



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**

**CINTIA ESTEFANO ALVES**

**EFEITO DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO NO**  
**EQUILÍBRIO ENTRE CÉLULAS T EFETORAS/T REGULADORAS**  
**EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA PULMONAR**  
**OBSTRUTIVA CRÔNICA**

**São Paulo, SP**

**2023**



**CINTIA ESTEFANO ALVES**

**EFEITO DA TERAPIA COM FOTOBIMODULAÇÃO NO  
EQUILÍBRIO ENTRE CÉLULAS T EFETORAS/T REGULADORAS  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA PULMONAR  
OBSTRUTIVA CRÔNICA.**

Dissertação apresentada universidade Nove de  
julho, para obtenção de título de mestre em  
biofotônica aplicada a ciências da saúde

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Ligeiro de  
Oliveira**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Aurileia  
Aparecida Brito**

**São Paulo, SP**

**2023**

Alves, Cintia Estefano.

Efeito da terapia com fotobiomodulação no equilíbrio entre células t efetoras/t reguladoras em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica. / Cintia Estefano Alves. 2023.

52 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Ligeiro de Oliveira.

1. DPOC. 2. Laser. 3. Fotobiomodulação. 4. Inflamação pulmonar.  
5. Citocinas.

I. Oliveira, Ana Paula Ligeiro de.                      II. Título.

CDU 615.831

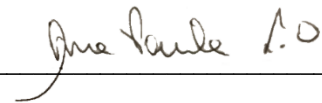
São Paulo, 26 de junho de 2023.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Cintia Estefano Alves

Título da Dissertação: “Efeito da fotobiomodulação no equilíbrio entre células refletoras e reguladoras em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica”.

Presidente: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA

 1.0

Membro: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



Membro: PROF DR. FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me aberto tantas portas e me sustentado durante todo esse processo.

Agradeço aos meus pais Antonio e Eliana, por terem me encaminhado sempre no caminho dos estudos, ajudando e incentivando em cada etapa dessa jornada, e por cada palavra de conforto que me fizeram nunca desistir.

Ao meu noivo Yuri, por me ajudar nas dificuldades, nas aulas de bioestatística e por toda a paciência e carinho que demonstrou por mim nesses meses.

Agradeço a minha professora Ana Paula por todo conhecimento adquirido e principalmente por toda a paciência que teve comigo nesses dois anos de estudos.

A minha querida amiga Tawany, por compartilhar comigo os momentos felizes e difíceis, por ter sido meu apoio nesse processo.

A Auriléia por ter me ensinado como ser uma boa profissional na carreira e na vida.

E agradeço a Universidade Nove de Julho por ter sido minha segunda casa nesses dois anos, por ter apoiado e incentivado minha pesquisa e me concedido uma bolsa sem a qual eu não conseguiria me dedicar tanto a esse projeto.

## Resumo

Atualmente, a DPOC tem alto impacto na morbimortalidade em todo o mundo. O hábito de fumar, o histórico de tabagismo, a taxa de fluxo aéreo, a obstrução e o enfisema pulmonar estão todos relacionados ao aumento do número dessas células CD4+, CD8+ expressando NF- $\kappa$ B, STAT4, IFN- $\gamma$  e perforina. Por outro lado, uma deficiência nas células T reguladoras de CD4+CD25+Foxp3+ (Tregs) pode prejudicar o sistema imune e, assim, levar a doenças imunológicas. Assim, estratégias imunoterapêuticas, como a terapia com fotobiomodulação (FBM), visam regular os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição. Nesse sentido, o objetivo foi avaliar as células Treg STAT4 e Foxp3, bem como a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no pulmão após terapia com FBM no modelo experimental de DPOC. Para tanto, animais C57BL/6 induzidos DPOC com extrato de fumaça de cigarro (EFC) e submetidos à terapia com laser de diodo (660nm, 30mW, 180s) por 15 dias. O protocolo utilizado para a indução da DPOC consistiu na aplicação orotraqueal de EFC (3x por semana/7 semanas). O Lavado broncoalveolar (LBA) e pulmões foram coletados para análise. Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman Keuls. Níveis de significância ajustados para 5% ( $p < 0,05$ ). A terapia com FBM reduziu o número de células inflamatórias, os níveis de IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , MCP-1, GM-CSF, KC/CXCL1, LTB4 e aumentou os de IL-10. Também observamos diminuição de colágeno, muco, índice de broncoconstrição, alargamento alveolar, células T CD4+, CD8+, CD4+STAT4+ e CD4+IFN- $\gamma$ +. Além disso, no grupo tratado com FBM, encontramos aumento de células T CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+IL-10+. Assim, o tratamento com FBM pode ser usado como uma estratégia imunoterapêutica para a DPOC, através do possível mecanismo de expansão da população de células T reg.

Palavras chaves: DPOC, Laser, fotobiomodulação, inflamação pulmonar, citocinas

## Abstract

Currently, COPD has a high impact on morbidity and mortality worldwide. The smoking habit, smoking history, airflow rate, obstruction and pulmonary emphysema are all related to the increase in the number of these CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> cells expressing NF- $\kappa$ B, STAT4, IFN- $\gamma$  and perforin. On the other hand, a deficiency in T cells regulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) may impair the immune system and thus lead to immune disease. Thus, immunotherapeutic strategies, such as photobiomodulation (PBM) therapy, aim to regulate the levels of cytokines, chemokines and transcription factors. In this sense, the objective was to evaluate STAT4 and Foxp3 Treg cells as well as the production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in the lung after PBM therapy in the COPD model. Thus, animals C57BL/6 with COPD submitted to diode laser therapy (660nm, 30mW, 180s) for 15 days. The protocol used for the induction of COPD consisted in the application orotracheal of extract of cigarette smoke (3x per week/7 weeks). Bronchoalveolar lavage (BAL) and lungs were collected for analysis. Data were submitted to the One-way ANOVA test followed by the NewmanKeuls test. Significance levels adjusted to 5% ( $p < 0.05$ ). PBM reduced the number of inflammatory cells, the levels of IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , MCP-1, GM-CSF, KC/CXCL1, LTB4 and increased IL-10. We also observed decrease of collagen, mucus, bronchoconstriction index, alveolar enlargement, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>STAT4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. In addition, in the treated group, we found an increase in T cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>. Thus, PBM treatment can be used as an immunotherapeutic strategy for COPD, through the possible mechanism of expansion of T reg cells population.

Keywords: COPD, Laser, photobiomodulation, lung inflammation, cytokines

## **Lista de ilustrações**

|                                                                                                                                                                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1 Características da DPOC .....</b>                                                                                                                                                                                                               | <b>8</b>  |
| <b>Figura 2. Esquema da fisiopatologia da DPOC .....</b>                                                                                                                                                                                                    | <b>9</b>  |
| <b>Figura 3. Ilustração do esquema de interação do laser com a célula .....</b>                                                                                                                                                                             | <b>15</b> |
| <b>Figura 4. Fluxograma com os grupos experimentais. ....</b>                                                                                                                                                                                               | <b>18</b> |
| <b>Figura 6. Esquema de obtenção do extrato de fumaça de cigarro .....</b>                                                                                                                                                                                  | <b>20</b> |
| <b>Figura 8. Pontos de aplicação do laser. ....</b>                                                                                                                                                                                                         | <b>21</b> |
| <b>Figura 7. Laser da marca MMO Optics/ Modelo: TF Premier PLUS. ....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>21</b> |
| <b>Figura 8. Esquema ilustrativo do experimento. ....</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>23</b> |
| <b>Figura 9. Efeito da terapia com FBM no total de células, neutrófilos, macrófagos e linfócitos TCD3<sup>+</sup> em modelo experimental de DPOC no infiltrado pulmonar (BAL) .....</b>                                                                     | <b>26</b> |
| <b>Figura 10. Efeito da terapia com FBM nas citocinas IL-1<math>\beta</math> (A), TNF-<math>\alpha</math> (B), IL-6 (C), IFN-<math>\gamma</math> (D), MCP-1 (E), GM-CSF (F), KC Níveis de /CXCL1 (G), LTB4 (H) e IL-10 (I) no sobrenadante do BAL .....</b> | <b>27</b> |
| <b>Figura 11. Efeito da terapia com FBM na produção de muco (A) nas vias aéreas. Os resultados referem-se ao uso de 10 camundongos em cada grupo experimental.....</b>                                                                                      | <b>28</b> |
| <b>Figura 12. Efeito da terapia com FBM na deposição de colágeno nas vias aéreas por histologia.....</b>                                                                                                                                                    | <b>29</b> |
| <b>Efeito da terapia com FBM no alargamento alveolar em modelo experimental de DPOC, por histologia .....</b>                                                                                                                                               | <b>30</b> |
| <b>Figura 13. Efeito da terapia com FBM nos níveis de CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (C) em LBA. ....</b>                                                                                                                                            | <b>30</b> |
| <b>Figura 14. Quantificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>STAT-4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>STAT-4<sup>+</sup>IFN-<math>\gamma</math><sup>+</sup> em LBA .....</b>                                                                                       | <b>31</b> |

**Lista de tabelas**

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do laser .....</b> | <b>22</b> |
|---------------------------------------------------------|-----------|

## **Tabela de abreviaturas e siglas**

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

FBM: Fotobiomodulação

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

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

IL – Interleucina

J – Joules

mg/ml – miligrama/mililitros

PBS – do inglês, “Phosphate Buferred Saline”

TGF- $\beta$  – do acera, “transforming growth acer beta”

$\mu$ L – microlitros

RPM – rotações por minuto

TNF- $\alpha$  (do inglês, “Tumor Necrosis Factor – alpha”)

OMS - Organização Mundial da saúde

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

Th1 – do inglês, “Thelper1”

PCDT - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença (PCDT) Pulmonar Obstrutiva Crônica

ATP - do inglês, “Adenosina Triphosphate”

EPM - do inglês, “Enterprise Performance Management”

ROS - do inglês, “ Reactive oxygen species”

TGF - do inglês, “ Transforming growth factor”

GM-CSF - do inglês, “Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”

MMP12 Metaloproteinase de matriz 12

DNA Ácido desoxirribonucleico

CXCL8 Quimiocina (C-X-C Motif) ligantes 8

T CD4+ População de células T subpopulação CD4+

T CD8+ População de células T subpopulação CD8+

EDTA – do inglês, “Ethylenediamine tetraacetic acid”

## Sumário

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Dados epidemiológicos .....                      | 07 |
| 1.2. Definição da DPOC .....                          | 07 |
| 1.3. Fisiopatologia da DPOC .....                     | 08 |
| 1.4. Sintomas e sinais clínicos .....                 | 10 |
| 1.5. A teoria da emissão espontânea da radiação ..... | 11 |
| 1.6. O laser de baixa intensidade .....               | 12 |
| 1.7. A emissão da luz laser .....                     | 13 |
| 1.8. Laser vermelho.....                              | 14 |
| 2. Objetivos .....                                    | 17 |
| 3. Materiais e métodos .....                          | 15 |
| 3.1 Desenho do estudo .....                           | 18 |
| 3.2. Tamanho amostral .....                           | 18 |
| 3.3. Critério de inclusão e exclusão .....            | 19 |
| 3.4. Randomização .....                               | 19 |
| 3.5. Cegamento .....                                  | 19 |
| 3.7. Métodos estatísticos .....                       | 19 |
| 3.8. Animais experimentais .....                      | 19 |
| 3.9. Procedimentos experimentais .....                | 17 |
| 3.10. Extrato de cigarro .....                        | 20 |
| 3.11. Irradiação .....                                | 21 |
| 3.12. Desfecho .....                                  | 23 |
| 4. Resultados .....                                   | 26 |

|                      |    |
|----------------------|----|
| 5. Discussão .....   | 31 |
| 6. Referências ..... | 33 |

# 1. Contextualização

## 1.1 Dados epidemiológicos

As infecções respiratórias são classificadas como o maior contribuidor individual para a carga geral de doenças no mundo <sup>1</sup>.

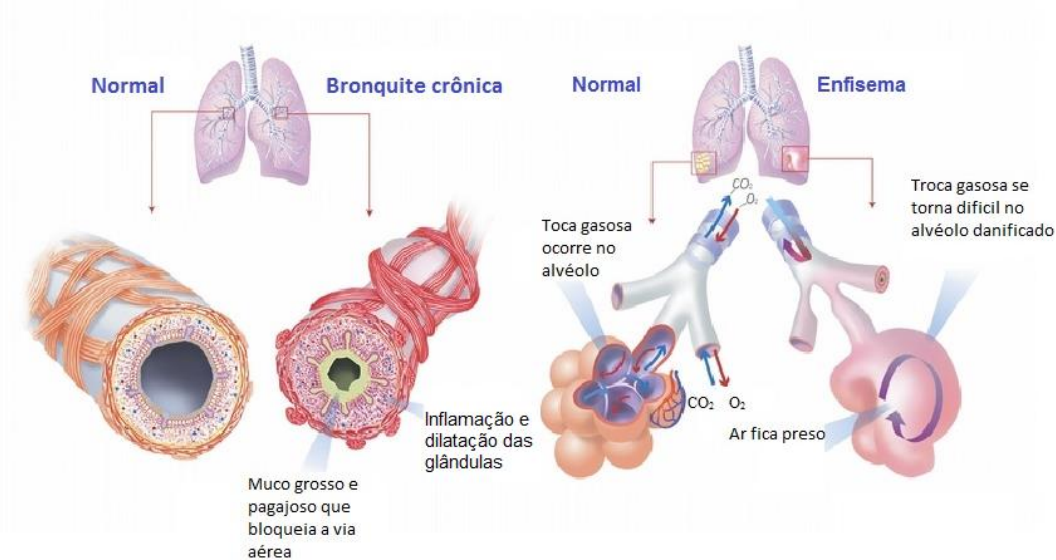
Segundo a OMS (2018), a DPOC afeta 210 milhões de pessoas, é a quarta causa de mortalidade e representa 4,8% dos óbitos em todo o mundo. Em 2019, a OMS estimou a DPOC como a terceira principal causa de morte no mundo <sup>2</sup>.

Embora a DPOC tenha recebido atenção crescente da comunidade médica nos últimos anos, ainda é relativamente desconhecido ou ignorado pelo público, bem como as autoridades de saúde e governamentais públicas <sup>3</sup>.

A exposição a partículas e gases tóxicos, incluindo fumaça de cigarro, é o principal fator de risco para DPOC <sup>4</sup>, porém estudos recentes descreveram uma prevalência significativa de DPOC entre os que nunca fumaram <sup>5</sup> outros causadores menos comuns são, a queima da biomassa, fumos de diversos tipos como os narguilés, cachimbos, cigarros eletrônicos e maconha, e a queima de carvão e madeira usados em fogão a lenha. Em 1% a 2% dos casos de DPOC se dão por um fator genético, que é a deficiência de alfa-1 antitripsina, uma antiprotease cuja principal função é proteger os pulmões da destruição tecidual mediada pela protease, sem essa proteína, a parede do pulmão sofre danos que levam ao surgimento do enfisema pulmonar, sendo ainda mais grave em pacientes fumantes ou expostos a outros tipos de fumaça.

## 1.2. Definição da DPOC

A doença pulmonar obstrutiva crônica é uma doença crônica, progressiva e parcialmente reversível. É definida como a existência de duas patologias que podem estar associadas, a bronquite crônica, que é a obstrução das vias aéreas causadas por excesso de muco, e o enfisema pulmonar, que é quando ocorre a destruição da parede morfofuncional do pulmão, devido às partículas nocivas do cigarro que são aprisionadas com à dificuldade de troca gasosa que ocorre nos alvéolos (figura 1).

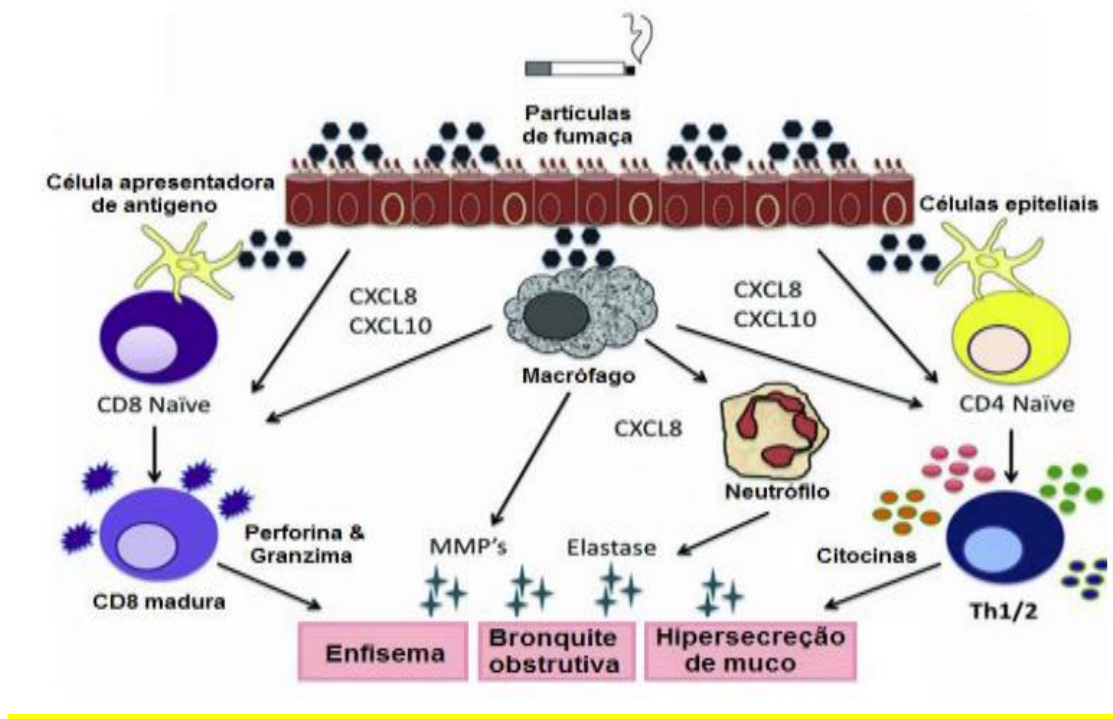


**Figura 1. Características da DPOC.** Fonte: Adaptado de Bourbeau (2003) <sup>27</sup>

## 1.3. Fisiopatologia da DPOC

O estresse oxidativo exerce um importante papel na gênese da DPOC através de danos diretos aos componentes do trato respiratório, bem como amplificando os outros mecanismos coparticipantes <sup>6</sup>. Outros efeitos causados pelo estresse oxidativo são, apoptose, remodelamento da matriz extracelular, lesão epitelial alveolar, respiração mitocondrial, peroxidação lipídica da membrana, hipersecreção de muco e inativação oxidativa de surfactantes e antiproteases <sup>7</sup>. É considerada uma patologia neutrofílica, pois os neutrófilos é a principal célula presente na inflamação pulmonar por DPOC, inclusive ele pode ser relacionado com o surgimento do enfisema pulmonar, já que os neutrófilos quando recrutados para o

pulmão produzem collagenase e elastase que são responsáveis por destruir o colágeno e a elastina, o que resulta na destruição da parede pulmonar. Porém, células como eosinófilos, linfócitos em especial os TCD8, também podem se encontrar aumentados. Outros achados comuns no parênquima pulmonar de pacientes com DPOC são as citocinas pró inflamatórias como IL-6, IL-8 (CXCL8), o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e outros mediadores nos pulmões <sup>8</sup>.



**Figura 2. Esquema da fisiopatologia da DPOC.** Fonte: Adaptado de Rufino e Costa, (2013) <sup>26</sup>.

Quando a fumaça contendo partículas tóxicas entram em contato com o pulmão, elas liberam mediadores inflamatórios, como os macrófagos, neutrófilos e células Tc1. Os macrófagos e os neutrófilos liberam collagenase e elastase, e as células Tc1 liberam as perforinas e granzimas, todos esses elementos em conjunto são fatores determinantes para o enfisema pulmonar, por outro lado existe também a liberação de células Th1 que aumentam a quantidade de muco presente na via aérea, caracterizando a bronquite crônica. As duas patologias também podem estar presentes simultaneamente.

As células efetoras e reguladoras desempenham papéis importantes no sistema imunológico, atuando de maneiras distintas para modular as respostas imunes. Elas estão

envolvidas na resposta imunológica a agentes patogênicos, na regulação da inflamação e na manutenção da homeostase imunológica.

A fisiopatologia da DPOC está relacionada à inalação de fumaça de cigarro e outros irritantes que recrutam células inflamatórias para o parênquima pulmonar. Dentre eles, os mais relevantes são os neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ T (Tc1) e CD4+ T (Th1).

O objetivo primário do manejo da DPOC é a estabilização da doença crônica e a prevenção de exacerbações agudas <sup>9</sup>.

Um dos maiores desafios no tratamento da DPOC é o seu diagnóstico tardio, na sua fase inicial a maioria dos pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomas leves que são ignorados, e passam a ser incômodos no momento em que a doença já se encontra em sua fase mais grave. Esse problema ficou mais evidenciado em 2020 com a epidemia do COVID-19, pacientes com problemas respiratórios como a DPOC, entraram para o grupo de risco, e foi então que em 2021 o Diário Oficial da União aprovou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (PCDT), onde ele aumenta o rol de medicamentos que podem ser utilizados no tratamento.

O diagnóstico é feito por uma avaliação médica dos sintomas, com um estudo do estilo de vida do paciente e seu histórico familiar onde o médico encaminha o paciente para a realização de exames clínicos que avaliam a sua função pulmonar, como espirometria, ergoespirometria, e exames de imagem como radiografia e tomografia de tórax.

#### **1.4. Sintomas e sinais clínicos**

Segundo o Ministério da saúde do estado do Distrito federal (2010), os principais sintomas da DPOC são tosse seca, expectoração, falta de ar decorrentes dos danos causado pela destruição do parênquima pulmonar, infecções respiratórias frequentes, fadiga constante a menor realização de atividades físicas e sibilância, (popularmente conhecida como chiado no peito). A DPOC também está associada aos efeitos sistêmicos, tais como a inflamação sistêmica e a disfunção muscular esquelética <sup>10</sup>. Embora a doença seja tratável, pode ocorrer alguns efeitos extrapulmonares, efeitos esses como perda de peso anormal, com possível presença de carências nutricionais e disfunções músculo

esqueléticas, que colaboram para a piora do quadro geral do paciente, aumentando os riscos para a saúde e levando a uma perda da autonomia.

A DPOC está associada a exacerbações respiratórias periódicas que se manifestam como piora da função pulmonar e aumento da dispneia, tosse e produção de escarro <sup>11</sup>.

As pessoas com DPOC sentem o impacto da doença no seu dia a dia através de sintomas como falta de ar e tosse e agravamento agudo dos sintomas em crises pulmonares <sup>12</sup>. A frequência de internações causadas por sintomas exacerbados da DPOC, é responsável pelo alto custo que a doença representa para o sistema de saúde. Outros sintomas como perda de peso rápida e excessiva, pneumonia, osteoporose e câncer de pulmão também são achados comuns em pacientes com o avanço da doença.

A doença também é conhecida por seus efeitos sistêmicos. A DPOC também parece ser uma doença vascular. Supõe-se que a fumaça do cigarro seja vasoativa e afeta diretamente a vasculatura pulmonar <sup>13</sup>. Ela também pode estar associada a piora no quadro de pacientes com insuficiência cardíaca, pois o baixo nível de sangue comuns na DPOC, promovem um estresse adicional no coração, piorando o quadro geral da doença.

Os tratamentos mais utilizados são as oxigenoterapias e os tratamentos medicamentosos, que incluem o uso de corticóides, broncodilatadores e os anticolinérgicos, porém ambos possuem muitos efeitos adversos<sup>8</sup>. Os corticosteroides (um dos principais tratamentos utilizados na DPOC), administrados por via oral ou inalatória, são anti-inflamatórios altamente eficazes para a asma <sup>6</sup>. Porém ele não ajuda na regressão da inflamação pulmonar na DPOC, sendo assim pouco eficaz no tratamento propriamente dito.

### 1.5. A teoria da emissão espontânea da radiação

Já havia relatos do uso da luz como fonte terapêutica nas antigas civilizações egípcias, onde o sol era adorado como um Deus e acreditava-se que ele era responsável por curar certas doenças, por ter a capacidade de afugentar maus espíritos, e por ser tão benéfico na área agrícola, sendo necessária no crescimento de plantas e flores. A terapia solar foi ganhando destaque e em 1904 rendeu um prêmio Nobel a Nils Finsen, com o surgimento da helioterapia ou terapia com luz ultravioleta. Mas tarde essa terapia foi usada para tratar doenças como o raquitismo e outras doenças de pele.

Albert Einstein ficou conhecido no campo da física por seu fascínio pela luz, e foi originário da ideia de que a luz é composta por pequenos pacotes de energia, ou seja, assim como a matéria é formada por átomo a luz seria formada por partículas. E foi a teoria do quantum de luz (mais tarde conhecido como fóton) que concedeu a Einstein um prêmio nobel de física em 1921.

Outra importante contribuição de Einstein, foi a teoria da emissão espontânea. Einstein propôs que um átomo excitado no espaço vazio fará uma transição para um estado mais baixo através de um processo que chamou de emissão espontânea <sup>14</sup>.

Foi então que vários cientistas começaram a estudar a possibilidade de criar um equipamento que fosse capaz de ampliar essa luz. Mas foi o cientista Theodore Harold que por volta de 1960 criou um equipamento surpreendentemente simples, feito de um bastão de rubi colocado no centro de uma lâmpada de flash <sup>15</sup>. Ele conseguiu com isso a amplificação da luz. Após isso a história do laser é meio nebulosa pois vários cientistas em todo o mundo corriam na busca por evoluir nessa área, em uma corrida que resultou em diversas descobertas que contribuíram para o que viria a seguir.

## 1.6. O laser de baixa intensidade

A inserção do laser na área médica ganhou força no final dos anos 1970, quando se deu início às descobertas de como o laser interage com as células do corpo.

O laser se difere das demais luzes devido a suas propriedades únicas, sendo uma luz monocromática, coerente e colimada.

Sendo dividido em duas categorias temos, o laser de alta intensidade, usado principalmente em cirurgias, para cortes limpos e com menos dor ou danos. E a fotobiomodulação demonstrou ter um efeito terapêutico de biomodulação do processo inflamatório. A Terapia com FBM envolve a exposição de células ou tecidos a baixos níveis de luz vermelha e infravermelha, e é chamada de “baixo nível” devido ao uso de luz em densidades de energia baixas em comparação com outras formas de terapia <sup>16</sup>. A fotobiomodulação desencadeia a cura, diminui a dor e diminui a inflamação <sup>17</sup>. Tem a capacidade de modular eventos metabólicos através de processos fotoquímicos e fotofísicos, aumentando o metabolismo celular pela estimulação da atividade mitocondrial <sup>18</sup>. Os efeitos da fotobiomodulação podem ser observados sobre os macrófagos, aumentando a fagocitose; elevando a secreção de fatores de crescimento de fibroblasto e intensificando a reabsorção tanto de fibrina quanto de colágeno <sup>19</sup>.

Ainda é pouco conhecido a forma exata de como o laser atua na célula, mas acredita-se que ele é absorvido por uma molécula presente na membrana plasmática das células chamada de cromóforo, interferindo diretamente na cadeia respiratória levando a um aumento do nível de ATP celular, o que obriga a célula em estresse a entrar em um estado de homeostase. Promovendo também a divisão celular e o aumento da produção de ácidos graxos.

### **1.7. A emissão da luz laser**

Um laser é um dispositivo que emite luz através de um processo de amplificação óptica baseado na emissão estimulada de fótons <sup>20</sup>. Isso se dá quando um átomo em estado excitado é atingido por um fóton que obriga ele a voltar ao seu estado de equilíbrio, fazendo com que ele produza mais um fóton, levando a uma ampliação da luz.

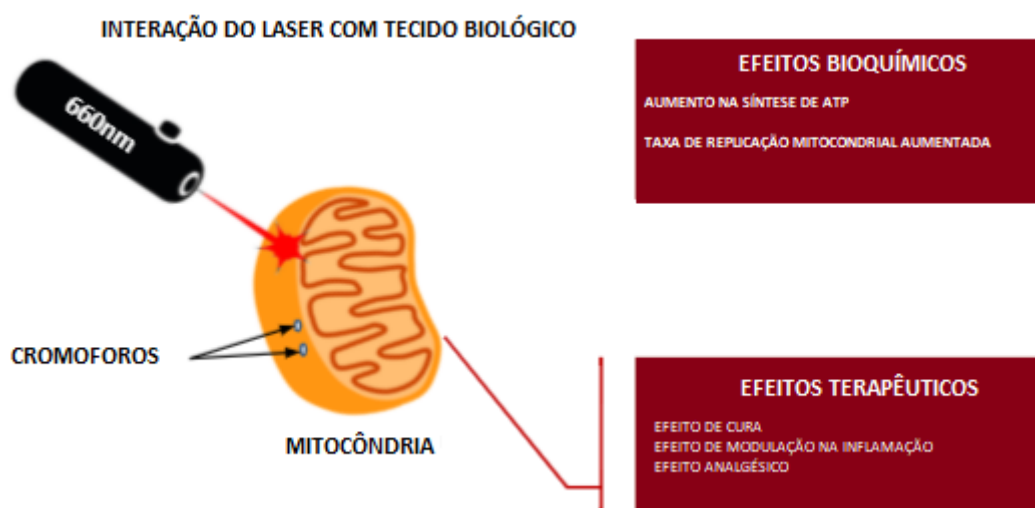
O laser é uma forma de radiação não ionizante que se difere das outras luzes por suas características de monocromaticidade quando todos os fótons emitem o mesmo comprimento de onda, conseqüentemente a mesma cor, coerência, todas as ondas produzidas pelo laser estão em fase e a sua colimação que é quando os raios de luz possuem pouca divergência, sendo emitidos em paralelo, o que permite que a luz seja apontada.

Quando a energia do laser atinge a superfície do tecido, ela pode ser refletida, espalhada, absorvida ou transmitida aos tecidos circundantes <sup>21</sup>. Esse comportamento depende do tipo de laser e da dose escolhida para a aplicação.

O laser incidido no tecido demonstrou causar efeitos fotoquímicos e fotobiológicos importantes para o reparo tecidual, vasodilatação, síntese proteica, decréscimo nos níveis de prostaglandinas, presença de mitose celular, migração e proliferação de queratinócitos <sup>22</sup>. Os elétrons excitados na citocromo C oxidase levam a mais transferência de elétrons e subsequentemente mais produção de ATP <sup>23</sup>.

### **1.8. Laser vermelho**

Ainda é pouco conhecido a forma exata de como o laser atua na célula, mas a teoria mais aceita é de que ele é absorvido por uma molécula presente na membrana plasmática das células chamada de cromóforo, interferindo diretamente na cadeia respiratória levando a um aumento do nível de ATP celular, o que obriga a célula em estresse a entrar em um estado de homeostase. Promovendo um remodelamento da inflamação, analgesia e também a divisão celular e o aumento da produção de ácidos graxos.



**Figura 3. Ilustração do esquema de interação do laser com a célula.** Fonte: própria.

Pela observação dos seus efeitos biológicos em nível celular, a terapia com fotobiomodulação ficou popularmente conhecida como fotobiomodulação (Figura 3).

Outros efeitos observados também foram redução de edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose, da síntese de colágeno e da epitelização<sup>24</sup>.

Outros artigos mostram que a terapia com FBM, reduziu o influxo de neutrófilos, a produção de TNF- $\alpha$  e aumentou a produção de IL-10<sup>26-27</sup>.

A literatura acerca dos efeitos da terapia com FBM na DPOC é escassa, no entanto, recentemente, demonstramos que o laser em baixa intensidade (660 nm) sozinho ou em associação com células-tronco mesenquimais derivadas de dente decíduo, reduziu a DPOC induzida por extrato de fumaça de cigarro<sup>28-29</sup>.

Um outro estudo do nosso grupo de pesquisa, de dosimetria do laser em modelo experimental de asma crônica<sup>30</sup> mostrou que a dose influencia diretamente no resultado do tratamento. Foi observado que o melhor resultado foi com a dose de 3J do laser 660 nm, que foi capaz de reduzir significativamente importantes da doença no grupo com asma em relação ao grupo controle.

Com base nesse estudo fizemos um estudo piloto com os mesmos parâmetros em modelo de DPOC, e assim como na asma o melhor resultado foi com a densidade de

energia de 3J, onde foi capaz de reduzir a migração celular, citocinas pró-inflamatórias no infiltrado pulmonar, sangue e pulmão, dos animais submetidos ao tratamento.

Modelos experimentais têm como objetivo investigar a fisiopatologia do enfisema pulmonar e descobrir novas abordagens terapêuticas. Tendo em vista todos esses efeitos da fotobiomodulação na diminuição de células inflamatórias em doenças pulmonares, neste trabalho avaliamos o efeito da fotobiomodulação no equilíbrio entre células T efectoras e reguladoras em modelo experimental de DPOC.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo primário:**

Avaliar os efeitos da terapia com fotobiomodulação no equilíbrio entre células T efetoras e reguladoras na inflamação pulmonar em modelo experimental de DPOC.

### **2.2. Objetivos secundários:**

- Quantificar as células totais e diferenciais, tais como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos presentes no LBA e no sangue dos animais;
- Analisar a população de macrófagos, células dendríticas, linfócitos totais, bem como os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no pulmão;
- Avaliar os níveis de citocinas e quimiocinas secretadas: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, LTB<sub>4</sub>, IL-10, IFN- $\gamma$ , KC/CXCL1, MCP-1, GM-CSF e LTB<sub>4</sub>;
- Avaliar a deposição de muco e colágeno, bem como o alargamento alveolar.
- Estudar a população de células T efetoras (CD4<sup>+</sup>STAT-4<sup>+</sup>) produtoras de IFN- $\gamma$  e a população de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) produtoras de IL-10.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Animais experimentais

Previamente ao início dos experimentos, o projeto do estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) AN006/2013 da Universidade Nove de Julho. Seguimos os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA/Junho de 1991.

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem C57BL/6, os animais foram obtidos no biotério da Universidade Nove de Julho, criados em ambiente controlado, umidade (50% - 60%), luminosidade (12h claro/12h escuro) para simular o dia e noite, temperatura entre (22° - 25°).

#### 3.2 Desenho do estudo



Figura 4. Fluxograma com os grupos experimentais.

### **3.3. Tamanho amostral**

Utilizamos para o projeto aproximadamente 24 Camundongos C57BL/6, (realizamos a divisão do total de animais, de 4 grupos, com o total de 6 animais cada. Os animais foram escolhidos de forma aleatória, o tamanho da amostra foi baseado no estudo de (RIGONATO-OLIVEIRA *et al.* 2019).

### **3.4 Randomização**

Neste estudo utilizamos a randomização de forma em que os animais foram distribuídos e escolhidos aleatoriamente para compor os grupos.

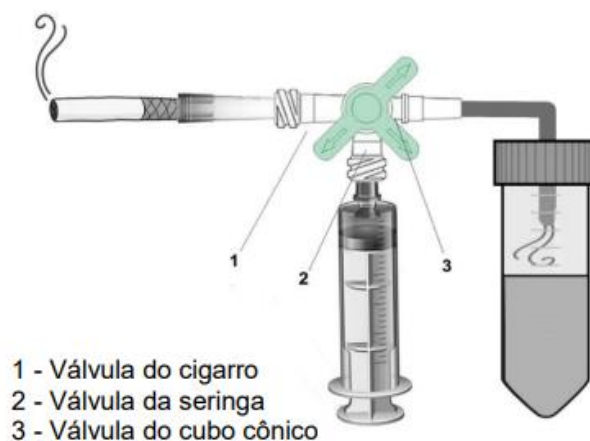
### **3.5 Cegamento**

O pesquisador do presente estudo conduziu todo experimento como também a realização da avaliação de todas as análises.

### **3.6 Procedimentos experimentais**

#### **3.6.1. Obtenção do extrato de fumaça de cigarro (EFC)**

Para a obtenção do extrato de fumaça de cigarro, foram utilizados cigarros da marca Marlboro, (alcatrão 13,0 mg, nicotina 1,10 mg, monóxido de carbono 10 mg) os quais foram queimados e a fumaça passada através de uma mangueira onde em uma de suas extremidades foi ligada à um tubo cônico contendo PBS 1X, sendo utilizado 1 cigarro / 4 ml de solução tampão - 1 cigarro em 4 ml. Na outra extremidade da mangueira foi acoplada a uma bomba à vácuo com uma pressão constante, onde o cigarro foi introduzido.



**Figura 6. Esquema de obtenção do extrato de fumaça de cigarro.**

### **3.6.2 Indução de DPOC com EFC**

Para indução da doença usando extrato de cigarro, os animais foram anestesiados, com injeção intramuscular de xilazina 2% (0,06ml/100g) + cetamina 10% (0,08ml/100g), 4 µl por animal, e foram posicionados na vertical em uma posição que permite o acesso apropriado a via de administração. Foram administrados 30 µl do extrato de cigarro por via orotraqueal, 3 vezes por semana durante 7 semanas (49 dias).

### **3.6.3 Terapia com FBM**

Após 35 dias de indução da doença, o grupo DPOC + LASER, recebeu aplicação pontual com um laser de diodo, comprimento de onda de 660nm, área irradiada de 0.785 cm<sup>2</sup>, em três regiões: uma abaixo da traqueia, e as outras duas em cada lobo pulmonar (direito e esquerdo), o tempo e a potência variaram para cada grupo como no esquema a seguir.

Os animais foram imobilizados e irradiados nos pontos ilustrados na imagem a seguir (Figura 6).



**Figura 8. Pontos de aplicação do laser.**

Foi utilizado o laser da marca MMO Optics/ Modelo: TF Premier PLUS (Figura 7).

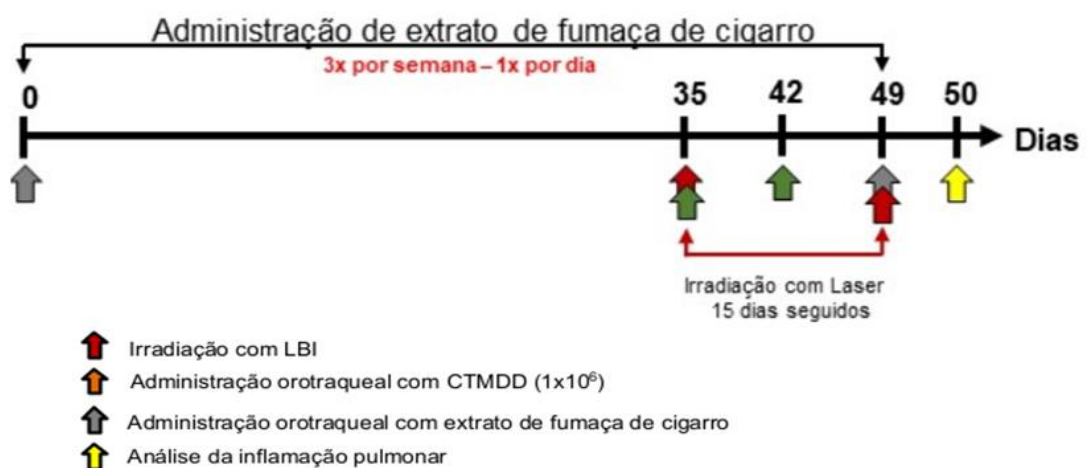


**Figura 7. Laser da marca MMO Optics/ Modelo: TF Premier PLUS.**

**Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do laser.**

|                                              |               |
|----------------------------------------------|---------------|
| Energia radiante                             | 3J            |
| Comprimento de onda (nm)                     | 660           |
|                                              |               |
| Largura espectral                            | ±20           |
| Modo de operação                             | Contínuo      |
| Potência radiante média (J/cm <sup>2</sup> ) | 100 mw        |
| Exposição radiante (J/cm <sup>2</sup> )      | 66            |
| Área do feixe no alvo (cm <sup>2</sup> )     | 0,045         |
| Tempo de exposição (S)                       | 30s           |
| Frequência                                   | Única         |
| Pontos de aplicação                          | 3 pontos      |
| Técnica de aplicação                         | 1cm distância |

### 3.6.4 Grupos experimentais



## **Figura 8. Desenho experimental.**

### **3.7 Eutanasia**

Após os 45 dias de experimento, os animais foram eutanasiados com uma alta dose de anestesia, com injeção intramuscular (i.m.) de xilazina 2% (0,06ml/100g) + cetamina 10% (0,08ml/100g). A substância será administrada minutos antes da exsanguinação, utilizando uma seringa de 1mL e agulha hipodérmica 25x5 mm. Após a coleta de sangue, para realização das lâminas de esfregaço, e contagem diferencial de células em circulação. Os animais foram traqueostomizados e canulados e os pulmões lavados com 3 x 0,5 ml de tampão fosfato salino (PBS).

### **3.8 Desfecho**

#### **3.8.1. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado broncoalveolar (LBA)**

O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1600 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante armazenado a -70°C para análise das citocinas por método de ELISA. O botão celular foi ressuscitado em 1 ml de tampão fosfato salino (PBS) e utilizado para a determinação do número de células totais no LBA realizado por meio de contagem na Câmara de Neubauer. O restante do material ressuscitado foi utilizado para preparação de lâminas de cytopspin. Foram utilizados 200µl de amostra de cada animal para contagem diferencial das células, centrifugadas por 10 minutos, 450 rpm no equipamento de modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA. As lâminas foram coradas através da técnica de coloração Instant Prov: 1) colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov I, deixar por 10 segundos, retirar e deixar escorrer por 5 segundos. (2). Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov II, deixar por 10 segundos, retirar e deixar escorrer por 5 segundos. (3). Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov III, deixar por 20 segundos, retirar, deixar escorrer por 5 segundos e lavar as lâminas em água corrente. Após a coloração, 100 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial.

### **3.8.2 Dosagem dos níveis de citocinas no LBA por ELISA.**

Os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, KC/CXCL1, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, GM-CSF, MCP-1 e LTB4 em BAL foram avaliados no sobrenadante de BAL, usando o kit Biolegends and R&D Sistemas. Para a leitura da placa foi utilizado o equipamento SpectraMax i3 (Molecular Devices) com absorbância ajustada de 450 nm. O ELISA é a abreviação de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

### **3.8.3 Identificação de células recrutadas para o pulmão por Citometria de Fluxo**

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

### **3.8.4 Avaliação da inflamação e remodelamento das vias aéreas através da histomorfometria.**

Com o intuito de avaliar os efeitos da terapia com FBM sobre a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas na parede das vias aéreas, além da espessura do músculo liso brônquico e da expressão de muco ácido e muco neutro pelas células epiteliais brônquicas, os pulmões esquerdos foram coletados, fixados em formalina 10% e embebidos em parafina, cortes de 4 $\mu$ m de espessura foram realizados e as lâminas coradas com picrossírius para detecção das fibras de colágeno, com ácido periódico de schiff e azul alciano para detecção de muco ácido e neutro e com hematoxilina e eosina. os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software Image Pro Plus (versão 4.5, NIH, Maryland, EUA).

### **3.8.5 Fenotipagem**

Para avaliar a expressão das moléculas de superfície, as células obtidas serão incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD16/32 eBioscience® 1:100 por trinta minutos a 4°C para bloqueio dos receptores Fc. Em seguida, as células serão incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (FITC, PE, Percp e APC) específicos para as moléculas de interesse por 30 minutos, também a 4°C. A seguir foi utilizado anticorpos

monoclonais: anti-CD3 (0,5µg/10<sup>6</sup> células), anti-CD4 (0,5µg/10<sup>6</sup> células) e anti-CD8 (0,5µg/10<sup>6</sup> células).

Foi realizada análise de fenotipagem para células Tregs com (anti-CD4 FITC e anti-CD25 PE) e com fator de transcrição (anti-Foxp3 Percp, bem como caracterização de IL-10 (anti-IL-10 APC) (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA). Para as células T efectoras (anti-CD4 FITC e anti-STAT4 PE), bem como a caracterização de IFN-γ (anti-IFN-γ APC). As amostras foram adquiridas em um Citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, Mountain View, CA).

Antes da aquisição, foram realizados controles para excluir autofluorescência inespecífica. Um total de 20.000 eventos foram registrados. Os parâmetros FSC e SSC foram usados para identificar a população de células. Em seguida, as populações de linfócitos foram bloqueadas como células CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+. Depois, nas células CD4+ foram controlados STAT4+, bem como IFN-γ+ nesta população ou CD25+Foxp3+ e IL-10+. A intensidade média de fluorescência (MFI) foi obtida para cada marcador usado para análise estatística. Os resultados referem-se ao uso de 5 a 6 camundongos em cada grupo experimental.

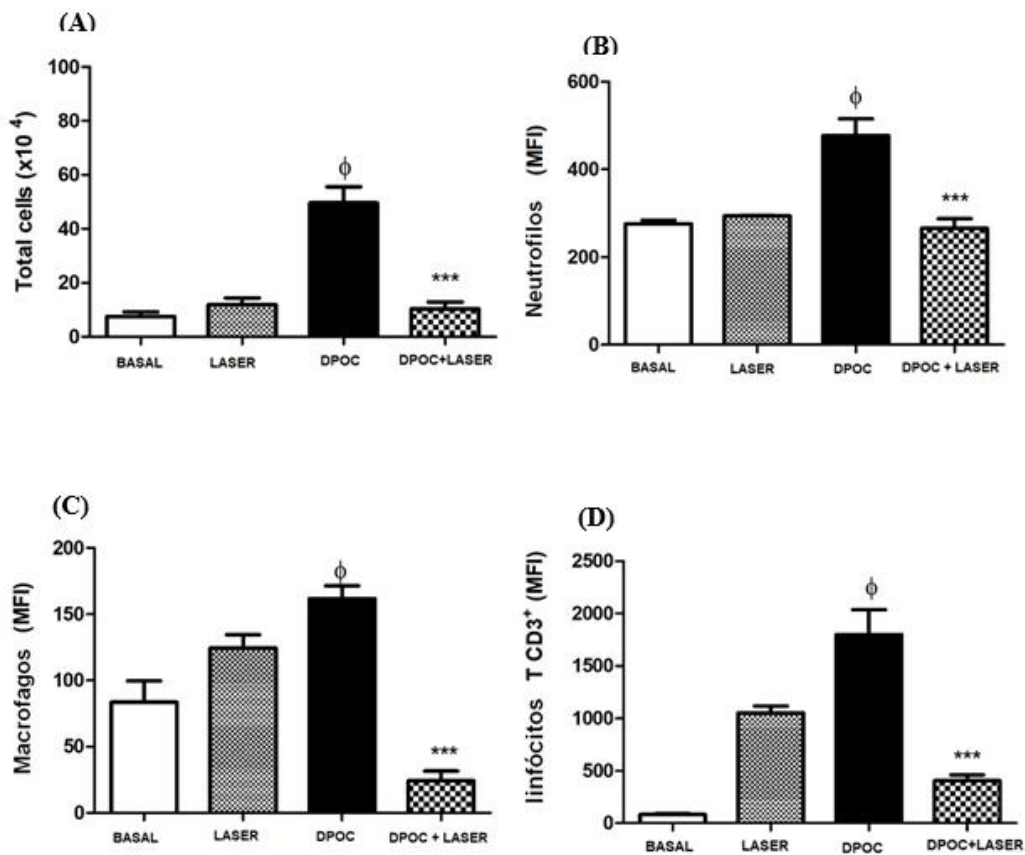
### **3.8.6 Métodos estatísticos**

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn, para a comparação entre os grupos. Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 3.1 (Califórnia, EUA).

## **4. Resultados**

### **4.1 Efeito da terapia com FBM no total de células, neutrófilos, macrófagos e linfócitos TCD3<sup>+</sup> em modelo experimental de DPOC no infiltrado pulmonar (BAL)**

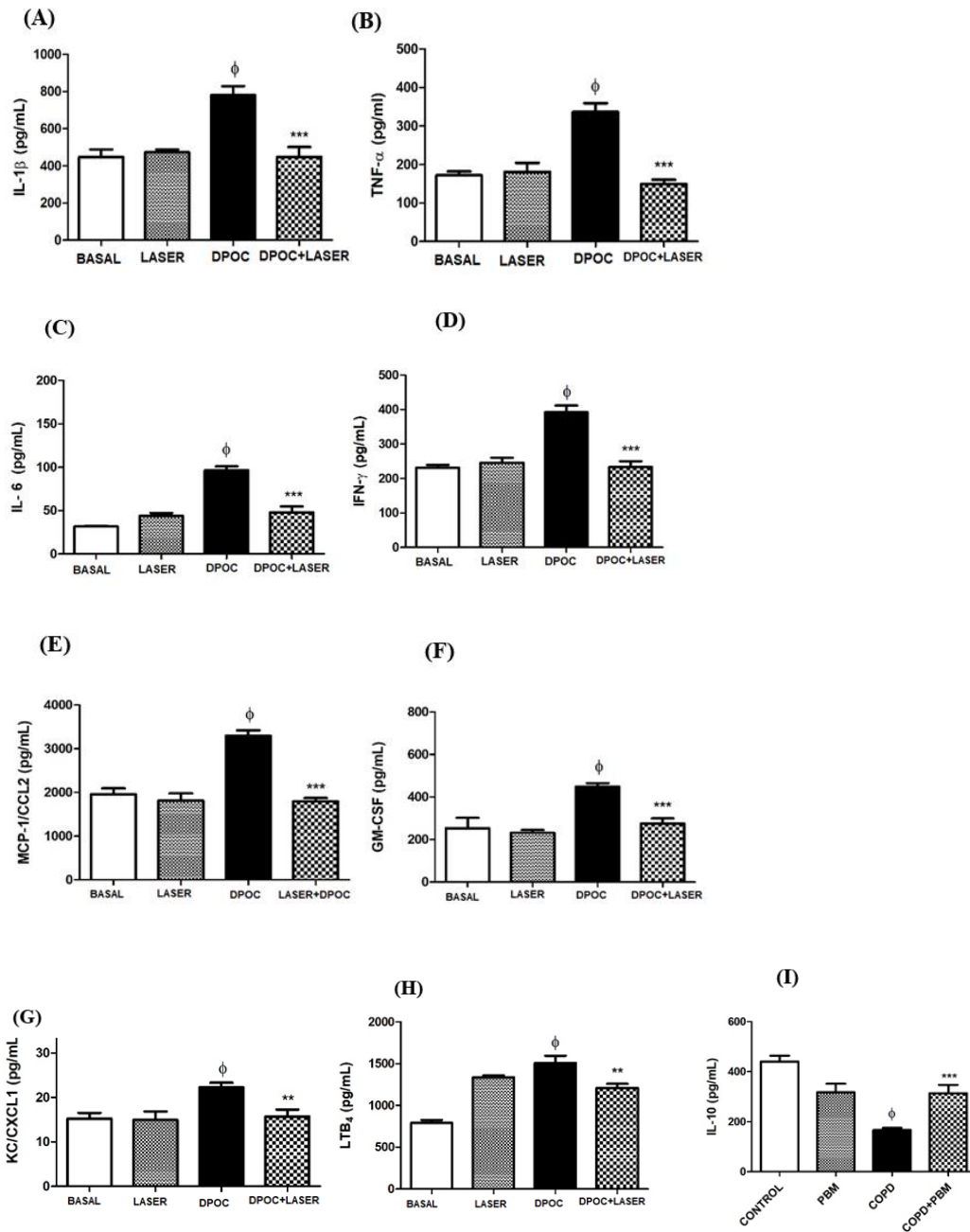
Os resultados relacionados à quantificação de células no LBA estão representados na Figura 9, encontramos um aumento significativo no número total de células (A), macrófagos (B), neutrófilos (C) e linfócitos T CD3<sup>+</sup> (D) no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. Quando analisamos o grupo DPOC submetido à terapia com FBM (DPOC+FBM), observamos uma diminuição significativa de todas as células em relação ao grupo DPOC.



**Figura 9. Efeito da terapia com FBM no número total de células (A) macrófagos (B), neutrófilos (C) e linfócitos (D) no BAL.** Os resultados referem-se ao uso de 10 camundongos em cada grupo experimental. Valores expressos em média e desvio padrão. f p<0,001 quando comparado ao grupo controle; \*\*\*p<0,001 quando comparado ao grupo DPOC.

#### **4.2 Efeito da terapia com FBM nas citocinas IL-1 $\beta$ (A), TNF- $\alpha$ (B), IL-6 (C), IFN- $\gamma$ (D), MCP-1 (E), GM-CSF (F), KC Níveis de /CXCL1 (G), LTB4 (H) e IL-10 (I) no sobrenadante do BAL**

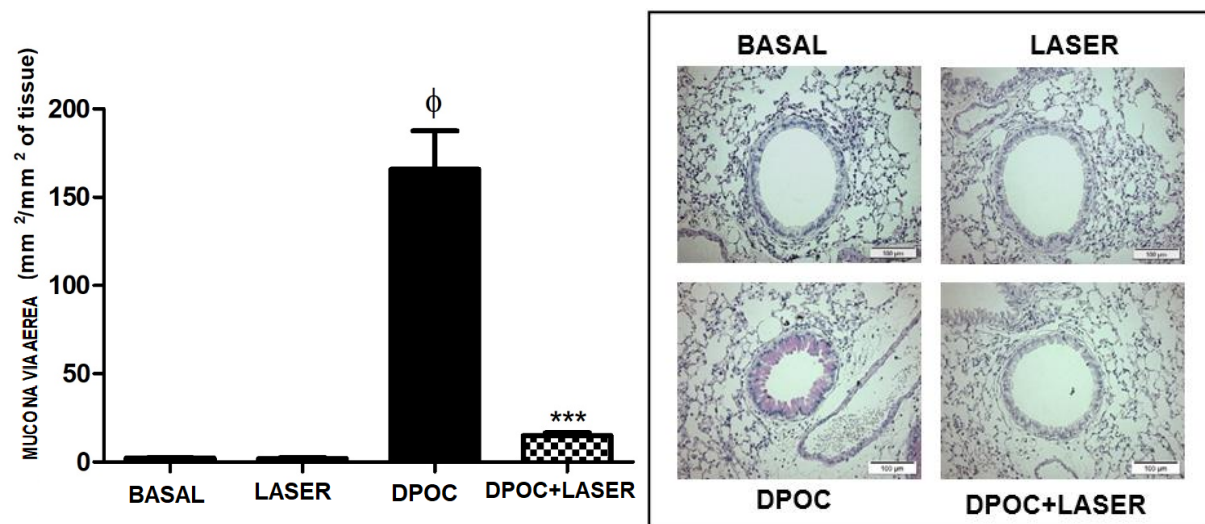
São apresentados os resultados referentes à quantificação dos níveis de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), LTB4 (D), IL-10 (E) e IFN- $\gamma$  (F) na figura 16, KC/CXCL1 (A), MCP-1 (B) e GM-CSF (C) na figura 10. Observamos o aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, KC/CXCL1, IFN - $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1 e LTB4 no grupo doente (DPOC) quando comparado ao grupo Baseline e redução significativa nos grupos tratados, exceto para as citocinas. Por outro lado, houve redução do nível da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo doente (DPOC) e aumento em todos os grupos em tratamento quando comparado ao grupo DPOC (figura 10).



**Figura 10. Efeito da terapia com FBM nas citocinas IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C), IFN- $\gamma$  (D), MCP-1 (E), GM-CSF (F), KC Níveis de /CXCL1 (G), LTB $_4$  (H) e IL-10 (I) no sobrenadante do BAL.** Os resultados referem-se ao uso de 6 camundongos em cada grupo experimental. Valores expressos em média e desvio padrão.  $\phi$  p<0,001 quando comparado ao grupo controle; \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 quando comparados ao grupo DPOC.

#### **4.3 Efeito da terapia com FBM na produção de muco nas vias aéreas. Os resultados referem-se ao uso de 6 camundongos em cada grupo experimental**

Em relação à produção de muco, notamos um aumento significativo no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal. O painel A representa uma redução significativa no grupo que recebeu terapia FBM quando comparado ao grupo DPOC (figura 11). A deposição de colágeno mostrou um aumento no grupo DPOC em relação ao grupo Basal e uma redução significativa no grupo tratado com FBM (painel C). As fotomicrografias representam todos os grupos avaliados (painel B e D).



**Figura 11. Efeito da terapia com FBM na produção de muco (A) nas vias aéreas. Os resultados referem-se ao uso de 6 camundongos em cada grupo experimental. Valores expressos em média e desvio padrão. As fotomicrografias representam todos os grupos avaliados (painel B). Aumento de  $\times 200$ . f  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.**

#### 4.4 Efeito da terapia com FBM na deposição de colágeno nas vias aéreas por histologia

O painel A representa uma redução significativa no grupo que recebeu terapia FBM quando comparado ao grupo DPOC (figura 12). A deposição de colágeno mostrou um aumento no grupo DPOC em relação ao grupo Basal e uma redução significativa no grupo tratado com FBM (painel C). As fotomicrografias representam todos os grupos avaliados (painel B e D).

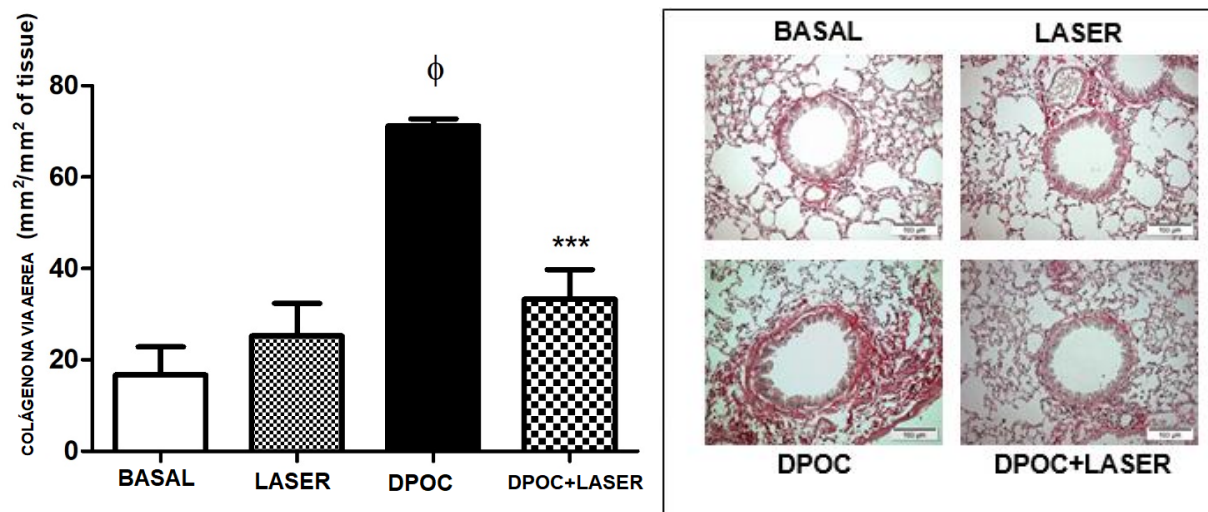


Figura 12. Efeito da terapia com FBM na deposição de colágeno (A) nas vias aéreas. Os resultados referem-se ao uso de 6 camundongos em cada grupo experimental. Valores expressos em média e desvio padrão. As fotomicrografias representam todos os grupos avaliados (painel B). Aumento de  $\times 200$ .  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo DPOC.

#### 4.5 Efeito da terapia com FBM no alargamento alveolar em modelo experimental de DPOC, por histologia

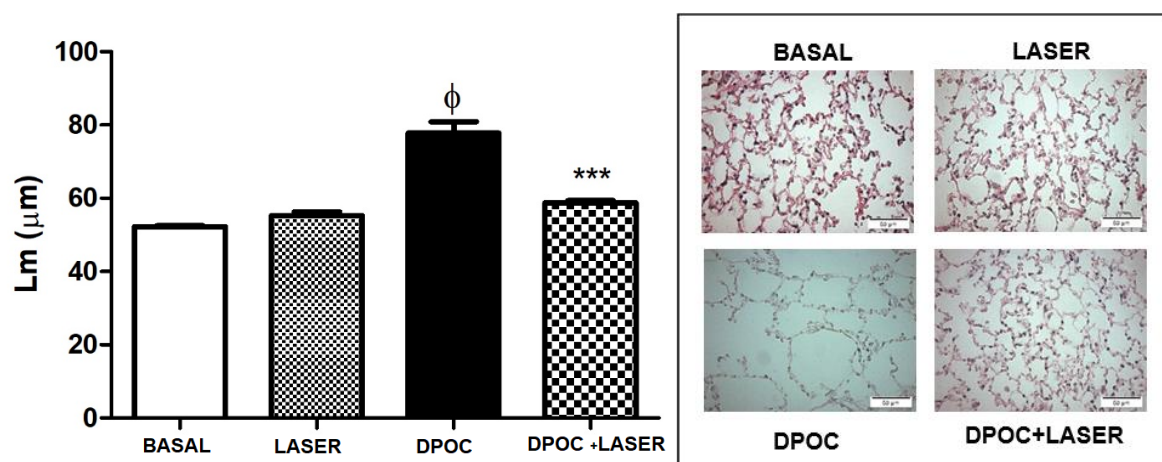


Figura 13. Os dados de alargamento alveolar mostraram um aumento significativo no grupo DPOC quando comparado ao grupo Basal e uma redução significativa no grupo tratado com FBM (figura 13). As fotomicrografias representam todos os grupos avaliados (painel B e D).

#### 4.6 Quantificação de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em LBA de modelo experimental de DPOC

Os resultados da quantificação de linfócitos CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) no LBA demonstraram aumento significativo no grupo DPOC em relação ao grupo Basal. Por outro lado, os grupos tratados com terapia FBM tiveram redução de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando comparados ao grupo DPOC (figura 14). O histograma representa todos os grupos avaliados (painel B e D).

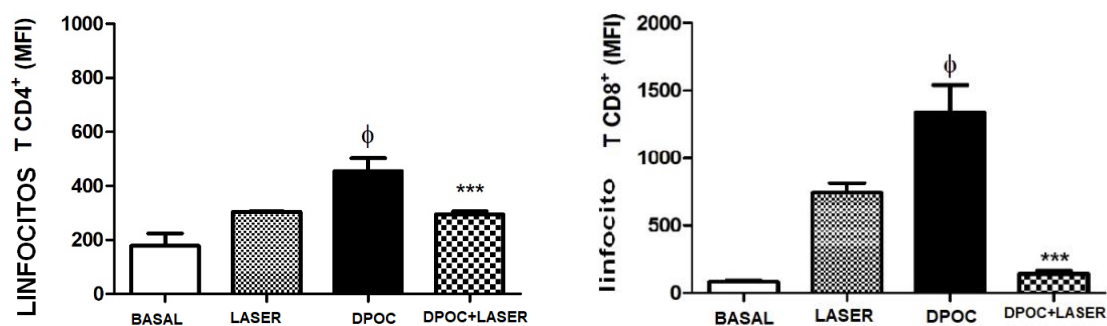


Figura 13. Os resultados referem-se ao uso de 6 camundongos em cada grupo experimental. Valores expressos em média e desvio padrão.  $\phi$   $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparados ao grupo DPOC.

#### 4.6 Quantificação de linfócitos T CD4+STAT-4+ e CD4+STAT-4+IFN- $\gamma$ + em LBA.

Os resultados de linfócitos CD4+STAT-4+ (figura A) e CD4+IFN- $\gamma$ + (figura B) em BAL mostraram um aumento no grupo DPOC em comparação com o grupo Basal e uma redução significativa no grupo tratado com terapia de FBM.

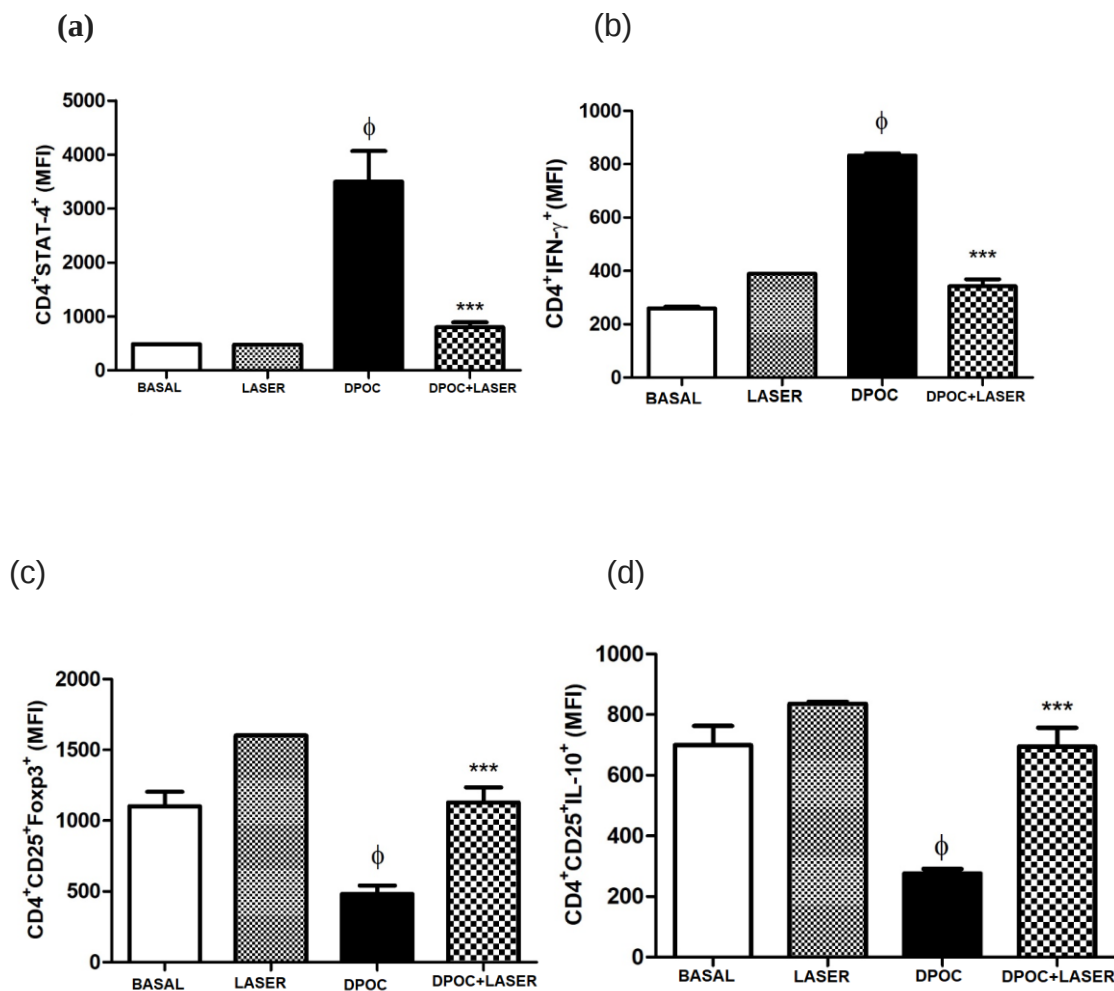


Figura 14 Quantificação de linfócitos T CD4+STAT-4+, CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+STAT-4+IFN- $\gamma$ + em LBA. O histograma representa todos os grupos avaliados (painel B e D) Valores expressos em média e desvio padrão. f p<0,001 quando comparado ao grupo basal; \*\*\*p<0,001 quando comparado ao grupo DPOC.

## 5. Discussão

Doenças associadas ao cigarro, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), diminuem a qualidade de vida dos pacientes, representando um importante comprometimento social e econômico. Entretanto, as terapias atuais, mesmo representando um gasto enorme ao sistema de saúde, não conseguem prevenir nem reduzir os danos ocorridos no pulmão. Atualmente, as terapias disponíveis para o tratamento da DPOC não são curativas. Os tratamentos atuais apenas controlam a inflamação, sem modificar o declínio a longo prazo da função pulmonar, característico desta doença<sup>29</sup>. Os medicamentos disponíveis para o controle da DPOC são os mesmos para o tratamento da asma, porém as fisiopatologias são distintas. Sendo assim, há a necessidade de desenvolver novas terapias anti-inflamatórias, com atividade imunomoduladora para fornecer estratégias alternativas para o tratamento dessa doença. A fotobiomodulação é considerada uma terapia muito promissora e a avaliação acerca do modelo de indução de DPOC por administração orotraqueal de extrato de fumaça de cigarro, torna-se possível uma investigação pontual acerca da dosimetria, bem como um possível mecanismo celular dos efeitos da Terapia com fotobiomodulação.

Um estudo anterior feito por nosso grupo de pesquisa<sup>30</sup>, foi capaz de mostrar que a terapia com fotobiomodulação associada a terapia com células-tronco de dente decíduo, é eficiente no tratamento da DPOC, pois reduziu a migração de células para o pulmão, os níveis de citocinas e o remodelamento das vias aéreas (muco, colágeno e alargamento alveolar).

Na fisiopatologia da DPOC, os macrófagos e os neutrófilos contribuem para a lesão pulmonar, liberando vários mediadores, radicais livres, proteases, citocinas e quimiocinas<sup>32</sup>. A inflamação neutrofílica é uma característica da DPOC e contribui para as principais características patológicas, incluindo enfisema e disfunção mucociliar<sup>35</sup>.

O infiltrado celular de neutrófilos e monócitos derivados do sangue de pacientes com DPOC, secretam citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , CXCL1, LTB4, IFN- $\gamma$ , MCP-1, mediadores lipídicos e várias outras moléculas. Esse cenário é acompanhado pela degradação da matriz extracelular pela MMP-1 (matrix metaloproteinase-1), secretada por macrófagos alveolares, causando destruição tecidual e enfisema. A exposição crônica, por outro lado, leva a um intenso infiltrado de linfócitos T CD4 e CD8. Evidências anteriores em modelos experimentais, certificaram que a terapia

com a FBM em outras doenças pulmonares já atuou principalmente de forma a diminuir o infiltrado inflamatório<sup>31</sup>.

FBM reduziu a inflamação e o enfisema pulmonar em camundongos com DPOC induzido por extrato de fumaça de cigarro. Muitos dos parâmetros avaliados, tais como celularidade, secreção de citocinas pró-inflamatórias, expressão do fator de transcrição inflamatório STAT4, foram reduzidos significativamente no LBA. Por outro lado, o fator de transcrição anti-inflamatório Foxp3 como bem como os níveis de IL-10. Esse perfil foi associado à melhor manutenção de integridade tecidual quando comparada aos animais com DPOC não tratados, evidenciada pela redução da secreção de muco, deposição de colágeno e dano tecidual. Vale ressaltar que essas características são responsáveis pela destruição tecidual e posterior declínio da qualidade de vida do paciente<sup>33</sup>.

Bilhões de dólares são gastos a cada ano no tratamento de pacientes enfisematosos em todo o mundo. Por isso, a necessidade de uma abordagem terapêutica mais eficiente e barata no manejo de pacientes com DPOC é de suma importância.

Outro estudo realizado anteriormente utilizou fotobiomodulação em conjunto com células-tronco mesenquimais derivadas de tubas uterinas humanas em um modelo experimental de DPOC. Houve redução tanto da inflamação pulmonar quanto do alargamento alveolar. Muitos dos parâmetros avaliados, como celularidade no lavado broncoalveolar, secreção de citocinas pró-inflamatórias, infiltrado perivascular e expressão de fatores de transcrição como NF-KB foram significativamente reduzidos. Tanto a associação quanto o PBM sozinhos mantiveram a integridade do tecido pulmonar, diminuição da deposição de colágeno, bem como do infiltrado peribrônquico<sup>37</sup>.

Nesse contexto, avaliamos a presença de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (BAL). Em geral, os dados obtidos indicaram um aumento no número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA de animais com DPOC. Os macrófagos são de grande importância nesta patogênese e estão aumentadas em tabagistas e indivíduos com DPOC. Em relação aos macrófagos, observamos que a fotobiomodulação reduziu a quantidade dessas células.

Os dados deste estudo corroboram achados anteriores que mostram uma redução na expressão de STAT4 e nas concentrações de IL-8 e LTB<sub>4</sub> no pulmão, que atraem principalmente neutrófilos. Sugerindo que o efeito anti-inflamatório da irradiação laser

sobre esses mediadores e, conseqüentemente, na redução da migração celular para o pulmão, poderia ser devido à expressão reduzida de STAT4, inibição da IL-8 e LTB<sub>4</sub>.

A exposição à fumaça do cigarro leva inicialmente a um infiltrado celular de neutrófilos derivados do sangue e monócitos secretoras de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , juntamente com quimiocinas, mediadores lipídicos e várias outras moléculas. Este cenário é acompanhado de degradação da matriz extracelular por MMP-1 (metaloproteinase da matriz-1), secretado por macrófagos alveolares, causando destruição tecidual e enfisema<sup>40</sup>.

A DPOC leva a um intenso infiltrado de linfócitos T CD4 e CD8 , e o IFN- $\gamma$  é provavelmente a citocina mais importante derivada das células T. de transcrição STAT4, também são muito relevante na fase tardia da doença [28] . Observamos que as células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , bem como aqueles que expressam STAT4, estavam aumentados, mas as células Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) estavam diminuídas em animais com DPOC induzida por extrato de fumaça de cigarro.

Além disso, o fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF) desempenha um papel na diferenciação e sobrevivência de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, e tem sido implicada em DPOC. O GM-CSF é secretado predominantemente por macrófagos, células epiteliais e células T em resposta aos estímulos inflamatórios. O GM-CSF é liberado pelos macrófagos alveolares de pacientes com DPOC, e pode ser importante para aumentar a sobrevivência de neutrófilos e macrófagos nas vias aéreas<sup>46</sup>. Concentrações aumentadas de GM-CSF no LBA de pacientes com DPOC, particularmente durante exacerbações, estão correlacionadas com o aumento do número de neutrófilos no pulmão.

Observamos um aumento significativo no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos grupos com DPOC, por outro lado, nos grupos tratados, uma diminuição dos linfócitos CD4<sup>+</sup> pode ser observada em todos os grupos submetidos aos tratamentos. Outros estudos relataram que a proliferação células T CD4<sup>+</sup> ativadas eram suprimidas pelas células Treg<sup>33</sup>. e que a geração de células Treg é induzida principalmente pela presença de TGF- $\beta$  e IL-10<sup>44-45</sup>. IL-10 inibe a síntese de muitas proteínas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF e quimiocinas, bem como metaloproteinases como a MMP-9, que são altamente expressas na DPOC. As concentrações de IL-10 são reduzidas no escarro de pacientes com DPOC<sup>44</sup>.

Abordagens terapêuticas capazes de reduzir essa ativação poderiam contribuir sobremaneira para a manutenção da integridade pulmonar. Esses dados sugerem que a terapia com FBM foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 produzida pelas células Treg no grupo tratado, suprimindo assim a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> efetoras. Além dos resultados anteriores, alguns autores demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> são inversamente correlacionadas com a função pulmonar<sup>42</sup>.

Fumar pode destruir diretamente o equilíbrio da resposta pró/anti-inflamatória, via inibição de células Treg CD8<sup>+</sup><sup>42</sup>. No entanto, análises mais aprofundadas dessas células precisam ser feitas para determinar as funções regulatórias ou a possível relação entre células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas e produção de IL-10.

Podemos sugerir que a fotobiomodulação tem o potencial de diminuir a gravidade da doença através de uma “upregulation” da liberação de IL-10. Assim, alguns autores sugerem que as células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> podem ser responsáveis pela diminuição da severidade da doença observada em camundongos que receberam fototerapia. Na verdade, alguns estudos indicam um possível mecanismo de modulação dos efeitos da PBM no pulmão, via liberação de IL-10.

Neste estudo, observamos uma redução significativa do número de citocinas e quimiocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, LTB<sub>4</sub>, IL-10 e IFN- $\gamma$ , KC/CXCL1, MCP-1 e GM-CSF MCP-1 e LTB<sub>4</sub> no grupo tratado com FBM e um aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 após o tratamento.

A IL-10 inibe a síntese de muitas proteínas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF e quimiocinas, bem como metaloproteinases, como MMP-9, altamente expressas na DPOC.

A atividade da IL-1 $\beta$  na DPOC está associada a vários efeitos negativos nos pulmões. Ela promove a produção de outras citocinas inflamatórias, como a IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que contribuem para a inflamação crônica. Além disso, a IL-1 $\beta$  está envolvida na destruição do tecido pulmonar através da ativação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), que contribuem para a degradação do tecido elástico dos pulmões. Pudemos observar um aumento significativo de IL-1 $\beta$  no grupo DPOC bem como uma diminuição da citocina em todos os grupos tratados.

As partículas de gases nocivos causam um dano no tecido que leva à ativação excessiva do TGF- $\beta$ , resultando em um aumento da produção de colágeno e uma diminuição da produção de elastina, fatores esses que são características fundamentais da DPOC.

Esses dados sugerem que o FBM foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 produzida pelas células Treg no grupo tratado, suprimindo assim a proliferação de células T efectoras CD4<sup>+</sup>. Além dos resultados anteriores, alguns autores mostraram que as células T CD8<sup>+</sup> estão inversamente correlacionadas com a função pulmonar. Fumar pode destruir diretamente o equilíbrio da resposta pró/anti-inflamatória, via inibição das células Treg CD8<sup>+</sup> e produção de IL-10. Outros trabalhos do nosso grupo com laser em modelo experimental de DPOC, apresentaram tanto a expressão, como os níveis de IL-10 aumentados no pulmão (de Moraes *et al.*, 2018, Peron *et al.*, 2015).

As células Th1 também estão aumentadas nas vias aéreas de fumantes com DPOC e expressam STAT-4 ativado, um fator de transcrição essencial para ativação e comprometimento da linhagem Th1<sup>39</sup>. Foi demonstrado também que tanto os linfócitos T CD4 (T helper) como os CD8 (citotóxico) estavam aumentados nas vias aéreas e no parênquima pulmonar dos pacientes com DPOC<sup>34-35</sup>.

Como podemos observar, o nosso modelo de DPOC foi capaz de aumentar a inflamação do DPOC elevando os valores de CD4+STAT-4+ e CD4+IFN- $\gamma$ + bem como uma diminuição significativa no grupo tratado com FBM.

Alguns autores sugerem que as células T CD4+CD25 podem ser responsáveis pela diminuição da gravidade da doença observada em camundongos que receberam fototerapia<sup>42</sup>.

Na DPOC ocorre um aumento na deposição de colágeno e muco, essas características são responsáveis pela destruição tecidual e posterior declínio na qualidade de vida do paciente<sup>36</sup>. É possível observar aumento na produção de glândulas submucosas que são responsáveis pela produção de muco mais espesso e pegajoso. A hipertrofia das glândulas submucosas é mediada por fatores de crescimento e pela inflamação crônica. Estudos provaram que o tratamento com FBM manteve a integridade do tecido pulmonar, reduzindo a deposição de colágeno e o infiltrado peribrônquico<sup>37</sup>.

No nosso estudo, podemos observar um aumento na deposição de muco e colágeno no grupo DPOC induzido por extrato de cigarro, bem como uma diminuição significativa na produção de ambos os parâmetros após a terapia com FBM.

Resultados positivos são obtidos acerca dos efeitos da fotobiomodulação em diversas patologias, incluindo distúrbios pulmonares, como a doença pulmonar obstrutiva crônica e asma (Mafrá De Lima, et al., 2009; Peron et al., 2015). Embora ainda existam muitas lacunas em relação ao mecanismo de ação da terapia com Fotobiomodulação, sobretudo em doenças inflamatórias pulmonares, os estudos são animadores e promissores. Assim, a laserterapia pode ser uma importante ferramenta complementar no tratamento de doenças pulmonares incluindo a DPOC.

Vale ressaltar, que esses parâmetros foram escolhidos, pois nos estudos anteriores a dose de 3 J/cm<sup>2</sup>, com potência de 30mW, apresentaram resultados positivos acerca da fotobiomodulação em modelos experimentais de doenças pulmonares<sup>41</sup>.

Com relação ao tratamento com terapia de fotobiomodulação, vários mecanismos de ação têm sido propostos, embora nenhum deles esteja claramente estabelecido. Estes incluem o aumento dos níveis celulares de ATP, supressão de citocinas inflamatórias tais como TNF-, IL-1, IL-6 e IL-8, aumento da produção de fatores de crescimento, alteração do potencial de membrana da mitocôndria, entre outros.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento com irradiação com FBM reduziu significativamente a inflamação e o enfisema pulmonar em camundongos com DPOC induzida por extrato de fumaça de cigarro. Muitos dos parâmetros avaliados, como celularidade, secreção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e deposição de muco e colágeno.

Dados anteriores mostraram que a terapia com FBM no modelo de DPOC experimental induzida por fumaça de cigarro (DE MORAES *et al* 2016), diminuiu o número de células no LBA, a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17) e quimiocina (CXCL1/KC), produção de muco e colágeno, morte celular, alargamento alveolar, bem como a diminuição da expressão do receptor purinérgico P2X7 e aumento da citocina antiinflamatória (IL-10),

Assim, incentivamos outros grupos a focar no potencial da terapia a laser, pois ela tem mostrado resultados satisfatórios na DPOC, destacando a necessidade de

experimentos adicionais, como a quantificação de MMP-12 e 9, caracterização do tipo de colágeno presente no pulmão parênquima, bem como análise dos níveis de IL-17, PGE2, TGF- $\beta$ , ATP e estresse oxidativo. Além disso, a verificação do perfil das células T CD8+ reguladoras, uma vez que desempenha um papel de destaque na fisiopatologia da DPOC

## 6. Conclusão

Nossos resultados demonstram que a terapia de fotobiomodulação reduziu a migração celular para o pulmão, os níveis de citocinas e quimiocinas, bem como o alargamento alveolar. Um possível mecanismo seria o aumento da população de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) produtoras de IL-10 no pulmão, atuando na redução das células T efectoras ( $CD4^+STAT-4^+$ ), produtoras de IFN-  $\gamma$ . Ressaltamos a importância do uso da terapia de fotobiomodulação, pois pode regular a inflamação e o tratamento do enfisema pulmonar em indivíduos com DPOC.

## 6. Referências

1. Marciniuk D, Nana A, Rabe K, Zar H, Ferkol T & MontesdeOca M et al. Doenças respiratórias no mundo: realidades de hoje, oportunidades para amanhã. Fórum das Sociedades Respiratórias Internacionais. 2014, Afr J Resp Dis; 6; 4-13.
2. Lindberg AN, Lindberg LN, Sawalha SM, Stridsman CR, Lundback, BO, Backman HL. Large underreporting of COPD as cause of death-results from a population-based cohort study. Volume 186, 106518, Respiratory Medicine, SEPTEMBER 01, 2021.
3. Vestbo, J. et al. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, GOLD executive summary. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 187, 347–365 (2013). This strategy document is often regarded as the COPD standard and is the basis for most national guidelines.
4. Brandsma CA, Van den Berge M, Hackett TL, Brusselle G, Timens W. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine. J Pathol. 2020 Apr;250(5):624-635. doi: 10.1002/path.5364. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31691283; PMCID: PMC7216938.
5. da Cunha Moraes G, Vitoretti LB, de Brito AA, Alves CE, de Oliveira NCR, Dos Santos Dias A, et al. Low-Level Laser Therapy Reduces Lung Inflammation in an Experimental Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Involving P2X7 Receptor. Oxid Med Cell Longev (2018), 2018:6798238. doi: 10.1155/2018/6798238
6. Cavalcante AGM, Bruin PFC. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. J Bras Pneumol. 2009;35(12):1227-1237
7. Dailah HG. Therapeutic Potential of Small Molecules Targeting Oxidative Stress in the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Comprehensive Review. Molecules. 2022 Aug 28;27(17):5542. doi: 10.3390/molecules27175542. PMID: 36080309; PMCID: PMC9458015.

8. Wang C, Zhou J, Wang J, Li S, Fukunaga A, Yodoi J, Tian H. Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Oct 27;5(1):248. doi: 10.1038/s41392-020-00345-x. PMID: 33110061; PMCID: PMC7588592.
  
9. Guarascio AJ, Ray SM, Finch CK, Self TH. The clinical and economic burden of chronic obstructive pulmonary disease in the USA. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2013 Jun 17;5:235-45. doi: 10.2147/CEOR.S34321. PMID: 23818799; PMCID: PMC3694800.]
  
10. Rodrigues SO, Cunha CMCD, Soares GMV, Silva PL, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF. Mechanisms, Pathophysiology and Currently Proposed Treatments of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Sep 26;14(10):979. doi: 10.3390/ph14100979. PMID: 34681202; PMCID: PMC8539950.
  
11. Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J bras pneumol [Internet]*. 2006Mar;32(J. bras. pneumol., 2006 32(2)). Available from: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132006000200012>
  
12. Antibody deficiency in patients with frequent exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) *PLoS One*. 2017; 12(2): e0172437. Published online 2017 Feb 17. doi: 10.1371/journal.pone.0172437.
  
13. Poot CC, Meijer E, Kruis AL, Smidt N, Chavannes NH, Honkoop PJ. Integrated disease management interventions for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Sep 8;9(9):CD009437. doi: 10.1002/14651858.CD009437.pub3. PMID: 34495549; PMCID: PMC8425271.
  
14. Karnati S, Seimetz M, Kleefeldt F, Sonawane A, Madhusudhan T, Bachhuka A, Kosanovic D, Weissmann N, Krüger K, Ergün S. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and the Cardiovascular System: Vascular Repair and Regeneration as a Therapeutic Target. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Apr 12;8:649512. doi: 10.3389/fcvm.2021.649512. PMID: 33912600; PMCID: PMC8072123.

15. Kleppner D. Relendo Einstein sobre radiação. Rev Bras Ensino Fís [Internet]. 2005Jan;27(Rev. Bras. Ensino Fís., 2005 27(1)). Available from: <https://doi.org/10.1590/S1806-11172005000100009>
16. Neto CPS, Júnior OF. Um Presente de Apolo: lasers, história e aplicações. Revista Brasileira de Ensino de Física, vol. 39, nº 1, e1502 (2017) <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2016-0152>.
17. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. Ann Biomed Eng. 2012 Feb;40(2):516-33. doi: 10.1007/s10439-011-0454-7. Epub 2011 Nov 2. PMID: 22045511; PMCID: PMC3288797
18. Ohsugi Y, Niimi H, Shimohira T, Hatasa M, Katagiri S, Aoki A, Iwata T. In Vitro Cytological Responses against Laser Photobiomodulation for Periodontal Regeneration. Int J Mol Sci. 2020 Nov 26;21(23):9002. doi: 10.3390/ijms21239002. PMID: 33256246; PMCID: PMC7730548.
19. Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. Rev Col Bras Cir. [periódico na Internet] 2014;41(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>
20. Cios A, Cieplak M, Szymański Ł, Lewicka A, Cierniak S, Stankiewicz W, Mendrycka M, Lewicki S. Effect of Different Wavelengths of Laser Irradiation on the Skin Cells. Int J Mol Sci. 2021 Feb 28;22(5):2437. doi: 10.3390/ijms22052437. PMID: 33670977; PMCID: PMC7957604.
21. Gogia PP. Laser Treatment. Clinical Wound Management. United States of America; Slack Incorporated; 1995;177-178.
22. Baxter GD. Therapeutic Lasers: Theory and Practice. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994

23. Lins RDAU, Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2010 Nov;85(6):849–55. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000600011>
24. Oliveira MC Jr, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Custódio RW, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR, Almeida FM, Albertini R, Lopes-Matins RA, de Oliveira LV, de Carvalho Pde T, Ligeiro de Oliveira AP, Leal Jr EC, Vieira RP. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 134:57-63(2014).
25. Peinado, V. I., Pizarro, S. & Barbera, J. A. Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest* 134, 808–814 (2008).
26. RUFINO, Rogério; COSTA, Cláudia Henrique da. Patogenia da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 12, n. 2, 2013.
27. Bourbeau J, Julien M, Maltais F, Rouleau M, Beaupré A, Bégin R, Renzi P, Nault D, Borycki E, Schwartzman K, Collet JP, Singh R. Redução da utilização hospitalar em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica: uma doença -intervenção de autogestão específica. *Arch Int Med* 2003; 163: 585-591.
28. Mafra de Lima F, Costa MS, Albertini R, Silva JA Jr, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNFalpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg Med*. 2009 Jan;41(1):68-74.
29. Albuquerque ALP de, Quaranta M, Chakrabarti B, Aliverti A, Calverley PM. Exercise performance and differences in physiological response to pulmonary rehabilitation in severe chronic obstructive pulmonary disease with hyperinflation. *J bras pneumol*. 2016 Mar;42(2):121–9. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1806-37562015000000078>

30. Nicole Cristine Rigonato-Oliveira, Auriléia Aparecida de Brito, Luana Beatriz Vitoretti, Gabriel de Cunha Moraes, Tawany Gonçalves, Karine Zanella Herculano, Cintia Estefano Alves, Adriana Lino-dos-Santos-Franco, Flávio Aimbire, Rodolfo Paula Vieira, Ana Paula Ligeiro de Oliveira, "Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Pulmonary Inflammation in Asthma Induced by House Dust Mite (HDM): Dosimetry Study", *International Journal of Inflammation*, vol. 2019, Article ID 3945496, 12 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3945496>
31. Brito, Auriléia Aparecida de. "Efeito da associação das terapias com laser de baixa intensidade (LBI) e células-tronco da polpa dentária humana em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)". Tese de Doutorado, Doutorado em biofotônica aplicada às ciências da saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2019.
32. DE LIMA, F. M.; VILLAYERDE, A. B.; ALBERTINI, R.; OLIVEIRA, A. P. L.; FARIA NETO, H. C. C.; AIMBIRE, F. Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) mRNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28, 6:763-771, 2010.
33. Barnes PJ. Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004; 50: 627-37.
34. Wang Z, Locantore N, Haldar K, Ramsheh MY, Beech AS, Ma W, Brown JR, Tal-Singer R, Barer MR, Bafadhel M, Donaldson GC, Wedzicha JA, Singh D, Wilkinson TMA, Miller BE, Brightling CE. Inflammatory Endotype-associated Airway Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Clinical Stability and Exacerbations: A Multicohort Longitudinal Analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Jun 15;203(12):1488-1502. doi: 10.1164/rccm.202009-3448OC. PMID: 33332995; PMCID: PMC8483235.
35. Wouters E. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2:26-33.
36. BARNES, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Immunol Rev*. 8:183–192, 2008.

37. PERON JP, DE BRITO AA, PELATTI M, et al.: Human tubal derived mesenchymal stromal cells associated with low level laser therapy significantly reduces cigarette smoke-induced COPD in C57 BL/ 6 mice. PLoS One, 10: e0136942, 2015.
38. Cavalcante AG de M, Bruin PFC de. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. J bras pneumol [Internet]. 2009Dec;35(12):1227–37. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1806-3713200900120001>.
39. DI STEFANO, A., CARAMORI, G., CAPELLI, A., GNEMMI, I., RICCIARDOLO, F., OATES, T., DONNER, C. F., CHUNG, K. F., BARNES, P. J. and ADCOCK, I. M. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. Eur Resp J. 24, 78-85, 2004.
40. CHUNG, K. F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. European Respiratory Journal, 18(1), 50–59; 2001.
41. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. J Photochem Photobiol B. 2014 Nov;140:344-58. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25226343.
42. HOGG, J. C. & TIMENS, W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. Annu. Rev. Pathol. 4:435–459, 2009.
43. LUZ-CRAWFORD et al.: Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. Stem Cell Research & Therapy, 4:65, 2013.
44. HORI S, TAKAHASHI T, SAKAGUCHI S: Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. Adv Immunol 81:331–371, 2003.
45. SAKAGUCHI S: Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol, 22:531–562, 2004.

46. JOHN, GERRIT et al. "The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models" Clinical science (London, England: 1979) vol. 126,3 (2013): 207-21