

Universidade Nove de Julho
Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

**Efeito da LED terapia sobre parâmetros
inflamatórios em modelo experimental de asma**

Vanessa Perosino Cardoso Siqueira

Orientadora: Dra. Adriana Lino dos Santos Franco

São Paulo
2016

Efeito da LED terapia sobre parâmetros inflamatórios em modelo experimental de asma

Vanessa Perosino Cardoso Siqueira

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

Orientadora: Dra. Adriana Lino dos Santos Franco

São Paulo
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Siqueira, Vanessa Perosino Cardoso.

Efeito da LED terapia sobre parâmetros inflamatórios em modelo experimental de asma. / Vanessa Perosino Cardoso Siqueira. 2016. 44 f.

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

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

1. Asma. 2. LED terapia. 3. Citocinas. 4. Produção de muco. 5. Edema. 6. Hiperreatividade das vias aéreas.
- I. Franco, Adriana Lino dos Santos. II. Título

CDU 615.831

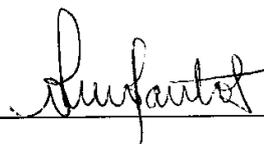
São Paulo, 07 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

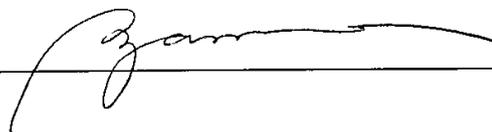
Aluna: VANESSA PEROSINO CARDOSO SIQUEIRA

Título da Dissertação: "Efeito da LED terapia sobre parâmetros inflamatórios em modelo experimental de asma"

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



Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROF^a. DR^a. ANA CRISTINA BREITHAUPT



DEDICATÓRIA

Aos meus pais por me proporcionarem na vida um alicerce intelectual para conseguir alcançar este degrau acadêmico.

Ao meu esposo que incentiva e apoia meu crescimento acadêmico e busca do crescimento profissional.

Ao meu filho, que hoje, com apenas onze meses de vida consegue, com um sorriso, repor as energias necessárias para seguir em frente mesmo nos dias de extremo cansaço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida, pois o início de tudo foi a chance de nascer e desenvolver sabedoria, amor, compaixão, força, enfim, capacidades físicas, mentais e espirituais imprescindíveis para a continuidade da vida.

Aos meus pais Orlando de Oliveira Cardoso e Maria Aparecida Perosino Cardoso por me proporcionarem condições para desenvolvimento do aprendizado e apoio para continuar o desenvolvimento acadêmico, sempre ao meu lado através de palavras, gestos de carinho e amizade.

Aos meus irmãos Antonio Carlos Perosino Cardoso e Luiz Fernando Perosino Cardoso por acreditarem em mim e em minha capacidade sempre.

Ao meu esposo Ivanilson José Siqueira, por me acompanhar em minhas decisões e me apoiar no desenvolvimento acadêmico, por ter a capacidade de me acalmar e manter o controle nos momentos difíceis e de extremo cansaço para a finalização deste trabalho com seriedade, competência exatidão científica.

Ao meu filho Matheus Perosino Cardoso Siqueira, por estar presente em minha vida e, mesmo com apenas onze meses de vida, ter a capacidade de, mesmo nos momentos onde o cansaço desgasta e consome, me fazer sorrir e repor as energias para seguir em frente e nunca desistir.

As minhas cunhadas por sempre mostrarem preocupação com o desenvolvimento deste projeto para meu crescimento acadêmico.

A minha IC Marina Izadora Silveira Evangelista pelo desenvolvimento dos experimentos deste projeto pois foi essencial e fundamental para a finalização do mesmo.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Adriana Lino dos Santos Franco que, com seu grande conhecimento, dedicação, sabedoria e paciência me orientou até o último momento, compartilhando comigo seus conhecimentos e compaixão nos momentos de necessidade, assim

como os “puxões de orelha” quando necessários que foram imprescindíveis para o sucesso e finalização deste projeto.

A Universidade Nove de Julho por proporcionar a oportunidade de desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas do Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, pelo sempre auxílio frente às necessidades e solicitações.

A todos os colegas que de alguma forma auxiliaram para o desenvolvimento deste, foram imprescindíveis para o desenvolvimento e finalização do projeto.

Expresso a todos meus sinceros agradecimentos.

“Pode um homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pelas suas próprias experiências”.

Mansour Chalita

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica caracterizada por broncoconstrição, aumento do número de células inflamatórias no espaço aéreo (eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos entre outras), perda do epitélio brônquico, aumento na secreção de muco e reatividade exacerbada do músculo liso. Considerando que a asma pode apresentar formas mais graves e resistentes aos tratamentos convencionais, novas terapias são de grande importância. Nesse sentido, as fototerapias, como a de Diodo emissor de luz (LED), tem emergido como tratamento promissor, de baixo custo e isenta de efeitos colaterais, para diversas doenças com caráter inflamatório. Deste modo, nosso objetivo foi investigar os efeitos do tratamento com LED sobre o desencadeamento de inflamação pulmonar de origem alérgica.

Camundongos machos Balb/c foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados ou não com LED (1 e 4 h após cada desafio com OVA). Após 24 horas do último desafio com OVA as análises foram realizadas. Nós priorizamos a contagem do número de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA), sangue e medula óssea, determinação da produção de muco, edema, desgranulação de mastócitos e reatividade traqueal. Ainda, investigamos a liberação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com LED reduziu a infiltração de células para o pulmão observado tanto pelo número de células totais quanto diferenciais (macrófagos, linfócitos e granulócitos). Notamos ainda redução no número de eosinófilos e neutrófilos no sangue periférico após tratamento com LED e recuperação no número de células totais na medula óssea. O tratamento com LED não alterou a liberação de citocinas inflamatórias, mas aumentou os níveis de anti-inflamatórias como IL-10 e IFN- γ . Além disso, tratamento com LED reduziu a desgranulação de mastócitos, produção de muco, edema e resposta contrátil da traquéia mediante estímulo colinérgico.

Em conclusão, o tratamento com LED reduziu diversos parâmetros inflamatórios importantes envolvidos com a piora da asma. Este estudo pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos do LED no aparelho respiratório e, além disso, abre possibilidade de uma nova abordagem para o tratamento da asma.

Palavras chaves: Asma; LED terapia; Citocinas; Produção de muco; Edema; Hiperreatividade das vias aéreas.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory lung disease characterized by bronchoconstriction, elevated number of inflammatory cells in the airways such as eosinophils, neutrophils, lymphocytes, mast cells among others; increased mucus production and hyperresponsiveness. Considering that asthma may present more severe and resistant characteristics to conventional treatments, new therapies are of great importance. Phototherapy as Light-emitting diode (LED) has emerged as a treatment that presents good results for diseases which are characterized by inflammation. Thus, our objective was to investigate the effects of LED on the development of allergic lung inflammation.

Male Balb/c mice were or not sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) and treated or not with an LED therapy (1h and 4 h after each OVA challenge). Twenty-four hours after the last OVA challenge, analyzes were performed. We prioritized to analyze the total and differential cells present in bronchoalveolar lavage (BAL), blood and bone marrow, determination of mucus production, oedema, mast cell degranulation, and tracheal responsiveness. In addition, we investigated the levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

Our results showed that LED treatment in asthmatic mice reduced the lung cell infiltration to the lung where can be observed by reduced number of both, total and differential cells (macrophages, lymphocytes and granulocytes). We also noted reduced number of eosinophils and neutrophils in the blood after LED treatment, and reestablishment of total cells found in the bone marrow. LED treatment did not alter the levels of inflammatory cytokines, but increased the levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IFN-gamma. Moreover, LED treatment reduced mast cells degranulation, mucus production, oedema, and the tracheal contractile response.

In conclusion, LED therapy reduced several important inflammatory parameters involved with worsening of asthma. Thus, this study may provide important information about the mechanisms involved in the LED effects on the respiratory tract, and in addition, it may open the possibility to a new approach for the treatment of asthma.

Key words: Asthma; LED therapy; Cytokines; Mucus production; Oedema; Airways hyperresponsiveness.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – trifosfato de adenosina

EROs – espécies reativas derivadas do oxigênio

IFN- γ – interferon “gama”

IL-10 – interleucina 10

IL-13 – interleucina 13

IL-17 – interleucina 17

IL-1 β – interleucina 1 “beta”

IL-3 – interleucina 3

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

ip – intraperitoneal

Laser- light amplification by stimulated emission of radiation = “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”

LBA – lavado broncoalveolar

LED – Light Emiting Diode = “diodo emissor de luz”

mA – miliAmper

mW – miliWats

NASA – National Aeronautics and Space Administration = “Administração Nacional do Espaço e da Aeronáutica

nm – nanômetro

OVA – ovoalbumina

PBS - phosphate buffered saline = “tampão fosfato-salino”

TNF- α – fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ASMA.....	17
1.2 LED TERAPIA	20
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS	25
3.2 INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA POR OVOALBUMINA (OVA)	25
3.3 TRATAMENTO COM LED.....	26
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
3.5 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	27
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES E NA MEDULA ÓSSEA.....	28
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NO SOBRENADANTE DO LBA	28
3.8 PCR EM TEMPO REAL PARA DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO PULMÃO	28
3.9 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO, DESGRANULAÇÃO MASTOCITÁRIA E INFILTRADO CELULAR	29
3.10 REATIVIDADE TRAQUELA <i>IN VITRO</i>	31
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	36
7 BIBLIOGRAFIA	37
ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL N° An0005/2015	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASMA

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica muito comum no mundo, que afeta parcela significativa da população (7 a 10%), com elevado custo social e econômico, estima-se que existam 300 milhões de pessoas no mundo afetadas por esta doença, com prevalência em crianças de 13 a 14 anos de idade (GINA, 2014). No Brasil cerca de 200 mil internações hospitalares são realizadas por ano apenas no serviço público de saúde, gerando um gasto médio anual de R\$ 120 milhões (GINA, 2014; POLITO, 2005).

A asma é caracterizada por broncoconstrição, espessamento das paredes das vias aéreas devido ao aumento do número de células inflamatórias no espaço aéreo (eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos entre outras), perda do epitélio brônquico, aumento na secreção de muco e reatividade exacerbada do músculo liso (GINA, 2014; BICE *et al.*, 2000). Segundo a Global Initiative For Asthma, os elementos celulares envolvidos causam hiperreatividade das vias aéreas, levando a episódios recorrentes de sibilos, dispneia, tiragem intercostal e tosse, mais acentuados pela manhã e a noite, estando estes associados a obstrução difusa, variável ao fluxo aéreo, porém frequentemente reversível espontaneamente e com tratamento. Durante o processo inflamatório mecanismos associados ao reparo e restauração da estrutura e função pulmonar são desencadeados, admite-se que estes mecanismos sejam uma resposta protetora e benéfica. Estímulos diversos podem desencadear a hiperreatividade presente no quadro asmático, como alérgenos, fumaça de cigarro, poluentes atmosféricos, fármacos, alterações na temperatura ambiental, infecções respiratórias, estímulos ocupacionais, substâncias presentes em alimentos, obesidade, exercício físico e estresse; no entanto, na asma devido ao processo inflamatório contínuo ou recorrente ocorrem lesões

teciduais com subseqüentes modificações no aparelho respiratório, resultando em reparo tecidual inadequado denominado de remodelamento das vias aéreas (GINA, 2007).

Avaliando as características fisiopatológicas da asma é possível distinguir duas fases, a imediata e a tardia. A fase imediata ocorre minutos após a exposição ao antígeno, é caracterizada pela obstrução das vias aéreas devido à broncoconstrição, aumento de muco e edema, os quais são decorrentes dos efeitos dos mediadores liberados por mastócitos ativados por antígeno. Mastócitos ativados liberam grande variedade de mediadores inflamatórios tais como, aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteases, espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), heparina, interleucinas, citocinas entre outros, os quais podem iniciar e/ou modular a resposta inflamatória (GALLI *et al*, 2005; BRADDING, 2003).

A fase tardia da asma ocorre horas após a exposição antigênica, estando associada a hiperreatividade brônquica e principalmente inflamação eosinofílica, é caracterizada pela presença de intenso infiltrado celular pulmonar (eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e linfócitos) e estas células ativadas promovem a liberação de diversos mediadores, os quais atuando no microambiente pulmonar determinam lesão epitelial, ativação de nervos sensoriais, secreção de muco, hiperreatividade brônquica e remodelamento (HAWORTH & LEVY, 2007; TALATI *ET AL.*, 2006).

O remodelamento é caracterizado pelo aumento das fibras colágenas acarretando em maior deposição de colágeno nas vias aéreas e envolve fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia da célula muscular lisa, inflamação das vias aéreas, perda da integridade da cartilagem, angiogênese, espessamento da membrana basal *reticularis*, hiperplasia das células caliciformes epiteliais e também deposição de proteínas na matriz extracelular (BURGESS, 2010; DEKKERS *et al*, 2009). Ainda, células epiteliais liberam diversos mediadores, entre eles fatores de crescimento, os quais podem contribuir para o remodelamento na asma (DEKKERS *et al*, 2009).

As alterações causadas na musculatura lisa das vias aéreas ocasionadas pelo remodelamento acarretam em redução da capacidade de relaxamento das vias aéreas e aumento da produção de citocinas e matriz extracelular. Nesse contexto, durante o remodelamento observado na asma, as células musculares lisas desempenham importante papel com função imuno-efetora por meio de sua proliferação, liberação de citocinas, modulação de moléculas de adesão e interação com diversas células inflamatórias (HIRST *et al.*, 2000).

No processo de desenvolvimento da asma, a crise está diretamente relacionada ao fator desencadeante, iniciando o quadro asmático pela sensibilização após o contato dos alérgenos inalados com a mucosa respiratória, uma vez existido o contato, estes alérgenos retidos no muco são capturados pelas células dendríticas do epitélio brônquico, estas células reconhecem, processam e apresentam fragmentos destes antígenos aos linfócitos T auxiliares, estes linfócitos respondem através da liberação de citocinas, principalmente interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, caracterizando uma resposta humoral, esta resposta induz a proliferação de linfócitos T helper 2, que liberam IL-4 e outras citocinas (HOLGATE, 1993).

As citocinas liberadas pelos linfócitos T estimulam a produção de imunoglobulinas IgE pelos linfócitos B, a proliferação de mastócitos, ativação de eosinófilos e aumento da sobrevivência deste. Os mastócitos presentes na circulação apresentam grande afinidade pelos anticorpos liberados na circulação, desta forma, quando há uma reexposição ao antígeno, este se liga à IgE nos mastócitos, que liberam mediadores com capacidade de abrir as junções entre as células epiteliais. Pode-se dizer que o antígeno entra na mucosa e ativa mastócitos e eosinófilos, que liberam mais mediadores; diretamente ou por reflexos neuronais, estes mediadores liberados no processo induzem broncoespasmo, aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de muco, e recrutamento de células secretoras de mediadores inflamatórios (GALLI *et al.*, 2005).

Outro aspecto importante a ser considerado na asma é a produção de muco. O aumento da produção de muco ocasiona o bloqueio das vias aéreas, contribuindo de forma significativa para a obstrução do fluxo de ar e em casos mais severos contribuindo para morte.

Diversos estudos têm possibilitado uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia da asma. À medida que o conhecimento se acumula, há também um aumento de possíveis alvos terapêuticos visando um melhor controle da doença e qualidade de vida do paciente. Nesse contexto, terapias que melhorem o desconforto respiratório de pacientes com doenças respiratórias como a asma, que reduzam os custos despendidos e os efeitos colaterais são de grande importância.

1.2 LED TERAPIA

A terapia luminosa, devido aos seus benefícios, vem sendo utilizada para o tratamento de diversas patologias há milênios. Constitui uma das mais antigas modalidades terapêuticas (BAROLET, 2008). Endre Mester, médico húngaro da década de 60, avaliou o potencial carcinogênico do laser (rubí, 694nm) em ratos. O médico através de seu estudo mostrou que o laser não induzia câncer, mas proporcionava o crescimento dos pêlos nos animais. Através desta observação, Endre foi o pioneiro em demonstrar que a terapia com laser de baixa intensidade exercia seus efeitos biológicos por fotobioestimulação. Sequencialmente, diversos estudos foram realizados a fim de ampliar os conhecimentos acerca dos mecanismos operantes e efeitos biológicos do laser (BAROLET, 2008).

Atualmente a fototerapia emerge como uma terapia alternativa, apresentando bons resultados para diversas doenças com caráter inflamatório, incluindo doenças pulmonares como a asma. Dentre as terapias usadas para patologias que acometem o pulmão, alguns estudos têm demonstrado efeitos promissores do laser de baixa intensidade devido suas ações

anti-inflamatórias e antioxidantes, ao baixo custo e a ausência de efeitos colaterais (LANDYSHEV et al., 2002; AIMBIRE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2014). Outra promissora fototerapia que tem sido pouco estudada é a LED terapia.

LED (light emitting diode) são diodos semicondutores de luz que estão sendo utilizados na prática fisioterapêutica para acelerar os processos cicatriciais em estudos experimentais. Estes diodos convertem corrente elétrica em um espectro luminoso estreito e a energia liberada pelo LED não é suficiente para causar danos aos tecidos humanos, não oferecendo assim o mesmo risco aos olhos como o oferecido pelo LASER, inclusive a terapia luminosa por luz visível e infravermelha já é considerada de risco insignificante pelo FDA (BAROLET, 2008). A emissão de luz LED é monocromática, não coerente e não colimada, o que a difere da luz LASER (ANDRADE *et al.*, 2001). Entretanto, a LED terapia tem se mostrado tão eficiente quanto a laser terapia, já que a coerência da luz do LASER não é responsável pelos efeitos da terapia, haja vista que esta propriedade se perde nas primeiras camadas de tecido biológico (DALL *et al.*, 2009). O LED não é térmico, nem tóxico nem invasivo, além de não apresentar relatos de efeitos colaterais em literatura, o que o torna seguro (BAROLET, 2008).

A luz LED possibilitou uma alternativa eficaz ao laser, uma vez que pode ser produzida através de múltiplos arranjos em forma de cluster, abrangendo desta forma, áreas maiores, com mais potência, menos tempo de tratamento e menor custo. É importante mencionar que o custo de um equipamento de LED é bem menor que de um LASER, possibilitando assim o acesso ao tratamento de pessoas com baixa condição econômica.

Um contexto interessante a salientar é o uso do LED pela NASA. Esta agência desenvolveu LEDs para experimentos objetivando o crescimento de plantas no espaço, porém observaram que a radiação luminosa emitida pelo LED foi promissora em tecidos corporais promovendo a cicatrização de feridas e crescimento tecidual, acelerando de forma impactante

o processo de cicatrização de feridas, reduzindo risco de infecção e barateando o custo do tratamento.

Casalechi *et al.* (2009) demonstraram a efetividade da LED Terapia no processo de regeneração do tendão de Aquiles através da diminuição no número de fibroblastos e melhora na qualidade do remodelamento. Ainda, Al-Watban e Andres (2003) demonstraram que os efeitos do tratamento com LED no processo de cicatrização de queimaduras em ratos não diabéticos foram insignificantes, porém em ratos diabéticos o tratamento foi eficiente. Outro estudo analisou LED's com diferentes comprimentos de ondas (azul e vermelho) para o tratamento de desordem afetiva sazonal e concluíram que o tratamento com LED azul diminuiu significativamente os escores em relação ao LED vermelho (GLICKMAN *et al.*, 2005). Ainda nessa linha de estudo, Vinck et al. (2005) estudaram a eficácia do LED verde na proliferação e na viabilidade de fibroblastos sob condições hiperglicêmicas. Este estudo concluiu que a irradiação com LED verde em fibroblastos, sob condições hiperglicêmicas, aumentou a proliferação celular. Caetano et al. (2009) mostraram que úlceras venosas quando tratadas com LED cicatrizaram mais rápido quando comparado ao grupo controle e ao placebo. Deste modo, os estudos com LED disponíveis na literatura ainda são poucos e com relação a doenças pulmonares são escassos. Estudo realizado por Wang et al. (2014) mostrou que o laser de baixa intensidade diminuiu o número de células totais e de eosinófilos no LBA assim como também reduziu os níveis de IL-4 e aumentou de IFN- γ . Foram ainda observados níveis séricos reduzidos de IgE e recuperação do equilíbrio no balanço Th1/Th2 após tratamento com laser. Nesse estudo os autores compararam os efeitos de um anti-inflamatório esteroideal (budesonida) com o laser e os achados sugerem efeitos semelhantes de ambos.

A foto estimulação da luz LED atua sobre as células interferindo na sua permeabilidade, atuando nas mitocôndrias, na síntese de ATP e em proteínas como colágeno e elastina. Age ainda como antimicrobiano e anti-inflamatório. Apesar de a LED terapia ainda ser pouco estudada, alguns trabalhos já mostram algumas vantagens em relação a laser terapia tais como custo, maior superfície de abrangência impactando em otimização do seu uso, possibilidade de arranjos na forma de clusters entre outros. No entanto, em doenças pulmonares não existem ainda estudos usando a terapia com LED, desta forma, este projeto apresenta, pela primeira vez, os efeitos benéficos da LED Terapia em modelo experimental de asma.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista que a asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica com elevado custo social, econômico e com significativa interferência na qualidade de vida do paciente, o presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito da LED terapia em modelo experimental de asma.

Para tanto, os seguintes parâmetros foram investigados:

- Número total de células migradas para o espaço alveolar através da técnica do Lavado broncoalveolar (LBA), objetivando análise do desenvolvimento da inflamação após tratamento com LED;
- Número de macrófagos, linfócitos e granulócitos através de citometria de fluxo, objetivando analisar os diferentes tipos celulares presentes no LBA após LED;
- Número de células presentes no sangue periférico e na medula óssea visando compreender se o processo de mobilização celular seria influenciado pelo LED;
- Mediadores inflamatórios (IL-4, IL-1 β , IL-17, TNF- α) e anti-inflamatórios (IL-10, IFN- γ) através da quantificação no sobrenadante do fluido do LBA a fim de investigar os efeitos do LED sobre a liberação destes mediadores;
- Expressão gênica de citocinas IL-4, IL-1 β , IL-17, TNF- α , IL-10 e IFN- γ no tecido pulmonar pela técnica de RT-PCR visando avaliar a expressão gênica de mediadores após tratamento com LED;
- Avaliação histológica do infiltrado inflamatório, produção de muco, edema e desgranulação mastocitária após tratamento com LED.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Balb/c machos adultos (~ 20g) provenientes do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e mantidos no biotério de experimentação da mesma Universidade sob condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C).

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Nove de Julho com protocolo nº AN0005/2015, conforme anexo 1.

3.2 INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR INDUZIDA POR OVOALBUMINA (OVA)

Grupos de animais receberam 10 µg de ovoalbumina (OVA, grau II) dissolvidas em alúmen (10 mg) por via subcutânea. Após 7 dias da sensibilização os animais receberam o reforço pela mesma via e no 12º, 13º e 14º dia foram bronco provocados com solução de ovoalbumina (1%). As sessões de inalação foram realizadas por 15 min, colocando 5 animais por sessão em caixa plástica (20 L) acoplada a um nebulizador ultrassônico (Icel®) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 a 1,0 µ. O período total de 14 dias de sensibilização foi embasado no estudo de Coleman *et al.* (1983), que descreve que após a injeção intraperitoneal de ovoalbumina emulsificada em alúmen, os níveis circulantes de anticorpos (IgE) aumentam rapidamente entre 7 e 14 dias. Os experimentos foram conduzidos 24 horas após a última broncoprovocação.

3.3 TRATAMENTO COM LED

Os animais foram irradiados com LED (parâmetros estão descritos na tabela abaixo) 1 e 4 h após os desafios com OVA. O aparelho respiratório foi irradiado por 150 s (1 ponto de aplicação abrangendo a traqueia e os dois lobos pulmonares).

Comprimento de onda	Potência	Densidade de energia	Densidade de potência	Área	Energia total	Tempo
660 nm	100mW	5,3J/cm ²	33,3mW/cm ²	2,8cm ²	15J	150s

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

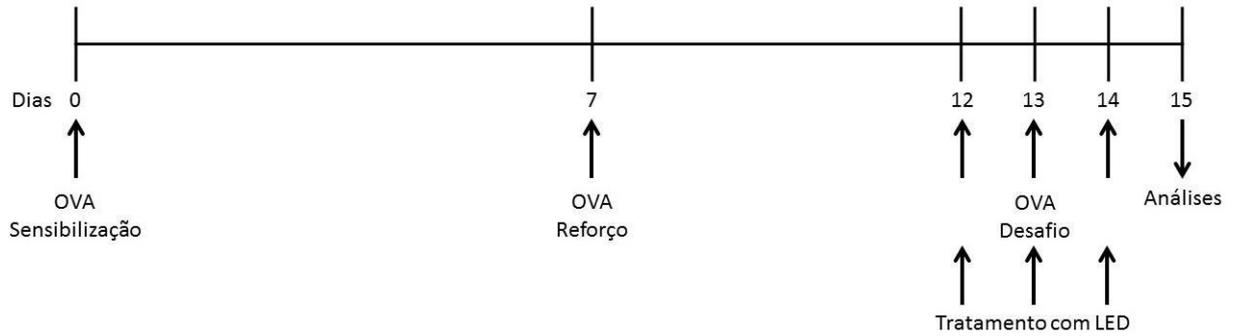
Usamos em nosso estudo 4 grupos experimentais:

Grupo Basal: consistiu de grupos de camundongos não manipulados para obtenção de parâmetros basais

Grupo OVA: Grupo de camundongos asmáticos

Grupo LED: Grupo de camundongos tratados com LED

Grupo OVA+LED: grupos de camundongos asmáticos tratados com LED



3.5 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS PRESENTES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Decorridas 24 h do último desafio com OVA, os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina (100 e 20mg/kg, ip) e as células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no espaço broncoalveolar foram obtidas pela técnica de lavado broncoalveolar (LBA) de acordo com De Lima et al. (1992). A contagem total de células foi feita em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

A contagem diferencial de células foi realizada por citometria de fluxo. Para tanto, células do lavado broncoalveolar foram incubadas com anticorpos monoclonais de superfície anti-CD3 FiTC ,anti-CD11b PercP e anti-Ly6G (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA) para caracterização fenotípica dos linfócitos, macrófagos e granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) respectivamente. As células foram incubadas por 20 minutos a 4° C e após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 0,01% de BSA e azida sódica e ressuspendidas em 200 µl do mesmo tampão. As amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD Accuri analisadas no software CSampler (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES E NA 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 PBS seguido de centrifugação, ressuspensão e contagem em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NO SOBRENADANTE DO LBA

Os mediadores inflamatórios e anti-inflamatório foram quantificados por ELISA em amostras de fluido do LBA. Para tanto, foram utilizados Kits Duo Set disponíveis comercialmente Biolegend. 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 CITOCINAS NO PULMÃO

Para realização do PCR em tempo real foram utilizados fragmentos de pulmão obtidos dos animais após os protocolos mostrados acima. Tais fragmentos foram colocados em tubos eppendorfs DNase RNase *free* e mantidos em Trizol até a extração do RNA. Nas amostras foram adicionadas 200 µl de clorofórmio e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Esta solução foi centrifugada (12.000g, 15 min. a 4°C) e o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,5 ml de isopropanol. Em seguida, esta solução foi incubada por 1 hora e então centrifugada novamente (12.000g, 15 min. a 4°C). O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foi adicionado 1 ml de etanol 75% e

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

3.9 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO, DESGRANULAÇÃO MASTOCITÁRIA E INFILTRADO CELULAR

Após lavagem do pulmão com solução fixadora ISOTON® o lóbulo maior de cada pulmão foi separado e mantido em solução fixadora de Bouin por 18 h e após a parafinização e emblocamento o material foi cortado a 5 µm de espessura e corado como descrito em Reinhard et al. (2005). As secções dos pulmões foram coradas com hematoxilina/eosina (H&E) para avaliação do infiltrado celular, azul de toluidina para avaliação de mastócitos e as

células produtoras de muco foram investigadas pela coloração com ácido periódico de Schiff (PAS). Todos os cortes foram examinados, através de análise cega pelos examinadores, usando microscópio Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha) com ampliações de x 10 e x 40.

Abaixo estão descritos os escores usados para as avaliações histológicas.

Acúmulo de muco: 0, ausente; 1, presença descontínua na superfície epitelial; 2, presença de metaplasia de células calciformes no epitélio brônquico e contínua na superfície epitelial; 3 presença de metaplasia de células calciformes no epitélio brônquico e uma camada de muco espesso na superfície epitelial; 4, uma obstrução parcial da luz bronquiolar por uma camada de muco. Edema: 0, ausente; 1, presença mínima de plasma no tecido intersticial; 2, presença de grandes quantidades de plasma no tecido intersticial; 3, presença de plasma e células vermelhas do sangue no espaço intersticial; 4, abundante presença de células, de plasma e glóbulos vermelhos no espaço intersticial. **Infiltração Perivascular:** 0, ausente; 1, presença de leucócitos descontínua em torno do vaso sanguíneo; 2, presença de monocamada contínua dos leucócitos em torno do vaso sanguíneo; 3, presença de leucócitos e camada contínua contendo dois ou três células de espessura em torno do vaso sanguíneo; 4, presença de leucócitos e camada contínua que contém mais do que quatro células de espessura em torno do vaso sanguíneo. **Infiltração peribrônquica:** 0, ausente; 1, presença de leucócitos descontínua em torno dos bronquíolos; 2, presença de monocamada contínua dos leucócitos em torno dos bronquíolos; 3, presença de leucócitos camada contínua contendo dois ou três células de espessura em torno dos bronquíolos; 4, presença de leucócitos camada contínua que contém mais do que quatro células de espessura em torno dos bronquíolos. **A ativação de mastócitos:** 0, a presença de mastócitos intactos; 1, presença de 25% de mastócitos ativados; 2, presença de 50% de mastócitos ativados; 3, presença de 75% de mastócitos ativados; 4, na presença de 100% de mastócitos ativados.

3.10 REATIVIDADE TRAQUEAL *IN VITRO*

Após a sensibilização e desafio alérgico os animais foram sacrificados por excesso de anestésico (quetamina+xilasina (100 and 10 mg/Kg) ip) e exsanguinados. A seguir o tórax foi aberto e a traquéia foi removida e montada para registro isométrico de contrações em cubas para órgão isolado (15 ml) contendo solução de Krebs-Henseleit aerada com 95% e 5% CO₂ com a seguinte composição (mM): NaCl, 115.0; KCl, 4.6; CaCl₂ 2. H₂O, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄. 7 H₂O, 2.5; NaHCO₃, 25.0 e glicose 11.0.

Os segmentos de traquéia foram expostos a uma carga inicial de 1g de tensão. Após a carga inicial o tecido permaneceu em repouso por um período de 40 minutos para a estabilização. Decorrido esse período, a tensão foi reajustada para 1g e a capacidade contrátil foi avaliada pela adição de um agonista colinérgico (metacolina, 10⁻³ M).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4 RESULTADOS

Dados fornecidos pelo artigo **"Light-Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin"**, publicado pela **Journal of Biophotonics**, pelos autores e coautores Vanessa Perosino Cardoso Siqueira, Marina Izadora Silveira Evangelista, Rodrigo Labat Marcos, Ana Paula Ligeiro-de-Oliveira; Christiane Pavani, Amílcar Sabino Damazo, Adriana Lino-dos-Santos-Franco. (no prelo).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos os efeitos do tratamento com LED sobre parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos em modelo experimental de asma induzida por ovoalbumina (OVA). Utilizamos um modelo bem estabelecido da literatura que se caracteriza por um aumento no número de células totais e granulócitos no LBA, liberação de citocinas, produção de muco, edema e hiperreatividade brônquica (MAIELLARO *et al.*, 2014; 2016).

A proposta apresentada nesse estudo contempla uma nova abordagem de tratamento a base de luz para doenças inflamatórias pulmonares. O princípio da bioestimulação promovida pelo tratamento à base de luz, mais especificamente luz laser, foi introduzido a mais de 30 anos, sendo aplicado primariamente na dermatologia para acelerar a cicatrização, para tratamento de aftas, herpes labial, quelite angular, trismo, parestesias, hipersensibilidade dentária e no pós-operatório (CAMELO, 2007). Recentemente o laser tem sido estudado para tratamento de doenças inflamatórias pulmonares em modelos experimentais em animais (PERON *et al.*, 2015; DE LIMA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MIRANDA DA SILVA, 2015; SILVA MACEDO *et al.*, 2016) bem como em humanos (LANDYSHEV *et al.*, 2002; FARADZHEVA, 2007; KASHANSKAIA AND FEDOROV, 2009).

Os estudos avaliando os efeitos biológicos da LED terapia são mais recentes, porém são tão eficazes quanto o laser. Alguns aspectos tornam o LED mais vantajoso que o laser, tais como menor custo, abrangência de áreas maiores, otimização do tempo de irradiação entre outros.

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. Nossos resultados mostraram que o tratamento com LED apresentou significativos efeitos anti-inflamatórios, uma vez que reduziu o infiltrado pulmonar desencadeado pela

OVA, o qual é caracterizado pelo aumento no número de linfócitos, macrófagos e granulócitos no espaço broncoalveolar.

Estudos realizados por Wang et al. (2014) mostraram, apesar de a luz utilizada pelo estudo de Wang ter características diferentes da que utilizamos nesse estudo, que o laser de baixa intensidade diminuiu o número de células totais e de eosinófilos no LBA assim como também reduziu os níveis de IL-4 e aumentou de IFN- γ em modelo experimental de asma induzido por ovoalbumina, nosso estudo corrobora com os estudos de Wang et al. citados, uma vez que esses dados reforçam que os efeitos biológicos da luz LED e da luz laser são semelhantes. Além disso, pudemos comprovar histologicamente a redução no infiltrado celular pulmonar após tratamento com LED.

A irradiação do LED foi feita localmente diretamente no aparelho respiratório sobre a pele, e aparentemente seus efeitos não estão circunscritos ao local da injúria, já que notamos efeitos sistêmicos que puderam ser observados pelo aumento no número de células presentes na medula. No entanto, entendemos que esta diferença de resposta na medula possa decorrer do processo de mobilização celular induzido pela OVA e bloqueado pelo LED devido aos efeitos anti-inflamatórios locais diretos no aparelho respiratório. Deste modo, admitimos que com a redução da inflamação pulmonar o estímulo no local da lesão (pulmão) diminui de modo afetando a mobilização das células da medula para a circulação. O mesmo raciocínio é válido para explicar a reduzida celularidade sanguínea, a qual nem mesmo no grupo alérgico mostrou-se muito alterada. Entretanto, no grupo alérgico (OVA) podemos inferir que houve uma redução das células da medula devido ao processo de migração, onde as mesmas se mostraram aumentadas no pulmão. Já no grupo tratado com LED, acreditamos que com a redução do recrutamento celular pulmonar, houve uma redução na saída das células da medula, o que explicaria o aumento observado no grupo OVA+LED.

Reconhecendo que não só o número de células, mas principalmente, o seu estado funcional é importante para o desenvolvimento e amplificação da resposta inflamatória, a seguir foram investigados os efeitos do LED sobre a liberação e expressão gênica de citocinas no tecido pulmonar.

Nossos dados mostraram níveis elevados de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a IL-10 e IFN- γ após o tratamento com LED. No entanto, não foram observadas diferenças na liberação de citocinas inflamatórias importantes como IL-4, IL-1 β , TNF- α e IL-17. Assim, acreditamos que o LED promove os seus efeitos pelo restabelecimento da homeostasia, aumentando os mecanismos de defesa do organismo. Sabe-se que a IL-10 e o IFN- γ são importantes citocinas anti-inflamatórias que regulam o influxo celular por reduzir a expressão de moléculas de adesão.

Embora a liberação de IL-10 tenha aumentado, observamos redução na sua expressão gênica. Este resultado pode ser explicado pelo momento em que as análises foram feitas. Tanto a liberação de citocinas como a expressão gênica foram avaliadas no mesmo tempo. Assim, esta redução na expressão gênica de IL-10 pode eventualmente refletir uma exaustão do sistema. É razoável admitir que um aumento na sua expressão tenha ocorrido anteriormente ao período em que analisamos. Com relação à expressão gênica das demais citocinas (IL-4, TNF- α , INF- γ , IL-17, IL-1 β), nós não notamos alterações entre os grupos tratados e não tratados. Tais resultados ficaram coerentes com os relacionados com a liberação destas mesmas citocinas.

Reconhecendo o importante papel dos mastócitos no desencadeamento de inflamação alérgica pulmonar, sequencialmente investigamos o papel do LED na desgranulação dos mastócitos. É bem estabelecido que após ativação, mastócitos liberam mediadores inflamatórios os quais modulam a migração celular, a produção de muco, edema e hiperretividade brônquica (GALLI, 2005). Os nossos dados mostraram que o tratamento com

LED reduziu significativamente a desgranulação mastocitária e este efeito pode ser o responsável pela menor migração celular pulmonar, menor produção de muco e edema assim como menor resposta contrátil da traquéia.

Tomados em conjunto, nossos dados apontam para efeitos promissores da luz LED para o tratamento de doença inflamatória pulmonar na qual mastócitos estejam envolvidos.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os nossos resultados mostraram que o tratamento com LED aumentou a liberação de IL-10 e IFN- γ e diminuiu a desgranulação mastocitária. Estes eventos contribuíram para um menor recrutamento celular pulmonar, menor produção de muco, edema além da reduzida resposta contrátil traqueal.

Este estudo pode fornecer informações importantes sobre os efeitos biológicos do LED além de abrir a possibilidade de uma nova abordagem para o tratamento da asma com menor custo e menor efeito colateral.

7 BIBLIOGRAFIA

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.*, v. 38, n. 8, p. 773-8; 2006.

AL-WATBAN, F.A.H., ANDRES, B.L., Polychromatic led therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. *Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery*, v. 21, n.5, p.249-258, 2003.

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

BAROLET, D. Light-emitting diodes (led) in dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, v. 27, p. 227-238, 2008.

BICE, E.; SEAGRAVE, J. C. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal. Toxicol.*, v. 12, p. 829–862, 2000.

BRADDING, P.; FEATHER, I. H.; HOWARTH, P. H.; MUELLER, R.; ROBERTS, J. A.; BRITTEN, K.; BEWS, J. P.; HUNT, T. C.; OKAYAMA, Y.; HEUSSER, C. H. et al. Interleukin 4 in localized to and released by human mast cells. *J. Exp. Med.*, v. 176, p. 1381-1386, 1992.

BURGESS JK1, BOUSTANY S, MOIR LM, WECKMANN M, LAU JY, GRAFTON K, BARAKET M, HANSBRO PM, HANSBRO NG, FOSTER PS, BLACK JL, OLIVER BG. Reduction of tumstatin in asthmatic airways contributes to angiogenesis, inflammation, and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Jan 15;181(2):106-15.

CAETANO, K.S. et al. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 27, n.1, p.111-118, 2009.

CAMELO FP. Avaliação clínica do efeito da irradiação pós-operatória do laser de baixa intensidade na cicatrização de gengivoplastias em humanos [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

CASALECHI HL1, NICOLAU RA, CASALECHI VL, SILVEIRA L JR, DE PAULA AM, PACHECO MT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci.* 2009, 24(4):659-65.

COLEMAN, J. W.; LAYTON, G. T.; STANWORTH, D. R. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cell: temporal dissociation from circulating levels of IgE. **Eur. J. Immunol.**, v. 13, p. 994–998, 1983.

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, W. T.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 213, p. 63-70, 1992.

DE LIMA FM, AIMBIRE F, MIRANDA H, VIEIRA R DE P, DE OLIVEIRA AP, ALBERTINI R. 2014. 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.*; 5(2):63-70.

DEKKERS BG, MAARSINGH H, MEURS H, GOSENS R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009, (8):683-92.

FARADZHEVA, N.A. 2007. Efficiency of a combination of haloaerosols and helium-neon laser in the multimodality treatment of patients with bronchial asthma. *Prob. Tuberk Bolezn Legk*, 8: 50–53.

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.

GALLI, S. J.; KALESNIKOFF, J.; GRIMBALDESTON, M. A.; PILIPONSKY, A. M.; WILLIAMS, C. M.; TSAI, M. Mast cells as tunable effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 23, p. 749-786, 2005.

GINA, NHLBI, WHO, 2016.

GLICKMAN, G. et al. Light therapy for seasonal affective disorder with blue narrow-band light-emitting diodes (leds). *Society of Biological Psychiatry*, v.59, p.502-507, 2006.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global strategy management and Prevention Program. National Heart, Lung and Blood Institute/World Health Organization. Workshop Report. Washington, U.S. Department of Health, Education, and Welfare. 2002. Publication No. 02-3659.

HAWORTH O, LEVY BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. **Eur Respir J.** 30(5):980-92, 2007.

HIRST SJ, WALKER TR, CHILVERS ER. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma. *Eur Respir J.* 2000 ; 16(1):159-77. Review.

HOLGATE, S.; PETERS-GOLDEN, M.; PANETTIERI, R. A.; HENDERSON, W. R. J. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function and remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 111, n. 1, p. 18-34, 2003.

KASHANSKAIA, E.P. AND FEDOROV, A.A. 2009. Low-intensity laser radiation in the combined treatment of patients with chronic obstructive bronchitis. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*, 2:19–22.

KERSON, B.V.D, JUNIOR, L.C.C., de PAULO, R. J. F., GOMES, A. C. *Ensaio e Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde. LEDTERAPIA : Uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doenças da pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual.* v.15, n.6, p.231-248, 2011.

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*, v. 74, p. 25–28, 2002.

MAIELLARO M, MACEDO RS, MENDES E, TAVARES-DE-LIMA W, FERREIRA CM, LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A. High dose of formaldehyde exposure during pregnancy increases neutrophils lung influx evoked by ovalbumin in the offspring. *Inflamm Res*. 2016, 65(3):179-81.

MAIELLARO M, CORREA-COSTA M, VITORETTI LB, GIMENES JÚNIOR JA, CÂMARA NO, TAVARES-DE-LIMA W, FARSKY SH, LINO-DOS-SANTOS-FRANCO A. Exposure to low doses of formaldehyde during pregnancy suppresses the development of allergic lung inflammation in offspring. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014, 278(3):266-74.

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.

OLIVEIRA MC JR, GREIFFO FR, RIGONATO-OLIVEIRA NC, CUSTÓDIO RW, SILVA VR, DAMACENO-RODRIGUES NR, ALMEIDA FM, ALBERTINI R, LOPES-MARTINS RA, DE OLIVEIRA LV, DE CARVALHO PD, 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*, 4;134C:57-63, 2014.

PERON JP, DE BRITO AA, PELATTI M, BRANDÃO WN, VITORETTI LB, GREIFFO FR, DA SILVEIRA EC, OLIVEIRA-JUNIOR MC, MALUF M, EVANGELISTA L, HALPERN S, NISENBAUM MG, PERIN P, CZERESNIA CE, CÂMARA NO, AIMBIRE F, VIEIRA RDE P, ZATZ M, LIGEIRO DE OLIVEIRA AP. 2015. Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice. *PLoS One*;10(8):e0136942.

SILVA VR, MARCONDES P, SILVA M, VILLAVERDE AB, CASTRO-FARIA-NETO HC, VIEIRA RP, AIMBIRE F, DE OLIVEIRA AP. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol.*, n. 1, v. 194:, p. 37-48, 2014.

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.

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

VINCK, E.M. et al. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblasts growth impaired by high glucose level. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 23, n.2, p. 167-171, 2005.

WANG XY1, MA WJ, LIU CS, LI YX. Effect of low-level laser therapy on allergic asthma in rats. *Lasers Med Sci.* 2014, 29(3):1043-50.

ANEXOS

ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Nº An0005/2015



Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nºAn0005/2015

Título do Projeto: Efeito da LED terapia em modelo de asma experimental induzido por *house dust mite*

Orientador: Adriana Lino dos Santos Franco

Objetivos: avaliar o efeito da LED terapia em modelo experimental de asma

Método: o modelo experimental de asma será desenvolvido como ministração intranasal de HDM. Para tal, os animais são anestesiados e seguidamente submetidos a *Dermatophagoides pteronyssinus* diluído em PBS nos respectivos dias: 7, 14, 21, 28, 35 e 42. Irradia-se com LED regiões abaixo da traqueia e os respectivos lobos pulmonares com 1h00 e 5h00 pós 3 últimas exposições com HDM. Após 24h00, os animais serão anestesiados para determinação da mecânica ventilatória e sacrificados para coleta de material biológico para dosagem de diferentes marcadores moleculares.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo): 96 camundongos (machos) Balb/c de ~20g e oriundos da Uninove.

Condições de alojamento e nutrição: alocados no biotério da Uninove, sem restrição hídrica e alimentar.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: procedimento anestésico convencional para roedores.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração): mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), i.p.

Eutanásia

Uso de mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), i.p. seguida de exsanguinação pela aorta abdominal

Pertinência e valor científico do estudo proposto: o estudo proposto poderá fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos que medeiam a asma, bem como permitirá propor alternativas terapêuticas para esta importante doença. Contribuiremos ainda, para a compreensão dos mecanismos operantes da LED terapia. Ressalto que a LED terapia merece destaque uma vez que tem se mostrado tão eficiente quanto a laser terapia.

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:

- 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