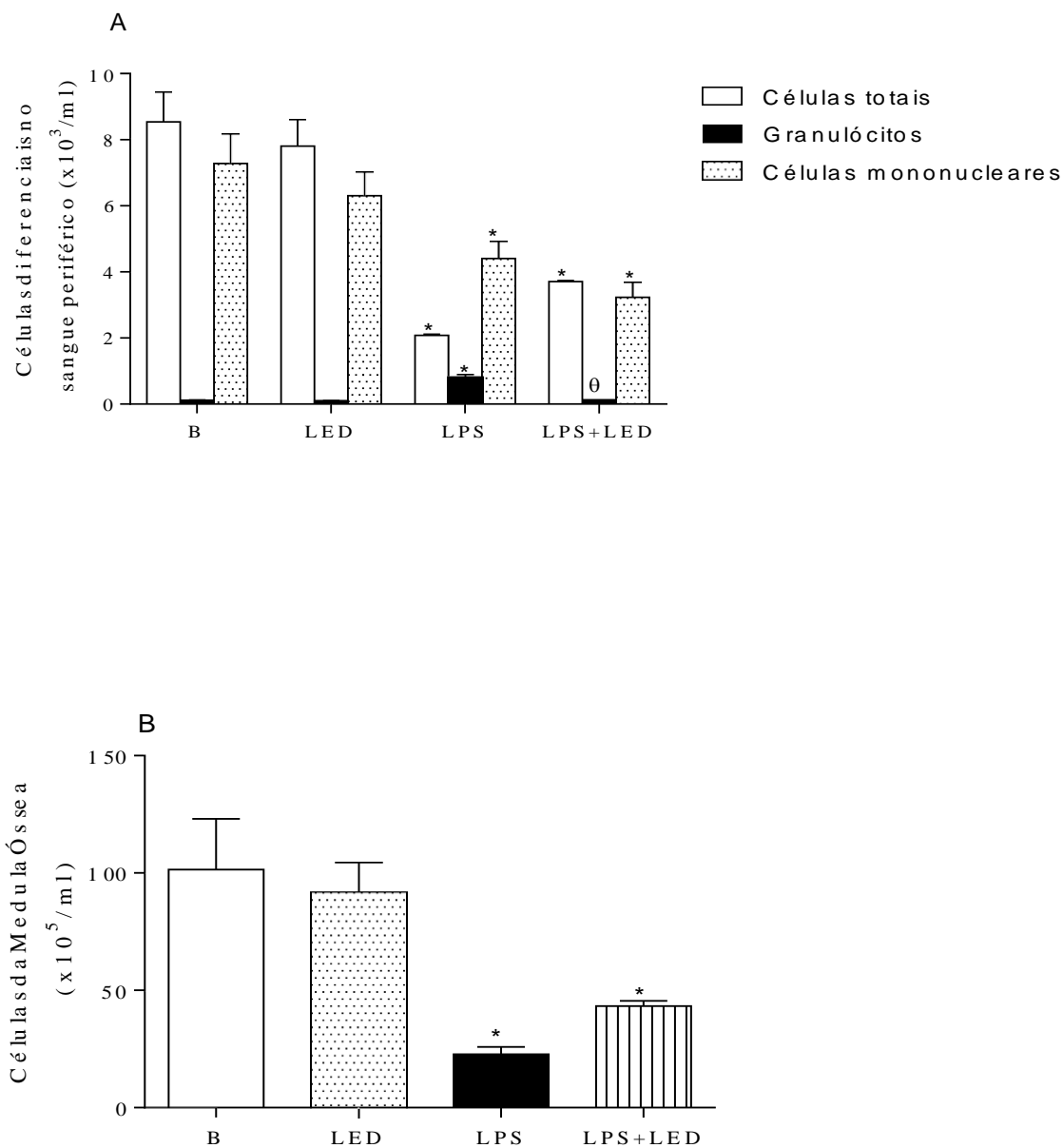


**Figura 1. Papel do LED sobre o recrutamento celular pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução de SDRA. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Grupos de camundongos foram apenas tratados com LED (sem indução a SDRA). Após 24 h da indução foi realizado o LBA e os pulmões foram removidos para a avaliação da atividade de MPO. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo B; <sup>θ</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS.

#### **4.2 TRATAMENTO COM LED REDUZ GRANULÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO, MAS NÃO INTERFERE NO NÚMERO DE CÉLULAS TOTAIS DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS**

A figura 2 (painel A) mostra que a indução a SDRA reduziu o número de células totais e mononucleares no sangue periférico em relação ao grupo B e em relação ao grupo LED. O número de granulócitos aumentou no grupo LPS em relação ao grupo B e LED e o tratamento com LED (LPS+ LED) reverteu este aumento em relação ao grupo LPS. O número de células totais, granulócitos e mononucleares não apresentaram diferenças entre os grupos B e LED.

O painel B mostra que houve diminuição significativa no número de células presentes na medula óssea dos animais submetidos a SDRA em relação ao grupo B e o tratamento com LED não reverteu tal redução. O número de células presentes na medula óssea não apresentou diferença entre os grupos B e LED.



**Figura 2. Papel do LED sobre o processo de mobilização celular em diferentes compartimentos: sangue periférico (A) e medula óssea (B) em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Grupos de camundongos foram apenas tratados com LED (sem indução a SDRA). Após 24 h da indução de SDRA foi realizada a contagem de células. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo B; <sup>0</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS.



### **4.3 TRATAMENTO COM LED INTERFERE NA LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NO FLUIDO DO LBA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS**

A figura 3 (Painel A) mostra que o grupo LPS apresentou aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  em relação ao grupo B e o tratamento com LED reduziu a liberação de IL-1 $\beta$  no fluido do LBA do grupo LPS+LED em relação ao grupo LPS.

No painel B observamos que a IL-6 aumentou tanto no grupo LPS como no grupo LPS+LED em relação ao grupo B.

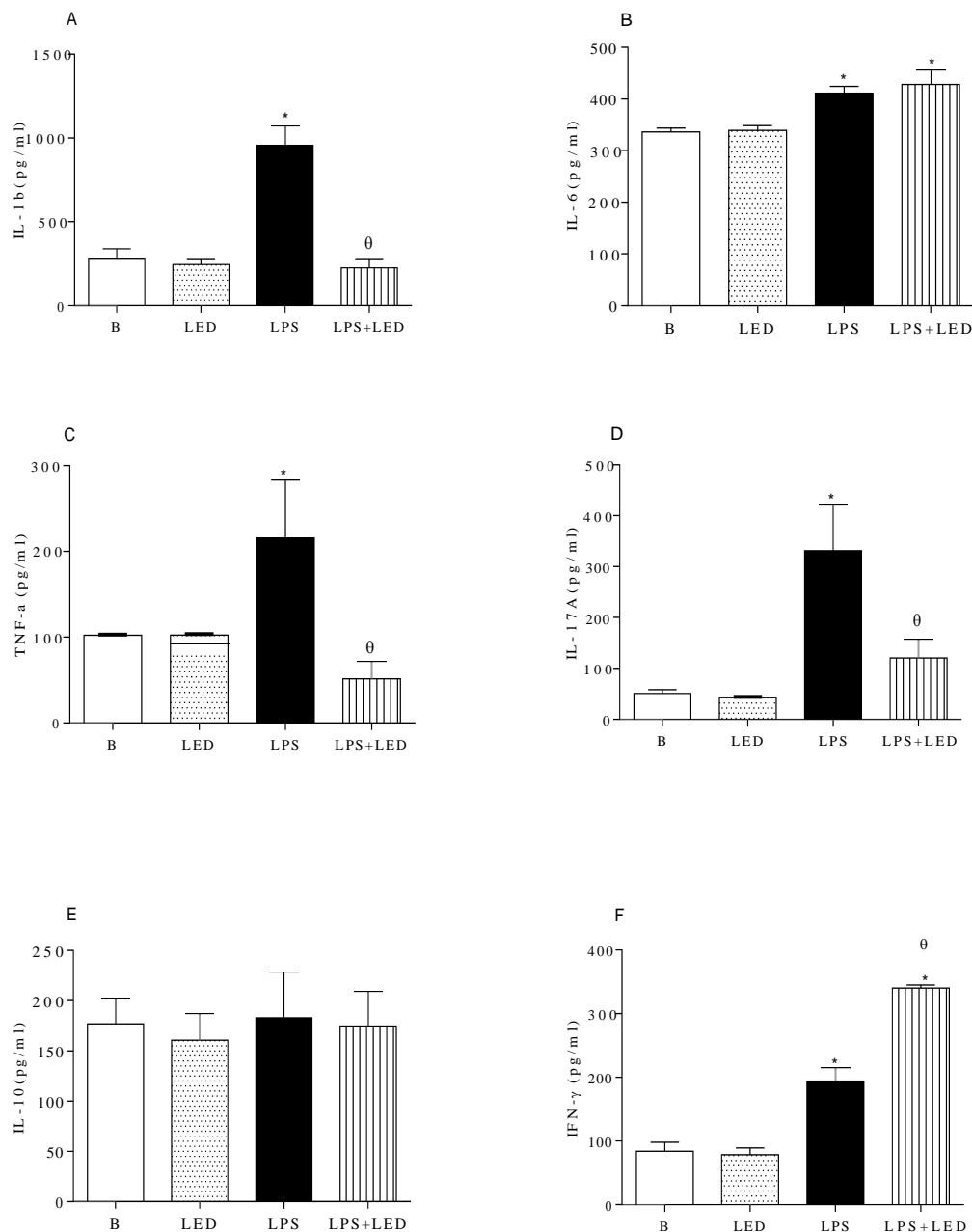
Como pode ser observado no painel C os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram no grupo LPS em relação ao grupo B, enquanto no grupo LPS+LED foi observado uma diminuição em seus níveis, em relação ao grupo LPS.

O painel D mostra que os níveis de IL-17A encontram-se aumentados no grupo LPS em relação ao grupo B e reduzidos no grupo LPS+LED, em relação ao grupo LPS.

O painel E mostra que não houve diferença nos níveis de IL-10 entre os grupos analisados.

O painel F mostra que os níveis de IFN- $\gamma$  aumentaram significativamente no grupo LPS em relação ao grupo B. Ainda, podemos notar que o tratamento com LED causou um aumento adicional na liberação de IFN- $\gamma$  no grupo tratado (LPS+LED) tanto em relação ao grupo não tratado (LPS) quanto em relação ao grupo basal.

Nos resultados das análises de citocinas, tanto anti-inflamatórias, quanto pró-inflamatórias não houve diferença entre os grupos B e LED.



**Figura 3. Papel do LED sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A e TNF- $\alpha$ , e citocinas anti-inflamatórias: IL-10 e IFN- $\gamma$  em fluido do LBA em modelo experimental de SDRa induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRa através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Grupos de camundongos foram apenas tratados com LED (sem indução a SDRa). Após 24 h da indução o LBA foi realizado e o sobrenadante recolhido para as análises das citocinas. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo B; <sup>θ</sup> $p < 0,05$  em relação ao grupo LPS.

#### **4.4 TRATAMENTO COM LED INTERFERE NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NO TECIDO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS**

A figura 4 (Painel A) mostra que a expressão de IL-1 $\beta$  no grupo LPS foi aumentada em relação ao grupo B e o tratamento com LED não reverteu esse aumento, apresentando valores bem próximos ao grupo LPS e um aumento significativo em relação ao grupo B.

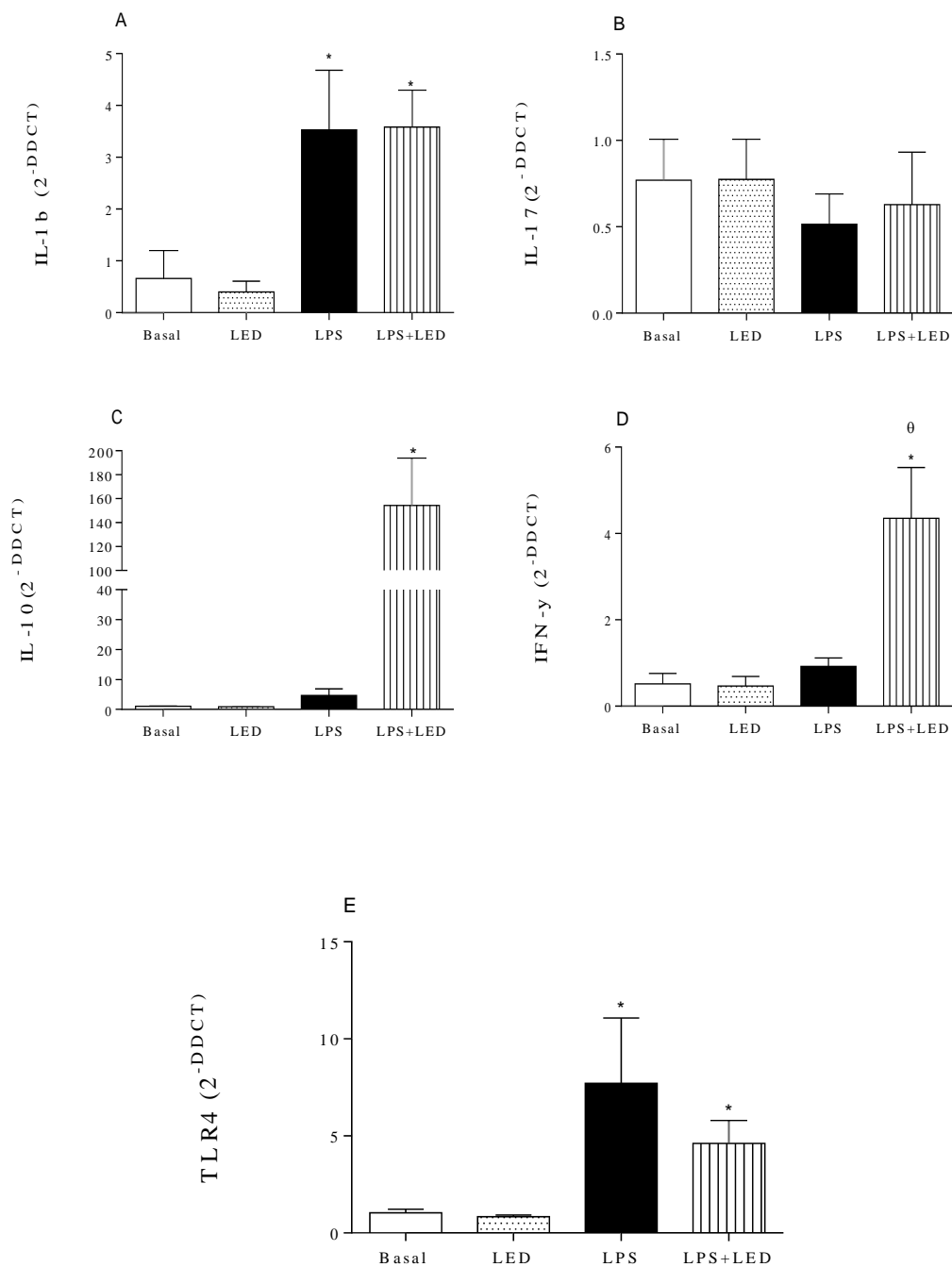
O painel B mostra que não houve diferença na expressão de IL-17A nos grupos analisados.

Como pode ser observado no painel C, a expressão de IL-10 no grupo LPS+LED aumentou significativamente em relação a todos os grupos de estudo.

O painel D mostra que a expressão de IFN- $\gamma$  aumentou significativamente no grupo LPS+LED tanto em relação ao grupo B, quanto ao grupo LPS.

No painel E vemos que a expressão de TLR4 foi aumentada no grupo LPS em relação ao grupo B e que essa situação não foi revertida pelo tratamento com LED (grupo LPS+LED) pois o mesmo também apresenta um aumento na expressão de TLR4 em relação ao grupo B.

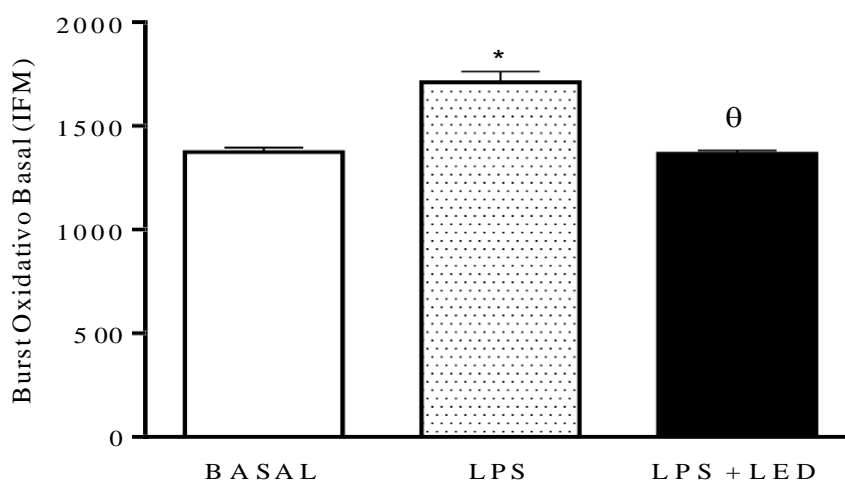
Para todos os resultados da expressão gênica de mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios não houve diferença entre os grupos B e LED.



**Figura 4. Papel do LED na expressão de IL-1 $\beta$  e IL-17A, IL-10 e IFN- $\gamma$  e TLR4 no tecido pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Grupos de camundongos foram apenas tratados com LED (sem indução a SDRA). Após 24 h da indução o pulmão foi retirado para as análises de PCR em tempo real. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo B;  $\theta p < 0,05$  em relação ao grupo LPS.

#### 4.5 TRATAMENTO COM LED REDUZ O BURST OXIDATIVO NAS CÉLULAS RECUPERADAS NO LBA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS

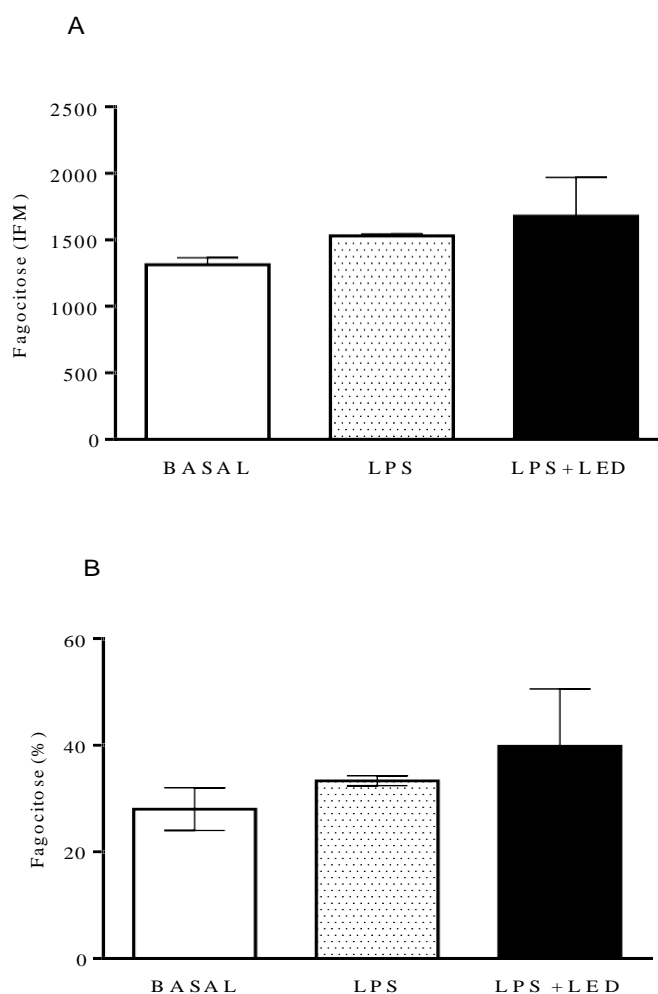
A figura 5 mostra que o burst oxidativo aumentou no grupo LPS em relação ao grupo B, e tal efeito foi revertido após tratamento com LED (LPS+LED). A partir desta análise os dados do grupo LED (apenas induzido) não foram utilizados, pois após a realização do teste T os dados não apresentavam diferenças significantes em relação ao grupo B.



**Figura 5. Papel do LED sobre o burst oxidativo nas células recuperadas no LBA em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Após 24 h da indução o LBA foi recolhido para as análises de burst oxidativo. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo B;  $\theta p < 0,05$  em relação ao grupo LPS.

#### 4.6 TRATAMENTO COM LED NÃO INTERFERE NA FAGOCITOSE DE CÉLULAS TOTAIS RECUPERADAS NO LBA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS

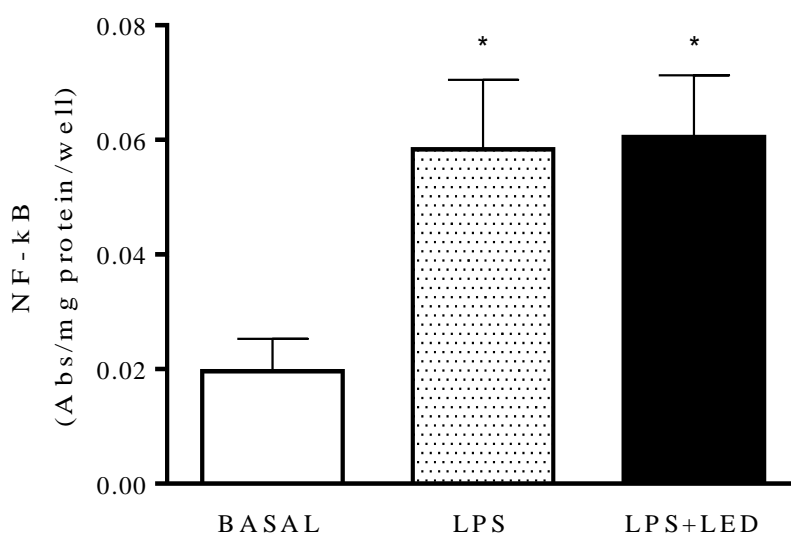
A figura 6 (painéis A e B) mostra que não houve diferenças entre os grupos de estudo em relação a intensidade de fluorescência bem como na porcentagem de células que realizam fagocitose respectivamente.



**Figura 6. Papel do LED sobre a fagocitose nas células recuperadas no LBA em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Após 24 h da indução o LBA foi recolhido para as análises de fagocitose. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais.

#### 4.7 TRATAMENTO COM LED NÃO INTERFERE NA TRANSLOCAÇÃO DO NF-kB NO TECIDO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDOS POR LPS

A figura 7 mostra que a translocação do NF-kB aumentou no grupo LPS em relação ao grupo B e tal efeito não foi revertido com o tratamento com o LED translocação continua aumentada no grupo tratado (LPS+LED).

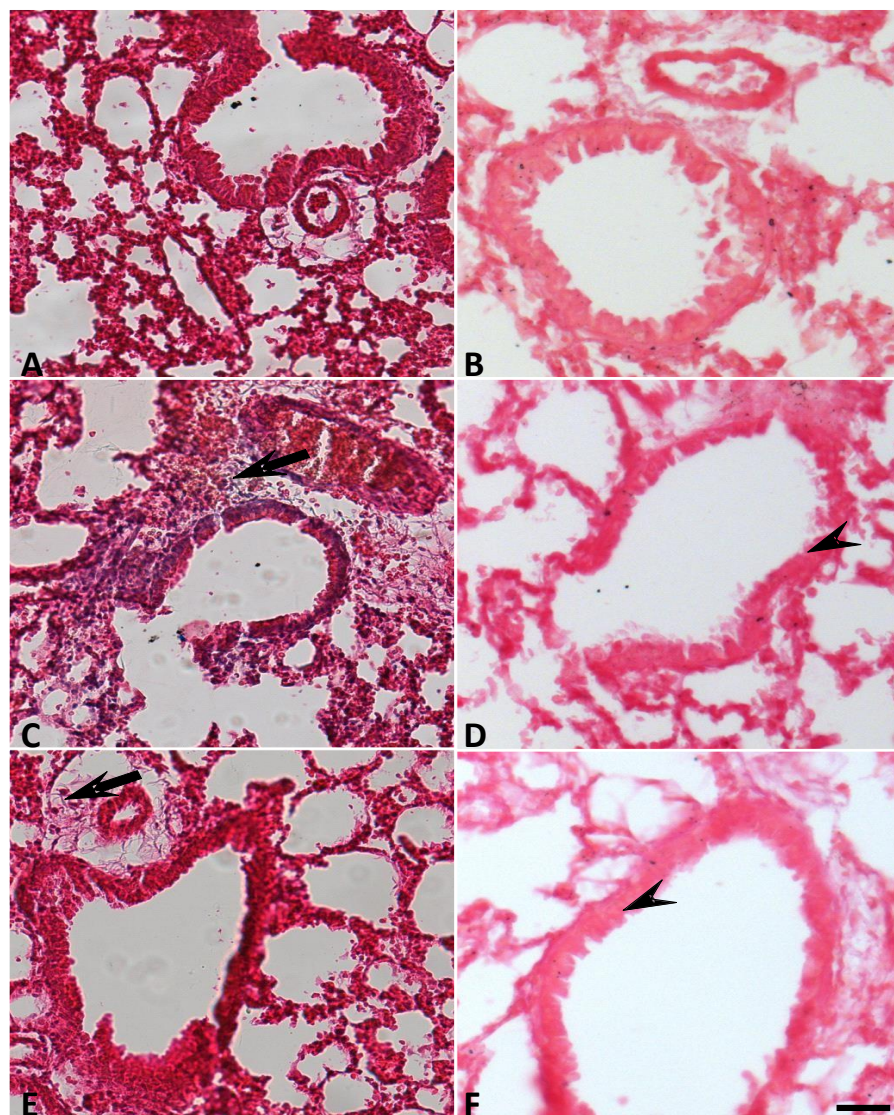


**Figura 7. Papel do LED sobre a translocação do NF-kB no tecido pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Após 24 h o pulmão foi retirado para as análises do NF-kB. Os dados representam a média  $\pm$  de 5 animais. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo B.

#### **4.8 TRATAMENTO COM LED REDUZ INFILTRADO LEUCOCITÁRIO, MAS NÃO INTERFERE NO ACÚMULO DE MUCO NO TECIDO PULMONAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE SDRA INDUZIDO POR LPS**

Na figura 8, os painéis A e B representam o grupo Basal evidenciado pelo tecido intersticial normal e ausência de infiltrado celular, presença de células do epitélio brônquico sem acúmulo de muco. No entanto, os painéis C e D representam o grupo LPS e como pode ser observado, encontramos um intenso infiltrado leucocitário na região perivascular e peribrônquica (seta) bem como intenso acúmulo de muco no epitélio brônquico (cabeça da seta). Já nos painéis E e F observamos o grupo tratado com LED caracterizado por significativa redução do infiltrado leucocitário na região perivascular (seta) e discreta redução do acúmulo de muco no epitélio brônquico.





**Figura 8. Papel do LED sobre o tecido pulmonar em modelo experimental de SDRA induzido por LPS.** Grupos de camundongos foram induzidos a SDRA através de injeção IP de LPS e tratados ou não com LED 2 e 6 h após a indução. Grupos de camundongos não manipulados foram utilizados para a obtenção de valores basais. Após 24 h da indução parte do pulmão foi recolhido para as análises histológicas. Coloração: (A, C e E) Hematoxilina e eosina, (B, D e F) PAS.

## 4 DISCUSSÃO

A sepse grave ou o choque séptico são problemas de saúde que afetam milhões de pacientes em todo mundo a cada ano. A resposta excessiva a patógenos infecciosos por mediadores inflamatórios está implicada na patogênese e na alta mortalidade de pacientes em choque séptico. A SDRA é uma das complicações mais devastadoras da sepse e do choque séptico (KIM e HONG, 2016). As células imunes inatas, principalmente os neutrófilos, são rapidamente recrutadas para os alvéolos pulmonares em resposta à lesão ou produtos bacterianos, tais como o lipopolissacarídeo (LPS). Estes neutrófilos contribuem para a lesão alveolar através da secreção de oxidantes e proteases no epitélio alveolar e no endotélio (LI et al., 2015).

Nosso modelo de inflamação pulmonar aguda foi realizado de acordo com BRIGHAM e MEYRICK (1986) e WANG et al. (2014). O sucesso deste modelo foi avaliado 24h após a indução sistêmica de LPS através de vários parâmetros inflamatórios.

Dada a gravidade e a alta mortalidade da SDRA, faz-se necessário a busca por novos alvos terapêuticos ou alternativas de tratamentos que apresentem maior eficiência, com menor custo e menores efeitos colaterais. Nesse sentido, o tratamento com fotobiomodulação tem se mostrado promissor para diversas patologias nas quais o processo inflamatório é o principal pilar. Assim, resolvemos avaliar se o tratamento com fototerapia poderia auxiliar no controle do desenvolvimento da SDRA, apresentando resultados mais eficientes do que os tratamentos convencionais.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com LED foi eficiente e reverteu totalmente a inflamação pulmonar induzida pelo LPS. A abordagem de tratamento utilizada neste estudo visou interferir num processo inflamatório em andamento, uma vez que o LED foi aplicado 2 e 6 horas após a administração de LPS. Este estudo parece promissor e abre possibilidades de uso em UTIs, já que apresenta baixo custo, fácil aplicação e isento de efeitos colaterais.

Como previamente estabelecido, a SDRA se desenvolve após lesão e ruptura na barreira do alvéolo com lesão persistente do epitélio alveolar, ocorrendo então uma série de eventos, incluindo a ativação do sistema de coagulação e a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que conduzem um influxo de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos para o local da lesão (BURNHAM et al., 2014).

Reconhecendo o importante papel dos neutrófilos no desenvolvimento da SDRA, avaliamos a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) pulmonar, que é usada como um biomarcador indireto da presença e a ativação de neutrófilos no pulmão. Como esperado, a administração de LPS induziu aumento significativo na atividade de MPO mostrando importante papel dos neutrófilos no desenvolvimento da SDRA.

Corroborando com nossos resultados da migração de células para o espaço alveolar, o tratamento com LED também reduziu significativamente a atividade da MPO. Esses dados reforçam a efetividade do tratamento em reduzir a inflamação pulmonar neutrofílica. De fato, a fotobiomodulação vem apresentando bons resultados em relação a sua utilização para tratamento de doenças pulmonares. LIMA et al. (2014) comprovou que o laser de baixa intensidade atenua a atividade da enzima MPO bem como a liberação de mediadores inflamatórios após processo de isquemia e reperfusão intestinal, a qual é uma das causas da SDRA.

Considerando que o processo inflamatório é multimediado e que seu desenvolvimento depende da mobilização das células de seus compartimentos de reservas, investigamos a dinâmica de mobilização celular após tratamento com LED. Nosso objetivo foi entender o mecanismo pelo qual o tratamento com LED reduz a migração de neutrófilos para o pulmão. Nesse sentido, é importante considerar que o tratamento com LED foi local, ou seja, os animais foram irradiados diretamente no aparelho respiratório pelo contato com a pele. Entretanto, buscamos avaliar se alterações sistêmicas também aconteceram após o tratamento.

Uma vez que durante o processo inflamatório há saída das células dos compartimentos de reserva para o foco de lesão, nossos resultados podem sugerir que a redução nas células presentes na medula óssea é um reflexo do processo de recrutamento. No entanto, pudemos observar que o tratamento com LED não foi capaz de alterar o reduzido número de células na medula apesar de causar menor influxo de células no pulmão. Ainda, notamos redução no número de neutrófilos presentes no sangue periférico. É razoável considerar que os tempos de análises foram os mesmos e eventualmente isso possa ter atrapalhado a visualização de alterações tanto na medula quanto no sangue após o tratamento que podem ter ocorrido num período que não foi analisado. De fato, apesar de não termos estatisticamente diferenças nas células da medula, mas nosso resultado mostra uma tendência a um aumento o que denota uma redução da saída destas células da medula.

Sabe-se que o processo de migração celular é controlado por diversos fatores entre eles por citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Na tentativa de compreender o mecanismo de ação do LED sobre a migração de células para o pulmão, fomos investigar a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias no sobrenadante do LBA. O presente estudo demonstrou que o tratamento com LED reduziu a liberação de importantes citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  as quais desempenham papel de destaque no desenvolvimento da SDRA.

Os receptores de reconhecimento padrão são componentes críticos do sistema imune inato e servem como uma linha primária de defesa do organismo, esses receptores reconhecem substâncias endógenas como os PAMPs e iniciam a cascata inflamatória, a sinalização e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (BUTT et al., 2016).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina envolvida na adesão de neutrófilos e sua ativação, coagulação e formação de edema, especialmente durante os eventos de inflamação pulmonar aguda, possuindo então alto poder pró-inflamatório e com papel central na fisiopatologia de SDRA (OLIVEIRA JR. et al., 2014). Isso reforça a importância do tratamento com o LED ter reduzido os níveis destas citocinas no modelo de SDRA. Outros estudos com fotobiomodulação apresentaram efeitos semelhantes, com a diminuição de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  com a utilização de laser de baixa intensidade (LIMA et al., 2014; OLIVEIRA JR. et al., 2014).

A interleucina 6 (IL-6) é considerada uma citocina pleiotrópica, apresentando um papel central na fisiopatologia da SDRA, é um biomarcador de gravidade da doença, indicando um mau prognóstico e o risco de morte, além de estar associada a doenças malignas no pulmão (OLIVEIRA JR. Et al., 2014; CHEN et al., 2016; REILLY et al., 2016). Observamos que no nosso estudo o tratamento com LED não foi capaz de reverter os altos níveis de IL-6. Levando em consideração que as outras citocinas pró-inflamatórias analisadas tiveram uma redução significativa, acreditamos que outros parâmetros do tratamento com LED, como o tempo de exposição e duração do tratamento, possam ser modificados futuramente (em outros estudos), a fim de se obter melhores resultados que possam impactar na diminuição de IL-6.

Por outro lado, a IL-17A é uma citocina produzida principalmente por células TCD4 ativadas, que estimulam a secreção de IL-6 e IL-8 por fibroblastos humanos, e tem um papel importante na proteção de organismos contra bactérias e fungos, devido a sua capacidade de recrutar neutrófilos (NORMANTON e MARTI, 2013). Além da

capacidade de recrutar neutrófilos, a IL-17A aumenta a permeabilidade do epitélio alveolar, favorecendo o extravasamento de plasma para os espaços alveolares, que, em conjunto com a eliminação do fluido alveolar danificado, leva ao edema alveolar (BURNHAM et al., 2014; LI et al., 2015). O presente estudo mostrou que o tratamento com LED reduziu os níveis de IL-17A, reforçando o papel anti-inflamatório do LED. Ainda, podemos inferir que tal redução possa ser uma das responsáveis pelo menor recrutamento de neutrófilos.

Em relação às citocinas antiinflamatórias o nosso estudo não identificou diferença nos níveis de IL-10 entre os grupos analisados. Em contrapartida, estudo clínico realizado por LIU (2015) mostrou redução nos níveis de IL-10 em pacientes com SDRA. Por fim, quantificamos outra importante citocina anti-inflamatória, o IFN- $\gamma$ . Nossos resultados mostraram que o tratamento com LED aumentou a liberação desta citocina. É digno de nota que tanto a IL-10 quanto o IFN-  $\gamma$  são importantes citocinas anti-inflamatórias que regulam o influxo celular por modulação das moléculas de adesão.

A análise da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias nos mostra que houve um aumento na expressão de IL-1 $\beta$  no grupo LPS e esse aumento não foi revertido pelo tratamento com o LED, porém na quantificação por ELISA apresentou uma redução significativa. A expressão da citocina IL-17A não apresentou diferenças entre os grupos analisados, porém, se comparado com o método ELISA houve uma importante redução na quantidade desta citocina.

No caso da expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias houve um aumento significativo na expressão de IL-10, apesar de não ter apresentado diferenças na quantificação pelo ELISA. Essa diferença pode ter ocorrido pela falta de intervalo de tempo entre as análises e pode não ter havido tempo suficiente para a efetiva produção desta citocina, deste modo vemos a necessidade de novos estudos com análises em tempos diferenciados. O tratamento com LED aumentou significativamente a expressão de IFN-  $\gamma$  tanto em relação ao grupo LPS quanto em relação ao grupo Basal, e esse aumento foi confirmada pelo método ELISA. Dessa forma podemos reforçar o efeito anti-inflamatório do LED.

A expressão de TLR4 foi aumentada no grupo LPS e apesar de não ter havido diferença significativa, vemos uma tendência à diminuição na expressão de TLR4 no grupo tratado (LPS+LED).

Os neutrófilos são profissionais no sistema de defesa, eles migram para o local da infecção, onde eles ingerem os microorganismos através da fagocitose. Para matar o microorganismo o neutrófilo inicia o burst oxidativo com a consequente formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SIMONS et al., 2005). Embora a produção de oxidantes seja crucial na luta contra organismos infecciosos, as espécies reativas de oxigênio também podem exacerbar o processo inflamatório e causar danos no tecido através do estresse oxidativo, então o controle da produção das ROS é muito importante (ZHAO and BOKOCH, 2005). O burst oxidativo no grupo tratado foi reduzido significativamente em relação ao grupo LPS mostrando efeitos protetores do LED contra geração de estresse oxidativo. Por outro lado, estudos do nosso grupo com Laser de baixa intensidade num modelo de inflamação pulmonar induzido por poluente, mostrou efeito antagônico do laser sobre o burst oxidativo. SILVA MACEDO et al. (2016) mostraram que o tratamento com LBI aumentou o burst oxidativo pelas células do LBA.

Para a análise da fagocitose foram utilizados dois parâmetros, a intensidade de fluorescência (painel A) e a porcentagem de células fagocitárias (painel B). Apesar de o burst oxidativo estar reduzido, a fagocitose não foi alterada nos grupos analisados, o que pode ser até benéfico, pois o tratamento com o LED não alterou um importante mecanismo de defesa do organismo contra patógenos.

Vários estudos revelam que a ativação de NF- $\kappa$ B que ocorre na SDRA pode causar a expressão de vários genes pró-inflamatórios como citocinas, moléculas de adesão, enzimas e quimiocinas, desempenhando um papel importante na resposta inflamatória, no estresse oxidativo, apoptose e outros processos patológicos. Além disso o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, entre outras citocinas pró-inflamatórias podem ativar o NF- $\kappa$ B em excesso no tecido pulmonar, fazendo com que a regulação de feedback positivo e negativo da ativação do NF- $\kappa$ B fique fora de equilíbrio (KAWAI et al., 1999; DENG et al., 2000; WANG et al., 2014). Além disso, o NF- $\kappa$ B exibe uma função reguladora de apoptose em células polimorfonucleares no tecido pulmonar e inibe a apoptose dessas mesmas células após sua ativação (WANG et al., 2014). Apesar de o tratamento com LED não reduzir a translocação do NF- $\kappa$ B em relação ao grupo LPS, podemos levantar a hipótese de que o tratamento com o LED estimulou o NF- $\kappa$ B a induzir a apoptose de neutrófilos no nosso modelo, já que o número de neutrófilos apresentou-se reduzido na análise de células recuperadas no LBA e também uma importante redução na atividade

da MPO. Essa hipótese pode ser confirmada através de análises de apoptose, que poderão ser realizadas futuramente.

A fisiopatologia da SDRA consiste em lesão endotelial pulmonar, aumento da permeabilidade vascular e passagem de fluidos ricos em proteínas, células e macromoléculas, lesão da barreira epitelial ativando uma profunda resposta inflamatória e secreção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores, com a subsequente ativação de neutrófilos e sua passagem para os espaços alveolares, aumentando o dano inicial e formação de edema (ESTENSSORO and DUBIN, 2016). Na análise histológica observamos um intenso infiltrado leucocitário na região perivascular e peribrônquica bem como acúmulo de muco no epitélio brônquico após administração de LPS. Mais uma vez, notamos que o tratamento com o LED reduziu o infiltrado leucocitário, dado que corrobora com as análises anteriores, porém, em relação ao acúmulo de muco a redução não foi significativa. Provavelmente, os efeitos benéficos de LED sobre esses parâmetros devem precisar de mais tempo para poder ser evidenciados.

Assim, nosso estudo abre possibilidades de uma nova terapia para o tratamento da ARDS, uma patologia tão séria e que acomete tantas pessoas; caracterizada por alto índice de mortalidade. A fotobiomodulação nesse cenário adquire relevância não apenas pelos seus resultados promissores, mas também por ser uma terapia não invasiva e pelo seu baixo custo.

## 6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos dados mostram que o tratamento com LED reduziu a inflamação pulmonar aguda, por diminuir não apenas o número de neutrófilos, mas também sua ativação. Tais efeitos foram modulados pela diminuição de IL-1 $\beta$ , IL-17A e TNF- $\alpha$ , pelo aumento de IFN- $\gamma$  e expressão de IL-10, concomitante com a diminuição do burst oxidativo.

Muitos estudos vêm sendo realizados utilizando o tratamento com LED em doenças de caráter inflamatório, mas com abordagem de terapia para SDRA é pioneiro. Assim, apesar de os resultados serem promissores, mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos bem como da dosimetria, a fim de que futuramente possa ter uma aplicação na clínica.



## 9 BIBLIOGRAFIA

ABRAHAM E, MATTHAY MA, DINARELLO CA, VINCENT JL, COHEN, J, OPAL SM. et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. *Critical Care Medicine* 2000; 28: 232-35.

AIMBIRE F, BJORDAL. 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; 38 (8): 773-8.

ANDRADE MD, RASTELLI ANS, SAAD RS, SAAD JRC. Avaliação da capacidade de polimerização de um novo dispositivo à base de LED à bateria. *J Am Dent Assoc* 2001; 4: 372-6.

ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, v. 2, p. 319-23, 1967.

BERNARD GR, ARTIGAS A, BRIGHAM KL, CARLET J, FALKE K, HUDSON L. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1994; 149: 818-24.

BEUTLER B and RIETSCHEL ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 169-76.

BRIGHAM KL and MEYRICK B. Endotoxin and lung injury. *The American Review of Respiratory Disease* 1986; 133: 913-27.

BURNHAM EL, JANSSEN WJ, RICHES DWH, MOSS M, DOWNEY GP. The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *Eur. Respir. Journal* 2014; 43 (1): 276-85.

BUTT Y, KURDOWSKA A, ALLEN TC. Acute lung injury: A clinical and molecular review. *Arch Pathol Lab Med.* 2016; 140: 345-350.

CAROFF, M. and KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research* 2003; 338: 2431-4.

CAVRIANI G, DOMINGOS HV, SOARES AL, TREZENA AG, LIGEIRO-OLIVEIRA AP, OLIVEIRA-FILHO RM. et al. Lymphatic system as a path underlying the spread of lung and gut injury after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Shock* 2005; 23(4):330-6.

CHEN C, SHI L, LI Y, WANG X, YANG S. Disease-specific dynamic biomarkers selected by integrating inflammatory mediators with clinical informatics in ARDS patients with severe pneumonia. *Cell Biol Toxicol.* 2016; 32: 169-84.

CLARCK SM, MICHAEL KC, KLAUS J, MERT A, VERTHELYIL AR, SAND J. et al. Dissociation between sickness behavior and emotionality during lipopolysaccharide

challenge in lymphocyte deficient Rag2<sup>-/-</sup> mice. *Behav Brain Res.* 2015 February 1; 278: 74–82.

COLLUCCI, C. Só 27% dos médicos sabem reconhecer a sepse, diz pesquisa. *Folha de São Paulo*, 28 jan. 2009.

DALL GF, OHLY NE, BALLANTYNE JA, BRENKEL IJ. The influence of pre-operative factors on the length of in-patient stay following primary total hip replacement for osteoarthritis: a multivariate analysis of 2302 patients. *J Bone Joint Surg Br.* 2009; 91(4): 434-40.

DE LIMA WT, SIROIS P, JANCAR S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesion. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 213:63-70.

DELLINGER RP, LEVY MM, CARLET JM, BION J, PARKER MM, JAESCHKE R. et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Critical Care Medicine* 2008; 36: 296-327.

DENG L, WANG C, SPENCER E, YANG L, BRAUN A, YOU J. et al. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103: 351-61.

ESTENSSORO E and DUBIN A. Síndrome de distress respiratorio agudo. *Medicina (Buenos Aires)* 2016; 76 (4): 235-241.

FARIA SL, SOUHAMI L, PORTELANCE L, DUCLOS M, VUONG T, SMALL D. et al. Absence of toxicity with hypofractionated 3-dimensional radiation therapy for inoperable, early stage non-small cell lung cancer. *Radiat. Oncol.* 2006; 1(1): 42.

FERRARESI C, PARIZOTTO NA, SOUSA MVP, KAIPPERT B, HUANG YY, KOISO T et al., Light-emitting diode therapy in exercise-trained mice increases muscle performance, cytochrome c oxidase activity, ATP and cell proliferation. *J Biophotonics* 2015 September; 8 (9): 740–754. doi:10.1002/jbio.201400087.

HOOPER MH and BERNARD GR. Pharmacogenetic treatment of acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anestesiologica* 2011; 77 (6): 624-36.

HUANG YY, CHEN A C-H, CARROLL JD, HAMBLIN MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 2009; 7: 358- 383. doi: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.

HUDSON LD, MILBERG JA, ANARDI D, MAUNDER RJ. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1995; 151: 293-301.

JANEWAY CA and MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 2002; 20: 197-216.

KAWAI T, ADACHI O, OGAWA T, TAKEDA K, AKIRA S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-229.

KIM WY and HONG SH. Sepsis and acute respiratory distress syndrome: recent update. *Tuberc Respir Dis* 2016; 79: 53-57.

LANDYSHEV I, AVDEEVA N, GOBOROV N, KRASAVINA N, TIKHONOVA G, TKACHEVA S. Efficacy of low-intensity irradiation and sodium nedocromil in the complex treatment of patients with bronchial asthma. *Ter Arkh* 2002; 74:25–28.

LEVAN TD, BLOOM JW, BAILEY TJ, KARP CL, HALONEN M, MARTINEZ FD. et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *Journal of Immunology* 2001; 167: 5838-44.

LEWANDOWSKI K and LEWANDOWSKI M. Epidemiology of ARDS. *Minerva Anestesiologica* 2006; 72: 473-7.

LI JT, MELTON AC, SU G, HAMM DE, LAFEMINA M, HOWARD J. et al. Unexpected Role for Adaptive  $\alpha\beta$ TH17 Cells in Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Immunol.* 2015; 195 (1): 87-95.

LIMA FM, AIMBIRE F, MIRANDA H, VIEIRA RP, OLIVEIRA APL, 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. *Journal of Lasers in Medical Sciences* 2014; 5: 63-70.

LIU D, LUO G, LUO C, WANG T, SUN G, HEI Z. Changes in the Concentrations of Mediators of Inflammation and Oxidative Stress in Exhaled Breath Condensate During Liver Transplantation and Their Relations With Postoperative ARDS. *Respiratory Care* 2015; 60 (5): 679-88.

MATUTE-BELLO G, FREVERT CW, MARTIN TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008; 295: 379-99.

MODRYKAMIEN AM and GUPTA P. The acute respiratory distress syndrome. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2015; 28(2): 163-71.

MOSS M and MANINO DM. Race and gender differences in acute respiratory distress syndrome deaths in the United States: an analysis of multiple cause mortality data. *Critical Care Medicine* 2002; 30: 1679-85.

NORMANTON M AND MARTI LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein* 2013; 11 (2): 237-46.

OLIVEIRA MC JR, GREIFFO FR, RIGONATO-OLIVEIRA NC, CUSTÓDIO RW, SILVA VR, DAMACENO-RODRIGUES NR. et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B.* 2014; 4 (134 C): 57-63.

PETRONI RC, BISELLI PJC, LIMA TM, THEOBALDO MC, CALDINI ET, PIMENTEL RN. et al. Hypertonic saline (NaCl 7.5%) reduces LPS- induced acute lung injury in rats. *Inflammation* 2015; DOI: 10.1007/s10753-015-0183-4.

POLTORAK A, SMIRNOVA I, HE X, LIU MY, VAN HUFFEL C, MCNALLY O. et al. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 1998; 24: 340-55.

REYLLY JP, ANDERSON BJ, HUDOCK KM, DUNN TG, KAZI A, TOMMASINI A. et al. Neutropenic sepsis is associated with distinct clinical and biological characteristics: a cohort study of severe sepsis. *Critical Care* 2016; 20: 222-31.

RUTHMAN CA and FESTIC E. Emerging therapies for the prevention of acute respiratory distress syndrome. *Ther Adv Respir Dis.* 2015 August; 9 (4): 173-87.

RYLANDER R, BAKE B, FISCHER JJ, HELANDER IM. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *The American Review of Respiratory Disease* 1989; 140: 981-6.

SALES-JÚNIOR JAL, DAVID CM, HATUM R, SOUZA PCSP, JAPIASSÚ A, PINHEIRO CTS. et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *RBTI - Revista Brasileira Terapia Intensiva* 2006; 18: 9-17.

SCHUSTER DP. What Is Acute Lung Injury? What is ARDS? *Chest* 1995; 107: 1721-6.

SHARP C, MILAR AB, MEDFORD ARL. Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 2015 April; DOI: 10.1159/000381102.

SHIMAZU R, AKASHI S, OGATA H, NAGAI Y, FUKUDOME K, MIYAKE K. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 1999; 189: 1777-82.

SILVA E, PEDRO MDEA; SOGAYAR AC, MOHOVIC T, SILVA CL, JANISZEWSKI M. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). *Critical Care* 2004; 8: 251-60.

SILVA IBRAHIM B, MIRANDA DA SILVA C, BARIONI ÉD, CORREA-COSTA M, POLISELLI FARSKY SH, LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A. Formaldehyde inhalation during pregnancy abolishes the development of acute innate inflammation in offspring. *Toxicol Lett.* 2015 Jun 1; 235 (2): 147-54.

SILVA VR, MARCONDES P, SILVA M, VILLAVERDE AB, CASTRO-FARIA-NETO HC, VIEIRA RP. et al. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014, 194: 37-48.

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. doi: 10.1155/2016/9303126.

SIMONS MP, NAUSEEF WM, APICELLA MA. Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with adherent polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, Apr. 2005; 73 (4): 1971- 1977. doi: 10.1128/IAI.73.4.1971–1977.

STANDIFORD TJ and WARD PA. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Translational Research* 2015 April; 1-9.

TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 335-76.

WANG H, XU L, ZHAO J, WANG D, GUO R, WANG J. et al. Regulatory mechanism of pyrrolidine dithiocarbamate is mediated by nuclear factor- $\kappa$ B and inhibits neutrophil accumulation in ARDS mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2014; 8: 614-22.

ZHAO T and BOKOCH GM. Critical role of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in reversion of the adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J. Immunol* 2005; 174: 8049- 8055. doi: 10.4049/jimmunol.174.12.8049.

## **10 ANEXOS**

- Termos de aprovação do uso de animais pelo COEP e/ou CEUA.



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nºAN0006/2015

**Título do Projeto:** Avaliação dos efeitos da LED terapia em modelo experimental de síndrome da angústia respiratória aguda.

**Orientador:** Adriana Lino dos Santos Franco

**Objetivos:**

Tendo em vista que a síndrome do desconforto respiratório agudo é uma importante patologia com alta mortalidade e que a LED terapia é uma ferramenta de tratamento promissora, o presente projeto terá como objetivo avaliar o efeito da terapia com LED sobre o desencadeamento de inflamação pulmonar aguda. Para isso serão investigados os parâmetros abaixo:

- O desenvolvimento de inflamação pulmonar aguda será avaliada através da contagem do número de células recuperadas no lavado broncoalveolar (LBA) e liberação e expressão gênica de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e antiinflamatórios (IL-10, IFN) no fluido do LBA e tecido pulmonar respectivamente;
- Alterações sistêmicas serão avaliadas através da contagem do número de células presentes no sangue periférico e na medula óssea;
- Avaliação de fagocitose e burst oxidativo;
- Determinação da translocação do NF $\kappa$ B e avaliação da expressão de TLR4.

**Método:**

**Indução da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) pela administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS):** Camundongos Balb/c machos adultos (~20g) provenientes do biotério de criação da Universidade Nove de Julho receberão por via intraperitoneal 5mg/kg de LPS (*Salmonella abortus equi*). A dose escolhida baseou-se em trabalho anterior (Ibrahim et al., 2015 artigo submetido) levando em consideração que a dose usada é sub-séptica (Clark et al. 2014). Após 24 h da administração de LPS as análises serão realizadas. Os animais serão eutanasiados com anestesia (quetamina+xilazina 100 and 10 mg/Kg; ip) seguida de exsanguinamento da aorta abdominal.

**Terapia com LED:** Os camundongos serão irradiados com LED (comprimento de onda de 680 nm) 1 h e 5 após a injeção com LPS em três regiões: uma abaixo da traqueia, em cada lobo pulmonar (direito e esquerdo), irradiando uma área de 0.785 cm<sup>2</sup>, com um tempo de 60s em cada ponto, totalizando 180s de exposição.

**Contagem de células presentes no LBA:** Decorridas 24 h da injeção com LPS os animais serão anestesiados com cetamina e xilasina (100 e 10mg/kg, ip) e as células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no espaço broncoalveolar serão obtidas pela técnica de lavado broncoalveolar (LBA).

**Definimento experimental;**

Usaremos em nosso estudo 4 grupos experimentais:

**Grupo Basal:** consistirá de camundongos não manipulados

**Grupo LPS:** consistirá de camundongos submetidos a injeção com LPS

**Grupo LPS + LED:** Consistirá de camundongos submetidos a injeção com LPS e tratados com LED

**Grupo LED:** Consistirá de camundongos tratados com LED

Número de animais utilizados para os experimentos: (n=6 por grupo, portanto como são 04 grupos n=24 para cada tipo de análise a seguir especificada).

24 animais: Analisaremos as células migradas para o pulmão através da técnica de LBA, avaliação do número de células no sangue, medula óssea, atividade de mieloperoxidase e coletaremos o pulmão para quantificação citocinas e TLR4 por PCR.

24 animais: Com estes grupos faremos avaliação do Burst oxidativo, fagocitose e translocação de NF- $\kappa$ B. Desde modo pretendemos utilizar um total de 48 animais num período de 2 anos.

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

Camundongo da espécie *Mus musculus* linhagem Balb/c, 48 animais. 20g do sexo masculino.

**Condições de alojamento e nutrição.**

- Alimentação ração ad libitum
- Fonte de água ração ad libitum
- Lotação - Número de animais/área 05 animais
- Exaustão do ar: sim
- Temperatura ambiente 22°C

**Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais**

Não haverá

**Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração)**

Fármaco	Cetamina
Dose (UI ou mg/kg)	100 mg/kg
Via de administração	Ip
Fármaco	Xilazina
Dose (UI ou mg/kg)	10 mg/kg
Via de administração	Ip

**Eutanásia**

Descrição	Anestesia seguida de exsanguinação pela a. aorta abdominal
Substância, dose, via	Xilazina/Cetamina, 10mg/ml - 100mg/ml, i.p.

**Pertinência e valor científico do estudo proposto**

A relevância do estudo reside no fato de a SDRA ser uma patologia importante com alta mortalidade e a LED terapia ser uma alternativa promissora como coadjuvante no tratamento de doenças inflamatórias no trato respiratório, não invasiva e com baixo custo. No entanto, seus mecanismos são pouco conhecidos necessitando ser explorados. Por isso, estudos que visam a compreensão da sinalização celular desencadeada pela LED terapia adquirem relevância.

Data de Início: 01/05/2015

Data de Término: 01/05/2017

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

 (X) 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**Comentários:**

- O investigador deve manipular com atenção o LPS no momento da diluição, utilizando EPI e capela de fluxo laminar.

- 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).

São Paulo, 14 de abril de 2015.



Prof. Dra. Kátia De Angelis  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho





Protocolo de Pesquisa referente ao ADENDO 01 do Projeto nº AN0006.2015

Título do Projeto: Avaliação dos efeitos da LED terapia em modelo experimental de Síndrome da Angústia Respiratória Aguda.

Orientador: Adriana Lino dos Santos Franco

Parecer ao Adendo

A CEUA da UNINOVE em reunião ordinária no dia 16 de março de 2016, **APROVADO o ADENDO 01 do Projeto AN 00006.2015** que solicitou 50 animais adicionais, porque no desenvolvimento do projeto surgiram perguntas que necessitavam de novas avaliações que envolvem outras metodologias. Os animais serão divididos para as seguintes avaliações: 25 animais para análises de reatividade das vias aéreas (este estudo complementa a avaliação de inflamação pulmonar) e 25 animais para avaliação de citometria de fluxo. Estes experimentos não podem ser feitos simultaneamente daí a necessidade de 25 animais para cada experimento.

São Paulo, 16 de março de 2016.

Prof. Dra. Karin Marie van der Heijden  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho