



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA-
BIOFOTÔNICA

VANESSA DE SOUZA

**REPERCUSSÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL
NA HOMEOSTASIA PULMONAR: PAPEL DA
FOTOBÍOMODULAÇÃO**

São Paulo, SP

2023



VANESSA DE SOUZA

**REPERCUSSÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL NA
HOMEOSTASIA PULMONAR: PAPEL DA
FOTOBIMODULAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção
do título de Doutor em Medicina Biofotônica.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lino dos Santos Franco

São Paulo, SP

2023

Souza, Vanessa de.

Efeito da terapia por fotobiomodulação sobre mecanismos de dor, em modelo experimental de tendinite induzida por collagenase. / Vanessa de Souza. 2023.

68 f.

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

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

1. Doença inflamatória intestinal. 2. Microbiota intestinal. 3. Inflamação pulmonar. 4. Fotobiomodulação. 5. Citocinas.

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

CDU 615 831

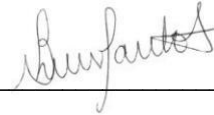
São Paulo, 13 de novembro de 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Vanessa de Souza

Título da Tese: "Repercussão da inflamação intestinal na homeostasia pulmonar: papel da fotobiomodulação".

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



Membro: PROF^a. DR^a. REBECA BOLTES CECATTO



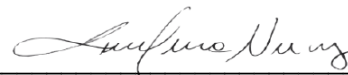
Membro: PROF^a. DR^a. DALIANA QUEROGA DE CASTRO GOMES



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^a. DR^a. SILVIA CRISTINA NUNEZ



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus à saúde física e mental (ao longo desse estudo me recuperei de uma lesão cervical) por me mostrar, mais uma vez, que estudar é um caminho conhecido há tempos que sempre me acolhe por inteiro, preenche a alma, traz autoconhecimento e me faz, muito, mas muito feliz.

Agradeço imensamente a minha família, minha mãe, Dona Anna Lucia, minha fortaleza, o seu apoio e a admiração que tenho por você, me fizeram sempre ir além. Meu forte e amado pai (José) e minhas queridíssimas irmãs (Vaninha e Valéria), obrigada pelo incentivo constante e as palavras de apoio (você são minha base) e a ajuda com o Thales. Meu filho Thales por ser uma criança iluminada e ser motivo da minha melhoria como ser humano diariamente.

Ao Adriano, parceiro de jornada nessa caminhada, por fazer parte de cada etapa deste estudo, por me ajudar a estudar as disciplinas de exatas, formatação de arquivos e recursos tecnológicos, nas apresentações em inglês entre tantas coisas do dia a dia. Pela paciência e amor que vi em seus olhos em cada dia cheio e difícil que se apresentou e tive que dar conta de tudo. Obrigada por ser meu colo para momentos de choro, mas também motivo de muitos sorrisos.

A minha professora Adriana Lino, por honrar a definição de orientadora, não tenho palavras para descrever o cuidado, respeito e comprometimento (desde os pequenos direcionamentos às grandes decisões). Levo como ensinamento a sua postura, amor e carinho com seus alunos e espero replicar o seu comportamento o maior número de vezes possível. Agradeço também aos alunos do grupo da professora pelos experimentos e trocas de experiências.

Agradeço a Universidade Nove de Julho pela oportunidade de agregar conhecimento, confesso que foi extremamente prazeroso. As minhas amigas e colegas, Professoras do curso de graduação em Enfermagem, por serem ouvintes nas queixas de

cansaço e sempre com uma mensagem positiva, por assistirem os treinos de apresentação e corrigirem falas, slides e palavras de incentivo: (Gilmara Farias, Danika Aoyagui, Virginia Polli, Juliana Veloso, Daniele Vieira, Cris Capeloa, entre outros queridos e queridas). A Mary Ellen Salles por escrever a carta de referência no processo seletivo.

As minhas coordenadoras, Neusa Fukuya, Claudia Soares, Adriana Jordão, Wilsa Cabral, Fernanda Pitanga e Cristina Braga pela compreensão, tolerância e apoio nos momentos de saúde, com a dinâmica de trabalho e pessoal (com o meu filho Thales), muito obrigada de coração.

Aos meus amigos de longa data, que sempre fizeram parte da minha jornada: Janaína de Jesus Paterno dos Santos, Aurivania Alexandre da Silva, Rita de Cassia, Luciana Alves da Silva, Franciele Ortega, Sibele Ferreira, Paola Keiti Ribeiro, Dejair Silva Filho, Sergio Alves Moraes, por sempre me apoiarem em palavras de encorajamento, escuta ativa e amorosa.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Jung

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas e multifatoriais caracterizadas por disfunção da mucosa intestinal e comprometimento da resposta imunológica. O complexo sistema de comunicação bidirecional existente entre as vias intestinal e pulmonar se relaciona ao papel fundamental da microbiota intestinal na sustentação da homeostase local e sistêmica. Consideráveis progressos têm sido feitos na terapêutica das DII, porém os fármacos deflagram efeitos colaterais extremamente nocivos e assim novas terapias são necessárias, deste modo a fotobiomodulação (FBM) emerge como uma terapia coadjuvante, apresentando bons resultados nas DII. Assim avaliamos a influência da inflamação intestinal sobre a homeostasia pulmonar e o papel da FBM como tratamento. Para tanto, 54 ratos Wistar machos, divididos em três grupos: Basal, Colite, Colite + FBM, foram submetidos à indução de DII por ácido acético a 10%. Após 48 horas da indução da colite, os ratos foram tratados por três dias consecutivos com LED vermelho com comprimento de onda de 660 nm. Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância seguidos de pós-teste Student Newman-Keuls. Nossos resultados considerados, foram com valores de $P < 0,05$. Verificou-se que a FBM reduziu o escore da atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido intestinal, reduziu o índice de atividade da doença e a redução da migração de células inflamatórias para a mucosa intestinal. Comprovou-se a alteração da hemostasia pulmonar ao verificar a atividade da MPO no tecido pulmonar, a migração de células inflamatórias para o pulmão, a indução da ativação de mastócitos pulmonares com grânulos de extrusão, níveis elevados de IL-6, IL-1 β e TNF- α no tecido pulmonar e a expressão gênica elevada de IL-6 e TNF- α . Também observou-se o papel da FBM no parênquima pulmonar em reduzir a atividade pulmonar da MPO, a redução da desgranulação dos mastócitos pulmonares, reverteu a elevação das citocinas e a expressão gênica das citocinas pró- inflamatórias. Novos estudos que investiguem o papel da FBM nas DII, mediante a comprovação da ligação do eixo intestino- pulmão são importantes para identificar novas abordagens, como a translacional, beneficiando evidências da pesquisa básica para protocolos clínicos.

PALAVRAS-CHAVE: Doença inflamatória intestinal; Microbiota intestinal; Inflamação pulmonar; Fotobiomodulação; Citocinas

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic and multifactorial diseases characterized by dysfunction of the intestinal mucosa and compromised immune response. The complex bidirectional communication system existing between the intestinal and pulmonary pathways is related to the fundamental role of the intestinal microbiota in supporting local and systemic homeostasis. Considerable progress has been made in IBD therapy, but drugs trigger contractual side effects and thus new therapies are allowed, thus photobiomodulation (FBM) emerges as an adjunctive therapy, showing good results in IBD. Thus, we evaluated the influence of intestinal inflammation on lung homeostasis and the role of FBM as a treatment. To this end, 54 male Wistar rats, divided into three groups: Basal, Colitis, Colitis + FBM, were subjected to IBD induction with 10% acetic acid. 48 hours after colitis induction, the rats were treated for three consecutive days with red LED with a wavelength of 660 nm. Sample data were subjected to analysis of variance followed by Student Newman-Keuls post-test. Our considered results were with values of $P < 0.05$. It was found that FBM impaired the myeloperoxidase (MPO) activity score in intestinal tissue, impairing the disease activity index and reducing the migration of inflammatory cells to the intestinal mucosa. It proves the alteration of pulmonary hemostasis to verify the activity of MPO in the lung tissue, the migration of inflammatory cells into the circulation, the induction of activation of pulmonary mast cells with extrusion mixtures, elevated levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in lung tissue and elevated gene expression of IL-6 and TNF- α . The role of FBM in the lung parenchyma in reducing pulmonary MPO activity, reducing pulmonary mast cell degranulation, reversing the elevation of cytokines and gene expression of pro-inflammatory cytokines was also observed. New studies that investigate the role of FBM in IBD, by proving the link between the intestine-transport axis, are important to identify new approaches, such as translational, benefiting evidence from basic research for clinical protocols.

KEY WORDS: Inflammatory bowel disease; Intestinal microbiota; Pulmonary inflammation; Photobiomodulation; Cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
COVID-19	COVID-19
CU	Colite Ulcerativa
DAI	Índice de atividade da doença
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
FBM	Fotobiomodulação
IgE	Imunoglobulina E
IL-4	Interleucina 4
IL-4 mRNA	Interleucina-4 RNA mensageiro
IL-6	Interleucina-6
IL-6 mRNA	Interleucina-6 RNA mensageiro
IL-10	Interleucina- 10
IL-12	Interleucina- 12
IL-13	Interleucina- 13
IL-17	Interleucina- 17
IL-10 mRNA	Interleucina- 10 RNA mensageiro
IL-1 β	Interleucina-1Beta
IL-1 beta mRNA	Interleucina-1Beta RNA mensageiro
IFN-gamma	Interferon-Gama
IFN-gamma mRNA	Interferon-Gama RNA mensageiro
LBA	Lavado broncoalveolar
LED	Light Emitting Diode = “Diodo emissor de luz”
NM	Nanômetros
PCR	Proteína C Reativa

RNA	Ácido ribonucleico
SDR	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDS	Sulfato de Dextrano Sódico
TGI	Trato Gastrointestinal
Th1	T helper tipo 1
Th2	T helper tipo 2

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: Fisiopatologia da evolução das doenças inflamatórias intestinais.

Figura 2: Prevalência da Colite Ulcerativa no Brasil.

Figura 3: Diferença fisiopatológica da Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa.

Figura 4: Adaptado à Ligação intestino-pulmão nas doenças inflamatórias intestinais.

Figura 5: Adaptado, tratamento medicamentoso na Colite Ulcerativa.

Figura 6: Aparelho BioLambda LEDsabr- BlackBox Min.

Figura 7: O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore DAI e a atividade de MPO.

Figura 8: O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histológico do intestino.

Figura 9: O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histopatológico do pulmão.

Figura 10: O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu a atividade de MPO pulmonar.

Figura 11. Figura 1. O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu a degranulação dos mastócitos nos pulmões.

Figura 12. O tratamento da DII com fotobiomodulação modula IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 no tecido pulmonar.

Figura 13. O tratamento da DII com fotobiomodulação modula a expressão gênica de IL-6, TNF- α e IL-10 no tecido pulmonar.

Quadro 1. O tratamento com fotobiomodulação em doenças inflamatórias intestinais. São Paulo.2023.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doenças inflamatórias intestinais.....	1
1.2 Microbiota intestinal e Doenças inflamatórias intestinais.....	6
1.3 Eixo intestino-pulmão: relação das doenças intestinais e respiratórias.....	7
1.4 Tratamentos das doenças inflamatórias intestinais e a Fotobiomodulação	13
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVOS.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais.....	21
4.2 Grupos experimentais.....	22
4.3 Delineamento experimental.....	23
4.4 Indução da inflamação intestinal.....	23
4.5 Tratamento com fotobiomodulação.....	24
4.6 Pontuação do Índice de Atividade da Doença (DAI).....	25
4.7 Eutanásia e a determinação da atividade da mieloperoxidase intestinal e pulmonar.....	25
4.8 Contagem de células totais e diferenciais presentes no lavado broncoalveolar	26
4.9 Quantificação de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar e no homogenato intestinal	26
4.10 Determinação da expressão gênica de citocinas no tecido pulmonar e intestinal.....	27
4.11 Análises histológicas no pulmão e intestino.....	27
4.12 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	30
5.1 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore DAI e a atividade do MPO.....	30
5.2 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histopatológico do tecido intestinal.....	32

5.3	O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histopatológico do pulmão.....	34
5.4	O tratamento da DII com fotobiomodulação diminui a atividade da enzima mieloperoxidase pulmonar.....	36
5.5	O tratamento da DII com fotobiomodulação reduz a desgranulação de mastócitos pulmonar.....	38
5.6	O tratamento da DII com fotobiomodulação modula IL-4, IL-6, IL-1B, IFN- γ TNF-A e IL-10 no tecido pulmonar.....	40
5.7	O tratamento da DII com fotobiomodulação modula a expressão gênica de IL-4, IL-6, IL-1 β e IFN- γ , TNF-A e IL-10 no tecido pulmonar.....	42
6	DISCUSSÃO.....	44
7	CONCLUSÃO.....	48
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
9	ANEXOS.....	54
9.1	Aprovação do Comitê de Ética.....	55
9.2	Check List ARRIVE.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas e multifatoriais caracterizadas por disfunção da mucosa intestinal e comprometimento da resposta imunológica ¹.

Na figura 1, observa-se o desenvolvimento das DII, por estágios, desde a exposição a fatores extrínsecos e intrínsecos no indivíduo, a transição da mucosa da inflamação para a cronificação, até a destruição tecidual da mucosa intestinal. Essas fases estão relacionadas a interação entre fatores genéticos e exposição a um meio específico, como uma alimentação não saudável, tabagismo, poluição, melhoria das condições de higiene e de armazenamento de alimentos que reduzem significativamente a frequência de infecções entéricas, ingestão de medicamentos, entre outros, podendo levar a disfuncionalidade da mucosa intestinal, comprometendo a tolerância imunológica, e assim, alterando a microbiota intestinal ^{2,3,4}.

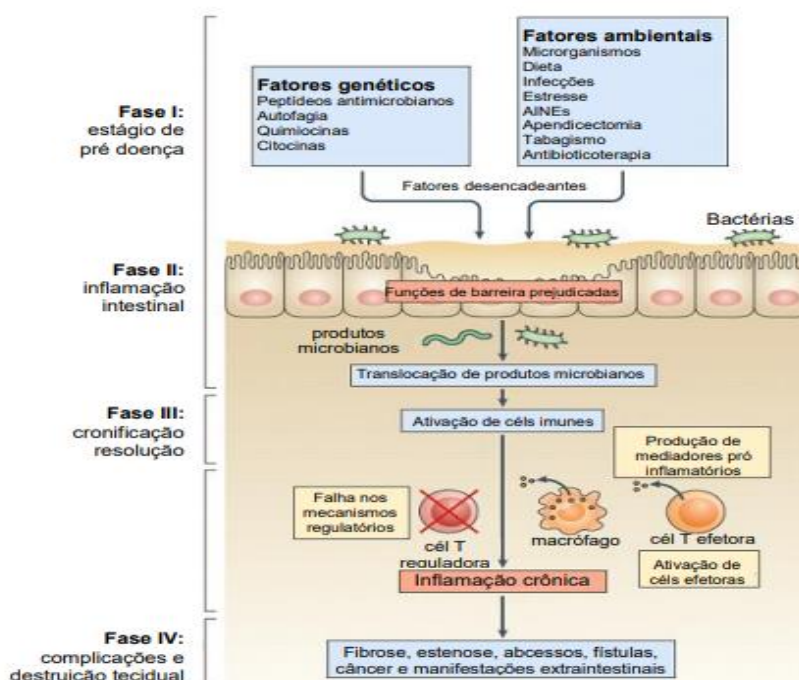
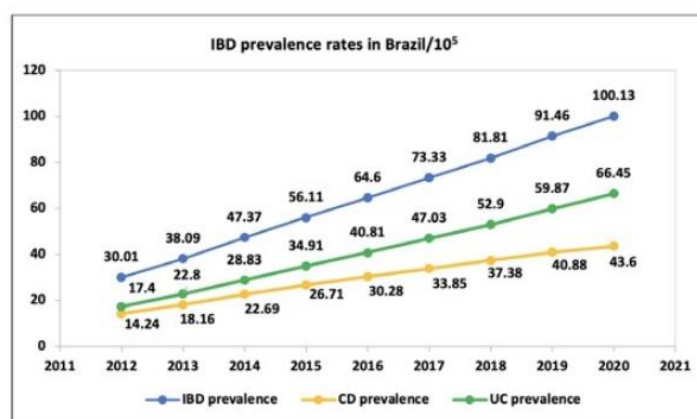


Figura 1: Quadro conceitual da patogênese das DII- Fonte: Adaptado de Neurath,2014 ³

Nos últimos 20 anos, os estudos epidemiológicos em continentes em desenvolvimento como a Ásia, América do Sul e África revelaram um aumento na incidência das DIIs ⁵. O Brasil é o país mais populoso da América do Sul, com mais de 200 milhões de pessoas, com diversas origens genéticas, secundárias à miscigenação de indígenas, europeus, africanos e asiáticos, em mais de 500 anos de sua história ⁶. Essa diversidade varia de acordo com a região do país, com grande carga genética de europeus, refletindo a maior probabilidade das DIIs nas regiões Sul e Sudeste do Brasil ^{6,7}.



Em azul, DII em geral; em verde, retocolite ulcerativa; em amarelo, doença de Crohn

Figura 2: Prevalência da Colite Ulcerativa no Brasil ⁸.

As DIIs são descritas com grande impacto na saúde pública, em relação à redução da qualidade de vida por ser uma doença incurável com tratamento de longo prazo, implicando em despesas e susceptibilidade a complicações ^{7,9}. Em países desenvolvidos, como Estados Unidos e Canadá, a maior incidência é encontrada em indivíduos com a faixa etária de extrema produtividade, entre 20 e 39 anos de idade, demonstrando a importância de estudos que descrevem essa temática ¹⁰.

As DIIs compreendem duas situações clínicas distintas, com alterações histológicas e anatômicas ao longo do trato gastrointestinal diferenciadas, mas

fisiopatologicamente muito semelhantes: Doença de Crohn (DC) e Colite Ulcerativa (CU). A evolução da doença se mostra pela desarmonia entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na mucosa afetada. Ambas as doenças, caracterizam-se pela infiltração linfocitária da lâmina intestinal, aumentando a permeabilidade da barreira da mucosa, que é um dos mecanismos que pode promover, quando ocorre o processo inflamatório intestinal, a translocação bacteriana, o que pode contribuir com a evolução da DII para um quadro de inflamação sistêmica ¹¹.

A DC é uma das inflamações intestinais que ocorre em pacientes com idade entre 15-35 anos. Ao contrário de outras doenças inflamatórias, as DIIs não são suprimidas facilmente. Consequentemente, o sistema imunológico é estimulado e parte do intestino é destruído. Causa dor, diarreia, febre e outras sintomatologias. Além do grave efeito na parte inferior do intestino delgado, a DC também pode ocorrer em partes do trato digestivo, incluindo o intestino grosso, estômago, esôfago ou mesmo boca ^{1, 2}.

Já a CU afeta a camada da mucosa do cólon. As lesões ocorrem no reto e no intestino. A sintomatologia varia de leves a graves e podem ameaçar a vida ³. A desnutrição é muito comum na DC porque o intestino delgado é responsável pela absorção de nutrientes, o qual fica danificado ¹⁰. A CU está associada a sangue nas fezes, dor intensa e diarreia, enquanto na DC também há risco de sangramento em casos graves. O sangramento retal é menos comum em DC, enquanto a CU é comumente associada ao sangramento retal. Mais de 50% das pessoas com DC sofrem de deficiência de vitamina D, enquanto mais de 50% das pessoas com CU sofrem de deficiência de ferro ⁸.

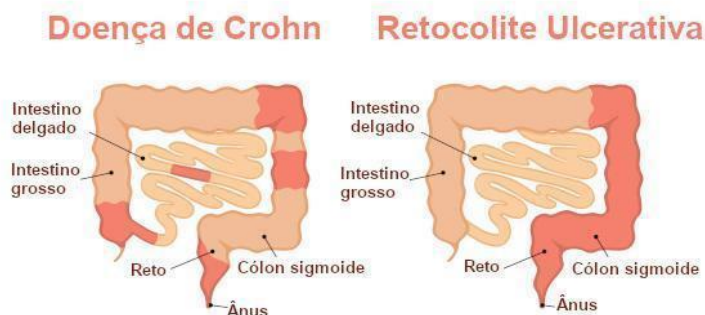


Figura 3: Diferença fisiopatológica da Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa.

Fonte: <https://brasilecola.uol.com.br/doencas/retocolite-ulcerativa.htm>

É bem conhecido que o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas está associado a um desequilíbrio no sistema imunológico, resultando em níveis elevados de várias citocinas específicas. Na DC há uma liberação aumentada de citocinas como TNF- α , IFN- α , IL-12 e IL-17, enquanto na CU ocorre um aumento de IL-13^{13,14}.

As citocinas são proteínas associadas às doenças inflamatórias e são liberadas por células como os macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos e mastócitos¹⁵.

Os linfócitos T auxiliares do subtipo Th1 produzem interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF), sendo responsáveis pelas células mediadoras da inflamação e da imunidade, como o interferon gama. As citocinas secretadas pelos linfócitos Th1 também estimulam a produção de óxido nítrico nos macrófagos, aumentando a sua atividade^{12,16}.

O TNF é outra citocina pró-inflamatória, reconhecido como um dos principais membros da família das citocinas, com importantes funções patogênicas na progressão de processos inflamatórios crônicos¹⁷.

Os linfócitos Th2 secretam IL-4, IL-6, IL-10, que estimulam os linfócitos B a promover a imunidade humoral. As citocinas secretadas pelas células Th2,

particularmente a interleucina-4 (IL-4), também podem ativar os mastócitos. A IL-4 derivada dos mastócitos pode polarizar as células T em células Th2^{15,16}.

A mucosa intestinal inflamada contém um grande número de neutrófilos e proteínas derivadas dessas células assim como aumentada produção da enzima mieloperoxidase (MPO), a qual é considerada um biomarcador da presença de neutrófilos. A MPO desempenha um papel importante nas respostas imunológicas e nos processos inflamatórios relacionados com os mecanismos bactericidas dependentes de oxigênio¹⁸. É catalisadora do processo de formação de radicais altamente reativos, que produzem estresse oxidativo, na qual exercem uma atividade oxidante prejudicial sobre as células e os tecidos ao redor¹⁹.

Os mastócitos também participam do processo inflamatório. São células secretoras multifuncionais do sistema imune que participam da regulação da resposta imunológica, pela liberação de mediadores químicos, frente a um estímulo apropriado. Observa-se a presença de mastócitos tanto na reação inflamatória aguda quanto na crônica, expressando em sua superfície o receptor que liga a imunoglobulina E (IgE)¹⁷. A desgranulação de mastócitos descreve a ação da liberação de mediadores químicos que amplificam os processos sistêmicos de inflamação tecidual²⁰.

Atualmente, três hipóteses estão sendo investigadas como possíveis causas desse desequilíbrio imunológico, incluindo distúrbios na microbiota intestinal, fatores imunológicos e defeitos na barreira mucosa. Nesse sentido, a literatura já evidenciou a fisiopatologia da DII sendo relacionada a desregulação do sistema imunológico da mucosa intestinal, conduzindo a uma resposta imune patogênica contra a flora comensal do intestino, demonstrando que a microbiota intestinal é um importante fator na condução da resposta inflamatória nas DIIs¹².

1.2 Microbiota intestinal e Doenças inflamatórias intestinais

A microbiota intestinal é constituída por microrganismos vivos, dos quais fazem parte as bactérias, vírus e fungos. O biossistema do trato gastrointestinal (TGI) é separado do interior do hospedeiro por uma fina camada de células epiteliais, que atuam como interface entre hospedeiro e meio ambiente, e esse epitélio é coberto com cílios, microvilosidades, células produtoras de muco e junções intercelulares que proporcionam a fisiologia intestinal em contato com a microbiota ²¹.

Estima-se que no TGI haja aproximadamente 10¹⁴ micro-organismos, composto por mais de 1000 tipos distintos de espécies e mais de três milhões de genes comparados a aproximadamente 30.000 no genoma humano. A composição dos microrganismos, anaeróbios facultativos e estritos, que estão presentes no intestino varia ao longo do TGI e entre o lúmen e as células epiteliais, em condições normais, não nos causam doenças. A literatura descreve mais de 50 filos (*Filos*- Classificação em categorias hierárquicas da população do microbioma intestinal). Existem, quatro principais filos que colonizam o TGI humano: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* representando 98% da microbiota intestinal, os filos mais prevalentes são os *Bacteroidetes* e *Firmicutes* ²². A microbiota tem demonstrado interagir com o hospedeiro de forma simbiótica, modulando a inflamação e o sistema imunológico. ²³

Nesse sentido, a literatura vem evidenciando pesquisas que ilustram essa temática, e um estudo realizado em 2017, multicêntrico, duplo-cego em três hospitais na Austrália, com o objetivo de avaliar a eficácia do transplante fecal em pacientes com CU, demonstraram a importância das características da microbiota intestinal ²⁴.

Estudos recentes ^{25,26} revelam que a disbiose da microbiota intestinal está associada a várias infecções crônicas locais e de forma sistêmica. Uma comunidade

microbiana equilibrada no intestino é de grande importância na função imunológica e processo saúde - doença.

1.3 Eixo intestino-pulmão: relação das doenças intestinais e respiratórias

O maior reservatório de organismos vivos no corpo, é a microbiota entérica, considerada um fator fundamental na resposta imunológica local e sistêmica, por meio dos mediadores inflamatórios, que podem se estender para regiões mais distantes, como a região pulmonar ²⁷. O complexo sistema de comunicação bidirecional existente entre as vias intestinal e pulmonar, inicialmente denominado "eixo intestino-pulmão", descreve o papel fundamental da microbiota intestinal na sustentação da homeostase local e sistêmica. A relação da inflamação intestinal com repercussão pulmonar, ocorre devido ao cruzamento desta microbiota local com o desenvolvimento de repercussões inflamatórias distais em órgãos subjacentes ^{1,25}.

As interações biológicas entre os microrganismos e o homem ao longo da evolução, além da relevância do ecossistema luminal na modulação imune, já se impõem como um novo paradigma ²⁸.

O ecossistema microbiano que abriga esses organismos vivos atua interligando-se com outros órgãos, auxiliando a digestão, modulando a resposta imune, produzindo neurotransmissores, ademais mantém a integridade da barreira intestinal. ²⁹ Dessa forma, estudos experimentais mostram que bactérias que habitam no intestino influenciam diretamente o metabolismo epitelial, sua proliferação, bem como a sua troca entre diferentes “compartimentos”, como por exemplo o sistema respiratório ^{25,30}.

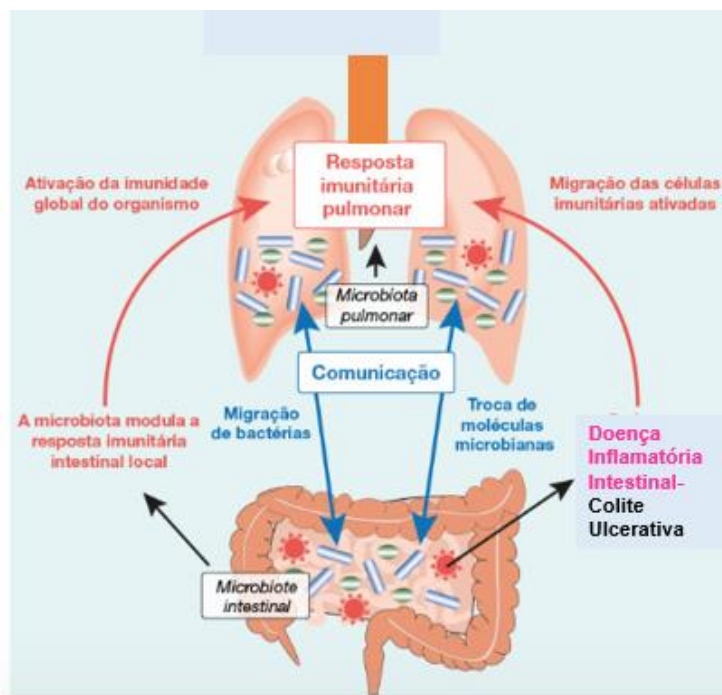


Figura 4- Adaptado Ligação intestino-pulmão nas doenças inflamatórias intestinais ²⁶.

Zhang et al em 2020 demonstraram que a microbiota intestinal tem um papel crítico na mediação da resposta imune em locais distantes, incluindo o pulmão. Seus metabólitos podem atingir outros órgãos por meio da corrente sanguínea. A colonização direta de bactérias benéficas da microbiota intestinal nas vias aéreas é outra possibilidade. Novas estratégias terapêuticas que visam a manipulação do microbioma intestinal por meio de antibióticos, probióticos, prebióticos, produtos naturais ou dietas foram experimentadas em várias doenças pulmonares por estudos clínicos e laboratoriais. Essas abordagens mostraram resultados encorajadores na maioria dos casos. Eles podem restaurar a disbiose da microbiota e aumentar a resposta imune ³¹.

A literatura demonstrou o papel da microbiota intestinal na aquisição e evolução do SARS-CoV-2 ^{32, 33}. Atuando diretamente na inibição da replicação viral, assim como indiretamente modulando a resposta imune, descrevem o predomínio majoritário na microbiota intestinal, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, os quais também estão presentes nas células pulmonares ³¹. A redução das Proteobactérias (bactérias Gram negativas)

intestinais pode ser uma forma de reduzir o nível de sinais inflamatórios e reduzir a gravidade de uma infecção por Covid 19. Estes microrganismos vivos demonstraram afetar a saúde pulmonar, por meio de uma “conversa” cruzada existente entre a microbiota intestinal e as células pulmonares, caracterizando assim o denominado “eixo intestino – pulmão”. Observa-se que essa relação pode ser bidirecional, ou seja, as endotoxinas e metabólitos microbianos podem afetar o pulmão por meio da corrente sanguínea, assim como inflamações pulmonares podem afetar a microbiota intestinal. Esse cruzamento de microbiotas entre os sistemas, possibilita que as endotoxinas, metabólitos microbianos, podem impactar o pulmão por meio do sangue e, quando ocorre inflamação no pulmão, pode afetar a microbiota intestinal também. Isso levanta a possibilidade que o SARS-CoV-2 também possa ter um impacto dependendo da microbiota do intestino ²⁹.

Um estudo realizado em 2018, descreve as associações e conexões entre a microbiota e o estado de saúde e doença dos indivíduos. O questionamento central deste estudo foi em relação à origem das doenças respiratórias e o microbioma pulmonar, no que tange às comunidades microbianas alteradas nos pulmões por causa das doenças respiratórias ou alterações pulmonares devida uma disbiose entre esses microrganismos ³⁰.

O sistema imune e o microbioma estão tão intimamente interligados que essa diferenciação é extremamente complexa. Concluiu-se que a maioria dos estudos nesse tema ainda são descritivos e, apesar de repletos de correlações provocativas, ainda não elucidam a causalidade entre a modulação das doenças do sistema respiratório e a microbiota residente, nem determinam temporalmente o que se inicia primeiro: a disbiose ou a doença pulmonar. Assim, os autores reforçam a importância de novos estudos que abordem a microbiota e suas repercussões no sistema imunológico ³⁰.

Breithaupt-Faloppa et al.²⁷ descreveram a relação do sistema linfático na modulação das respostas inflamatórias pulmonares após a lesão intestinal. As evidências mostraram que a linfa drenada do intestino após lesão isquêmica promove interações dos leucócitos com as células endoteliais do parênquima pulmonar com liberação de mediadores inflamatórios que, por sua vez, podem ser disseminados pela corrente sanguínea. Neste contexto, o pulmão é invadido por mediadores responsáveis pela iniciação de fenômenos inflamatórios sistêmicos, provenientes da lesão na mucosa intestinal. O estudo concluiu que, durante eventos isquêmicos intestinais, a linfa-mesentérica pode atingir a microcirculação pulmonar e esse achado pode ser relevante para a preservação da homeostase pulmonar.

Há tempos se evidencia a relação da microbiota intestinal e sistema imunológico por meio da existência de antígenos provenientes da microbiota intestinal, que estimulam o desenvolvimento dos órgãos linfóides, levando a capacidade de regulação de um estado de homeostasia com o hospedeiro³⁵. O processo de colonização do TGI por estes microrganismos inicia-se ao nascimento. A presença destes microrganismos na mucosa intestinal confere vários benefícios ao hospedeiro, dentre eles a estimulação do sistema imunológico²³. Esta colonização é referida como simbióticos intestinais em decorrência de possuírem uma relação mutualística com o organismo humano³⁸, impedindo a colonização do TGI por outros microrganismos que são potencialmente patogênicos e também estimular a resposta imunológica em nível de mucosa³⁴.

A microbiota intestinal possui a capacidade de modular a imunidade a nível de mucosa, por meio das células do tecido linfóide associado à mucosa intestinal incluindo as células apresentadoras de antígeno, linfócitos B e T, células epiteliais e outras que estão em contínuo contato com a microbiota intestinal³⁵. O intestino possui a maior massa de tecido linfático do corpo humano, contendo aproximadamente três quartos de todos os

linfócitos e produzindo a maioria das imunoglobulinas em indivíduos saudáveis^{36, 37}. Estes microrganismos estão fortemente interligados com as respostas imunológicas sistêmicas pela modulação na expansão extraintestinal das células T, ocasionando o desenvolvimento de tolerância oral e controle da inflamação³⁵.

A ocorrência de um desequilíbrio na microbiota intestinal conduz a ativação do sistema imune levando a indução de inflamação³⁸. Estudos indicam que a ocorrência da disbiose pode estar associada a doenças inflamatórias, processos oncológicos, obesidade entre outras²¹.

As consequências deletérias de eventos que lesionam a mucosa intestinal, desregulando toda a microbiota intestinal, não se restringem somente ao órgão afetado, o sistema de comunicação das vias imunológicas promove repercussões que ocorrem de forma sistêmica, notadamente em órgão adjacentes, como o parênquima pulmonar, podendo levar a doenças agudas, por inflamação pulmonar e, em condições mais graves, a Síndrome do desconforto respiratório agudo²⁷.

Verifica-se a interligação dos sistemas, intestinal e respiratório, por meio do sistema imunológico, nos estudos realizados em 2009 e 2012^{27, 39}, em que os linfócitos são ativados, indicando que a resposta imune inata é desencadeada demonstrando o acúmulo de neutrófilos e o aumento da permeabilidade vascular pulmonar como uma das principais alterações na Inflamação Intestinal Aguda. Além disso, citocinas e interleucinas estão inclusas no amplo espectro de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta fisiopatológica. Basicamente, um dano intestinal desencadeia uma rede inflamatória na qual interação leucócito-endotelial desempenha um papel crítico em lesão pulmonar, recrutando e ativando os neutrófilos para liberar mediadores inflamatórios.

No estudo de Deitch *et al*, em um modelo experimental, realizou-se a indução de hemorragia mesentérica e verificou-se as repercussões pulmonares. As evidências

mostraram que a hemorragia intestinal levou a um consistente aumento de 2,5 a 4 vezes na permeabilidade pulmonar. O sistema linfático é uma via relevante para a captação e transporte de proteínas, fluidos e células imunológicas. Além de seu papel central na imunorregulação, o sistema linfático foi considerado um modulador de lesão pulmonar aguda após traumatismo intestinal. A literatura reconhece que o aumento da inflamação no intestino lesado é consequência de sua capacidade de gerar mediadores inflamatórios. O pulmão é o órgão alvo inicial dos fatores presentes na linfa mesentérica ⁴⁰.

Neste contexto, a análise dos mediadores de inflamação após isquemia intestinal tem comprovado a modulação da inflamação, adesão celular e permeabilidade vascular. Estudos que investigam a ligação causal entre lesão intestinal e inflamação pulmonar, descrevem a rede de distribuição dos mediadores inflamatórios por meio do sistema linfático ^{27, 40}.

Em um estudo em 2011, descreveu que os neutrófilos circulantes desempenham um papel importante de translocação entre os órgãos, verificou-se o acúmulo destas células nos pulmões e o aumento da permeabilidade microvascular, em um modelo experimental de inflamação pulmonar aguda ocasionada por lesão intestinal. A resposta de defesa do organismo frente aos mediadores inflamatórios, pode ser observada por meio dos neutrófilos ⁴¹.

A literatura descreve que as DII emergiram como uma das temáticas mais investigadas para entender as condições da disbiose intestinal ^{12, 42,43}. A importância de estabelecer um equilíbrio entre a microbiota e o indivíduo, existindo uma simbiose e/ou simetria entre o hospedeiro e a microbiota comensal, em uma espécie de mutualismo, a qual ambos se beneficiem em prol da saúde do hospedeiro ⁴⁴.

1.4 Tratamentos das doenças inflamatórias intestinais e a Fotobiomodulação

Durante as últimas décadas, o desenvolvimento do tratamento para as DIIs mostra que o uso de imunomoduladores da resposta inflamatória da mucosa intestinal mudou radicalmente a estratégia terapêutica ⁴⁴. A avaliação da inflamação da mucosa tornou-se um importante direcionador para o tratamento no intuito de reduzir a progressão da doença e complicações a longo prazo.

A cicatrização da mucosa em pacientes com CU é um dos objetivos centrais do tratamento, além do controle da sintomatologia. É reconhecido na literatura científica como desfecho primário em ensaios clínicos a reparação tecidual da mucosa intestinal para avaliar a resposta à terapia proposta e conduzir as decisões medicamentosas, como escalonamento de doses, troca e retirada de fármacos ^{1, 45, 46}.

O principal objetivo do tratamento das DIIs é a remissão clínica sem corticosteroides, a diminuição da morbimortalidade e a melhoria na qualidade de vida. Para atingi-los é importante a abordagem multiprofissional (coloproctologista, gastroenterologista, nutrólogo, psicólogo) ^{47,48}.



Figura 5: Adaptado, tratamento medicamentoso na Colite Ulcerativa ⁴⁷.

O manejo do tratamento da doença intestinal é reduzir a inflamação que desencadeia a sintomatologia, porém proporciona alívio na maioria das vezes dos sintomas, mas nem sempre prevenindo a remissão a longo prazo e redução dos riscos de complicações ⁴⁷.

Einstein (1905): desenvolveu as bases para o desenvolvimento do laser. Einstein (1917): postulou as duas teorias que são a base para a produção do laser: EMISSÃO ESPONTÂNEA e EMISSÃO ESTIMULADA. Ele não criou o laser, mas a partir das duas teorias, que foram construídos os equipamentos lasers. Em 1959, surge, pela primeira vez o termo Laser, no manuscrito de Gould, ele fala sobre o LASER. Em 1960, Maiman publicou o primeiro trabalho de sucesso, baseado nas teorias de Einstein, que por sua vez evoluíram para a fototerapia e consequentemente FBM, relatando a emissão estimulada da luz dentro do espectro visível 694 nanômetros (nm), sendo aplicada cientificamente no âmbito fisiopatológico, demonstrando os efeitos fotoquímicos de lasers e do LED (Diodo emissor de luz) e outras fontes monocromáticas de luz para erradicar bactérias, vírus e outros patógenos com forte valor terapêutico como antimicrobiano e anti-inflamatório ⁴⁸.

Na última década, alguns pesquisadores demonstraram a aplicabilidade do LED, sendo a Fotobiomodulação (FBM) definida como uma terapia baseada nos efeitos de diferentes tipos de luzes sobre células e tecidos ⁴⁹.

A terapia com o uso da luz é definida como uma radiação eletromagnética, é uma modalidade segura não invasiva com significativos efeitos moduladores da inflamação confirmados por meta-análises e ensaios clínicos ^{50,51}, sendo aprovada no tratamento da dor, aceleração da reparação de tecidos e redução do linfedema e diversas outras. O processo de reparo pode ocorrer por regeneração ou cicatrização.

A FBM, evidencia-se na literatura ⁴⁸, como uma aplicação transcutânea de luz monocromática de baixa intensidade, que produz reações fotoquímicas intracelulares que ativam biomoléculas para restaurar a função celular normal e melhorar os processos de recuperação. A luz com comprimento de onda de 635 nm é capaz de penetrar na pele em aproximadamente 6 mm, a profundidade terapêutica efetiva, entretanto, parece estar próxima de 1-3 mm, quando utiliza-se luz em comprimento de 635 nm ⁵⁰.

A FBM por LED está distribuída em uma banda eletromagnética maior (635 ± 35 nm), podendo interagir com um maior grupo de fotorreceptores específicos, como a utilização eficaz do espectro da luz no tratamento de uma variedade de doenças com complicações respiratórias (efeitos no parênquima pulmonar, observando-se a redução do infiltrado pulmonar) e alterações sistêmicas da resposta imunológica ^{50, 51}.

As vantagens das terapêuticas do uso da FBM para doenças inflamatórias têm sido sugeridas por vários autores ^{52,53,54}. Quando a luz se propaga por meio do tecido, passa por uma série de interações dependendo do arranjo estrutural e das propriedades físicas do microambiente. Alguns estudos referiram que a FBM pode interferir positivamente para aliviar os sinais e sintomas de inflamação de tecidos. Todos os tratamentos com FBM na inflamação tecidual descritos acima foram feitos de maneira não invasiva, portanto é comprovado na literatura em modelos experimentais a FBM traz resultados benéficos na redução da resposta inflamatória, em específico na inflamação intestinal induzida ^{9, 41}.

Estudos mostram que a FBM com LED em baixa intensidade atua sobre as células interferindo na sua permeabilidade, atuando nas mitocôndrias, na síntese de ATP e em proteínas como colágeno e elastina. Atuando ainda como antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante ⁵⁵.

Em 2011, um estudo que analisou a relação bidirecional entre intestino e o pulmão, por meio da modulação intestinal com repercussão de inflamação pulmonar,

concluiu que a terapia laser de baixa potência pode proporcionar a modulação de mediadores inflamatórios, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Estudos adicionais são necessários para avaliar esse tema com uso da FBM ⁴¹.

Considerando que as DIIs são de difícil tratamento, novas abordagens terapêuticas são necessárias. Nesse sentido, vários estudos recentemente investigaram o tratamento com FBM em doenças inflamatórias intestinais, no quadro 1 abaixo, verifica-se estes estudos.

Quadro 1. O tratamento com fotobiomodulação em doenças inflamatórias intestinais. São Paulo.2023.

Autor Ano	Titulo	Objetivo / Principais Resultados
<i>Lima FM et al/2011</i> ⁴¹	Dual Effect of low-level laser therapy on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines.	- Método experimental: Machos Wistar. -A inflamação pulmonar aguda induzida por isquemia e reperfusão intestinal é um modelo experimental, concluiu que a FBM (660 nm) reduziu o edema, o influxo de neutrófilos, a atividade de MPO pulmonar. -E a FBM aumentou a IL-10 e reduziu o nível de TNF-γ no pulmão de animais submetidos a isquemia e reperfusão.
<i>Paula-Silva et al/2018</i> ⁹	Red light-emitting diode treatment improves tissue recovery in DSS-induced colitis in mice	- Método experimental: Machos Wistar. -O tratamento com FBM (660 nm) em um modelo experimental de colite, protegeu a estrutura celular do cólon, diminuindo a frequência de displasia/edema e reduziu os infiltrados inflamatórios e ulcerações da mucosa intestinal. - Demonstrando ações protetoras na barreira epitelial por meio de uma terapêutica não-invasiva e de baixo custo.
<i>Liebert et al/2019</i> ⁵⁶	“Photobiomimics”: Can Light, Including Photobiomodulation, Alter the Microbiome?	- Método: Revisão bibliográfica sobre o efeito da luz no microbioma. -Investigaram a FBM em um modelo de camundongo e demonstraram que os comprimentos de onda vermelho (660 nm) e infravermelho (808 nm), podem alterar a diversidade da microbiota em camundongos saudáveis. - Observou-se o aumento do número de <i>Allobaculum</i>, uma bactéria associada a um microbioma saudável.
<i>Alves LC, Jorge P, Santos A/2022</i> ⁵⁷	The effect of photobiomodulation therapy on the management of chronic idiopathic large-bowel diarrhea in dogs	- Método experimental: 30 cachorros. - FBM: 808/980 Nm. -Avaliar a eficácia da terapia de FBM no tratamento da diarreia crônica idiopática do intestino grosso, escores de fezes de Bristol e diarreia a partir de diferentes parâmetros clínicos. - O estudo demonstrou a melhora em todos os escores e sinais clínicos, aumento do peso corporal nos animais. -E observou-se o aumento do tempo de aparecimento de um segundo episódio de diarreia.
<i>Laakso E L, Ewais T/2023</i> ⁵⁸	A Holistic Perspective on How Photobiomodulation May Influence Fatigue, Pain, and Depression in Inflammatory Bowel Disease: Beyond Molecular Mechanisms	-Os autores estão conduzindo um estudo clínico em andamento (adultos), analisando a FBM no eixo- intestino-cerebro. -A hipótese é que a FBM da microbiota intestinal pode ser benéfica nos principais sinais e sintomas das DII como: a fadiga, dor e depressão.
<i>Ewais T, Begun J,</i>	Protocol for a Single-Arm Feasibility Study of Photobiomodulation for	-Método: 28 adultos (18-35 anos) com DII. - FBM + Tratamento Convencional -FBM: 904 Nm.

<i>Laakso EL/2023</i> ⁵⁹	Fatigue, Depression, and Pain in Inflammatory Bowel Disease	-Avaliar a FBM em pacientes com DII que apresentam altos níveis de fadiga, depressão, dor e qualidade de vida significativamente prejudicada. -Os benefícios potenciais do PBM podem ser particularmente relevantes em jovens-adultos com DII, pois afeta a sua escolaridade, o envolvimento profissional, a interação social, sendo um tratamento com prognóstico de longo prazo.
--	--	--

2 JUSTIFICATIVA

Considerando as doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas, multifatoriais, com importante impacto na qualidade de vida e cujos tratamentos são paliativos, faz-se necessário a busca por novas terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Além disso, é importante considerar que existe um complexo sistema de comunicação bidirecional existente entre as vias intestinal e pulmonar na sustentação da homeostase local e sistêmica e compreender os mecanismos envolvidos na regulação do intestino e pulmão, principalmente na presença de doenças assim como a resposta do organismo mediante tratamentos.

3 OBJETIVOS

Avaliar o papel da FBM na modulação da inflamação intestinal, bem como sua repercussão sobre a homeostasia pulmonar. Para tanto, investigou-se:

Parâmetros clínicos, como:

- Consistência das fezes e presença de sangue nas fezes
- **No intestino:**
- Inflamação por meio da liberação e expressão gênica de citocinas Pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, atividade da mieloperoxidase e determinação de alterações morfofuncionais por histologia.

No pulmão:

- Migração de células para o lavado broncoalveolar
- Liberação e expressão gênica de citocinas Pró-inflamatórias e anti-inflamatórias
- Alterações morfofuncionais por histologia

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e aprovado sob número CEUA nº 7297020821 (ID 000269).

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), com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, sendo aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 21/09/2021.

4.1 Animais

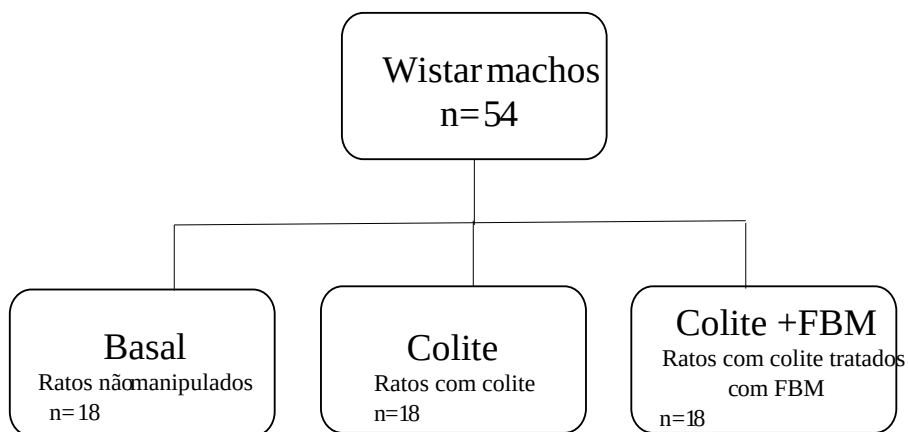
Foram utilizados 54 (cinquenta e quatro) ratos Wistar machos adultos, com aproximadamente entre 60-100 dias de vida, (~200 g), provenientes do Biotério de criação da Universidade Nove de Julho, e os animais foram mantidos em condições controladas com ciclo claro-escuro de 12 horas, condições controladas de umidade (50%-60%) e sala com temperatura controlada (22°C - 25°C), com livre acesso a ração e água, e mantidos em experimentação na mesma Universidade.

4.2 Grupos experimentais

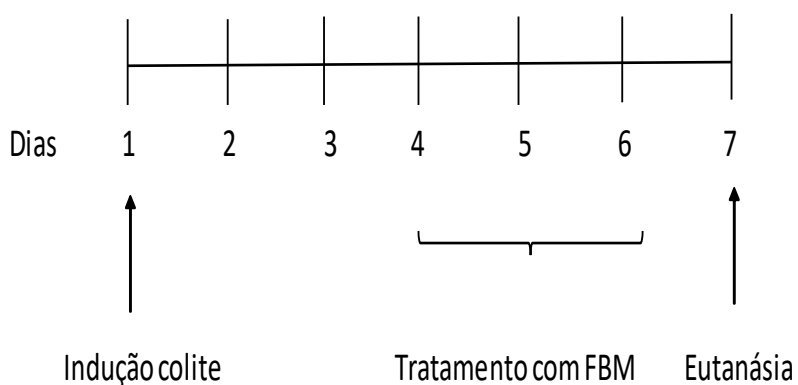
Os ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

- **Grupo Basal:** ratos controle, não manipulados (n=18)
- **Grupo Colite:** ratos com indução para colite (n = 18)
- **Grupo Colite+FBM:** ratos com indução para colite tratados com FBM (n = 18)

Os experimentos foram realizados duas vezes.



4.3 Delineamento experimental



4.4 Indução da inflamação intestinal

A colite experimental foi induzida com ácido acético a 10% de acordo com Owusu et al.⁶⁰, modificada pelo grupo de estudo. Para tanto, os animais foram contidos e uma sonda inserida (~6 cm) no reto de cada rato e em seguida injetado gradualmente 1 ml de solução de ácido acético a 10% por via retal. Antes da retirada da sonda, a mesma foi drenada com 1 ml de ar para assegurar a distribuição do ácido por meio do cólon, seguida de sua remoção suavemente para evitar qualquer sofrimento físico. As análises foram realizadas no dia 7 de acordo com o estudo descrito anteriormente⁶⁰.

4.4 Tratamento com fotobiomodulação

Utilizamos o equipamento BioLambda LEDstar- BlackBox Mini, São Paulo, Brasil para tratar os animais. Para tanto, 48 horas após a indução da colite os ratos foram tratados por três dias consecutivos com LED vermelho em três pontos, sendo um do lado direito e outro do esquerdo da superfície ventral e um na região anal externa. O grupo controle foi tratado da mesma forma que os animais tratados com LED, mas com o dispositivo emissor de LED desligado para padronizar o estresse de exposição entre os grupos. Os parâmetros de irradiação de LED foram utilizados de acordo com estudo anterior realizado por Paula- Silva et al.⁹ e encontram-se descritos no quadro 2.

Quadro 2: Parâmetros dosimétricos da fotobiomodulação

Potência	100 mW
Área do Feixe	2,8 J/cm ²
Modo	Contínuo (CW)
Comprimento de onda	660 ± 10 nm
Energia	15 J
Exposição radiante	5,35 J/cm ²
irradiância	33,3 mW/cm ²
Tempo de exposição por ponto	150 s
Número de pontos de irradiação	3
Número de Tratamentos	3 dias consecutivos/ 1 vez ao dia



Fonte: <https://loja.biolambda.com/black-box-smart>

Figura 6: Aparelho BioLambda LEDstar- BlackBox Min

4.6 Pontuação do Índice de Atividade da Doença (DAI)

A pontuação do índice de atividade da doença (DAI) foi avaliada, por meio do registro das características das fezes dos animais nos grupos: Colite e Colite+ FBM, após 5 dias de indução da DII, e os parâmetros avaliados seguem abaixo, no quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros para avaliação das características das fezes dos grupos indução colite.

Pontuação	Consistência das fezes	Sangue das fezes
0	Normal	Negativo
1	Cor marrom avermelhada úmida e pegajosa	
2	Sangue macio	Visível
3	Diarréia	Sangramento retal

4.7 Eutanásia e a determinação da atividade da mieloperoxidase intestinal e pulmonar

Após 48h de indução no grupo Colite e após os três dias consecutivos de tratamento com fotobiomodulação, no grupo Colite + FBM, e ainda, no grupo Basal, foi realizada a eutanásia para coleta dos materiais.

A atividade da Mieloperoxidase (MPO) foi quantificada para determinar a inflamação intestinal e também pulmonar, uma vez que esta enzima é considerada um

biomarcador da presença de neutrófilos nos tecidos. A atividade da MPO foi analisada por sua capacidade de catalisar a oxidação da o-dianisidina na presença de peróxido de hidrogênio.

Os ratos foram sacrificados por secção da aorta abdominal sob anestesia profunda com cetamina (100 mg/kg, Dopalen®) e xilazina (20 mg/kg, Xilazin®) por injeção intraperitoneal. Fragmentos teciduais do intestino (cólon medial e terminal) e do pulmão, foram removidos.

4.8 Contagem de células totais e diferenciais presentes no lavado broncoalveolar

No dia 7, na eutanásia conforme descrito acima, as células presentes no espaço broncoalveolar foram obtidas pela técnica de lavado broncoalveolar (LBA) de acordo com Lima et al ⁶¹. A contagem de células totais foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica.

4.9 Quantificação de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar e no homogenato intestinal

O tecido intestinal removido foi padronizado em torno de 1 cm e pesado. A seguir foi adicionado tampão para homogeneizar os tecidos em um cadinho com auxílio de um pistilo. Após homogeneização, o conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante recolhido para quantificação das citocinas (homogenato intestinal).

Os níveis de citocinas foram determinados em amostras de sobrenadante do LBA e no sobrenadante de homogenato intestinal. Os resultados foram expressos como pg de

citocina produzida por ml. IL-1beta, TNF-alfa, IL-6, IL-10, e IFN-gama foram quantificadas utilizando kits de ELISA adquiridos da BioLegend (San Diego, EUA). As determinações foram feitas em duplicata para cada amostra, utilizando curvas padrão de acordo com as especificações do fabricante.

4.10 Determinação da expressão gênica de citocinas no tecido pulmonar e intestinal

As amostras de fragmentos de pulmão e intestino foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido. A expressão gênica das citocinas foi determinada por ensaio de RT-PCR. 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. Os cDNAs de primeira cadeia foram sintetizados utilizando a transcriptase reversa MML-V (Promega, Madison, WI). A RT-PCR foi realizada usando o ensaio de PCR em tempo real Taqman (Applied Biosystem, EUA) para as seguintes moléculas:

IL-4 (Rn00561420_m1), IL-6 (Rn01410330_m1), IL-10 (Rn01644839_m1), TNF- α (Rn00562055_m1), IL-1 β (Rn00580432_m1), IFN-gama (Rn00594078_m1) e HPRT (Rn00446968_m1). As condições de ciclagem foram as seguintes: 10 min a 95 °C seguido de 45 ciclos de 20 s cada a 95 °C, 20 s a 58 °C e 20 s a 72 °C.

4.11 Análises histológicas no pulmão e intestino

Após a eutanásia por secção da aorta abdominal sob anestesia profunda como mencionado acima, o intestino e o pulmão foram removidos. As amostras foram imersas em solução de paraformaldeído tamponado a 4% e transportadas para o laboratório de histologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB). As amostras

conservadas no fixador por 24 h foram desidratadas em soluções com concentração crescente de etanol, clarificadas em xilol e embebidas em parafina. Em seguida, as amostras de parafina foram seccionadas (3 μm), utilizando o micrótomo RM2125RT (Leica, EUA). Os cortes foram colocados em lâminas histológicas e, após desparafinização e reidratação, corados com hematoxilina-eosina para análise histopatológica e azul de toluidina para análise de mastócitos. As lâminas foram analisadas usando o microscópio AxioScope A1 (Carl Zeiss, GR) e analisadas usando o Software Zen (Carl Zeiss, GR). As análises histopatológicas foram realizadas pela pontuação abaixo:

- Equivalente a nenhum dano;
- Lesão focal da mucosa;
- Lesão da mucosa e foco de infiltrado leucocitário;
- Lesão grave da mucosa e foco de infiltrado leucocitário;
- Destruição da estrutura da mucosa e intenso infiltrado leucocitário.

Para a desgranulação dos mastócitos, foram consideradas as seguintes classificações de pontuação:

- 0% mastócitos íntegros;
- 100% desgranulação intensa de mastócitos com liberação de grânulos citoplasmáticos na matriz extracelular.

4.12 Análise estatística

Os dados das amostras foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste Student Newman-Keuls para comparação de todos pares de colunas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Prism Software V5. Os resultados descritos apresentaram média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore DAI e a atividade do MPO

Na figura 7 observa-se a deflagração da inflamação intestinal (Painéis A e B) e ilustrou-se também que o tratamento com a FBM reduziu significativamente tanto o escore DAI quanto a atividade da MPO no grupo Colite + FBM quando comparados ao grupo Colite. Também observamos a elevação do escore DAI e atividade da MPO no grupo Colite e Colite + FBM, quando comparados ao grupo basal.

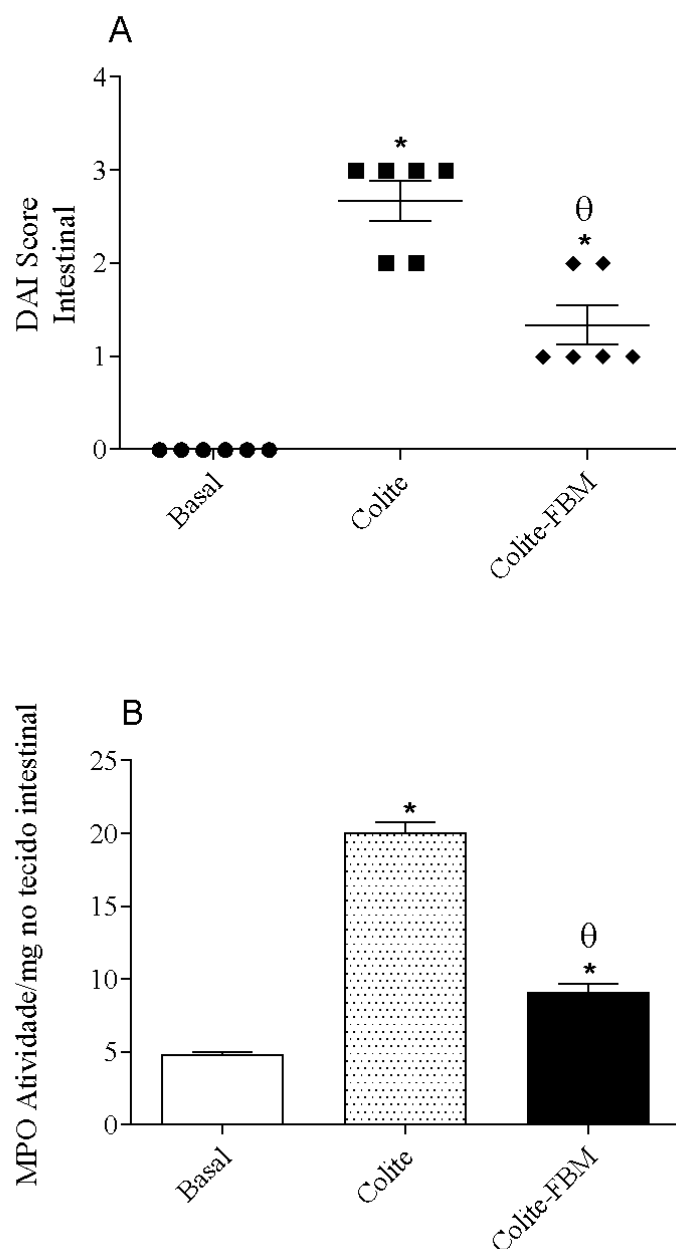


Figura 7. O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore DAI e a atividade de MPO. Grupo de ratos foram submetidos à indução de DII e tratados ou não com FBM. No dia 7 a inflamação intestinal foi avaliada. Os dados representam a média $\pm$ SEM de 6 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo B; θ P < 0,05 em relação ao grupo Colite (one-way ANOVA).

5.2 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histopatológico do tecido intestinal

A Figura 8 (Painéis B e D) ilustra que após a indução de DII observou-se a migração de células inflamatórias para mucosa e submucosa intestinal de forma semelhante quando comparada ao grupo basal (Painéis A e D). Por outro lado, após o tratamento com FBM, observou-se a redução da migração de células inflamatórias para a mucosa e submucosa quando comparados aos grupos não tratados (Painéis C e D).

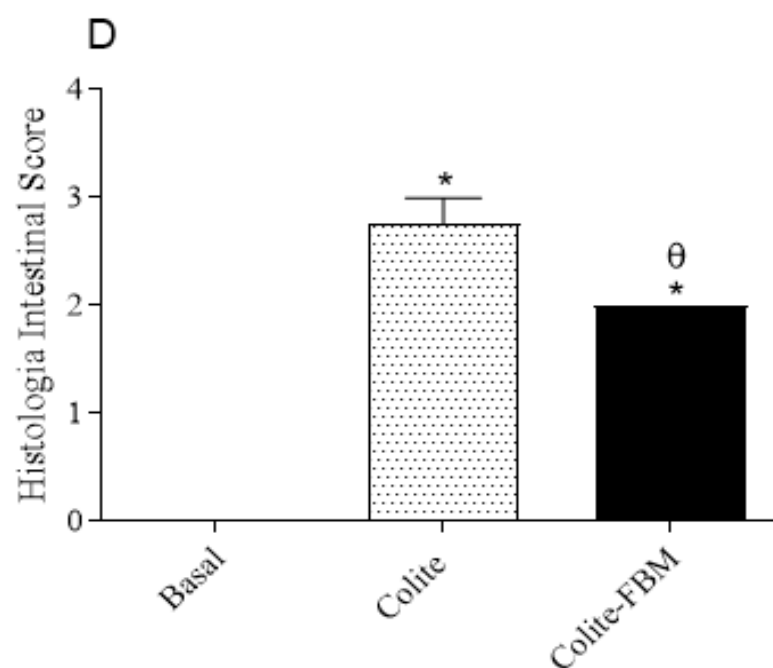
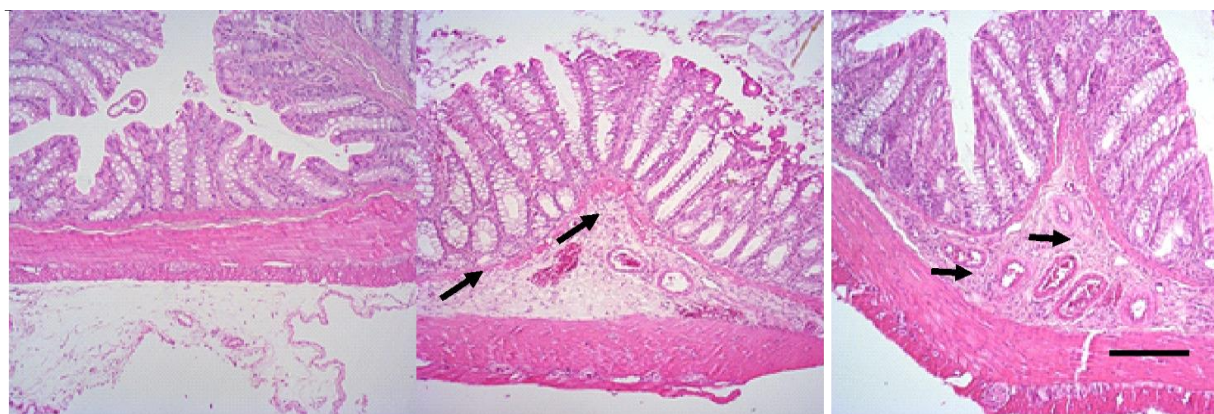


Figura 8. O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histológico do intestino. Grupo de ratos foram submetidos à indução de DII e tratados ou não com FBM. No dia 7 a histologia intestinal foi avaliada. Os dados representam a média $\pm$ SEM de 6 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo B; ^θ $P < 0,05$ em relação ao grupo Colite (one-way ANOVA).

5.3 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histopatológico do pulmão

A Figura 9 (Painéis B e D) evidencia que após a indução da DII observou-se a intensa migração de leucócitos para o pulmão, em particular a migração eosinófila quando comparada ao grupo basal (Painéis A e D). Por outro lado, o tratamento com FBM reduziu a migração de células inflamatórias para o pulmão, quando comparado aos grupos não tratados (Painéis C e D).

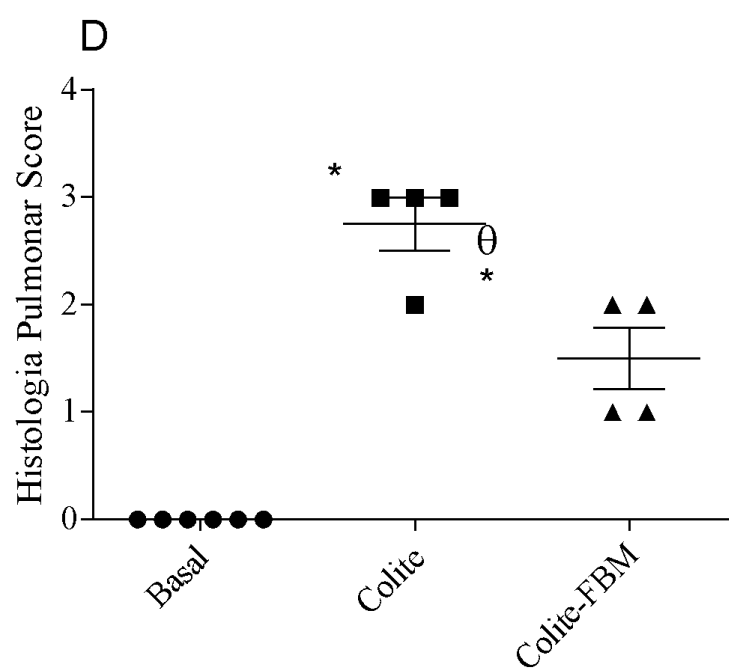
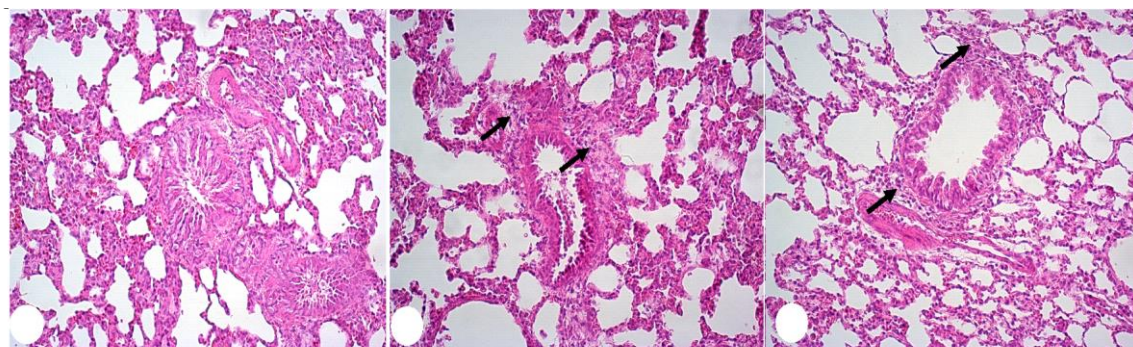


Figura 9. O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu o escore histopatológico do pulmão. Grupo de ratos foram submetidos à indução de DII e tratados ou não com FBM. No dia 7 a histologia pulmonar foi avaliada. Os dados representam a média ± SEM de 6 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo B; ^θP < 0,05 em relação ao grupo Colite (one-way ANOVA).

5.4 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase pulmonar

A Figura 10 mostrou que o tratamento com FBM reduziu significativamente a atividade pulmonar da MPO nos grupos Colite+FBM quando comparado ao grupo Colite. Também observou-se a atividade pulmonar elevada da MPO no grupo Colite e Colite + FBM quando comparado ao grupo basal.

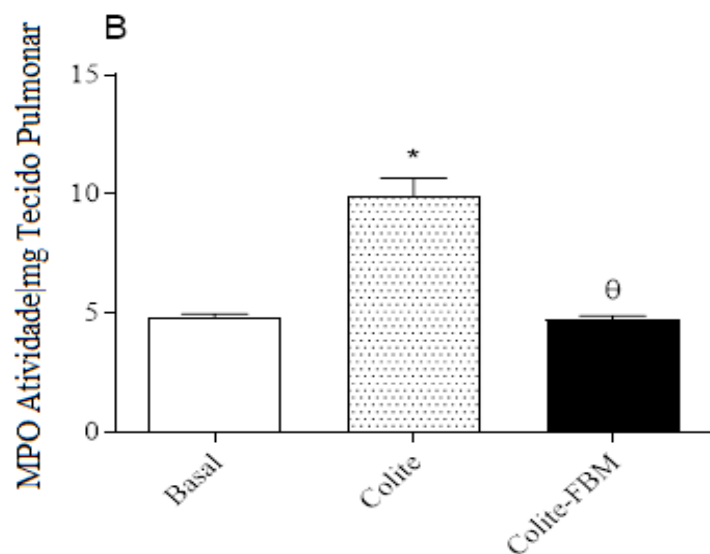


Figura 10. O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu a atividade de MPO pulmonar. Grupo de ratos foram submetidos à indução de DII e tratados ou não com FBM. No dia 7 a MPO foi avaliada. Os dados representam a média $\pm$ SEM de 6 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo B; ^θP < 0,05 em relação ao grupo Colite (one-way ANOVA).

5.5 O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu a desgranulação de mastócitos pulmonares

A Figura 11 evidencia os mastócitos intactos em grupos basais (Painéis A e D). Também ilustra que o grupo Colite induziu a ativação de mastócitos pulmonares com grânulos de extrusão quando comparados aos grupos basais (Painéis B e D). Por outro lado, o grupo Colite+FBM apresentou redução da desgranulação dos mastócitos pulmonares quando comparado aos grupos não tratados (Painéis C e D).

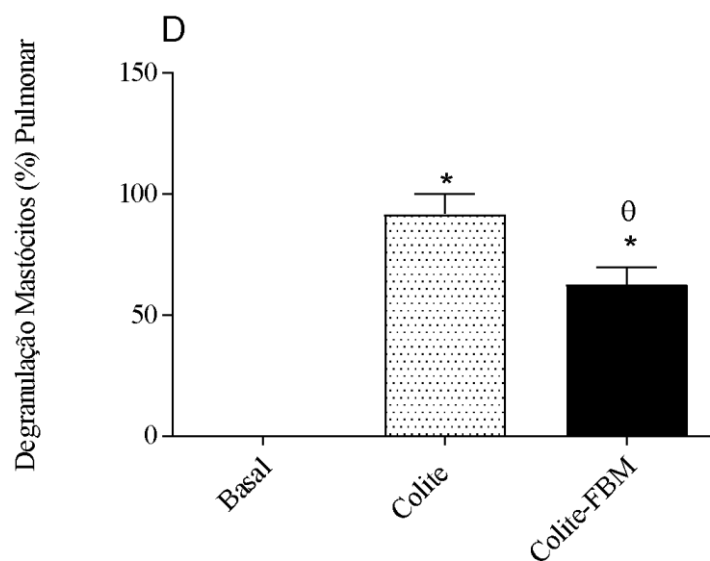
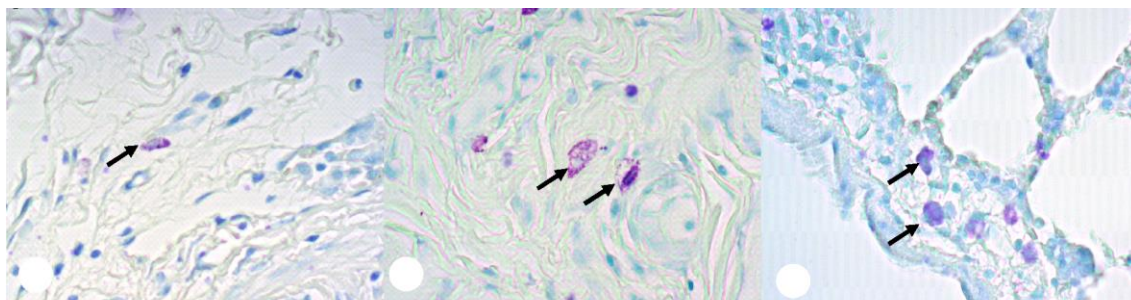


Figura 11. O tratamento da DII com fotobiomodulação reduziu a desgranulação dos mastócitos nos pulmões. Grupo de ratos foram submetidos à indução de DII e tratados ou não com FBM. No dia 7 a desgranulação mastocitária foi avaliada. Os dados representam a média $\pm$ SEM de 6 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo B; ^θ $P < 0,05$ em relação ao grupo Colite (one-way ANOVA).

5.6 O tratamento da DII com fotobiomodulação modulou IL-4, IL-6, IL-1 β , IFN- γ TNF- α e IL-10 no tecido pulmonar

A Figura 12 (Painéis A e F) ilustra que não foram observadas diferenças nos níveis de IL-4 e IFN- γ entre os grupos do estudo.

Por outro lado, identificou-se níveis elevados de IL-6, IL-1 β e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias) no tecido pulmonar nos grupos das DII quando comparados ao grupo basal (Painéis B, C e D), e o tratamento com FBM reverteu essa elevação.

Verificam-se níveis reduzidos de IL-10 (citocina anti-inflamatória) observados no tecido pulmonar do grupo DII quando comparado ao grupo basal (Painel E). Além disso, o tratamento com FBM reverteu essa redução.

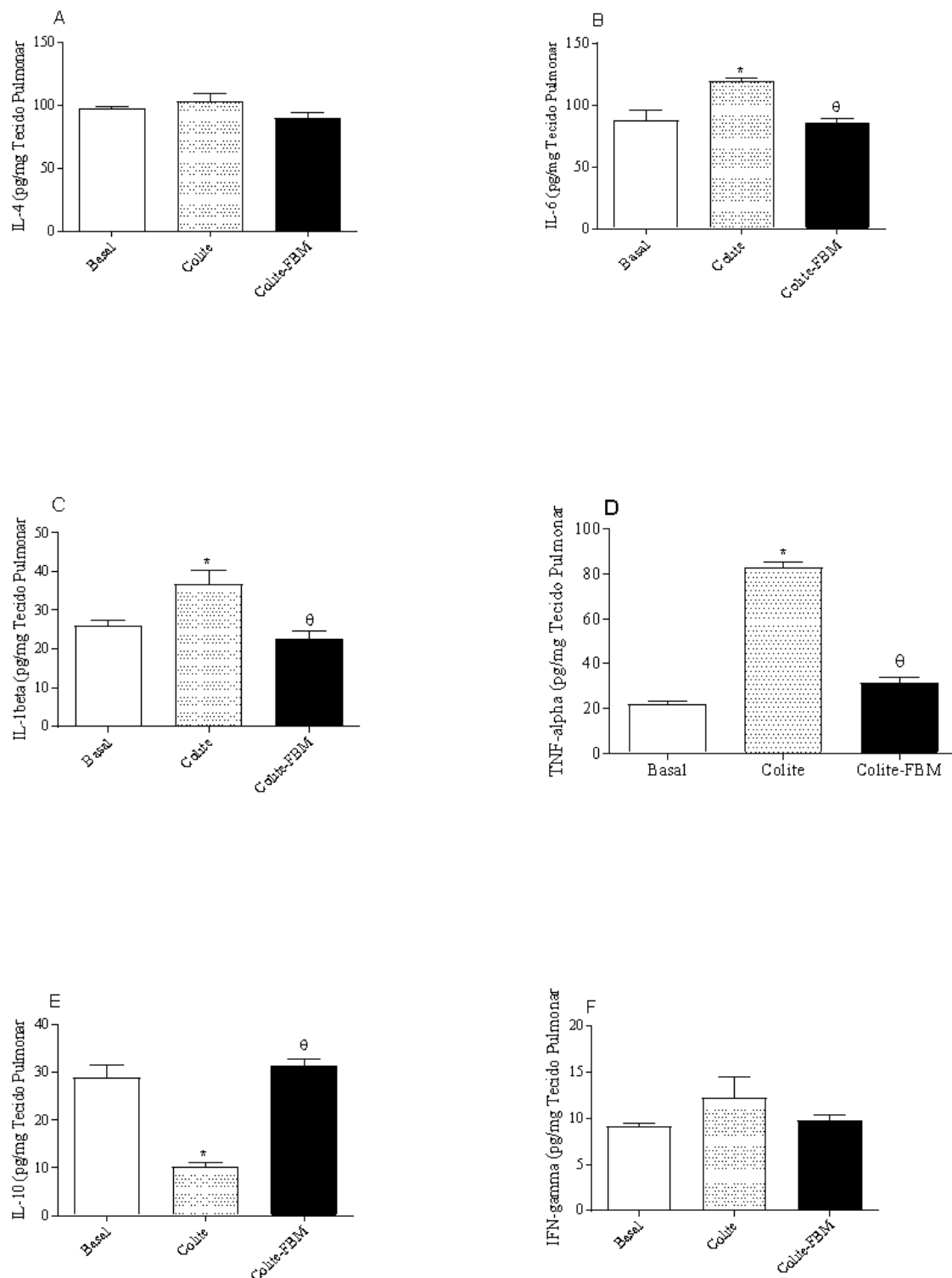


Figura 12. O tratamento da DII com fotobiomodulação modula IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 no tecido pulmonar. Grupo de ratos submetidos à indução de DII e tratados ou não com PBM. No dia 7 as citocinas foram avaliadas. Os dados representam a média $\pm$ SEM de 6 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo B; θ P < 0,05 em comparação com o grupo DII (one-way ANOVA).

5.7 O tratamento da DII com fotobiomodulação modulou a expressão gênica de IL-4, IL-6, IL-1 β e IFN- γ , TNF-A e IL-10 no tecido pulmonar

A Figura 13 (Painéis A, C e F) evidenciou que não foram observadas diferenças na expressão gênica de IL-4, IL-1 β e IFN- γ entre os grupos do estudo.

Por outro lado, identificou-se a expressão gênica elevada de IL-6 e *TNF- α* (citocinas pró-inflamatórias) no tecido pulmonar dos grupos das DII quando comparados ao grupo basal e o tratamento com FBM reverteu esta elevação (Painéis B e D).

Observou-se a redução da expressão gênica de IL-10 observada no tecido pulmonar do grupo Colite quando comparado ao grupo basal, enquanto o tratamento com FBM reverteu essa redução (Painéis E).

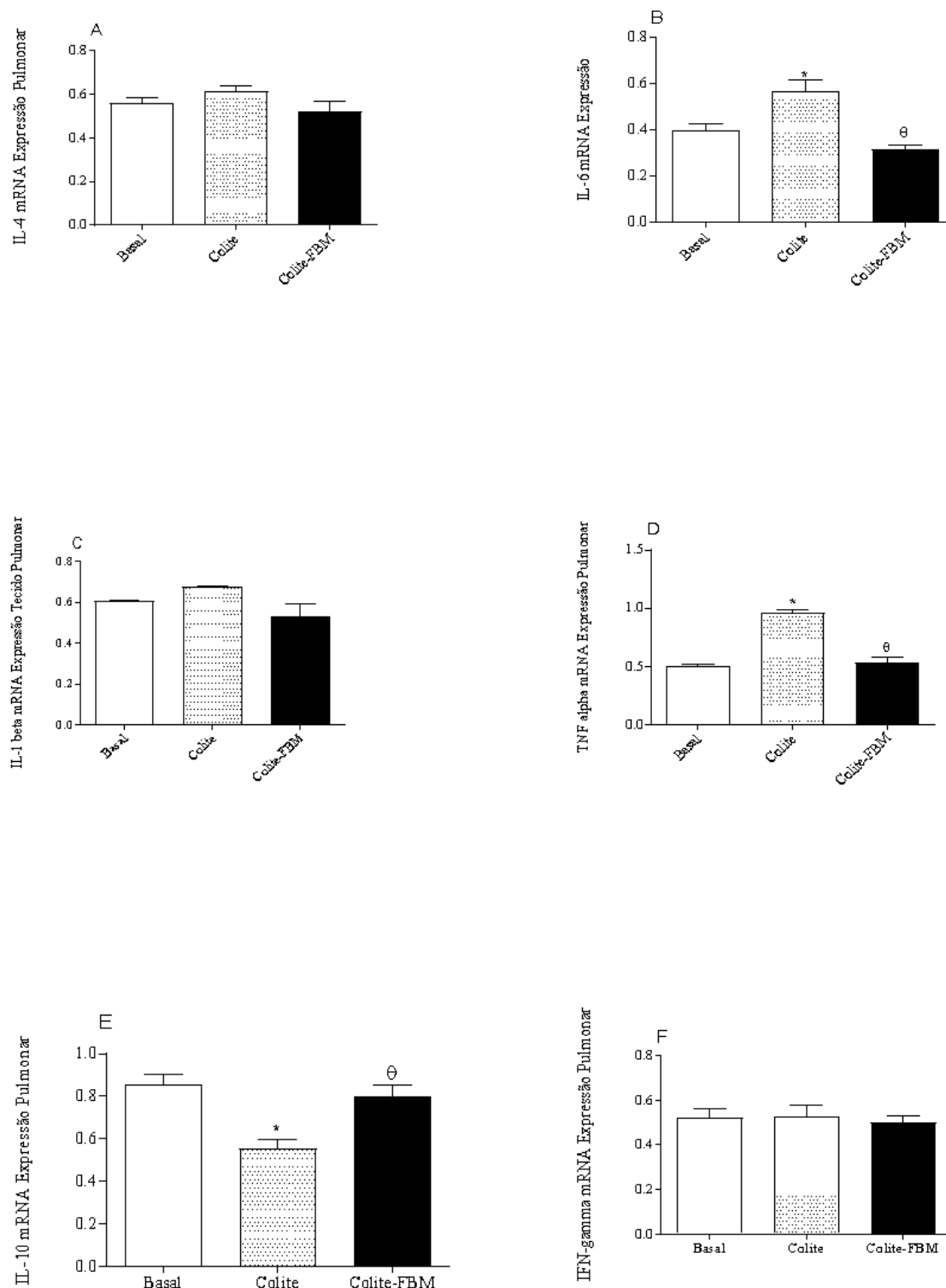


Figura 13. O tratamento da DII com fotobiomodulação modula a expressão gênica de IL-6, TNF- α e IL-10 no tecido pulmonar. Grupo de ratos submetidos à indução de DII e tratados ou não com PBM. No dia 7, a atividade da MPO pulmonar foi avaliada. Os dados representam a média $\pm$ SEM de 6 animais. *P < 0,05 em relação ao grupo B; ^θP < 0,05 em comparação com o grupo DII (one-way ANOVA).

6 DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que existe uma complexa comunicação bidirecional entre intestino e pulmão e é relevante a compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação destes dois órgãos, especialmente na presença de doenças intestinais. Neste estudo, avaliou-se a repercussão da doença intestinal, bem como seu tratamento com a FBM na homeostase pulmonar. Para isso, utilizou-se um modelo experimental para induzir a DII por meio da administração de ácido acético a 10% no intestino. Este modelo reproduz a fisiopatologia da DII pela indução de citocinas inflamatórias como IL-1beta, IL-4, IL-6, TNF-alfa e IFN-gama, dilatação e espessamento das paredes do cólon, aumento do infiltrado inflamatório e redução produção de muco ^{62,63}.

Mostramos que a DII alterou a homeostase pulmonar e o tratamento com a FBM reduziu os biomarcadores da doença e reverteu todos os parâmetros aumentados no pulmão, restaurando assim sua homeostase.

Primeiro, identificou-se importantes biomarcadores da DII para confirmar o desenvolvimento da doença, como a elevação do DAI score por meio da avaliação da presença das fezes com diarreia e sangramento retal, bem como as alterações histopatológicas, como a migração celular para o intestino. Outro parâmetro estudado foi a atividade da MPO, um biomarcador indireto da presença de neutrófilos no tecido ⁶⁴. Nossos dados mostraram que o ácido acético induziu uma elevada migração de neutrófilos. Assim, os sintomas e sinais da DII foram desencadeados. De fato, leucócitos como os neutrófilos, linfócitos e monócitos desempenham um papel importante na lesão tecidual do intestino ¹⁴.

As citocinas produzidas localmente, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , contribuem para o recrutamento de células inflamatórias e perpetuam a inflamação crônica ^{15, 64}. Por outro

lado, as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, são liberadas para equilibrar o processo inflamatório ¹⁵.

Sequencialmente avaliou-se as repercussões pulmonares da DII. Mostrou-se que a DII alterou a homeostase pulmonar. Observamos elevada migração de células para o pulmão, atividade de MPO, desgranulação de mastócitos e liberação de citocinas. Estudos têm mostrado o importante papel do **cross-talk** (conexão cruzada) entre a microbiota intestinal e as células pulmonares. Endotoxinas e metabólitos microbianos podem afetar o pulmão por meio da corrente sanguínea ³¹. Outra via importante que liga o intestino e o pulmão é o sistema linfático ¹.

Estudos comprovaram que a mucosa intestinal durante a isquemia e reperfusão causam graves alterações hemodinâmicas, inflamação sistêmica, aumento da permeabilidade vascular, ativação de células endoteliais e desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Como consequência, os mediadores inflamatórios são transportados pelo sistema linfático até os pulmões ^{27, 41}. Assim, o pulmão tem sua microbiota diretamente relacionada com a microbiota intestinal por meio da comunicação bidirecional transportando metabólitos microbianos e toxinas geradas por microrganismos intestinais por meio da circulação e do sistema linfático.

Verificamos que a DII alterava a homeostase pulmonar, o próximo passo foi tratar a doença com FBM e avaliar suas repercussões no pulmão. Nossos dados comprovaram que o tratamento com FBM melhorou a DII induzida por ácido acético, uma vez que o escore DAI, as alterações histopatológicas, bem como a atividade da MPO, foram reduzidas. Esses dados estão de acordo com estudos recentes do nosso grupo, mostrando que o tratamento com FBM promoveu proteção estrutural e modulou a resposta inflamatória em um modelo experimental de colite ulcerativa ⁹.

Também verificou-se os efeitos benéficos do tratamento com FBM no pulmão. Os dados constatarem a redução da migração de leucócitos pulmonares, a atividade da MPO, desgranulação de mastócitos e liberação de citocinas. A regulação negativa das respostas inflamatórias causadas pela FBM é uma estratégia importante para proteger a barreira epitelial, pois o acúmulo de células inflamatórias e mediadores no local do tecido lesionado, não só prolonga a lesão tecidual, como também altera órgãos distantes, como o pulmão.

A regulação de mediadores inflamatórios são características da homeostase pulmonar. Neste estudo, verificou níveis reduzidos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no pulmão, enquanto a concentração de IL10 aumentou após o tratamento com a FBM. Esses dados provam que a FBM exerceu seus efeitos no sentido de restabelecer a homeostase, aumentando os mecanismos de defesa pela elevação de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória que regula o influxo celular; e reduzindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, citocinas pró-inflamatórias que induzem a migração de leucócitos, edema e hiperresponsividade das vias aéreas ^{66, 67}.

Em estudos anteriores avaliou-se a translocação local de um evento inflamatório na mucosa oral para um desfecho sistêmico, demonstrando o percorrer dos mediadores inflamatórios, de acordo com Van Velzen, citado por Brunet ⁶⁸, existem três possíveis mecanismos, sendo : (1) Disseminação metastática devido à translocação de microrganismos, (2) Lesão metastática devido à circulação de toxinas de microrganismos e (3) Inflamação metastática devido à lesão imunológica induzida por microrganismos, resultando em inflamação cruzada, conforme Van Velzen et al ⁶⁹. Resumidamente, a principal via de transmissão ocorre pela disbiose intestinal, as quais apresentam microrganismos considerados patógenos intestinais potenciais para causar inflamações intestinais.

Em estudos que avaliaram os distúrbios respiratórios graves, como Covid 19^{51, 53,}
⁵⁴ entre outros limitantes na hematose^{25, 55}, podemos considerar que a avaliação das condições da microbiota intestinal em pacientes hospitalizados é uma prática deficiente e que corrobora para o aumento da quantidade de distúrbios gastrointestinais como constipação e fezes líquidas intermitentes por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos aumentando o tempo de internação. A proposta do nosso estudo é que em um protocolo clínico os profissionais entendam a importância do eixo intestino- pulmão e regularizem tanto a microbiota intestinal em alterações benéficas do parênquima pulmonar, como atente-se a alterações do quadro pulmonar em pacientes que apresentam DII.

Novos estudos que investiguem o papel da FBM nas DII e a comprovada ligação com eixo pulmonar, são importantes para identificar novas abordagem em relação a translacional da pesquisa básica para a clínica, como : dosimetria na clínica, como trabalho recente em andamento de Ewais T et al⁵⁹ que avalia o eixo intestino- cérebro com o uso 904 nm em adultos de 18 a 35 anos, sendo aplicados em diversos pontos abdominais.

Em relação ao espessamento do tecido abdominal, para novas abordagens futuras na clínica, os locais de aplicação em pacientes obesos, devido ao tecido adiposo, poderão ser beneficiados, segundo algumas evidencias, como Libert et al⁵⁶ que apontam a utilização da aplicação da acupuntura por laser em pontos específicos que podem ser benéficos na microbiota intestinal.

A FBM como um tratamento coadjuvante nas DII mostrou-se eficaz na repercussão da hemostasia pulmonar, demonstrando a conexão dos mediadores inflamatórios da microbiota intestinal como uma conexão sistêmica, sendo importante em estudos posteriores descrever essas alterações.

7 CONCLUSÃO

Confirmou-se que o tratamento com a FBM após a indução de DII reduziu os biomarcadores da doença e reverteu todos os parâmetros aumentados no pulmão, restaurando assim sua homeostase. Assim, verificou-se experimentalmente o importante eixo intestino-pulmão e os mecanismos pelos quais a microbiota intestinal influencia na resposta imune pulmonar. E o papel da FBM, demonstrando que a luz de baixa intensidade (660 nm) poderá ser utilizada como um tratamento coadjuvante. A FBM demonstrou ser um tratamento promissor, podendo ser utilizada com uma terapêutica não farmacológica coadjuvante no intuito de estabelecer estratégias de caráter não invasivo trazendo benefícios a estes pacientes. Novos estudos que investiguem o papel da FBM nas DII, mediante a comprovação da ligação do eixo intestino- pulmão são importantes para identificar novas abordagens, como a translacional, beneficiando evidências da pesquisa básica para protocolos clínicos

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tontini GE et al. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World J. Gastroenterol.* 2015 , 21, 21–46.
2. Ni J, Wu, GD; Albenberg, L .; Tomov, VT Gut microbiota and IBD: Causation or Correlation? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017 , 14, 573–584.
3. Neurath MF, Citocinas na doença inflamatória do intestino, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (5).2014 , 329-342.
4. Cai Z, Wang S, Li J. Treatment of Inflammatory Bowel Disease: A Comprehensive Review. *Front Med (Lausanne).* 2021 Dec 20;8:765474.
5. Kaplan GG. A carga global do IBD: de 2015 a 2025. *Nat Ver Gastroenterol Hepatol* . 2015; 12 (12): 720–727.
6. Souza AMD, Resende SS, Sousa TND, Brito CFAD. Uma sistemática revisão do escopo da ancestralidade genética da população brasileira. *Genet Mol Biol* . 2019; 42 (3): 495–508.
7. Gomes, T et al. Clinical and Demographic Profile of Inflammatory Bowel Disease Patients in a Reference Center of São Paulo, Brazil. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2021, 14, 91 - 102.
8. Quaresma AB et al. Temporal Trends in the epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases in the public healthcare system in Brazil: A large population-based study. DOP 41, ECCO congress, 2021.
9. Paula-Silva et al. Red light-emitting diode treatment improves tissue recovery in DSS-induced colitis in mice. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* 2018 (11) 212.
10. Bitton A et al. Epidemiologia da Doença Inflamatória Intestinal em Québec. *Inflamm Bowel Dis.* 2014; 20 (10): 1770–1776.
11. Johansson ME et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2014; (63) 281–291.
12. Kostic, A. D., Xavier, R. J. & Gevers, D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology.* 2014. 146, 1489–1499.

13. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology*, 2013 (9) 181-218.
14. Etienne R., Viegas FPD, Viegas Jr C. Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação e o Planejamento de Fármacos: uma Visão Geral Atualizada. *Rev. Virtual Quim.*, 2021.
15. Vázquez-Frias R et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine profile in pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Rev Gastroenterol Mex.* 2015;80(1):6-12.
16. Fox SI. *Fisiologia Humana*. Editora Manole. 7ª edição. 2007.
17. Gartner LP. *Atlas Colorido de Histologia*, 7ª edição. Grupo GEN. 2018.
18. Ahmad et al. Effect to flow-level laser therapy in patients with chronic knee osteoarthritis: a single-blinded randomized clinical study. *Lasers In Medical Science*. 2013 (29) 2,749-755.
19. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 2012.
20. Santos PPA et al. Relação entre Mastócitos e Células T na Inflamação. *Odontol. Clín.-Cient., Recife*. 2010 (3) 9 215-217.
21. Kwa, M., Plottel, C. S., Blaser, M. J., & Adams, S. The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor–Positive Female Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 2016, 108(8).
22. Chong-Neto HJ et al. A microbiota intestinal e sua interface com o sistema imunológico. *Arq Asma Alerg Imunol.* 2019, 3 (4): 406-420.
23. Samuelson, DR. et al. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. *Front. Microbiol.* 2015 ;6:1085.
24. Paramsothy S et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2017.25;389(10075):1218-1228.
25. Keely S, Talley NJ, Hansbro, PM. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal Immunol.* 2012. 5, 7–18.
26. McAleer JP, Kolls J K. Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *Eur. J. Immunol.* 2018. 48, 39–49.

27. Breithaupt-faloppa et al. Intestinal Lymph-Borne Factors Induce Lung Release of Inflammatory Mediators and Expression of Adhesion Molecules After an Intestinal Ischemic Insult. *Journal of Surgical Research*. 2012,176.
28. Neish AS. Mucosal immunity and the microbiome. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11 (1):28-32.
29. Silveira ACO. Impacto do microbioma na COVID-19 Impact of the microbiome on COVID-19. Comunicação Breve/Short Communication. *RBAC*. 2020;52(2):192-3.
30. Costa NA et al. The pulmonary microbiome: challenges of a new paradigm. *J. bras. pneumol*. 2018; 44(5): 424-432.
31. Zhang D et al. The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases. *Front Microbiol*. 2020.
32. Gu S et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clin Infect*. 2020.
33. Dhar D, Mohanty A. Gut microbiota and Covid-19 - possible link and implications. *Virus Res*. 2020;285:198.
34. Zeuthen LH. et al. *Lactobacillus acidophilus* induces a slow but more sustained chemokine and cytokine response in naïve foetal enterocytes compared to commensal *Escherichia coli*. *BMC Immunology*. 2010;11.
35. Geuking MB. et al. The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes*. 2014; 5(3):411–418.
36. Janeway CA Jr. et al. *The mucosal immune system Immunobiology*. New York: Garland Science. 2001. 10-13.
37. Kenneth Murphy, Paul Travers et al. *Imunobiologia de Janeway – 7.ed. – Porto Alegre : Artmed, 2010*.
38. Santos LA. a microbiota intestinal e sua relação com o sistema imunológico . *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* . 2018, 16.
39. Edgerton C et al. IL-17 producing CD4⁺ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *Clin Immunol* 2009;130:313.
40. Deitch EA, Adams C, Lu Q, et al. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability. *Surgery* 2001; 129:39.

41. Lima FM et al. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers Surg Med*. 2011 Jul;43(5):410-20.
42. Sartor RB. Influências microbianas no intestino inflamatório doenças. *Gastroenterology* 2008; 134: 577 -594.
43. Paixão LA , Castro FFS. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. *Ciências da Saúde, Brasília*. 2016, 14 (1) 85-96.
44. Bernstein CN *et al* The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Extra-intestinal Diseases in IBD. *J Can Assoc Gastroenterol*. 2019, 2(1):73-80.
45. Orlando A et al. Implicações clínicas da cicatrização da mucosa no manejo de pacientes com doença inflamatória intestinal. *Dig Liver Dis* 2013; 45 : 986-991.
46. Annese V et al. Organização Europeia de Crohn e Colite. Europeu consenso baseado em evidências para endoscopia em processos inflamatórios doença intestinal. *J Crohns Colitis* 2013; 7 : 982-1018.
47. Sobrado CV. Manejo da colite ulcerativa aguda grave: atualização terapêutica. *Arq Bras Cir Dig* 2016;29(3):201-205.
48. Enwemeka CS, Bumah VV, Masson-Meyers DS. Light as a potential treatment for pandemic coronavirus infections: A perspective. *J Photochem Photobiol B*. 2020, 207.
49. Oliveira K.T et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química* 2014; 7: 310-335.
50. Chen N et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*;2020, 395 (10223):507–513.
51. Sigman SA, Mokmeli S, Vetrici MA. Adjunct low level laser therapy (LLLT) in a morbidly obese patient with severe COVID-19 pneumonia: A case report .*Can J Respir Ther*. 2020.28;56:52-56.
52. Andrade FSSD et al. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2014; 41(2): 129-133.
53. Gorman S, Weller RB. Investigating the Potential for Ultraviolet Light to Modulate Morbidity and Mortality From COVID-19: A Narrative Review and Update. *Front Cardiovasc Med*. 2020. 7:6.
54. Surazakov A, Klassen A, Gizinger O. The bioenergetics of COVID-19 immunopathology and the therapeutic potential of biophysical radiances. *J Photochem Photobiol B*;2020,213.

55. Cardoso Siqueira VP et al. Light-Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. *J of Biophotonics* 2017, (1) 11.
56. Liebert A et al. "Photobiomics": Can Light, Including Photobiomodulation, Alter the Microbiome?. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019;37(11):681-693. doi:10.1089/photob.2019.4628.
57. Alves JC, Jorge P, Santos A. The effect of photobiomodulation therapy on the management of chronic idiopathic large-bowel diarrhea in dogs. *Lasers Med Sci.* 2022;37(3):2045-2051. doi:10.1007/s10103-021-03469-w.
58. Laakso EL, Ewais T. A Holistic Perspective on How Photobiomodulation May Influence Fatigue, Pain, and Depression in Inflammatory Bowel Disease: Beyond Molecular Mechanisms. *Biomedicines.* 2023;11(5):1497. Published 2023 May 22. doi:10.3390/biomedicines11051497.
59. Ewais T, Begun J, Laakso EL. Protocol for a Single-Arm Feasibility Study of Photobiomodulation for Fatigue, Depression, and Pain in Inflammatory Bowel Disease. *Biomedicines.* 2023;11(8):2179. Published 2023 Aug 2. doi:10.3390/biomedicines11082179.
60. Owusu G et al. Acetic acid-induced ulcerative colitis in sprague dawley rats is suppressed by hydroethanolic extract of cordia vignei leaves through reduced serum levels of tnf- α and il6. *Int J Chronic Dis.* 2020:8785497.
61. 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.
62. Costa SAP et al. The analgesic effect of photobiomodulation therapy (830 nm) on the masticatory muscles: a randomized, double-blind study, *Braz. Oral Res.* 2017, 31: 1–10.
63. Alghadir A, Omar MT, Al-Askar AB, Al-Muteri NK. Effect of low-level laser therapy in patients with chronic knee osteoarthritis: a single-blinded randomized clinical study. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):749-755.
64. Jung C, Hugot JP, Barreau Peyer's Patches F. The Immune Sensors of the Intestine, *Int J Inflam.* 2010 (19).
65. Aleisa AM et al. Pretreatment of *Gymnema sylvestre* revealed the protection against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats, *BMC Complement Altern Med*, 10 (2014)14-49.
66. Silva JGF et al. Effect of systemic photobiomodulation in the course of acute lung injury in rats, *Lasers Med Sci.* 36 (5) (2021)965-973.

67. Schapochnik A et al. Intravascular laser irradiation of blood (ILIB) used to treat lung diseases: a short critical review, *Lasers Med Sci*, 25 (1) (2023)93.
68. BRUNETTI, M. C. **Periodontia Médica. Uma abordagem integrada.** São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2004. 633p.
69. VAN VELZEN, S. K., et al. Plaque and Systemic Disease: a Reppraisal of the Focal Infection Concept. **Journal of Clinical Periodontology**, v.11, p. 209-220, 1984. apud BRUNETTI, M.C., 2004.

9 ANEXOS

9.1 Aprovação do Comitê de Ética

9.2 Check List ARRIVE

9.3 Artigos científicos