

UNINOVE



Universidade Nove de Julho

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

Robson Alexandre Brochetti

**O Papel da luz de diodo infravermelho em
modelo experimental de asma resistente a
corticoide**

São Paulo, SP

2021



Robson Alexandre Brochetti

O Papel da luz de diodo infravermelho em modelo experimental de asma resistente a corticoide

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lino dos Santos Franco

São Paulo, SP

2021

Brochetti, Robson Alexandre.

O Papel da luz de diodo infravermelho em modelo experimental de asma resistente a corticoide. / Robson Alexandre Brochetti. 2021.

63 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

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

1. Asma resistente a corticosteroides. 2. Fotobiomodulação. 3. Diodo emissor de luz infravermelha. 4. Interleucinas. 5. Mastócitos. 6. Eicosanoides.

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

CDU 615.831

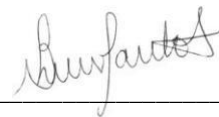
São Paulo, 09 de dezembro de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Robson Alexandre Brochetti

Título da Tese: “O papel da luz de diodo infravermelho em modelo experimental de asma resistente a corticóide”.

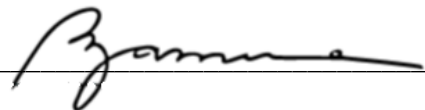
Presidente: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



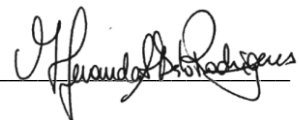
Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



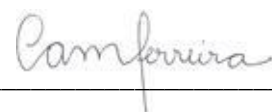
Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROF^a. DR^a. CAROLINE MARCANTÔNIO FERREIRA



Dedico este trabalho aos meus pais, Ronaldo Brochetti e Loredana da Mota Brochetti, o berço do meu destino.

Aos meus irmãos, Lígia Maria, Rodrigo Emanuel e Luciana Cristina, pela sublime paciência e caridade do convívio diário.

As minhas filhas, Isabella e Luisa, pelo templo aberto ao coração com amor, ternura e dedicação.

Aos meus avós Arnaldo e Ignês (*in memoriam*); Guilherme e Antônieta (*in memoriam*) fatores inspiradores que levaram a acreditar no meu sonho.

A minha esposa Christiane Pavani, pela dedicação e transmissão de seus conhecimentos com o intuito de me guiar para alcançar meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, fornecendo saúde, conhecimento, determinação, força, foco e fé para superar todas as dificuldades encontradas ao longo desta trajetória.

Aos meus pais Ronaldo Brochetti e Loredana da Mota Brochetti pelo amor, incentivo e apoio incondicional e berços inspiradores do meu sonho.

Aos meus irmãos Ligia Maria Brochetti, Rodrigo Emanuel Brochetti e Luciana Cristina Brochetti por acreditarem em mim.

As minhas filhas Isabella Solange Tagliapietra Brochetti e Luisa Orlandin Brochetti, por estarem presentes na minha vida e serem fonte de energia e inspiração.

A minha esposa Christiane Pavani, por ter depositado toda confiança, paciência, conhecimento e credibilidade para que eu pudesse alcançar meu sonho.

Aos meus tios Romeu Nicolau Brochetti, Dario Roberto Pereira e tias Margarete Mota Macedo, Rita de Cássia e Romilda Brochetti, por estarem sempre me incentivando a alcançar meu objetivo.

Aos meus cunhados André Tezedor e Wesley Fars, por estarem sempre me motivando a seguir em frente.

A minha aluna de Iniciação Científica Michele de Lima Ribeiro, pela colaboração, elaboração dos experimentos, empenho e dedicação para o bom desempenho e elaboração deste trabalho.

A minha orientadora Profa. Dra. Adriana Lino dos Santos Franco, por sua amizade, paciência, gentileza, conhecimento, inspiração científica e pela brilhante orientação deste estudo.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, pelo sempre auxílio frente às necessidades e solicitações para a realização deste estudo.

Ao meu ex-professor, Luiz Roberto Viana Fernandes, por acreditarem, incentivar e ter compartilhado seu conhecimento desde a minha graduação até os dias de hoje.

Aos meus amigos e professores, Alberto Malvezzi, Alexandre Beltramini, Camila Malvezzi, Cristiano Martins (*in memoriam*), Fernando Garcia, Kátia Denise, Leonardo Boscolo, Marcello Rosa de Resende, Marlene Juliani Orlandin, Michel Sant'Anna, Patrícia Pavesi, Rafael Beltramini, Ricardo Alex Rosa, Vinicius Manuel, Wilson Orlandin pelo ensinamento, conhecimento, motivação e força diária.

A Universidade Nove de Julho por proporcionar a oportunidade no desenvolvimento deste projeto.

E por fim, a todos os colegas que de alguma forma auxiliaram para o desenvolvimento deste, e suas contribuições foram imprescindíveis para a finalização deste projeto.

Expresso a todos, meus sinceros agradecimentos.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível, se torna realidade”.

Albert Einstein

RESUMO

A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica e reversível dos brônquios com células inflamatórias, hipertrofia das células do músculo liso e hiperreatividade brônquica das vias aéreas. Ela é definida pela história de sintomas respiratórios, tais como sibilos, dispneia, opressão torácica retroesternal e tosse, os quais variam com o tempo e na intensidade, e predominantemente a noite e pela manhã. Os corticosteroides são a base do tratamento da asma, visto que eles bloqueiam a produção das citocinas inflamatórias. No entanto, uma proporção considerável de pacientes com asma não responde à corticoterapia, mesmo quando administrados em altas doses, estes pacientes apresentam um perfil de resistência às ações antiinflamatórias dos corticosteroides, desenvolvendo um tipo de asma mais grave, com características celulares do tipo neutrofílica, do que eosinofílica, o que difere da asma alérgica, e este tipo de asma é caracterizado por asma resistente a corticoide. Neste sentido, nosso objetivo foi avaliar o efeito da fotobiomodulação usando diodos emissores de luz (LEDs) infravermelho no desenvolvimento de asma resistente a corticosteroides. Para tanto, utilizamos ratos wistar machos e dividimos aleatoriamente em 4 grupos, sendo: grupo basal ratos controle não manipulados; grupo CRA: ratos asmáticos; grupo CRA+LED: ratos asmáticos tratados com LED e grupo CRA+DEXA: ratos asmáticos tratados com dexametasona. Os três grupos, exceto o grupo basal, foram sensibilizados no 1º dia com ovalbumina grau V acrescidos de adjuvante completo de Freund (AF) e nos dias 21º e 22º dia foi submetido ao desafio inalatório (nebulização) com ovalbumina a 1% grau III, para a criar a asma resistente a corticoide do tipo neutrofílica; o grupo CRA + LED foi tratado com o LED diretamente na pele sobre o trato respiratório em um único ponto, nos parâmetros: comprimento de onda 810 nm; potência 100 mW; densidade de energia 5 J/cm; energia total 15J; tempo 150s; O grupo CRA + DEXA, foi tratado com o medicamento dexametasona (2mg/ml) injetada por via intraperitoneal (ip) nos dias 21º e 22º 3 horas antes de cada desafio inalatório, Sendo assim, avaliamos a inflamação pulmonar (número total de células no LBA), a determinação da atividade da mieloperoxidase, os mediadores (citocinas) inflamatórias e antiinflamatórias, a expressão gênica e a desgranulação mastocitária. Nosso modelo experimental foi capaz de induzir asma com características neutrofílica. O tratamento com corticosteroides não reverteu a migração de células para o lavado broncoalveolar, nem reduziu os níveis de leucotrieno B4, interleucinas 17 e 6. Já o tratamento com FBM reduziu a migração de células para o espaço alveolar, a atividade de mieloperoxidase, a desgranulação de mastócitos e os níveis de leucotrieno B4, tromboxano B2, prostaglandina E2, fator de necrose tumoral alfa e interleucinas 17 e 6. Além do aumento do nível de interleucina 10, pela FBM. Mostramos efeitos promissores do LED na faixa infravermelho quando irradiado diretamente sobre o trato respiratório como um tratamento alternativo para asma resistente a corticosteroides.

Palavras-Chave: Asma resistente a corticosteroides; Fotobiomodulação; Diodo emissor de luz infravermelha; Interleucinas; Mastócitos; Eicosanoides.

ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous disease generally characterized by chronic and reversible inflammation of the bronchi with inflammatory cells, smooth muscle cell hypertrophy, and bronchial airway hyperreactivity. It is defined by a history of respiratory symptoms, such as wheezing, dyspnea, retrosternal chest tightness, and coughing, which vary with time and intensity, and predominantly at night and in the morning. Corticosteroids are the mainstay of asthma treatment as they block the production of inflammatory cytokines. However, a considerable proportion of patients with asthma do not respond to corticosteroid therapy, even when administered in high doses, these patients present a profile of resistance to the anti-inflammatory actions of corticosteroids, developing a more severe type of asthma, with cellular characteristics of the neutrophilic type, than eosinophilic, which differs from allergic asthma, and this type of asthma is characterized by steroid-resistant asthma. In this sense, our objective was to evaluate the effect of photobiomodulation using infrared light emitting diodes (LEDs) on the development of corticosteroid-resistant asthma. Therefore, we used male Wistar rats and randomly divided them into 4 groups: basal group, unmanipulated control rats; ARC group: asthmatic rats; ARC+LED group: asthmatic rats treated with LED and ARC+DEXA group: asthmatic rats treated with dexamethasone. The three groups, except the basal group, were sensitized on the 1st day with grade V ovalbumin plus complete Freund's adjuvant (FA) and on the 21st and 22nd day underwent inhalation challenge (nebulization) with 1% ovalbumin grade III, to create neutrophil-type corticosteroid-resistant asthma; the ARC + LED group was treated with the LED directly on the skin over the respiratory tract at a single point, in the parameters: wavelength 810 nm; power 100 mW; energy density 5 J/cm²; total energy 15J; time 150s; The ARC + Dexamethasone group was treated with the drug dexamethasone (2mg/ml) injected intraperitoneally (ip) on the 21st and 22nd days 3 hours before each inhalation challenge. Therefore, we evaluated pulmonary inflammation (total number of cells in the BAL), the determination of myeloperoxidase activity, inflammatory and anti-inflammatory drugs (cytokines), gene expression and mast cell degranulation. Our experimental model was able to induce asthma with neutrophil characteristics. Corticosteroid treatment did not reverse cell migration to the bronchoalveolar lavage, nor did it reduce the levels of leukotriene B₄, interleukins 17 and 6. Treatment with FBM, on the other hand, reduced cell migration to the alveolar space, myeloperoxidase activity, degranulation of mast cells and the levels of leukotriene B₄, thromboxane B₂, prostaglandin E₂, tumor necrosis factor alpha and interleukins 17 and 6. In addition to the increase in the level of interleukin 10, by FBM. We show promising effects of LED in the infrared range when irradiated directly into the respiratory tract as an alternative treatment for corticosteroid-resistant asthma.

Key words: Corticosteroid-resistant asthma; Photobiomodulation; Infrared light emitting diode; Interleukins; Mast cells; Eicosanoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases imediata e tardia da asma, com ações dos principais fármacos.....	12
Figura 2 - Comparação entre uma via aérea normal e uma via aérea acometida por asma.	13
Figura 3 - Diagrama resumido dos mediadores inflamatórios derivados dos fosfolípidios, com uma apresentação dos seus efeitos e dos locais de ação de fármacos anti-inflamatórios.	18
Figura 4 - Síndrome de Cushing.	23
Figura 5 - Delineamento experimental.	33
Figura 6 - O LED reduz a inflamação pulmonar, bem como a atividade da mieloperoxidase em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.	36
Figura 7 - O LED reduz a liberação de eicosanoides em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.	37
Figura 8 - O LED reduz a degranulação de mastócitos em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.	38
Figura 9 - O LED reduz a degranulação de mastócitos em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.	39
Figura 10 - O LED reduz citocinas inflamatórias enquanto aumenta as citocinas antiinflamatórias em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.	40
Figura 11 - O LED não alterou a expressão gênica de citocinas no pulmão em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AF	Adjuvante de Freund's
ARC	Asma resistente a corticosteroide
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina-monofosfato-cíclico
CCO	Citocromo C oxidase
COX	Ciclooxigenase
COX2	Ciclooxigenase 2
CRF	Hormônio liberador de corticotrofina
CRA	Cortisona Resistente a Asma (Cortisone Resistant Asthma)
CYSLT	Cysteinyl leukotriene
CYSLT1	Cysteinyl leukotriene receptor
CYSLT2	Cysteinyl leukotriene receptor
DEXA	Dexametasona
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROs	Espécie reativa de oxigênio
FBM	Fotobiomodulação
GC's	Glicocorticoide
CBG	Globulina ligadora de cortisol
GM-CSF	Fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos
GR	Receptor de glicocorticoide
HHSR	Hipotálamo-hipófise-suprarrenal
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11

IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-17A	Interleucina 17A
IL-1 β	Interleucina 1 “beta”
IL1RA	Antagonista de receptor de interleucina
IFN- γ	Interferon “gama”
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
Ip	Intraperitoneal
KH	Krebs-Hanseleit
KCl	Cloreto de Potássio
LBA	Lavado Broncoalveolar
LBP	Laser de Baixa Potência
LPS	Lipopolissacarídeo
LED	Light Emiting Diode = “diodo emissor de luz”
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
LTF4	Leucotrieno F4
PBM	Fotobiomodulação
PBS	Tampão Salina tamponado com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina 2
MPO	Mieloperoxidase
M2	Receptor Muscarínico de acetilcolina
M3	Receptor Muscarínico de acetilcolina
MCh	Metacolina
iNOS	Óxido nítrico indutível
NOS2	Óxido nítrico sintetase 2
NK1-2	Antagonista de receptor de neurocinina
OVA	Ovalbumina

RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
Sc	Subcutâneo
SCF	Stem cell factor
Th	T helper = T auxiliar
Th1	T helper tipo 1
Th2	T helper tipo 2
Th17	T helper tipo 17
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta (β)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (α)
TX	Tromboxanos
TXB2	Tromboxanos 2

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	8
1.1	Introdução	8
1.2	Epidemiologia da asma	9
1.3	Patogenia e característica da asma	10
1.3.1	Asma atópica.....	11
1.3.2	Asma não atópica.....	14
1.3.3	Asma Induzida por Medicamentos	14
1.3.4	Asma Ocupacional	14
1.4	Fármacos utilizados no tratamento da asma	15
1.4.1	Broncodilatadores.....	15
1.4.2	Antagonistas de receptores muscarínicos.....	16
1.4.3	Tratamento com anti-IgE	16
1.4.4	Antagonistas dos receptores de leucotrienos.....	17
1.4.5	Glicocorticoides	17
1.4.6	Usos clínicos dos glicocorticoides na asma	19
1.4.7	Mecanismo de ação	19
1.4.8	Efeitos metabólicos e sistêmicos gerais dos glicocorticoides.....	21
1.4.9	Efeitos adversos	22
1.4.10	O mecanismo de resistência da asma aos glicocorticoides	24
1.5	Fotobiomodulação.....	25
1.5.1	Mecanismo da fotobiomodulação.....	26
1.5.2	O papel da fotobiomodulação na asma	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Gerais.....	29
2.2	Específicos	29
3.	METODOLOGIA	30
3.1	Animais.....	30
3.2	Indução da asma experimental resistente a glicocorticoide	30
3.3	Tratamento com LED	31
3.4	Tratamento com dexametasona	32
3.6	Eutanásia	32
3.7	Delineamento experimental.....	33
3.8	Avaliação da inflamação pulmonar.....	33
3.9	Determinação da atividade da mieloperoxidase pulmonar	33

3.10 Análise ELISA de eicosanoides e citocinas e expressão do gene de citocinas	34
3.11 Degranulação de mastócitos	35
3.12 Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS	36
4.1 O LED reduz a inflamação pulmonar e a atividade da mieloperoxidase em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides	36
4.2 O LED reduz a liberação de eicosanoides em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides	37
4.3 O LED reduz a degranulação de mastócitos em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides	38
4.4 O LED reduz citocinas inflamatórias enquanto aumenta citocinas antiinflamatórias em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides	40
4.5 O LED não alterou a expressão gênica de citocinas no pulmão em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides	41
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO 1 – Artigo: Beneficial effects of infrared light-emitting diode in corticosteroid-resistant asthma.....	53
ANEXO 2 – Protocolo aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal.....	54

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Introdução

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica que afeta uma parcela significativa da população (7 a 10%), com elevado custo social e econômico¹. No Brasil cerca de 350 mil internações hospitalares são realizadas por ano apenas no serviço público de saúde, gerando um gasto médio anual de R\$120 milhões ².

Os indivíduos que apresentam um quadro de asma podem ter as seguintes características: 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. Na asma, os elementos celulares envolvidos causam aumento da hiperreatividade das vias aéreas, levando a episódios recorrentes de sibilos (sons altos, semelhantes a um assobio que ocorrem durante a respiração quando há bloqueio parcial das vias aéreas), dispneia, tiragem intercostal (esforço respiratório, retração respiratória dos espaços intercostais, supra-esternal, supraclavicular) e tosse, mais acentuados pela manhã e à 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, com o intuito de restaurar a homeostase^{1,3,4}.

A causa exata da asma ainda não é conhecida, mas acredita-se que pode ser causada por um conjunto de fatores: genéticos (história familiar de alergias respiratórias – asma ou rinite) e ambientais.^{2,5}

Diversos estímulos, conhecidos como gatilhos, podem desencadear a hiperreatividade presente no quadro asmático. São eles: alérgenos, fumaça de cigarro, poluentes atmosféricos, fármacos, alterações na temperatura ambiental, infecções respiratórias, estímulos ocupacionais, substâncias presentes em alimentos, obesidade, exercício físico e estresse, pólen, animais domésticos, ácaros e fungos. No entanto na asma, devido ao processo inflamatório contínuo ou recorrente, ocorrem lesões teciduais com subsequentes modificações no

aparelho respiratório, o que pode resultar em reparo tecidual inadequado denominado de remodelamento das vias aéreas ⁵.

O diagnóstico da asma é predominantemente clínico (realizado por um profissional médico) e se baseia na presença dos sintomas de tosse (seca ou com eliminação de muco transparente semelhante à clara de ovo), chiado no peito, falta de ar, sensação de aperto no peito de forma repetida ou contínua, presença de histórico pessoal ou familiar de doenças alérgicas (a própria asma em pais ou outras doenças como rinite e dermatite atópica) e melhora dos sintomas com o uso de medicamento dilatadores de brônquios (broncodilatadores). Contudo, outros exames podem ajudar a confirmar essa suspeita, como a espirometria para avaliar o grau de comprometimento da função dos pulmões^{1,5}.

Em muitos pacientes, a asma pode ser acompanhada por sintomas no nariz (rinite) tais como coceira, espirros, coriza e fungação. Testes alérgicos deverão ser realizados para verificar se a doença tem uma natureza alérgica ou não. As medicações visam o controle da doença, reduzindo, principalmente, a inflamação dos brônquios.⁵ A classe de medicamentos mais utilizada são os corticoides. Contudo, uma parcela dos pacientes não responde a esta medicação e desenvolvem uma forma grave de asma, de difícil tratamento. Sendo necessárias novas terapias.

1.2 Epidemiologia da asma

Estudos epidemiológicos indicam que a incidência da asma tem aumentado nos últimos anos e em grande parte, o aumento da comorbidade se relaciona com a industrialização^{6,7}

Estima-se que no Brasil existem aproximadamente 20 milhões de asmáticos, e segundo o Datasus (Ministério da Saúde), o banco de dados do Sistema Único de Saúde, ligado ao Ministério da Saúde, ocorrem no Brasil, em média, 350.000 internações anualmente. A asma é a terceira ou quarta causa de hospitalizações pelo SUS (2,3% do total), conforme o grupo etário considerado⁸.

Estudos devem ser realizado para uma melhor compreensão da doença por parte dos portadores bem como a distribuição de medicamentos para os pacientes asmáticos graves. Entretanto, nos últimos 10 anos observa-se uma

queda no número de internações e mortes por asma no país. Apesar disso, a disponibilização de tratamento adequado aos asmáticos ainda é restrita em muitos estados do país, uma vez que um percentual alto da nossa população não tratada é por completo.^{2,9}

1.3 Patogenia e característica da asma

Atualmente, os principais fatores que caracterizam e contribuem para o desenvolvimento da asma são obstrução reversível das vias respiratórias, com crises de sibilos, falta de ar e, muitas vezes, tosse noturna, causada por hiperreatividade do músculo liso, elevada produção do muco e inflamação crônica¹⁰⁻¹².

A asma é considerada grave quando, apesar da utilização de altas doses de duas ou três medicações de controle associadas, ainda existem sintomas, exacerbações e limitações no dia-a-dia.^{5,13}

Dentro do processo de desenvolvimento da asma, a crise está diretamente relacionada ao fator desencadeante (gatilho), 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 helper (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 Th2 (linfócito T helper 2), que liberam IL-4 e outras citocinas^{4,12}. As citocinas liberadas pelos linfócitos T estimulam a produção de imunoglobulinas IgE pelos linfócitos B. A proliferação de mastócitos e ativação e aumento da sobrevivência de eosinófilos, os mastócitos presentes na circulação apresentam grande afinidade aos anticorpos liberados na circulação, desta forma, quando há uma reexposição ao antígeno, este se liga a 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, liberam mais mediadores. É provável que, diretamente, ou por reflexos neuronais os mediadores liberados no processo descrito induzem broncoespasmo, aumento

da permeabilidade vascular e produção de muco. Outros mediadores que merecem atenção são os leucotrieno B4 (LTB4) e o cisteinil-leucotrienos (C4 e D4).¹⁴

A asma é subclassificada em atópica (evidência de sensibilização a alérgeno) ou não atópica. Em ambos os tipos os episódios de broncoespasmo podem ser desencadeados por diversas exposições, tais como infecções respiratórias (especialmente as virais), irritantes aéreos (p. ex., fumaça, vapores), ar frio, estresse e exercício. Também existem padrões variados de células imunológicas com caráter eosinofílico (mais comum na asma), neutrofílico inflamatório e que podem estar associados a diferentes etiologias, imunopatologias e respostas ao tratamento.¹⁵

1.3.1 Asma atópica

Estudos recentes indicam que este é o tipo de asma mais comum e tem como característica reação de hipersensibilidade tipo I mediada por IgE. Geralmente se inicia na infância. Um histórico familiar positivo é mais comum para asma, e a manifestação dos ataques asmáticos é frequentemente precedida de rinite alérgica, urticária ou eczema. Os ataques podem ser desencadeados por algum alérgeno de poeira, pólen, pelos de animais, alimentos ou por infecções. Um teste cutâneo com o antígeno causal resulta em uma reação imediata de pápula e eritema. A asma atópica também pode ser diagnosticada com base em testes sorológicos radioalergossorventes (RAST's), que identificam a presença de IgE's que reconhecem alérgeno específicos.⁵

A forma atópica clássica está associada à ativação excessiva da célula T auxiliar tipo 2 (Th2). As citocinas produzidas pelas células Th2 são responsáveis pela maioria das características deste tipo de asma atópica; a IL-4 e a IL-13 estimulam a produção de IgE, a IL-5 ativa os eosinófilos e a IL-13 também estimula a produção de muco. A IgE recobre os mastócitos submucosos que, ao serem expostos ao alérgeno, liberam os conteúdos de seus grânulos e secretam citocinas e outros mediadores, 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^{16,17}. Por outro lado, os mediadores derivados

dos mastócitos produzem duas ondas de reação: fase inicial (imediate) e fase tardia.

A fase imediata, que se inicia em minutos, é caracterizada por broncoconstrição, aumento de muco e edema, os quais são decorrentes dos efeitos dos mediadores liberados por mastócitos ativados por antígeno. Nesse contexto, mastócitos são considerados células efetoras fundamentais da resposta imunológica e estão associados aos eventos mediados pelos linfócitos do tipo Th2¹⁸ (Figura 1 e 2).

A fase tardia, que se inicia em horas, 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 podem determinar lesão epitelial, ativação de nervos sensoriais, secreção de muco e hiperreatividade brônquica¹⁹ (Figuras 1 e 2).

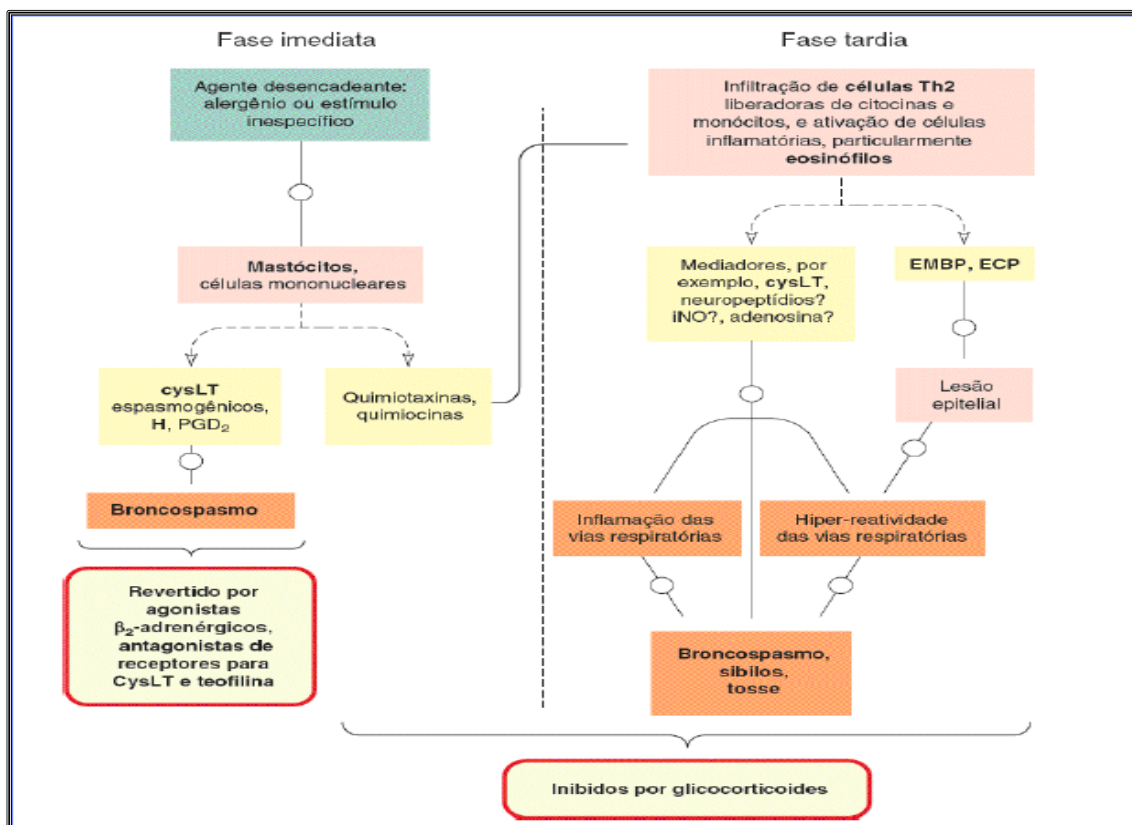


Figura 1 - Fases imediata e tardia da asma, com ações dos principais fármacos.

Fonte: Adaptado Rang & Dale, 2020

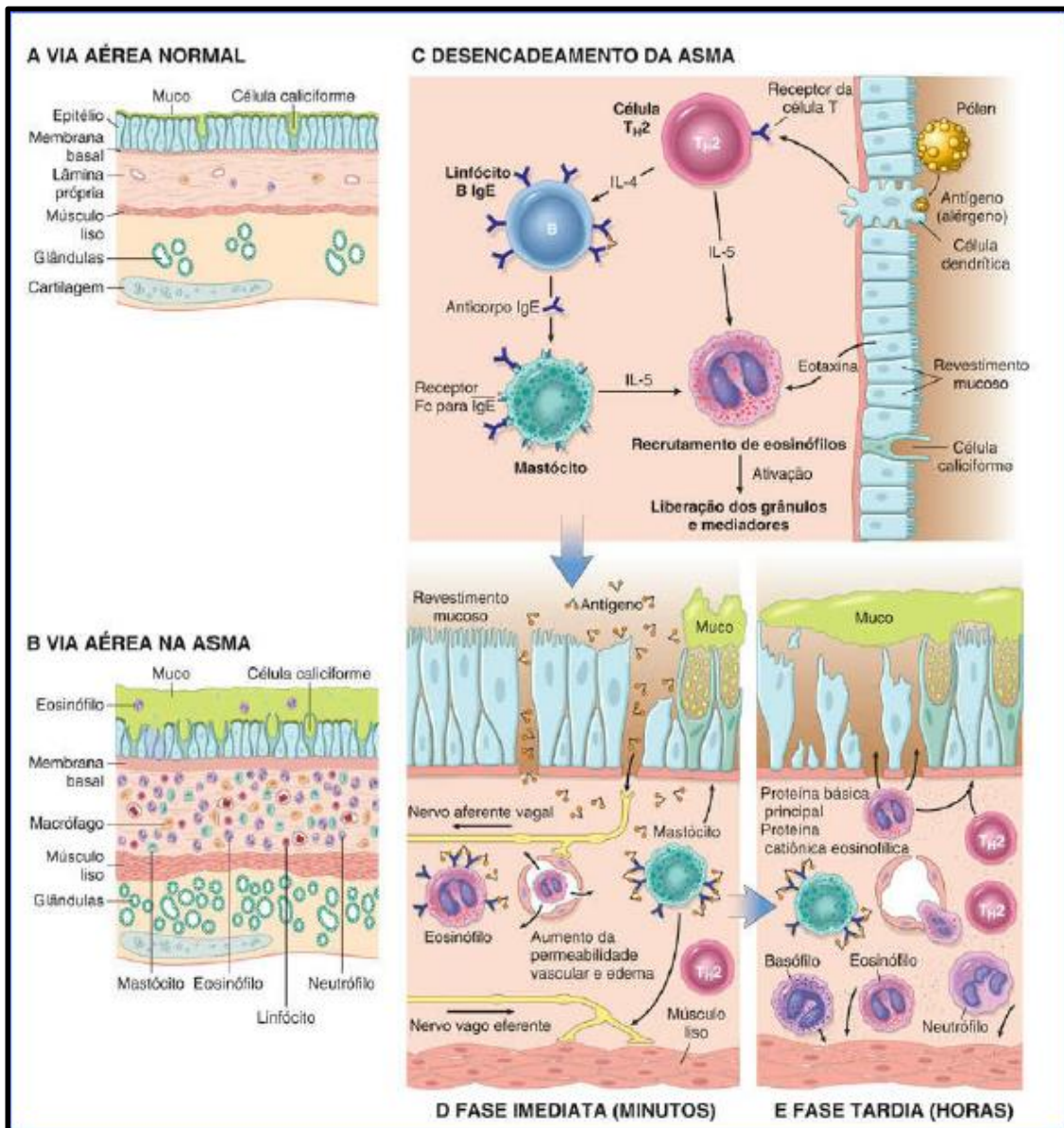


Figura 2 - Comparação entre uma via aérea normal e uma via aérea acometida por asma.

Fonte: Adaptado Robbins, patologia básica, 2018.

Episódios de inflamação recorrentes geram alterações estruturais na parede brônquica, que são referidas, de uma forma geral, como remodelamento das vias aéreas. Estas alterações incluem hipertrofia do músculo liso brônquico e das glândulas mucosas, e aumento da vascularização e do depósito de colágeno subepitelial, que podem ocorrer muitos anos antes do início dos sintomas.^{15,20}

Apesar de a asma ser considerada uma reação tipicamente mediada pelos linfócitos Th2 e de caráter eosinofílico, estudos recentes mostram que a

asma pode também estar associada a linfócitos Th1 ou Th17, citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-8, IL-17 e neutrofilia.^{10,21-24}

1.3.2 Asma não atópica

Os pacientes com as formas não atópicas, não apresentam evidência de sensibilização por alérgeno, os testes cutâneos geralmente são negativos e um histórico familiar positivo para asma é menos comum. Os desencadeadores mais comuns são infecções respiratórias por viroses (p. ex., rinovírus, vírus da parainfluenza) e poluentes atmosféricos inalados (p. ex., dióxido de enxofre, ozônio, dióxido de nitrogênio). Acredita-se que a inflamação da mucosa respiratória induzida por vírus reduz o limiar dos receptores vagais subepiteliais aos agentes irritantes. Embora as relações ainda não estejam bem esclarecidas, os mediadores humorais e celulares finais da obstrução das vias aéreas (p. ex., eosinófilos) são comuns a ambas as variantes da asma, logo elas são tratadas da mesma forma.^{15,20}

1.3.3 Asma Induzida por Medicamentos

Diversos agentes farmacológicos podem provocar a asma, sendo o ácido acetilsalicílico o exemplo mais marcante. Os pacientes com sensibilidade ao ácido acetilsalicílico apresentam rinite recorrente, pólipos nasais, urticária e broncoespasmo. A patogenia exata ainda é desconhecida, porém provavelmente envolve algum tipo de anormalidade no metabolismo da prostaglandina com origem na inibição da ciclooxigenase pelo ácido acetilsalicílico.¹⁵

1.3.4 Asma Ocupacional

A asma ocupacional pode ser desencadeada por vapores (resinas epóxicas, plásticos), poeiras orgânicas e químicas (madeira, algodão, platina), gases (tolueno) e outros químicos. Os episódios de asma geralmente se desenvolvem após a exposição repetida ao(s) antígeno(s) que os incita(m).¹⁵

1.4 Fármacos utilizados no tratamento da asma

As classes de medicamentos mais utilizadas para o tratamento da asma são: broncodilatadores, antagonistas receptores muscarínicos, anti-IgE, antagonistas de leucotrienos, glicocorticoides.

1.4.1 Broncodilatadores

Os agonistas β 2-adrenérgicos possuem um efeito primário na asma e dilatam os brônquios por ação direta sobre os receptores β 2-adrenérgicos da musculatura lisa. Sendo antagonistas fisiológicos dos broncoconstritores, relaxam o músculo brônquico quaisquer que sejam os espasmógenos envolvidos. Também inibem a liberação de mediadores de mastócitos e a liberação de TNF- α de monócitos, além de aumentarem a remoção do muco por ação sobre os cílios. Os agonistas β 2-adrenérgicos geralmente são administrados por inalação de aerossol, pó ou solução nebulizada (uma solução que foi convertida em “nuvem” ou uma mistura de microgotas), mas alguns podem ser administrados por via oral ou parenteral. Usa-se um inalador com válvula medidora de dose para preparações em aerossol. ^{25,26}. Duas categorias de agonistas β 2-adrenérgicos são usadas na asma, são elas:

- Os agentes de ação curta: salbutamol e terbutalina. Administrados por inalação, atuam imediatamente, e o efeito máximo ocorre em 30 min, a duração da ação é de 3 a 5h. geralmente são usados “conforme a necessidade” para controlar os sintomas.²⁶

- Os agentes de ação mais longa: por exemplo, salmeterol e formoterol. São administrados por inalação, a duração de ação é de 8 a 12h. Não são usados “conforme a necessidade”, mas administrados regularmente, duas vezes/dia, como terapia complementar em pacientes cuja asma não esteja adequadamente controlada com glicocorticoides. Os efeitos indesejáveis dos agonistas β 2-adrenérgicos decorrem da absorção sistêmica. No contexto de seu uso na asma, o efeito adverso mais comum é o tremor; outros efeitos indesejáveis são taquicardia e arritmia cardíaca. ^{20,26}

1.4.2 Antagonistas de receptores muscarínicos

Os antagonistas de receptores muscarínicos à exemplo o ipratrópio, é administrado por meio de inalação de aerossol e é o único antagonista muscarínico de ação curta que é amplamente usado na clínica como broncodilatador. Atualmente, estão disponíveis antagonistas muscarínicos de ação prolongada inalados, tais como tiotrópio, aclidínio, umeclidínio e glicopirrolato. O ipratrópio é um derivado quaternário da atropina. Ele não faz discriminação entre subtipos de receptores muscarínicos, e é possível que seu bloqueio de receptores M2 (receptores muscarínicos de acetilcolina) nos nervos colinérgicos aumente a liberação de acetilcolina e reduza a eficácia de seu antagonismo nos receptores M3 (receptores muscarínicos de acetilcolina) na musculatura lisa. Não é particularmente eficiente contra estímulos por alergênicos, mas inibe o aumento da secreção de muco que ocorre na asma e pode aumentar a depuração mucociliar das secreções brônquicas. Não tem efeito sobre a fase inflamatória tardia da asma.^{25,26}

O efeito máximo ocorre depois de aproximadamente 30 minutos após a inalação e persiste por 3 a 5h. Tem poucos efeitos indesejáveis e, em geral, é seguro e bem tolerado. Pode ser usado com agonistas β 2-adrenérgicos, particularmente em situações agudas, no alívio sintomático. Os antagonistas muscarínicos de ação prolongada são também compostos de amônio quaternário, desenhados para ter maior seletividade para o receptor M3 e para se dissociarem do receptor muito lentamente, produzindo um efeito sustentado com uma dose diária regular. São utilizados com frequência em conjunto com os agonistas β 2-adrenérgicos de longa duração em um inalador combinado.²⁶

1.4.3 Tratamento com anti-IgE

O omalizumabe é um anticorpo anti-IgE monoclonal humanizado. Tem efeito em pacientes com asma alérgica, bem como na rinite alérgica, e o seu papel clínico é essencialmente nos pacientes com asma alérgica grave persistente mediada por IgE confirmada que necessitam de tratamento contínuo ou frequente com corticosteroides orais, apesar da utilização de outras terapias-padrão.^{20,26}

1.4.4 Antagonistas dos receptores de leucotrienos

Os cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) atuam nos receptores CysLT1 e CysLT2, expressos na mucosa respiratória e nas células inflamatórias infiltrativas. Os fármacos da classe lucaste (montelucaste e zafirlucaste) antagonizam somente o receptor CysLT1. Os lucastes inibem a asma induzida pelo exercício e diminuem respostas precoces e tardias a alérgeno inalatório (Figura 3). Eles dilatam as vias respiratórias na asma leve, mas são menos eficazes que o salbutamol, com o qual sua ação é aditiva. Reduzem a eosinofilia do escarro, mas não há evidências claras de que modifiquem o processo inflamatório subjacente na asma crônica. Os lucastes são administrados por via oral, em combinação com um corticosteroide inalatório, e geralmente não são bem tolerados; os efeitos adversos consistem principalmente em cefaleia e distúrbios gastrointestinais.^{20,25,26}

1.4.5 Glicocorticoides

Os glicocorticoides são os principais fármacos usados no tratamento da asma devido à sua ação antiinflamatória. Não são broncodilatadores, mas impedem a progressão da asma crônica e são eficazes na asma grave aguda.²⁶ A base da ação anti-inflamatória dos glicocorticoides é uma ação importante e de relevância para a asma, é que eles restringem a proliferação clonal das células Th (linfócito T helper) por meio da redução da transcrição do gene da IL-2 e diminuem a formação de citocinas, em particular as citocinas Th2, que recrutam e ativam eosinófilos, sendo responsáveis por promover a produção de IgE e a expressão de receptores de IgE.^{25,27}

Os glicocorticoides também inibem a geração dos vasodilatadores PGE₂ e PGI₂ por inibirem a indução de COX-2 (Figura 3). Por indução da anexina-1, poderiam inibir a produção de leucotrienos e do fator ativador de plaquetas, embora não haja atualmente evidência direta de que a anexina-1 esteja envolvida na ação terapêutica dos glicocorticoides no ser humano.^{20,26}

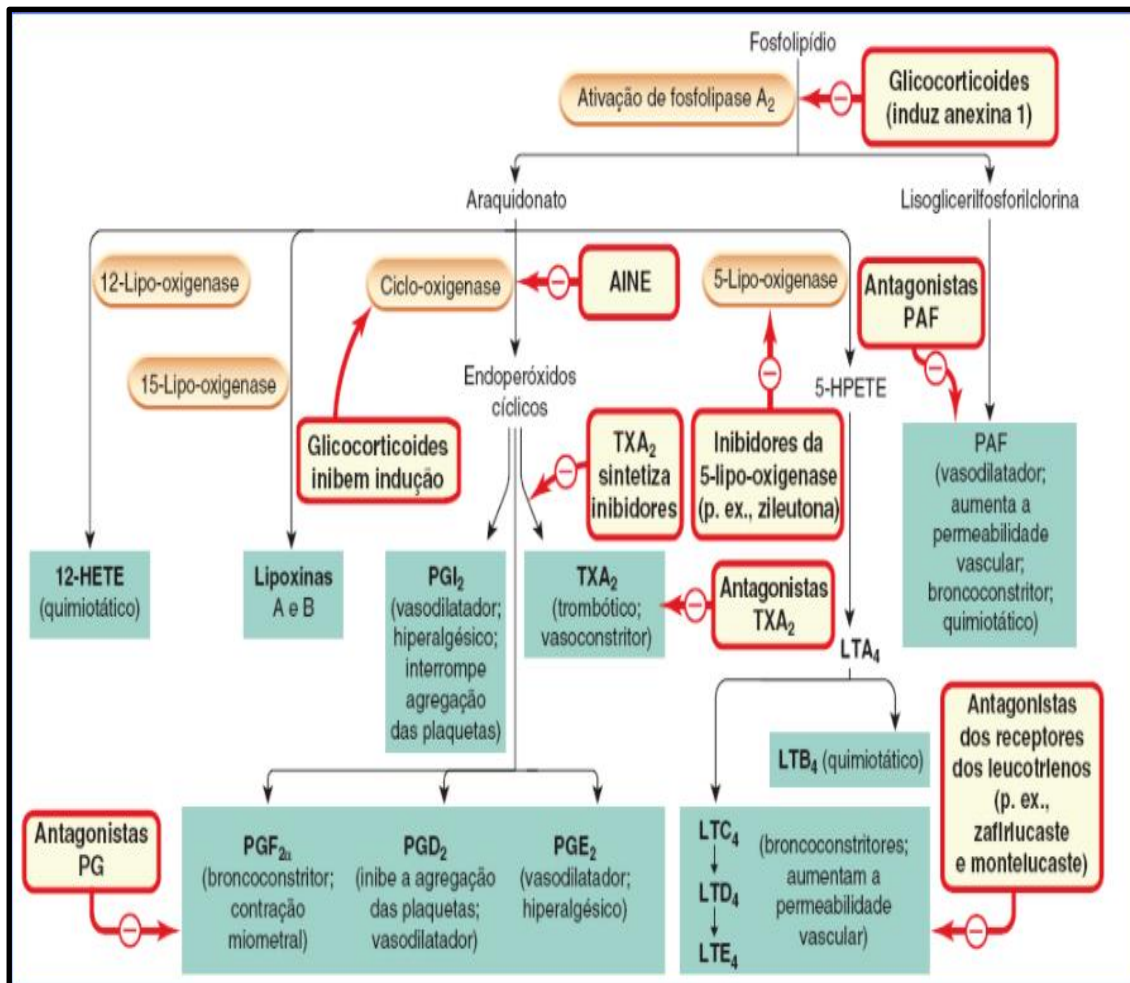


Figura 3 - Diagrama resumido dos mediadores inflamatórios derivados dos fosfolipídios, com uma apresentação dos seus efeitos e dos locais de ação de fármacos anti-inflamatórios.

Fonte: Adaptado Rang & Dale, 2020.

Os corticosteroides inibem o influxo, induzido por alergênicos, de eosinófilos para o pulmão. Os glicocorticoides supra regulam (upregulate) os receptores β 2-adrenérgicos, diminuem a permeabilidade microvascular e reduzem indiretamente a liberação de mediadores dos eosinófilos, inibindo a produção de citocinas (p. ex., IL-5 e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos) que ativam os eosinófilos. A redução da síntese de IL-3 (a citocina que regula a produção de mastócitos) pode explicar porque o tratamento a longo prazo com esteroides finalmente reduz o número de mastócitos na mucosa respiratória e, por isso, suprime a resposta de fase inicial a alérgenos e ao exercício.²⁶

Os principais compostos usados são beclometasona, budesonida, fluticasona, mometasona e ciclesonida. Administrados por inalação por meio de

um inalador com válvula medidora de dose ou inalador de pó seco, assim atingindo o efeito pleno sobre a hiperresponsividade brônquica somente depois de semanas ou meses de terapia. Existem agora várias formulações de inaladores em que os corticosteroides inalados são combinados com agonistas β 2-adrenérgicos de ação de longa duração. Os glicocorticoides orais são reservados para pacientes com doenças mais graves.²⁰

São incomuns os efeitos indesejáveis graves com esteroides inalados. Podem ocorrer candidíase orofaríngea (os linfócitos T são importantes na proteção contra infecção fúngica), bem como irritação da garganta e voz rouca, mas o uso de espaçadores, que diminuem a deposição orofaríngea do fármaco e aumentam a deposição nas vias respiratórias, reduz esses problemas. Doses altas regulares de glicocorticoides inalatórios podem produzir certa supressão da suprarrenal. Isso é menos provável com fluticasona, mometasona e ciclesonida, pois esses fármacos são pouco absorvidos do trato Gastrointestinal e passam por metabolismo pré-sistêmico quase completo. Os efeitos indesejáveis dos glicocorticoides orais são fornecidos na Figura 4.^{20,25}

1.4.6 Usos clínicos dos glicocorticoides na asma

Os pacientes que necessitam de uso regular de broncodilatadores devem ser considerados para tratamento com glicocorticoides (p. ex., beclometasona inalada em baixa dose) Os pacientes afetados mais gravemente são tratados com fármacos inalados de alta potência (p. ex., fluticasona). Os pacientes com exacerbações agudas de asma podem precisar de hidrocortisona intravenosa, dexametasona ou prednisolona oral. Para alguns asmáticos em estado grave, é necessário tratamento prolongado com prednisolona oral, além dos broncodilatadores e esteroides inalatórios.²⁰

1.4.7 Mecanismo de ação

A ação antiinflamatória dos glicocorticoides deve-se em grande parte a inibição da indução ciclooxigenase, esses fármacos também podem estimular a produção do inibidor da fosfolipase A2 a LIPOCORTINA, conforme Figura 3.

Corticosteroides alteram a transcrição de muitos genes. Em geral, aumentam a transcrição de genes que codificam o receptor β 2-adrenérgico e diversas proteínas anti-inflamatórias como IL-10, IL-12 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra). Corticosteroides diminuem a transcrição de genes que codificam numerosas proteínas pró-inflamatórias (e outras proteínas); os exemplos incluem IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-13, IL-15, TNF- α , GM-CSF, SCF, moléculas de adesão endoteliais, quimiocinas, sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), ciclooxigenase (COX), fosfolipase A2, endotelina-1 e receptor de NK1-2. Como mencionado, a IL-4 é importante na indução da produção de IgE pelas células B, enquanto a IL-5 constitui importante fator de recrutamento de eosinófilos.^{20,28}

Por conseguinte, a inibição de IL-4 e IL-5 diminui acentuadamente a resposta inflamatória na asma. Além disso, os corticosteroides induzem apoptose em diversas células inflamatórias, particularmente eosinófilos e linfócitos Th2. Não afetam diretamente os mastócitos, provavelmente pelo fato de que mediadores de mastócitos são, em sua maioria, pré-formados. Todavia, os mastócitos são indiretamente inibidos com o passar do tempo, quando toda a resposta inflamatória é contida.^{22,26}

Corticosteroides diminuem a quantidade de células inflamatórias nas vias respiratórias, bem como reduzem a lesão do epitélio dessas vias. A permeabilidade vascular também é reduzida, com consequente resolução do edema das vias respiratórias. Além disso, embora os esteroides não afetem diretamente a função contrátil do músculo liso das vias respiratórias, a inflamação reduzida leva, com o passar do tempo, a diminuição da hiperresponsividade das vias respiratórias.^{20,29}

O resultado consiste na reversão de muitas das características da asma pelos corticosteroides. Infelizmente, os esteroides são apenas supressores da cascata inflamatória e não curam a asma, de modo que precisam ser administrados cronicamente. Além disso, esses fármacos são incapazes de reverter a remodelagem das vias respiratórias causada pela asma de longa duração e inadequadamente controlada. Não obstante, como os efeitos desses fármacos são de longo alcance, os corticosteroides inalados constituem a classe mais importante de fármacos na maioria dos casos de asma. Algumas vezes, porém, corticosteroides inalados são inadequados, sendo necessário utilizar

corticosteroides sistêmicos, como dexametasona e prednisona, na forma de reforço curto para as exacerbações agudas ou como terapia a longo prazo, quando a asma não consegue ser controlada com outros medicamentos.^{15,20}

1.4.8 Efeitos metabólicos e sistêmicos gerais dos glicocorticoides

Os principais efeitos metabólicos ocorrem no metabolismo de carboidratos e proteínas. Os glicocorticoides causam tanto redução da captura e utilização da glicose, quanto aumento da gliconeogênese, resultando em tendência à hiperglicemia. Ocorre ainda o aumento concomitante do armazenamento de glicogênio, que pode ser resultado da secreção de insulina em resposta ao aumento de açúcar no sangue. De modo geral, há síntese reduzida de proteínas e aumento da quebra delas, particularmente no músculo, o que pode levar à atrofia do tecido. A administração de grandes doses de glicocorticoides por longo período, resulta na redistribuição da gordura corporal característica da síndrome de Cushing - síndrome provocada pela exposição excessiva a glicocorticoides endógenos. (Figura 4)²⁰

Os glicocorticoides exógenos são fármacos anti-inflamatórios por excelência e, quando administrados terapêuticamente, suprimem as manifestações do sistema imune tanto inato como adaptativo. Revertem praticamente todos os tipos de reações inflamatórias causadas por patógenos invasores, por estímulos químicos ou físicos ou por respostas imunes desencadeadas inadequadamente, como ocorre na hipersensibilidade ou na doença autoimune.²⁵

Não surpreende que seus efeitos antiinflamatórios sejam complexos, considerando que os glicocorticoides modificam a expressão de muitos genes (aproximadamente 1% do genoma total é afetado) e que a extensão e a direção da regulação variam entre tecidos e mesmo entre momentos diferentes durante a doença.²⁰

As ações sobre as células inflamatórias, incluem: menor saída de neutrófilos dos vasos sanguíneos e redução da ativação de neutrófilos, macrófagos e mastócitos, seguida de redução da transcrição gênica de fatores de adesão celular e citocinas, redução geral da ativação de células Th, redução da expansão clonal das células T e troca da resposta imune do tipo Th1 para

Th2. Redução da função dos fibroblastos, menor produção de colágeno e glicosaminoglicanos e, em algumas circunstâncias, diminuição da cicatrização e reparo.^{20,26}

As ações nos mediadores das respostas inflamatória e imune, incluem: produção diminuída de prostanoídes por meio da expressão reduzida de ciclooxigenase II, supressão da liberação de substrato de ácido araquidônico e a produção reduzida de várias citocinas, incluindo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α , fatores de adesão celular e GM-CSF, em grande parte devido à inibição da transcrição gênica; Redução da concentração de componentes do complemento no plasma; Produção diminuída de óxido nítrico pela isoforma induzida da sintetase 2 do óxido nítrico (NOS2); Redução da liberação de histamina e de outros mediadores pelos basófilos; Redução da produção de imunoglobulina G (IgG); Síntese aumentada de fatores anti-inflamatórios, como IL-10, receptor solúvel de IL-1 e anexina-1.^{20,25,26}

Recentemente, nosso entendimento sobre o domínio dos glicocorticoides foi enriquecido ainda mais pela descoberta de numerosas isoformas e variantes de junção de receptores de glicocorticoides (GR), algumas das quais são expressas de maneira específica para os tecidos que abre uma possibilidade real, no futuro, de fármacos glicocorticoides altamente seletivos.^{20,28}

1.4.9 Efeitos adversos

A terapia de reposição com glicocorticoides em doses baixas normalmente não traz problemas, porém, em doses elevadas ou administração prolongada, ocorrem efeitos adversos graves. Os principais efeitos são: Supressão da resposta a infecções ou lesões: infecções oportunistas podem tornar-se muito graves se não forem tratadas rapidamente com agentes antimicrobianos e com aumento na dose do esteroide. Sapinho (candidíase, uma infecção fúngica); ocorre com frequência quando os glicocorticoides são administrados por inalação, em razão da supressão local dos mecanismos anti-inflamatórios; Osteoporose, com conseqüente risco de fraturas, é uma das principais limitações ao tratamento a longo prazo com glicocorticoides; Hiperglicemia produzida por glicocorticoides exógenos pode transformar-se em diabetes; Desgaste muscular e fraqueza muscular; Em crianças, ocorre a

inibição do crescimento, e caso o tratamento seja continuado por mais de 6 meses; Efeitos no SNC: euforia e psicose com administração a curto prazo, depressão com o tratamento crônico; Outros efeitos: glaucoma em pessoas com predisposição genética, aumento da pressão intracraniana e aumento da incidência de catarata. (Figura 4)^{20,26}

A retirada abrupta desses fármacos após terapia prolongada pode resultar em insuficiência aguda da suprarrenal, devido à supressão da capacidade do paciente para sintetizar corticosteroides. Devem-se seguir procedimentos cautelosos para a retirada em estágios. A recuperação da função total da suprarrenal demora aproximadamente 8 (oito) semanas, embora possa levar até 18 (dezoito) meses ou mais, após tratamento prolongado com doses elevadas.^{15,20}



Figura 4 - Síndrome de Cushing.

Fonte: Adaptado Rang & Dale, 2020.

1.4.10 O mecanismo de resistência da asma aos glicocorticoides

Os glicocorticoides são potentes antiinflamatórios usados no tratamento da asma e seus efeitos são mediados pelo receptor de glicocorticoide (GR).^{20,28}

Na maioria dos pacientes os sintomas de asma podem ser bem controlados com doses baixas de corticosteroides inalados. Entretanto, alguns pacientes requerem doses mais altas ou até mesmo corticosteroides pela via sistêmica, indicando que esses pacientes apresentam um perfil de resistência às ações antiinflamatórias dos corticosteroides. Este tipo de asma é denominado como asma resistente a corticoide.^{28,30}

De 10 e 25% dos asmáticos são resistentes a esteroides e não respondem à terapia com glicocorticoides (GC's), fato que contribui para altos custos associados com a asma e ainda mortalidade.³¹⁻³³

Diversos estudos apontam que os asmáticos resistentes aos esteroides não têm eosinófilos nas vias aéreas, mas sim neutrófilos^{29,34}.

O papel dos neutrófilos na patogênese da asma brônquica é controverso³⁵. Atualmente, alguns estudos demonstram que os neutrófilos desempenham um papel regulador na asma, pois sintetizam e liberam diversos mediadores inflamatórios responsáveis pelo desencadeamento da asma atópica, o que leva a um quadro de asma grave (severa)³⁶.

Os neutrófilos são geralmente considerados menos responsivos aos glicocorticoides, uma vez que os eventos envolvidos na ativação de neutrófilos, incluindo a aderência, quimiotaxia, desgranulação e liberação de metabólito do ácido araquidônico não são efetivamente inibidas pelos glicocorticoides^{37,38}.

A fisiopatologia da asma abrange o envolvimento de diversas células do sistema imune tais como células dendríticas, linfócitos, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e também de células estruturais incluindo o músculo liso das vias aéreas e células epiteliais^{15,39,40}. Na asma tradicional (atópica), a resposta inflamatória é mediada principalmente por linfócitos T helper tipo 2 (Th2) e por eosinófilos, enquanto que nas formas mais severas como as resistentes aos glicocorticoides, os neutrófilos apresentam papel crucial juntamente com linfócitos mistos (Th2, Th1 e Th17)^{23,41}.

Todas essas células liberam diversas citocinas que contribuem para as diferentes características da asma. Portanto, vários agentes biológicos têm sido

desenvolvidos para agir em citocinas chave, como interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)³⁷.

Recentemente, estudos foram aperfeiçoados a fim de identificar os subtipos clínicos e imunológicos (fenótipos e endotipos, incluindo imunofenótipos) para a asma. Nesse sentido, há evidências estabelecidas de um fenótipo IL-17A em pacientes com asma grave. Subgrupos de pacientes com asma grave demonstraram ter concentrações aumentadas da citocina pró-inflamatória IL-17A no escarro e no lavado broncoalveolar (LBA). Adicionalmente, a produção de IL-17A tem sido correlacionada com a hiperreatividade das vias aéreas e resistência a esteroides.^{38,41-43}

Considerando que os corticoides têm papel fundamental no tratamento da asma, estudos que visem investigar novas terapias que não respondam a esta classe de medicamentos são relevantes.

1.5 Fotobiomodulação

A terapia luminosa, devido aos seus benefícios, vem sendo utilizada para o tratamento de diversas patologias há milhares de anos e constitui uma das mais antigas modalidades terapêuticas. O médico húngaro, dr. Endre Mester, por volta da década de 60, avaliou o potencial carcinogênico do laser (rubí, 694nm) em ratos. Dr. Mester, através de seu estudo mostrou que o laser não induzia câncer, mas proporcionava o crescimento dos pelos nos animais. Através desta observação, dr. Mester 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.⁴⁴

Diversos estudos têm possibilitado uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia de doenças pulmonares crônicas. À medida que o conhecimento se acumula, há também um aumento de possíveis alvos terapêuticos visando um melhor controle das doenças e qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, terapias que melhorem o desconforto respiratório de pacientes com doenças pulmonares e reduzam os custos despendidos, bem como os efeitos colaterais são de grande importância^{45,46}

Ao decorrer dos anos, a fotobiomodulação (PBM) surge 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, o laser de baixa potência (LBP) tem se destacado devido suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, ao baixo custo e a ausência de efeitos colaterais³⁴. Outra promissora terapia que tem sido estudada nos últimos anos a LED terapia.⁴⁷

O LED (Light Emitting Diode) são diodos emissores de luz, semicondutores complexos que convertem corrente elétrica em um espectro luminoso, onde a emissão de luz é monocromática, não coerente e não colimada, o que a difere da luz LASER colimada e coerente. Assim, a LED terapia tem se mostrado tão eficiente quanto a laser terapia, o que possibilita uma alternativa eficaz ao laser, já que a luminosidade do LED pode ser produzida através de múltiplos arranjos em forma de cluster (o cluster é uma unidade luminosa do LED), abrangendo desta forma, áreas maiores, com mais potência e menor custo.⁴⁸

1.5.1 Mecanismo da fotobiomodulação

Estudos indicam que os efeitos da fotobiomodulação resultam, em parte, de mecanismos de sinalização intracelular causados pela interação da luz vermelha e infravermelho com o citocromo C oxidase (CCO) da molécula do fotoceptor mitocondrial, com isso, propiciando relação entre as ações da luz vermelha e infravermelha no metabolismo oxidativo mitocondrial.^{49,50} Outra via de sinalização a partir da mitocôndria está conectada com molécula de adenosina-trifosfato-ATP. A molécula de ATP é um combustível universal dentro de células vivas que impulsiona todas as reações biológicas. Sabe-se que mesmo pequenas mudanças no nível da ATP podem alterar significativamente o metabolismo celular. Aumentar a quantidade dessa energia pode melhorar o metabolismo celular, especialmente em células suprimidas ou outras sábias.^{49,51}

Uma longa série de descobertas recentes demonstrou que a ATP não é apenas uma moeda de energia dentro das células, mas também é uma molécula de sinalização rica que permite que células e tecidos em todo o corpo se comuniquem entre si. Os receptores específicos para ATP como a molécula

sinalização (família P2) e para seu produto de colapso final, adenosina (família P1), foram encontrados e identificados. Ativação ATP de receptores P2 (subtipos P2X e P2Y) pode produzir diferentes efeitos celulares.^{18,50}

1.5.2 O papel da fotobiomodulação na asma

Estudos mostram que a terapia com LED em baixa intensidade gera efeitos semelhantes quando comparados ao LASER. 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.^{22,52}

Nosso grupo de estudo, demonstraram resultados anteriores satisfatórios, utilizando o LED, como abordagem terapêutica para tratamento de asma experimental convencional (perfil Th2), mostraram que o tratamento reduziu a infiltração de células para o pulmão, a produção de muco, e o edema pulmonar. Estes efeitos foram modulados por IL-10, IFN- γ e mastócitos^{14,34,53,54}.

Em um outro estudo animal, utilizando um modelo experimental de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), observou-se que o tratamento com LED reduziu o influxo de neutrófilos induzido por LPS, diminuiu os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-17A e aumentou os níveis de IFN- γ no fluido do lavado broncoalveolar (LBA). Além disso, o tratamento com LED aumentou os níveis de RNAm de IL-10 e IFN- γ , reduziu parcialmente o burst oxidativo elevado e aumentou a expressão de anexina V contribuindo para a menor migração de neutrófilos^{21,55,56}. Observamos também que a fotobiomodulação modula o processo de resolução na SDRA, uma vez que níveis de lipoxinas foram aumentados^{57,58}.

Um segundo estudo animal, utilizando a PBM, foi observado a redução da inflamação pulmonar aguda em diversos modelos animais. Em um modelo de camundongo de inflamação pulmonar causada pela inalação de lipólise ou administração intranasal da TNF α analisaram o fluido de lavagem de broncoalveolar. PBM (660 nm, 4,5 J/cm²) foi administrado na pele sobre o brônquio superior direito 15 min após a indução. O PBM atenuou o fluxo de neutrófilos e reduziu a TNF- α . Nos macrófagos alveolares, o PBM aumentou o cAMP e reduziu o TNF α mRNA.²¹

Um terceiro modelo animal estava relacionado à asma⁵³, onde os camundongos foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) e depois desafiados por uma única exposição de 15 minutos ao OVA aerossolizado. O PBM foi aplicado acima (660 nm, 30 mW, 5,4 J/ cm²). A hiperresponsividade brônquica (medida por curvas de resposta de dose à acetilcolina) foi reduzida por PBM, bem como reduções em eosinófilos e eotaxina. PBM também diminuiu a expressão da molécula de adesão intracelular e Th2 citocinas, bem como transdutor de sinal e ativador de níveis de transdução 6 (STAT6) nos pulmões de camundongos desafiados. Recentemente, um estudo que concluiu que a inflamação pulmonar reduzida e os efeitos positivos do PBM nas vias aéreas parecem ser mediados pelo aumento da secreção da citocina anti-inflamatória IL-10, e redução do muco nas vias aéreas^{35,53}.

Um quarto estudo, avaliou o efeito da LED terapia sobre parâmetros inflamatórios em modelo experimental de asma, 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.¹⁴

Estes estudos, podem fornecer informações importantes sobre os mecanismos de LED e, além disso, abrem possibilidade de uma nova abordagem para o tratamento de asma, uma vez que, não há tantos trabalhos publicados voltados a resistência ao corticoide.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Tendo em vista que a asma resistente a corticoide é uma importante doença respiratória e que a fotobiomodulação parece ser uma ferramenta de tratamento promissora, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da terapia com LED sobre o desenvolvimento da asma resistente a corticoide.

2.2 Específicos

- Avaliação da inflamação pulmonar;
- Determinação da atividade da mieloperoxidase pulmonar (marcadores de neutrófilos);
- Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios (IL-6; IL-17; TNF- α); anti-inflamatórios (IL-10) e eicosanoides (LTB4; TBX2; PGE2).
- Análise da expressão gênica de mediadores inflamatórios (IL-6; IL-17; TNF- α) e anti-inflamatórios (IL-10);
- Degranulação de mastócitos.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e aprovado sob número 4474030619 em 20/08/19.

Diante desta aprovação, desenvolvemos o estudo experimental com o intuito de atender às Normas Éticas para Experimentação Animal o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCALCOBEA) e a legislação nacional atual sobre Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal nº 11.794, de 9 de outubro de 2008).

3.1 Animais

Foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratos da espécie *Rattus norvegicus* machos adultos, com aproximadamente entre 50-60 dias de vida, pertencentes a linhagem Wistar, provenientes do Biotério de criação da Universidade Nove de Julho, e os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas e sala com temperatura controlada (21 ± 2 ° C), com livre acesso a ração e água, e mantidos em experimentação na mesma Universidade.

Os ratos wistar machos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos:

Grupo Basal: ratos controle, não manipulados (n=6)

Grupo CRA: ratos asmáticos (n = 6)

Grupo CRA+LED: ratos asmáticos tratados com LED (n = 6)

Grupo CRA+DEXA: ratos asmáticos tratados com dexametasona (n = 6)

Os experimentos foram realizados duas vezes.

3.2 Indução da asma experimental resistente a glicocorticoide

Os ratos foram divididos em três grupos (n=6 ratos para cada grupo), e identificados: Asma Resistente a Corticoide (CRA); Asma resistente a corticoide + LED (CRA + LED) e Asma resistente a corticoide + Dexametasona (CRA +

Dexa). E para criar a sensibilização nos grupos, foram administrados dois tipos de ovalbumina nos ratos; uma ovalbumina grau V combinada como adjuvante completo de Freund's (AF), via subcutânea; e posteriormente uma outra solução de ovalbumina a 1% grau III por nebulização (desafio inalatório), aos quais, imitam a heterogeneidade da inflamação celular encontrados em pacientes com asma.⁴⁰

Para realizarmos a sensibilização (indução), separamos os três grupos de ratos (CRA; CRA+LED e CRA+DEXA), exceto o grupo basal e sensibilizamos no 1º (primeiro) dia com 20 µg de ovalbumina, grau V emulsionada com 75 µl de adjuvante completo Freund's por via subcutânea. Decorridos cerca de 20 dias após a sensibilização, entre o 21º e 22º dia, os ratos foram submetidos ao “desafio inalatório” com uma solução de ovalbumina a 1%, grau III. O desafio inalatório foi realizado através do sistema gerador de gás, o qual apresenta fluxo contínuo para evitar problemas secundários a hipóxia ou interferências pela amônia ou excesso de umidade. Para isto, foram realizados dois orifícios em lados opostos na câmara de vidro padrão (20 L), um para entrada e outro para saída dos gases, e o fluxo contínuo será garantido através de um nebulizador ultrassônico que produz um aerossol com partículas entre 0,5 e 1 micron com o intuito de alcançar as vias aéreas⁵⁹. Cada grupo realizava a nebulização com cerca de 10 mL da solução (ovalbumina a 1% grau III) por 15 minutos e todos os grupos eram sensibilizados sempre no mesmo horário, e as análises foram realizadas 24 horas após a última inalação.^{14,19,39,40,60}.

Assim, pode-se dizer que, com a sensibilização induzida por ovalbumina grau V e mais o adjuvante completo de Freund's, provocam uma inflamação pulmonar com características de um quadro de asma grave do tipo neutrofílica, e que está mal controlado por glicocorticoides (GC's), entretanto, a ovalbumina a 1% grau III preparada e administrada por via inalatória (nebulização), contribui para acentuar o processo inflamatório.⁴⁰

3.3 Tratamento com LED

Para tratar os animais do grupo CRA+LED (n=6) irradiamos duas vezes por dia, nos dias 21º e 22º (uma hora e 4 h após os desafios inalatórios), utilizamos uma matriz de LED da BIOLAMBDA - BLACKBOX MINI, São Paulo,

Brasil, o LED era aplicado em um único ponto localizado no trato respiratório (abrangendo a traqueia e os pulmões), nos seguintes parâmetros dosimétricos: Poder Radiante (Radiant Power) 100 mW; Modo de operação contínua (CW); Comprimento de onda $810 \pm 10\text{nm}$; Emissão radiante total 15 J; Área $2,8\text{ cm}^2$; Densidade de energia $5,35\text{ J/cm}^2$; Irradiância $33,3\text{ mW/cm}^2$; Tempo de exposição 150 segundos, e, as análises foram realizada 24 horas após a última inalação.

3.4 Tratamento com dexametasona

O grupo CRA + Dexa (n=6), foi tratado com o medicamento dexametasona (2mg/ml) injetada por via intraperitoneal (ip) nos dias 21^o e 22^o 3 horas antes de cada desafio inalatório.⁴⁰. Antes da administração do medicamento, os ratos, foram pesados e realizados uma média, resultando em aproximadamente 300 mg, sendo assim, foi calculada a dose de 0,15 mL para cada rato do grupo, e, as análises foi realizada 24 horas após a última inalação.

3.6 Eutanásia

Após 24h da última inalação foi realizada a eutanásia para coleta dos materiais. Os animais foram pesados e realizadas sedação e analgesia por hiperdosagem dos anestésicos Cetamina (100 mg/kg, Dopalen[®], Ceva Saúde Animal Ltda., Paulínia, São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Xilazina (20 mg/kg, Xilazin[®], Syntec do Brasil Ltda., Cotia, São Paulo, Brasil) por injeção intraperitoneal, até completa perda de sensibilidade.

Logo após a eutanásia, os animais foram submetidos à secção da aorta abdominal (exsanguinação), e realizadas as canulações das traqueias para a coleta do LBA¹⁹ e em seguida removidos ambos os pulmões de todos os grupos. Todos foram armazenados de acordo com a análise que foi realizada.

3.7 Delineamento experimental

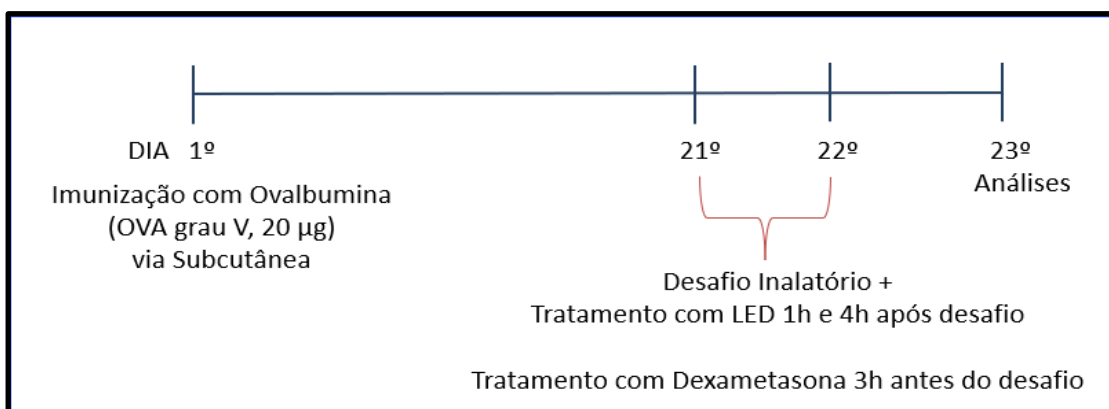


Figura 5 - Delineamento experimental.

Fonte: autor

3.8 Avaliação da inflamação pulmonar

Quantificamos o número total de células que migraram para o espaço alveolar (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) por meio da análise do lavado broncoalveolar (LBA) de acordo com estudos anteriores³⁴. A traqueia foi canulada e os pulmões foram lavados duas vezes com PBS (pH = 7,4, 10 mL). A lavagem recolhida foi centrifugada (1500 rpm durante 15 min a 20 ° C) e o sedimento celular foi ressuspensão em 1 mL de PBS. A suspensão de células (90 µL) foi corada com cristal violeta (10 µL), e o número total de células foi determinado microscopicamente em câmara de Neubauer (objetiva de microscópio 40 x).

3.9 Determinação da atividade da mieloperoxidase pulmonar

A atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar foi avaliada 24h após o último desafio OVA. É importante mencionar que o MPO é um biomarcador de neutrófilos nos pulmões⁵⁷. Os pulmões foram perfundidos com PBS por uma artéria pulmonar e, em seguida, os pulmões foram homogeneizados com 3 mL/g de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich Inc., Missouri) e 5 mL de EDTA (Labsynth Produtos Para Laboratório Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil), e foi

centrifugado a 37000g por 15 min. A atividade da MPO foi analisada por sua capacidade de catalisar a oxidação da o-dianisidina na presença de peróxido de hidrogênio. Amostras de homogenatos de tecido (10 mL) foram incubadas por 15 min com H₂O₂ (0,1%) (Labsynth) e o-dianisidina (1%) (Labsynth); a reação foi interrompida pela adição de NaN₃ a 1% (Labsynth). A absorbância foi determinada a 450 nm usando um leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

3.10 Análise ELISA de eicosanoides e citocinas e expressão do gene de citocinas

Eicosanoides (LTB₄, TXB₂ e PGE₂), citocinas (IL-4, IL-5, TNF-alfa e IL-10) foram medidos no líquido BAL (Broncoalveolar). Os níveis de citocinas e eicosanoides foram determinados por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (BD® Biosciences, New Jersey, EUA e Cayman Chemical, Michigan, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL. A expressão gênica das citocinas foi determinada por ensaio de RT-QPCR. Amostras de pulmão foram congeladas em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído usando Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo fornecido pela Invitrogen. As concentrações de RNA foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm.

O DNA das amostras dos grupos foram sintetizadas usando a transcriptase reversa MML-V (Promega, Madison, Wisc). A RT-QPCR foi realizada com o ensaio Taqman PCR em tempo real (Applied Biosystem, EUA). As condições de ciclagem foram as seguintes: 10 minutos a 95 °C seguidos por 45 ciclos de 20 segundos cada a 95 °C, 20 segundos a 58 °C e 20 segundos a 72 °C. A análise foi realizada usando Sequence Detection Software 1.9 (SDS), e a expressão de mRNA foi normalizada para a expressão HPRT. Os ensaios foram realizados com primers da taqman para as seguintes moléculas: IL-4 (Rn00561420_m1), IL-5 (Rn01459975_m1), TNF (Rn1525859_g1), IL-10 (Rn00563409_m1), and HPRT (Rn01527838_g1).

3.11 Degranulação de mastócitos

Fragmentos de pulmão foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão de fosfato de Sorensen (0,1 M, pH 7,4) a 4 ° C por 24 horas. Os tecidos foram desidratados com solução de álcool seguida de limpeza com xileno. Os fragmentos foram incluídos em parafina, seccionados a 5 µm em micrótomo HYRAX M60 (Zeiss, GR) e desparafinados. Em seguida, as lâminas (5 milímetros de espessura) foram coradas com azul de toluidina para visualização dos mastócitos. A quantificação foi realizada com o software Image J.

3.12 Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou que os dados obtidos foram paramétricos ($p > 0,05$). Os dados foram expressos como médias \pm SEM, e as comparações entre os grupos experimentais foram analisadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls de Student para comparações múltiplas usando o software GraphPad prism V.5. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 O LED reduz a inflamação pulmonar e a atividade da mieloperoxidase em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides

A Figura 6 (painel A) mostra que o LED reduziu o número de células recrutadas para o LBA em ratos asmáticos em comparação com o grupo CRA. Por outro lado, a dexametasona não reduziu o número de células recrutadas para o LBA. Houve um aumento do número de células recrutadas para o BAL nos grupos CRA, CRA + LED e CRA + Dexa quando comparado ao grupo B.

No painel B, podemos observar que tanto o LED quanto a dexametasona reduziram a atividade da MPO em animais asmáticos quando comparados ao grupo não tratado. Houve aumento da atividade da MPO nos grupos CRA, CRA + LED e CRA + Dexa quando comparados ao grupo B.

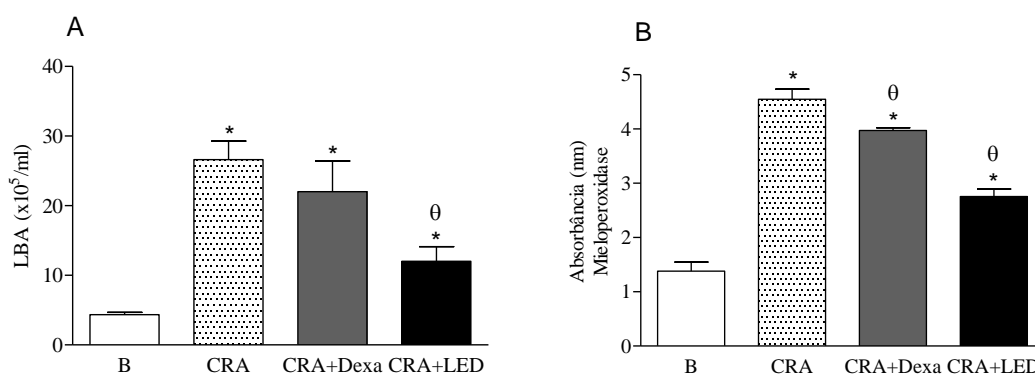


Figura 6 - O LED reduz a inflamação pulmonar, bem como a atividade da mieloperoxidase em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.

Os ratos foram submetidos tratados ou não nos dias 21 e 22, 1 e 4 h após os desafios de OVA. Após 24 horas do último desafio OVA. No painel A, observa-se a Lavagem broncoalveolar (LBA) que foi realizada e quantificada a inflamação pulmonar através do número total de células (painel A). No Painel B evidencia a atividade da mieloperoxidase, um marcador de neutrófilo e os dados representam a média \pm SEM de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo B; θ $P < 0,05$ em comparação com o grupo CRA (ANOVA de uma via).

4.2 O LED reduz a liberação de eicosanoides em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides

Na Figura 7 (painéis A-C) é mostrado que o tratamento com LED reduziu os níveis de LTB₄, TXB₂ e PGE₂ no fluido BAL em comparação com os níveis do grupo CRA não tratado. Por outro lado, o tratamento com dexametasona reduziu os níveis de TXB₂ e PGE₂ sem alterar o LTB₄. Observamos também que os grupos CRA, CRA + LED e CRA + Dexa apresentaram níveis mais elevados de LTB₄, TXB₂ e PGE₂ em comparação com o grupo B.

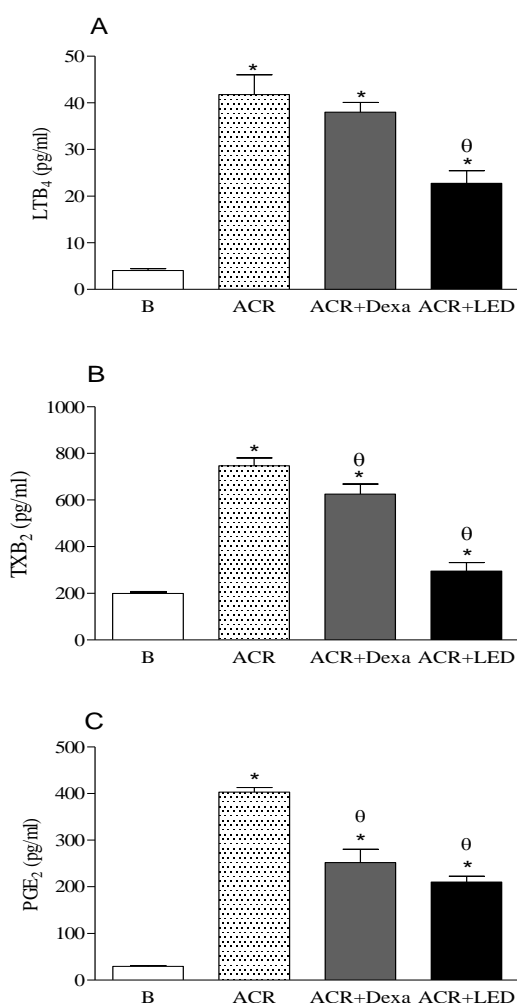


Figura 7 - O LED reduz a liberação de eicosanoides em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.

Os ratos foram submetidos tratados ou não nos dias 21 e 22, 1 e 4 h após os desafios de OVA. Após 24 horas do último desafio OVA, os mediadores eicosanoides foram avaliados, e os dados representam a média \pm SEM de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo B; θ $P < 0,05$ em comparação com o grupo CRA (ANOVA de uma via).

4.3 O LED reduz a degranulação de mastócitos em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides

A Figura 8 (painéis A-D) mostra a coloração com azul de toluidina dos mastócitos. Na Fig. 8A está o grupo de controle com mastócitos intactos (seta). A Fig. 8B mostra amostras de animais com CRA mostrando os mastócitos desgranulados (seta) e infiltrado celular difuso (cabeça de seta). A Fig. 8C mostra animais submetidos a CRA e tratados com dexametasona com redução da degranulação de mastócitos (setas) e infiltrado celular localizado (ponta de seta). Na Fig. 8D os animais com CRA e tratados com LED apresentaram redução na desgranulação de mastócitos (setas) e na migração de leucócitos (ponta de seta). Bar = 50 μ m.

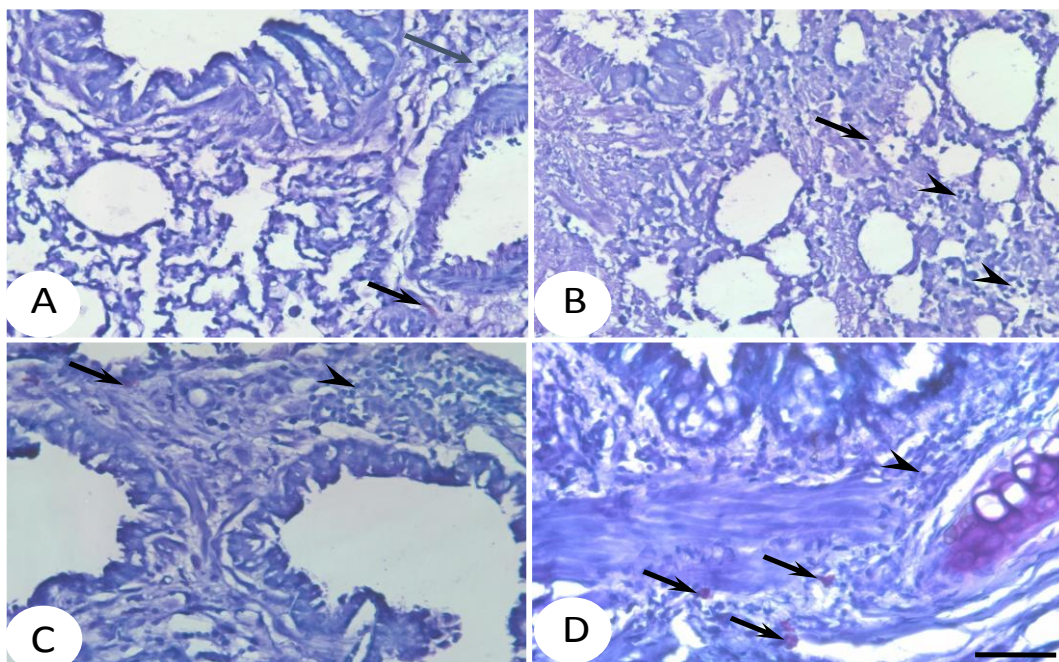


Figura 8 - O LED reduz a degranulação de mastócitos em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.

Os ratos foram submetidos tratados ou não nos dias 21 e 22, 1 e 4 h após os desafios de OVA. Após 24 horas do último desafio OVA, a histologia pulmonar foi avaliada e os dados representam a média \pm SEM de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo B; $\theta P < 0,05$ em comparação com o grupo CRA (ANOVA de uma via).

No painel E, há um gráfico que mostra a porcentagem de degranulação dos mastócitos. Nossos resultados mostraram menos degranulação de mastócitos em ambos os grupos, CRA + Dexametasona e CRA + LED, em comparação com o grupo CRA. Além disso, também evidenciamos aumento da degranulação de mastócitos em CRA, CRA + LED e CRA + Dexametasona quando comparados ao grupo B.

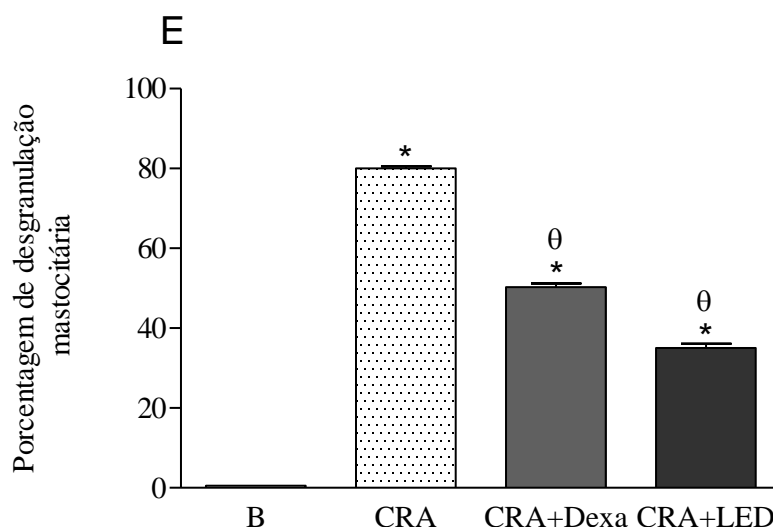


Figura 9 - O LED reduz a degranulação de mastócitos em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.

Os ratos foram submetidos tratados ou não nos dias 21 e 22, 1 e 4 h após os desafios de OVA. Após 24 horas do último desafio OVA, a porcentagem de desgranulação mastocitária foi avaliada e os dados representam a média \pm SEM de 6 animais. * $P < 0,05$ comparado ao grupo B; θ $P < 0,05$ em comparação com o grupo CRA (ANOVA de uma via).

4.4 O LED reduz citocinas inflamatórias enquanto aumenta citocinas antiinflamatórias em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides

A Figura 10 (painéis A-D) mostra que o tratamento com LED reduziu os níveis de IL-17, TNF- α e IL-6 quando comparado ao grupo CRA não tratado. Por outro lado, o tratamento com dexametasona reduziu apenas os níveis de TNF- α quando comparado ao grupo CRA não tratado. Ambos os tratamentos, LED e Dexa, aumentaram os níveis de IL-10 em comparação com o grupo CRA não tratado.

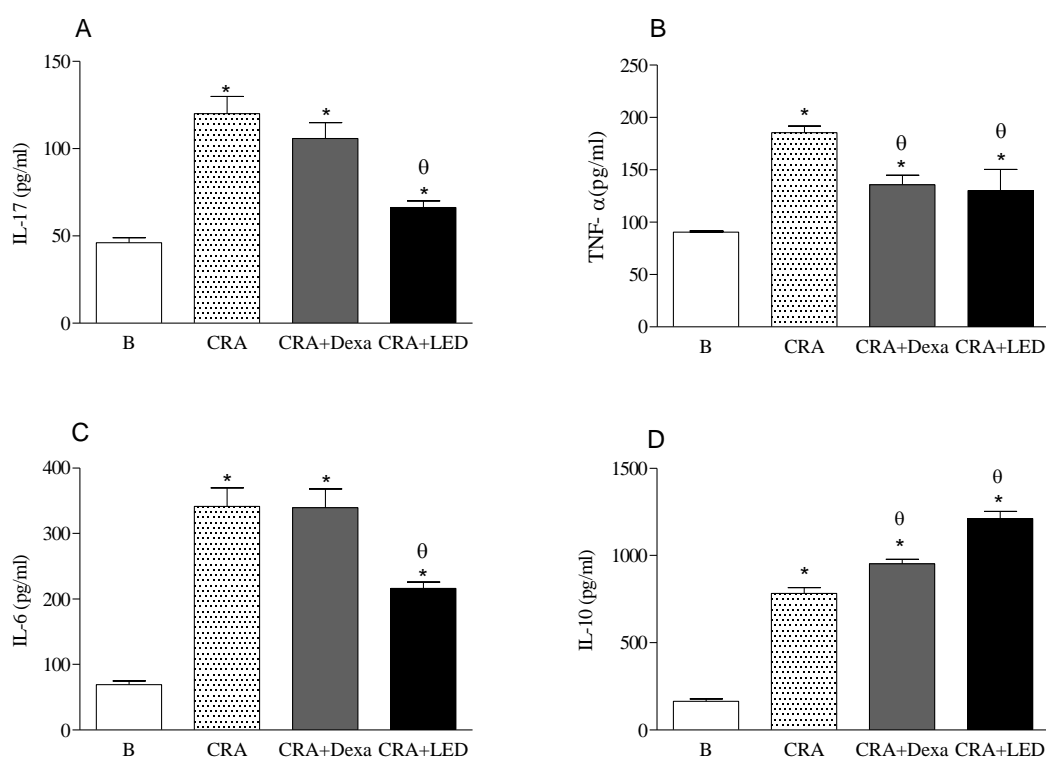


Figura 10 - O LED reduz citocinas inflamatórias enquanto aumenta as citocinas antiinflamatórias em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.

Os ratos foram submetidos tratados ou não nos dias 21 e 22, 1 e 4 h após os desafios de OVA. Após 24 horas do último desafio OVA. As citocinas foram avaliadas e os dados representam a média \pm SEM de 6 animais. * P < 0,05 comparado ao grupo B; θ P < 0,05 em comparação com o grupo CRA (ANOVA de uma via).

4.5 O LED não alterou a expressão gênica de citocinas no pulmão em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides

A Figura 11 (painéis A-D) mostra a expressão gênica elevada de IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-10 em comparação com o grupo B. Também observamos que nem os tratamentos com LED nem Dexa produziram qualquer alteração na expressão gênica das citocinas avaliadas.

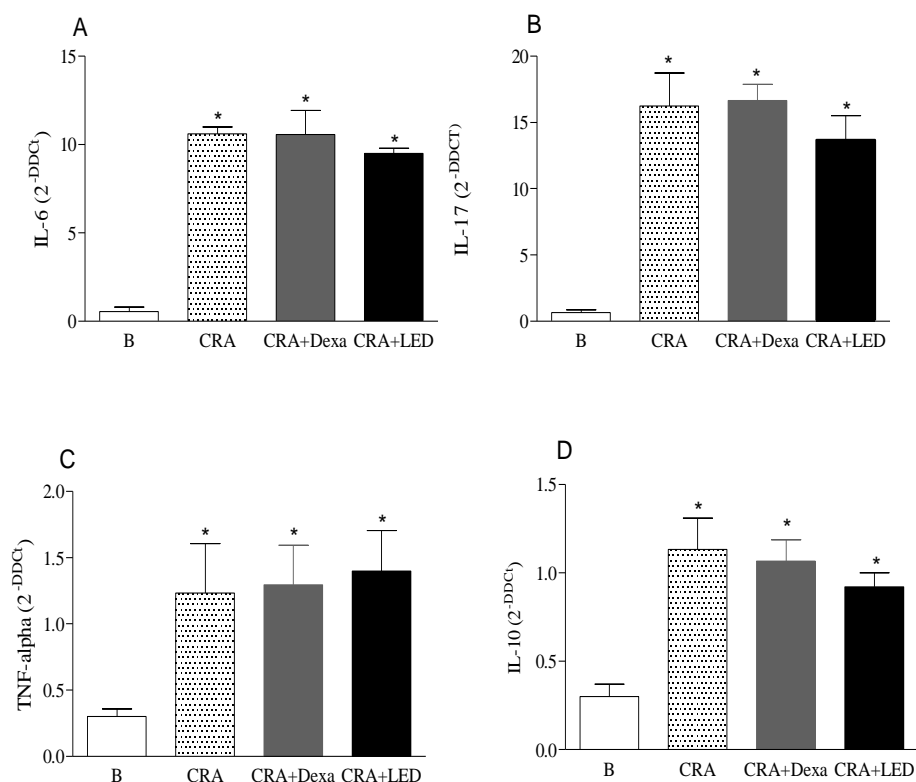


Figura 11 - O LED não alterou a expressão gênica de citocinas no pulmão em modelo experimental de asma resistente a corticosteroides.

Os ratos foram submetidos tratados ou não nos dias 21 e 22, 1 e 4 h após os desafios de OVA. Após 24 horas do último desafio OVA. A expressão do gene foi avaliada, e os dados representam a média \pm SEM de 6 animais. * P <0,05 comparado ao grupo B; θ P <0,05 em comparação com o grupo CRA (ANOVA de uma via).

5 DISCUSSÃO

A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica e reversível dos brônquios com células inflamatórias, hipertrofia das células do músculo liso e hiperreatividade brônquica das vias aéreas e que pode afetar pessoas de qualquer idade. Ela é definida pela história de sintomas respiratórios, tais como sibilos, dispneia, opressão torácica retroesternal e tosse, os quais variam com o tempo e na intensidade, e predominantemente a noite e pela manhã. Os corticosteroides são a base do tratamento da asma, contudo, na maioria dos casos a doença possa ser controlada com o uso de corticosteroides, que bloqueiam a produção das citocinas inflamatórias, e do antagonista adrenérgico (β_2) que atuam causando broncodilatação a curto ou longo prazo, no entanto, uma proporção considerável de pacientes com asma não responde à corticoterapia, mesmo quando administrados em altas doses. Neste trabalho, investigamos os efeitos da fotobiomodulação em um modelo animal de asma resistente a corticosteroides experimental, visto que, vários estudos investigaram o uso da fototerapia para tratar doenças inflamatórias pulmonares em modelos animais ^{14,31,61}, bem como em humanos ^{43,62}.

No desenvolvimento da hipersensibilidade na fase imediata a exposição de um antígeno se dá pelo estímulo aos linfócitos Th2 que desencadeiam citocinas que atuam produzindo IgE e uma vez ativado, quando exposto novamente, ocorre então uma fase de hipersensibilidade tardia, onde o IgE se liga a receptores de alta afinidade expressos em mastócitos e basófilos e induzem a degranulação mastocitária e o desencadeamento de toda cascata inflamatória da asma ^{15,26}, justificando os sintomas da fase tardia com obstrução brônquica, sibilos e remodelamento pulmonar.

Portanto na asma leve, a resposta inflamatória é dominada por um fenótipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) e influxo de eosinófilos, enquanto em formas mais graves de resistência a GC, os neutrófilos também são recrutados e um fenótipo Th2 / Th1 misto com um Th17 componente é observado. Enquanto na asma grave é caracterizada por inflamação neutrofílica, e que está associada à resistência aos corticosteroides^{4,40}. Para tanto, utilizamos um modelo

experimental de CRA induzida pela administração de ovalbumina emulsionada com o adjuvante de Freund⁴⁰, para produzir uma condição caracterizada por um aumento do número de neutrófilos recrutados para o lavado broncoalveolar.

Nossos dados confirmaram o estabelecimento desse modelo experimental, uma vez que apresentamos elevado número de neutrófilos, evidenciado pelo aumento da atividade de MPO após a indução de CRA. Em outros modelos experimentais de asma alérgica, o padrão das células é diferente, com a infiltração predominantemente composta por eosinófilos^{36,41}. Em nosso modelo, o tratamento com corticosteroide não reverteu a migração das células pulmonares ou afetou os níveis de leucotrieno B₄, interleucinas 17 e 6. Assim, novos estudos são necessários, e que visam, avaliar novos tratamentos para um tipo de asma que apresenta características neutrofílica típicas e resistência aos corticosteroides.

Nossos resultados mostraram que o tratamento fotobiomodulação foi eficaz na redução do número de neutrófilos que migram para os pulmões. Os neutrófilos desempenham um papel regulador na asma grave e, geralmente, são considerados menos responsivos aos corticosteroides. Os eventos envolvidos na ativação de neutrófilos incluem adesão, quimiotaxia, degranulação e liberação de metabólitos do ácido araquidônico^{6,63}.

Considerando que os sintomas asmáticos são dependentes da degranulação dos mastócitos, avaliamos o percentual de degranulação dos mastócitos após o tratamento com fotobiomodulação. Os mastócitos atuam como uma importante sentinela imunológica e uma cascata inflamatória é desencadeada após o desafio com OVA. Entre os efeitos desencadeados por mastócitos ativados, podemos incluir a modulação da migração celular, produção de muco, edema e hiperresponsividade das vias aéreas^{37,38,47}. Nossos dados mostraram pequena degranulação de mastócitos após os tratamentos Dexametasona e LED. No entanto, o tratamento com LED foi mais eficaz em comparação com Dexametasona. Este resultado é importante e sugere que o LED pode ser incluído na abordagem convencional para o tratamento da asma.

Muitos mediadores lipídicos estão envolvidos na regulação da inflamação pulmonar, em particular os eicosanoides. Assim, também avaliamos os metabólitos do ácido araquidônico liberados após o tratamento com LED. Os leucotrienos são mediadores potentes da asma e são sintetizados a partir do

ácido araquidônico pela via da 5-lipoxigenase em neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, basófilos e populações de mastócitos. Isso causa aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e secreção excessiva de muco⁶⁴. Os tromboxanos são liberados de plaquetas, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais e estimulam a ativação das plaquetas, além de ser um potente agente vasoconstritor. As prostaglandinas afetam o tônus da musculatura lisa dos brônquios⁴². Nossos resultados mostraram que o tratamento com a fotobiomodulação foi mais eficaz que os corticosteroides na redução dos níveis de leucotrieno B₄, tromboxano B₂ e prostaglandina E₂ no líquido do lavado broncoalveolar. Essa redução pode ser consequência do número reduzido de neutrófilos migrados para o lavado broncoalveolar, bem como da menor desgranulação dos mastócitos.

Há evidências estabelecidas para um fenótipo geral de IL-17A em pacientes com asma grave. Foi demonstrado que subgrupos de pacientes com asma grave apresentam concentrações elevadas da citocina pró-inflamatória IL-17A na expectoração e no lavado broncoalveolar^{7,52,65-67}. Além disso, a produção de IL-17A foi correlacionada com hiperreatividade das vias aéreas e resistência a esteroides. IL-6 é uma citocina inflamatória relacionada à função pulmonar prejudicada e asma grave³³. O TNF- α é uma citocina inflamatória com papel predominante na asma, onde governa a inflamação das vias aéreas e afeta o resultado do tratamento.

Considerando o importante papel dessas citocinas na asma grave, avaliamos os níveis de proteínas e a expressão gênica. Nossos dados mostraram níveis reduzidos de proteínas de IL-17, TNF- α e IL-6 após o tratamento com a fotobiomodulação. No entanto, observa-se que essas reduções não foram acompanhadas por alterações na expressão gênica, isto porque as coletas foram realizadas em período e em tempos diferentes, e diante deste fato, observamos que não houve alteração na expressão gênica. Além disso, o tratamento com corticosteroides não reduziu os níveis de IL-17 e IL-6 ou a expressão gênica de todas as citocinas estudadas.

A IL-10 é uma importante citocina antiinflamatória que regula o influxo celular. A IL-10 é produzida principalmente por células CD8⁺ ativadas. Células Th0, Th1, Th2 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados por LPS também podem produzir IL-10, sendo fontes menos importantes. O efeito

principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN-g, IL-2, IL-12, TNF- β . Inibe ainda a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2. IL-10 atua como um coestimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores. Observamos um nível elevado de IL-10 no fluido lavado broncoalveolar foi observado após ambos os tratamentos, Dexametasona e LED, entretanto, sabemos que a dexametasona é um potente antiinflamatório esteroidal dos quais já é sabido seu mecanismo de ação, por outro lado, o mecanismo em que LED atua no processo antiinflamatório ainda é pouco estudado, ao qual vale mais estudos na área. Por outro lado, a expressão do gene IL-10 não foi afetada. É importante notar que o LED foi mais eficaz do que o Dexametasona. Assim, acreditamos que o LED promove seus efeitos pelo restabelecimento da homeostase, e pelo aumento dos mecanismos de defesa.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que a FBM reduziu o número total de células recrutadas para o LBA, a atividade de MPO (marcador de neutrófilos), os níveis de LTB₄, TXB₂ e PG₂, entretanto, observa-se que não houve alteração na expressão gênica das citocinas IL-17, TNF- α e IL-6. Contudo, a FBM também reduziu a desgranulação mastocitária.

Portanto, este estudo mostra a FBM como uma terapia promissora para o tratamento da asma resistente a corticoide e abre possibilidades de estudos futuros em pacientes asmáticos graves que não respondem aos corticoides.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bousquet J, Clark TJH, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'Byrne P, et al. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy*. 2007;62.
2. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 13]. Available from: <https://sbpt.org.br/portal/>
3. David E. Bice JS. ANIMAL MODELS OF ASTHMA: Potential Usefulness for Studying Health Effects of Inhaled Particles. *Inhal Toxicol*. 2000;12:829–62.
4. Campos HS. Manual Da Asma brônquica No Adulto. *Rev Bras Pneumol Sanit*. 2007;15:47–60.
5. Associação Brasileira de Alergia e Imunologia, ASBAI [Internet]. [cited 2021 Sep 13]. Available from: <https://asbai.org.br/>
6. Schleimer R, Freeland H, Peters S, Brown K, Derse C. An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;250:598–605.
7. Murdoch JR, Lloyd CM. Resolution of Allergic Airway Inflammation and Airway Hyperreactivity Is Mediated by IL-17-producing gdT Cells.
8. Datasus [Internet]. [cited 2021 Sep 13]. Available from: <https://datasus.saude.gov.br/>
9. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas da Asma. 2021;98. Available from: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20210526_PCDT_Relatorio_Aasma_CP_39.pdf
10. Monteseirín J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19:340–54.
11. Maiellaro M, Correa-Costa M, Vitoretti LB, Gimenes Júnior JAÔ, Câmara NOS, Tavares-de-Lima W, et al. Exposure to low doses of formaldehyde during pregnancy suppresses the development of allergic lung inflammation in offspring. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;278:266–74.
12. Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:S18–36.

13. Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:1033–42.
14. Siqueira VPC, Evangelista MIS, dos Santos A, Marcos RL, Ligeiro-de-Oliveira AP, Pavani C, et al. Light-Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. *J Biophotonics.* 2017;10:1683–93.
15. Kumar, Vinay; Abbas, Abul k.; Aster JC. *Robbins Basic Pathology.* 10th ed. EUA: Elsevier Inc.; 2018. 3410 p.
16. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: Recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:749–86.
17. Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, et al. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med.* 1992;176:1381–6.
18. Tsai S-R, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;170:197–207.
19. 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 lesions. *Eur J Pharmacol.* 1992;213:63–70.
20. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ. *Farmacologia a Base Fisiopatológica da Farmacologia.* 3ª Edição. Rio de Janeiro, RJ: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.;
21. Carvalho JL, Britto A, de Oliveira APL, Castro-Faria-Neto H, Albertini R, Anatriello E, et al. Beneficial effect of low-level laser therapy in acute lung injury after i-I/R is dependent on the secretion of IL-10 and independent of the TLR/MyD88 signaling. *Lasers Med Sci.* 2017;32:305–15.
22. Fischer R, Tomé D, Mcghee JR, Boyaka N. Th1 and Th2 cells are required for both eosinophil-and neutrophil-associated airway inflammatory responses in mice. 2007;
23. Foley SC, Hamid Q. Images in allergy and immunology: Neutrophils in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1282–6.
24. Alangari A. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Ann Thorac Med.* 2010;5:133.
25. Dale MM, Haylett DG. *Farmacologia Condensada.* 2ª Edição. Rio de Janeiro, RJ:

- Elsevier; 2010. 125 p.
26. Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, P. H, et al. Rang & Dale's Pharmacology. 9th ed. EUA: Elsevier Ltd; 2020. 2634 p.
 27. Hansbro PM, Kim RY, Starkey MR, Donovan C, Dua K, Mayall JR, et al. Mechanisms and treatments for severe, steroid-resistant allergic airway disease and asthma. *Immunol Rev.* 2017;278:41–62.
 28. Henderson I, Caiazzo E, McSharry C, Guzik TJ, Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? *Pharmacol Res.* 2020;160:105189.
 29. Wang M, Gao P, Wu X, Chen Y, Feng Y, Yang Q, et al. Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respir Res.* 2016;17:1–9.
 30. Leung DYM, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. Vol. 111, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mosby Inc.; 2003. p. 3–22.
 31. Brochetti RA, Leal MP, Rodrigues R, da Palma RK, de Oliveira LVF, Horliana ACRT, et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. *Lasers Med Sci.* 2017;32:1825–34.
 32. Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:410–8.
 33. Lipworth B, Chan R, Kuo C. Systemic IL-6 and severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202:1324–5.
 34. Alonso P, Schapochnik A, Klein S, Brochetti R, Damazo A, Destro MS, et al. Transcutaneous systemic photobiomodulation reduced lung inflammation in experimental modelo f asthma by altering the mast cell degranulation and interleukin 10 level. *Lasers Med Sci.* 2021;epub ahead of print.
 35. Rigonato-Oliveira NC, Brito AA De, Vitoretti LB, De Cunha Moraes G, Gonçalves T, Herculano KZ, et al. Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Pulmonary Inflammation in Asthma Induced by House Dust Mite (HDM): Dosimetry Study. *Int J Inflam.* 2019;2019.
 36. Fahy J V. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:256–9.
 37. Haworth O, Levy BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway

- inflammation. *Eur Respir J*. 2007;30:980–92.
38. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I, Nakazawa M. *Pathology of asthma*. 2013;
 39. Lee JU, Park JS, Jun JA, Kim MK, Chang HS, Baek DG, et al. Inhibitory Effect of Paquinimod on a Murine Model of Neutrophilic Asthma Induced by Ovalbumin with Complete Freund's Adjuvant. *Can Respir J*. 2021;2021.
 40. Dejager L, Dendoncker K, Eggermont M, Souffriau J, Van Hauwermeiren F, Willart M, et al. Neutralizing TNF α restores glucocorticoid sensitivity in a mouse model of neutrophilic airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2015;8:1212–25.
 41. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic Inflammation in Asthma. *N Engl J Med*. 1990;323:1033–9.
 42. Kytikova O, Novgorodtseva T, Denisenko Y, Antonyuk M, Gvozdenko T. Pro-resolving lipid mediators in the pathophysiology of asthma. *Med*. 2019;55:1–12.
 43. Nejatifard M, Asefi S, Jamali R, Hamblin MR, Fekrazad R. Probable positive effects of the photobiomodulation as an adjunctive treatment in COVID-19: A systematic review. *Cytokine*. 2021;137:155312.
 44. Barolet D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2008;27:227–38.
 45. Da Silva CM, Leal MP, Brochetti RA, Braga T, Vitoretti LB, Câmara NOS, et al. Low level laser therapy reduces the development of lung inflammation induced by formaldehyde exposure. *PLoS One*. 2015;10.
 46. Leal MP, Brochetti RA, Ignácio A, Câmara NOS, da Palma RK, de Oliveira LVF, et al. Effects of formaldehyde exposure on the development of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Toxicol Reports*. 2018;5:512–20.
 47. Chanez P, Humbert M. Asthma: still a promising future?
 48. Santos KFP, Ferrari RAM, França CM. *Biofotônica Conceitos e Aplicações*. Edição 1^a, editor. Vol. 148. São Paulo: Uninove; 2017. 258 p.
 49. R Hamblin M. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4:337–61.
 50. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:159–60.
 51. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* [Internet]. 2016;22:348–64. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7488285/>
 52. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG.

- Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity*. 2009;31:331–41.
53. 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.
 54. Schapochnik A, Klein S, Brochetti R, Alonso PT, Damazo AS, de Souza Setubal Destro MF, et al. Local (but not systemic) photobiomodulation treatment reduces mast cell degranulation, eicosanoids, and Th2 cytokines in an experimental model of allergic rhinitis. *Lasers Med Sci*. 2021;
 55. Aimbire F, Ligeiro De Oliveira AP, Albertini R, Corrêa JC, Ladeira De Campos CB, Lyon JP, et al. Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 β Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation.
 56. Costa Carvalho JL, de Brito AA, de Oliveira APL, de Castro Faria Neto HC, Pereira TM, de Carvalho RA, et al. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J Biophotonics*. 2016;9:1208–21.
 57. da Silva JGF, dos Santos SS, de Almeida P, Marcos RL, Lino-dos-Santos-Franco A. Effect of systemic photobiomodulation in the course of acute lung injury in rats. *Lasers Med Sci*. 2020;
 58. da-Palma-Cruz M, da Silva RF, Monteiro D, Rehim HMMA, Grabulosa CC, de Oliveira APL, et al. Photobiomodulation modulates the resolution of inflammation during acute lung injury induced by sepsis. *Lasers Med Sci*. 2019;34:191–9.
 59. Lino dos Santos Franco A, Damazo AS, Beraldo de Souza HR, Domingos HV, Oliveira-Filho RM, Oliani SM, et al. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;214:35–42.
 60. Maiellaro M, Correa-Costa M, Vitoretto LB, Gimenes Júnior JA, Câmara NOS, Tavares-de-Lima W, et al. Exposure to low doses of formaldehyde during pregnancy suppresses the development of allergic lung inflammation in offspring. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;278:266–74.

61. Schapochnik A, da Silva MR, Leal MP, Esteves J, Hebeda CB, Sandri S, et al. Vitamin D treatment abrogates the inflammatory response in paraquat-induced lung fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;355:60–7.
62. Fekrazad R, Asefi S, Pourhajibagher M, Vahdatinia F, Fekrazad S, Bahador A, et al. Photobiomodulation and Antiviral Photodynamic Therapy in COVID-19 Management. In: *Adv Exp Med Biol*. 2021. p. 517–47.
63. Wang M, Gao P, Wu X, Chen Y, Feng Y, Yang Q, et al. Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respir Res*. 2016;17:1–9.
64. Meshram D, Bhardwaj K, Rathod C, Mahady GB, Soni KK. The Role of Leukotrienes Inhibitors in the Management of Chronic Inflammatory Diseases. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2020;14:15–31.
65. Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1neg iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*. 2007;204:995–1001.
66. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, et al. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med*. 2008;205:385–93.
67. Reis AP dos, Machado JAN. Biomarcadores e imunobiológicos na asma. *Brazilian J Allergy Immunol*. 2018;2:405–15.

ANEXO 1 – Artigo: Beneficial effects of infrared light-emitting diode in corticosteroid-resistant asthma.


Lasers in Medical Science

<https://doi.org/10.1007/s10103-021-03457-0>

ORIGINAL ARTICLE



Beneficial effects of infrared light-emitting diode in corticosteroid-resistant asthma

Robson Alexandre Brochetti¹ · Simone Klein¹ · Paula Tatiane Alonso¹ · Adriana Schapochnik¹ · Amílcar Sabino Damazo² · Michael R. Hamblin³ · Maria Fernanda de Souza Setubal Destro¹ · Adriana Lino-dos-Santos-Franco¹ 

Received: 4 August 2021 / Accepted: 26 October 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2021

Abstract

Corticosteroid-resistant asthma (CRA) is a severe form of disease and clinically important, since patients do not respond to mainstay corticosteroid therapies. Thus, new therapies are needed. However, a big limiting factor in the understanding of CRA is the existence of different immunological and inflammatory phenotypes, a fact that makes it difficult to reproduce experimentally. Photobiomodulation (PBM) emerges as an alternative therapy based on earlier studies. This study aims to evaluate the effect of PBM using infrared light-emitting diode (ILED) on the development of corticosteroid-resistant asthma. Therefore, groups of rats were sensitized and challenged with ovalbumin plus Freund's adjuvant for the induction of CRA, and treated or not with ILED directly in the respiratory tract on the skin (wavelength 810 nm; power 100 mW; density energy 5 J/cm; total energy 15 J; time 150 s). Our experimental model was capable to induce neutrophilic asthma. Besides that, the corticosteroid treatment did not reverse the lung cell migration as well as the levels of leukotriene B₄, and interleukins 17 and 6. The treatment with ILED reduced the lung cell migration; myeloperoxidase activity; mast cell degranulation; and the levels of leukotriene B₄, thromboxane B₂, prostaglandin E₂, tumoral necrosis factor alpha, and interleukins 17 and 6. Still, ILED increased the level of interleukin 10. In conclusion, we showed promisor effects of ILED when irradiated directly in the respiratory tract as adjuvant treatment of corticosteroid-resistant asthma.

Keywords Corticosteroid-resistant asthma · Photobiomodulation · Near-infrared light-emitting diode · Interleukins · Mast cells · Eicosanoids

ANEXO 2 – Protocolo aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da luz de diodo infravermelha em modelo experimental de asma resistente a corticóide", protocolada sob o CEUA nº 4474030619 (ID 000165), sob a responsabilidade de **Adriana Lino dos Santos Franco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 20/08/2019.

We certify that the proposal "The role of infrared diode light in an experimental model of corticosteroid resistant asthma", utilizing 48 Heterogenics rats (48 males), protocol number CEUA 4474030619 (ID 000165), under the responsibility of **Adriana Lino dos Santos Franco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 08/20/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **08/2021**

Área: **Biofotônica Aplicada Às Ciências da Saúde**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **48**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **160 a 180 g**

Local do experimento: **Laboratório de Pesquisa da Universidade Nove de Julho -Vergueiro**

São Paulo, 16 de agosto de 2021

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

