

**Universidade Nove de Julho**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**REABILITAÇÃO**

**Flávia Mafra de Lima**

**Estudo do efeito do laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar  
induzida por isquemia e reperfusão intestinal**

**São Paulo**

**2013**

**Flávia Mafra de Lima**

**Estudo do efeito do laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar induzida por isquemia e reperfusão intestinal**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

**Aluna: Flávia Mafra de Lima**

**Orientador: Profª Drª Regiane Albertini de Carvalho**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira**

**São Paulo**

**2013**

## FICHA CATALOGRÁFICA

***Lima, Flávia Mafra de.***

***Estudo do efeito do laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar induzida por modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal. / Flávia Mafra de Lima. 2013.***

***94 f.***

***Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2013.***

***Orientador (a): Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho.***

São Paulo, 09 de outubro de 2013.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno(a): FLAVIA MAFRA DE LIMA

Título da Dissertação: "Efeito do laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar induzida por modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal".

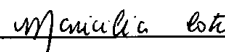
Presidente: PROFA. DRA. REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO



Membro: PROFA. DRA. TATIANA DE SOUSA DA CUNHA UCHIYAMA



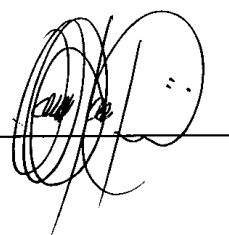
Membro: PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA



Membro: PROF. DR. RODOLFO DE PAULA VIEIRA



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILO DE CARVALHO



## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1 (p.34)

**Figura 1:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na permeabilidade pulmonar e pulmonar endotelial citoesqueleto de animais submetidos à I/R-i. Os ratos foram tratados com laser 30 minutos após o início da reperfusão. A permeabilidade pulmonar (A), o dano no citoesqueleto endotelial pulmonar (B), e os níveis de TNF em meio de cultura (C), foram mensurados 4 horas após a reperfusão. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. Os resultados foram considerados significativos com  $P < 0.05$ .

**Figura 2:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na expressão de mieloperoxidase (MPO) de tecido pulmonar após I/R-i. Os ratos foram tratados com laser 30 minutos após o início da reperfusão. A expressão de mieloperoxidase foi mensurada em homogenato de pulmão para identificar o recrutamento de neutrófilos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. Os resultados foram considerados significativos com  $P < 0.05$ .

**Figura 3:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na expressão do RNAm e proteína da citocina pró inflamatória TNF, em pulmão de rato. Os ratos foram tratados com laser 30 minutos após o início da reperfusão. Uma análise representativa RT-PCR mostrou que TNF junto com a expressão de GAPDH foram usadas como controles internos. O conteúdo de proteína TNF no pulmão foi mensurado pela técnica ELISA. A expressão do RNAm TNF (A) e proteína (B) foram mensurados 4 horas após I/R-i. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. Os resultados foram considerados significativos com  $P < 0.05$ .

**Figura 4:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na expressão do RNAm e proteína da citocina pró inflamatória IL-10, em pulmão de rato. Os ratos foram tratados com laser 30 minutos após o início da reperfusão. Uma análise representativa RT-PCR mostrou que IL-10 junto com a expressão de GAPDH foram usadas como controles internos. O conteúdo de proteína IL-10 no pulmão foi mensurado pela técnica ELISA. A expressão do RNAm IL-10 (A) e proteína (B) foram mensurados 4 horas após I/R-i. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. Os resultados foram considerados significativos com  $P < 0.05$ .

## **Artigo 2 (p.35)**

**Figura 1:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na disfunção da reatividade traqueal 30 minutos (A), 2 horas (B), e 4 horas (C). Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

**Figura 2:** Efeito da terapia de laser de baixa potência no edema pulmonar em resposta à I/R-i. A permeabilidade vascular pulmonar foi determinada usando extravasamento de Azul de Evans 30 min, 2 e 4 horas após I/R-i. Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

**Figura 3:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na expressão de mieloperoxidase (MPO). Amostras de pulmão foram removidos de ratos sacrificados 30 min, 2 e 4 horas após a reperfusão e processados. A MPO foi mensurada no sobrenadante através de densidade ótica. (O.D.) de 460nm. Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

**Figura 4:** Efeito da terapia de laser de baixa potência em ICAM-1. Após os períodos de reperfusão de 30min, 2 e 4 horas, os pulmões foram removidos e processados por RT-PCR para analisar a expressão do RNAm de ICAM-1. Para isso, RNA total foi isolado do tecido pulmonar usando TRIzol reagente, seguindo o protocolo do fabricante. RNA foi submetido a DNase I, seguido de transcrição reversa para DNA. Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

**Figura 5:** Efeito da terapia de laser de baixa potência no TNF. Após os períodos de reperfusão de 30min, 2 e 4 horas, os pulmões foram removidos e processados

por RT-PCR para analisar a expressão do RNAm de TNF. Para isso, RNA total foi isolado do tecido pulmonar usando TRIzol reagente, seguindo o protocolo do fabricante. RNA foi submetido a DNase I, seguido de transcrição reversa para DNA. Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

**Figura 6:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na IL-10. Após os períodos de reperfusão de 30min, 2 e 4 horas, os pulmões foram removidos e processados por RT-PCR para analisar a expressão do RNAm de IL-10. Para isso, RNA total foi isolado do tecido pulmonar usando TRIzol reagente, seguindo o protocolo do fabricante. RNA foi submetido a DNase I, seguido de transcrição reversa para DNA. Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

**Figura 7:** Efeito da terapia de laser de baixa potência sobre NO. Após os períodos de reperfusão de 30min, 2 e 4 horas, os pulmões foram removidos e processados por RT-PCR para analisar a expressão do RNAm do NO. Para isso, RNA total foi isolado do tecido pulmonar usando TRIzol reagente, seguindo o protocolo do fabricante. RNA foi submetido a DNase I, seguido de transcrição reversa para DNA. Os animais reperfundidos por 30 minutos receberam laser 15 minutos após o início da reperfusão, enquanto que aqueles que foram reperfundidos por 2 e 4 horas, foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão. Os animais receberam irradiação com laser na região do brônquio principal

### **Artigo 3 (p. 36)**

**Figura 1:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na expressão de mieloperoxidase em tecido pulmonar após I/R-i. Os camundongos foram tratados com laser 5 minutos após o início da reperfusão. A MPO foi mensurada em homogenato de pulmão com 2 horas de reperfusão para identificar o recrutamento de neutrófilos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0.05$ .

**Figura 2:** Efeito da terapia de laser de baixa potência na expressão e proteínas de mediadores pró e anti inflamatórios em pulmão de camundongo. Os camundongos foram tratados com laser 5 minutos após o início da reperfusão. Uma análise representativa RT-PCR mostrou IL-1, IL-6, TNF, IL-10 junto com expressão GAPDH foram usados como controle interno. O conteúdo de proteínas nos pulmões de IL-1, IL-6, TNF, IL-10 foram mensurados como média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0.05$ .



## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais João Félix e Ameir e minha irmã Emilze, pois são os maiores responsáveis por tudo na minha vida, são meus maiores incentivadores, e as pessoas que mais querem meu bem, sem eles não sou ninguém.

Dedico a minha vó Lourdes, que sei que continua torcendo e rezando por mim, e sempre por perto de nós todos.

Dedico a Mariana, Má, por todos os momentos, independente do lugar do mundo, seja para aventura ou simplesmente estar perto, você é a melhor companheira, parceira, dupla, amiga do mundo, faça neve ou faça sol.rs.

Dedico aos amigos de muitos anos, amigos que já são parte de minha família, e que estão comigo sempre. Tati e Ana.

Dedico aos amigos conquistados durante o doutorado, pessoas que se tornaram muito especiais e que compartilharam os melhores e os mais críticos momentos no decorrer de nossas caminhadas.

Dedico aos amigos conquistados durante o mestrado e que continuam tendo um espaço especial em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado força e saúde para completar mais essa etapa da minha vida.

Agradeço a minha família, aos meus pais João Félix e Ameir e minha irmã Emilze, por serem a base de toda minha vida, por me ajudarem de forma incondicional em todos os planos e sonhos, pelo carinho e dedicação, pela preocupação, pelas conversas, pelo beijo de boa noite nos finais de semana em casa, pela minha formação intelectual e pessoal, por me incentivarem sempre nos estudos, e por estarem do meu lado nos bons e maus momentos, e por me ensinarem a nunca desistir dos meus objetivos. Por me ensinarem tudo que sei e sou até hoje. Eles sim sabem do meu caráter, responsabilidade e profissionalismo.

Agradeço minha vó Lourdes, pelas orações e torcida de sempre, e pelos momentos junto.

Agradeço ao meu vô Joaquim, pelo cuidado e por acreditar que uma criança iria dar orgulho algum dia.

Agradeço aos meus amigos, que sempre estarão por perto, por mais que o tempo nos faça mudar, o carinho por vocês ainda permanece.

Agradeço a Má, que tem um lugar mais que especial na minha vida, que é uma super companheira, parceira de todos os momentos, que está presente nos melhores momentos, nas maiores aventuras, nos momentos gourmet, momentos decoração, momento luau, nas risadas mais gostosas, e que também está ao meu lado nos momentos mais delicados ou não tão felizes, minha companhia e incentivo para discussão dos mais variados temas, sempre.

Agradeço aos amigos conquistados durante o doutorado, que caminharam junto, dividiram conhecimento e momentos difíceis, e que espero que sempre continuem por perto.

Agradeço à Profa. Dra. Regiane Albertini, por me orientar e ajudar em todos os momentos desse trabalho, mesmo não sendo de sua área específica, por ouvir minhas idéias e dar continuidade algumas vezes.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira, pelas sugestões relacionadas a parte experimental do trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Paula Ligeiro, por estar sempre pronta a ajudar com alguma idéia para esse projeto.

Ao Prof. Dr. José Jr., por ajudar na realização de parte experimental desse projeto.

Agradeço aos técnicos, funcionários em geral, bioterista pela ajuda e organização na estrutura do laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Aimbire, pelos ensinamentos durante o mestrado, pelas atitudes no início do doutorado, obrigada, isso me fez crescer e conhecer muitos profissionais que contribuíram de alguma forma para os aprendizados durante o doutorado.

Agradeço ao Prof. Dr. Mauro Teixeira por ser acessível e deixar as portas de seu laboratório sempre abertas para ajuda em partes desse trabalho, por discutir e orientar em alguns momentos na elaboração e execução desse projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, por mais uma vez ter disponibilizado seu laboratório para realização de parte experimental desse projeto, por discutir sobre assuntos de pesquisa em geral ou sobre esse trabalho, pelas ideias em alguns momentos, e por me deixar aprender novas técnicas em seu laboratório.

Agradeço a **CAPES e a Fapesp** pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

## RESUMO

A inflamação sistêmica causada pela isquemia e reperfusão intestinal (I/R-intestinal) caracteriza-se pela geração, em quantidades exageradas de citocinas pró-inflamatórias tais como, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e NO. A lesão que ocorre em diversos órgãos após a I/R- intestinal está relacionada de forma geral à ocorrência de lesão microvascular, aumento do extravasamento plasmático, aumento da expressão de moléculas de adesão, recrutamento e ativação de células inflamatórias (notadamente neutrófilos). Os efeitos anti-inflamatórios do laser de baixa potência (LBP) são conhecidos em diversas doenças, entretanto, os mecanismos de sua ação ainda não são bem compreendidos. Assim, o objetivo desse estudo é descrever o efeito do laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar em modelo experimental de isquemia e reperfusão intestinal, buscando investigar os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos. Para tanto, dividimos o estudo em 3 etapas: 1ª) O objetivo foi avaliar o efeito do laser na disfunção de reatividade colinérgica e liberação de mediadores inflamatórios no pulmão após I/R-i. 2ª) O objetivo do artigo foi avaliar se o tratamento com laser poderia modular os mediadores pró e anti-inflamatórios na inflamação pulmonar aguda induzida por I/R-i. 3ª) foi realizar um estudo dose resposta em modelo de inflamação pulmonar induzido por I/R-i em camundongos Métodos: Foram utilizados ratos Wistar (150 -200g) e camundongos C57/BL6 (20-25g), provenientes do Biotério Central da Universidade Nove de Julho. Cada grupo experimental foi constituído de 5 animais, sendo os seguintes: grupo naive (basal); grupo sham (falso-operado); grupo I/R-intestinal; grupo I/R-intestinal + LBP na região linfática. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Quetamina/Xilazina (20 mg/kg-100 mg/kg) e após laparotomia mediana e desvicerização a isquemia intestinal foi induzida pelo pinçamento da artéria mesentérica superior por 45 minutos. No período após a reperfusão (2 horas), os animais foram novamente anestesiados e sacrificados por dessangramento pela aorta abdominal. Os animais foram irradiados com um laser de diodo com potência de 30 mW e comprimento de onda de 660 nm irradiando uma área de 0.785 cm<sup>2</sup> com uma dose de 5.4 J em ratos e (0.78, 2.37, 3.9, 5.8J) em camundongos. Resultados da 1ª etapa: Observamos que, embora o tratamento com laser reduza o edema e a expressão de mieloperoxidase, isso não acontece em todos os períodos de reperfusão. Isso também foi observado na expressão de ICAM-1. Porém ao mesmo tempo em que reduz TNF- $\alpha$  e iNOS, o laser aumenta a expressão de IL-10 nos pulmões de ratos submetidos à I/R-i, 2ª etapa: Os resultados indicam que o laser reduz o edema, expressão de MPO e TNF- $\alpha$  nos pulmões quando comparados com os grupos controle. o laser aumentou a expressão de IL-10 nos pulmões e 3ª etapa: em modelo de camundongo, o laser também mostrou-se eficaz ao reduzir a concentração indireta de neutrófilos no tecido pulmonar nas doses de (2.37, 3.9, 5.8 J) e reduziu a expressão do RNAm e síntese proteica de (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) Conclusão: Concluímos que o tratamento com laser de baixa potência é eficaz para inflamação pulmonar induzida por I/R-i nas doses estudadas. A dose que melhor apresentou resultado foi de 3.9 J. Nossos resultados mostraram que o laser reduziu a migração de células inflamatórias e o edema. Em relação à expressão de iNOS o laser também mostrou-se eficaz ao reduzir sua expressão, e isso indica um efeito do tratamento com laser na reatividade de traquéia, visto que na I/R-i a reatividade de traquéia está diretamente relacionada as concentrações de NO e IL-10. Em relação à expressão do RNAm e síntese proteica de mediadores pró inflamatórios (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) o laser mostrou reduzir esses valores, e aumentar a síntese proteica de IL-10

**Palavras chave:** laser de baixa potência, isquemia e reperfusão intestinal, inflamação, ARDS, dose resposta.

## ABSTRACT

The systemic inflammation caused by ischemia and reperfusion (I/R-i) is characterized by generating , in exaggerated amounts of proinflammatory cytokines such as TNF-  $\alpha$  , IL -1 $\beta$  IL- 6 and NO. The injury that occurs in various organs after intestinal I/R-i is generally related to the occurrence of microvascular injury, increased plasma extravasation increased expression of adhesion molecules, recruitment and activation of inflammatory cells (mainly neutrophils). The anti-inflammatory effects of low-level laser (LLL) is known in many diseases, however, the mechanisms of its action are not yet well understood. The objective of this study is to describe the effect of low level laser on pulmonary inflammation in an experimental model of ischemia and reperfusion in order to investigate the possible mechanisms involved in these effects .Therefore, we divided the study into three stages: 1st) The goal was to evaluate the effect of laser in reactivity cholinergic dysfunction and release of inflammatory mediators in the lung after I/R-i 2nd) The objective was to assess whether the laser treatment could modulate the proinflammatory mediators and anti -inflammatory drugs in acute lung inflammation induced by I / Ri. 3rd) was conducting a study dose response model of lung inflammation induced by I / Ri in mice Methods: Wistar rats (150 - 200g) and C57/BL6 mice (20 - 25g) from the animal house of the Nove de Julho University. Each experimental group consisted of 5 animals each, as follows: naive group (baseline), sham (fake - operated), I/R-i, I/R + LBP - intestinal lymph in the region. The animals were anesthetized intraperitoneally with Ketamine / Xylazine (20 mg/kg-100 mg/kg) and after laparotomy and desvicerização intestinal ischemia was induced by clamping the superior mesenteric artery for 45 minutes. In the period after reperfusion (2 hours) the animals were anesthetized and sacrificed by exsanguination through the abdominal aorta. The animals were irradiated with a diode laser with a power of 30 mW and a wavelength of 660 nm irradiating an area of 0785 cm<sup>2</sup> with a dose of 5.4 J in rats and (0.78 , 2.37 , 3.9, 5.8J ) in mice. Results Step 1: We note that, although laser treatment reduces edema and myeloperoxidase expression, it does not happen in all periods of reperfusion. This was also observed in the expression of ICAM- 1. But at the same time reducing TNF-  $\alpha$  and iNOS laser increases the expression of IL -10 in the lungs of rats subjected to I / Ri Step 2: The results indicate that the laser reduces edema, MPO expression and TNF -  $\alpha$  in the lungs when compared with control groups. laser increased the expression of IL - 10 in the lungs and 3rd stage: in mouse model, laser has also shown to be effective in reducing the concentration indirect neutrophils in the lung tissue at doses (2.37, 3.9, 5.8 J) and reduced mRNA expression and protein synthesis of (IL - 1 $\beta$ , TNF - $\alpha$ , IL - 6, IL - 10) Conclusion: we conclude that treatment with low level laser therapy is effective for lung inflammation induced by I / Ri at the doses studied. The dose that best submitted result was 3.9 J. Our results showed that the laser has reduced inflammatory cell migration and edema. Regarding the expression of iNOS laser has also shown to be effective in reducing its expression , and this indicates an effect of laser treatment on the reactivity of the trachea , since the I / Ri reactivity of the trachea is directly related to the concentrations of NO and IL-10. Regarding the expression of mRNA and protein synthesis of pro- inflammatory mediators (IL- 1, IL- 6 and TNF-  $\alpha$ ) laser was shown to reduce these values , and enhance protein synthesis in IL-10

Keywords: low power laser, ischemia and reperfusion, inflammation, ARDS, dose response.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução.....  | 15 |
| 2. Modelo experimental de Isquemia e reperfusão intestinal..... | 16 |
| 3. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo .....             | 17 |
| 4. Moduladores da Inflamação .....                              | 20 |
| 4.1 Moduladores da inflamação pulmonar .....                    | 20 |
| 4.1.1 Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) .....           | 20 |
| 4.1.2 Interleucina 1 (IL-1 $\beta$ ).....                       | 21 |
| 4.1.3 Interleucina 10 (IL-10) .....                             | 21 |
| 4.1.4 Interleucina 6 (IL-6) .....                               | 22 |
| 5. Reatividade das vias aéreas .....                            | 22 |
| 6. Laser de baixa potência .....                                | 24 |
| 7. Laser e Inflamação Pulmonar .....                            | 28 |
| 8. Justificativa .....  | 31 |
| 9. Objetivo geral.....  | 33 |
| 9.1 Objetivos Específicos.....                                  | 33 |
| 10. Resultados .....  | 34 |
| 10.1 Artigo 1.....  | 34 |
| 10.2 Artigo 2.....  | 45 |
| 10.3 Artigo 3.....  | 59 |
| 11. Discussão .....   | 74 |
| 12. Conclusão .....   | 81 |
| 13. Referências Bibliográficas.....                             | 83 |

## **Contextualização**

### **1.0 ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

A isquemia mesentérica foi primeiramente descrita por Antônio Benivieno em 1968 como sendo uma redução no fluxo sanguíneo intestinal. Essa situação geralmente é o resultado de oclusão arterial por trombos ou embolismo, e mais frequentemente, por processos não oclusivos como, por exemplo, situações de baixo fluxo mesentérico que ocorrem em insuficiência cardíaca, sepse, administração de agentes  $\alpha$ -adrenérgicos ou digitálicos. As artérias mais comprometidas pela obstrução mesentérica são o tronco cefálico, a artéria mesentérica superior e a artéria mesentérica inferior ou caudal (Cerqueira et al., 2005).

Conceitualmente, isquemia é a redução do fluxo sanguíneo, usualmente decorrente de obstrução mecânica no sistema arterial. Todavia a isquemia pode ser associada pela queda grave da pressão arterial ou ainda hemorragia. Uma vez instalada, causa diversas alterações do metabolismo, as quais resultam na redução de reservas energéticas, acúmulo de metabólitos tóxicos e eventualmente necrose tecidual (Scarabelli et al., 2002;).

A isquemia arterial inicia as alterações teciduais por bloqueio do suprimento de oxigênio, impedindo o metabolismo energético aeróbico, determinando assim a depleção dos níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP) e dessa forma contribuindo para o distúrbio celular homeostático (Grace et al, 1994). Durante o processo isquêmico com inadequado suprimento de oxigênio e consequente comprometimento da fosforilação oxidativa na mitocôndria, ocorre acúmulo de metabólitos que diretamente ou através de mediadores químicos, podem causar lesão celular. Além disso, dependendo do tempo e intensidade da isquemia, quando o oxigênio é reintroduzido aos tecidos, a lesão pode ser ainda mais exacerbada (Cerqueira et al., 2005).

A isquemia arterial mesentérica apresenta uma taxa de incidência entre 60% a 100% número que vem crescendo consideravelmente nos últimos vinte anos (Yasuhara et al., 2005).

A reperfusão tecidual é uma situação onde o suprimento sanguíneo interrompido pela isquemia é restaurado. Acredita-se que produtos tóxicos gerados durante a isquemia sejam, na vigência da reperfusão, removidos e possam ao ter acesso à circulação, promover importantes alterações no estado funcional do organismo como um todo. De fato, as conseqüências da isquemia e reperfusão intestinal (I/R- intestinal) não são restritas ao intestino e envolvem a indução de lesão tecidual em órgãos distantes (Sirotković-Skerlev et al., 2006;), onde aquelas no pulmão e a falência múltipla dos órgãos, ocupam lugar de destaque (Halldorsson et al., 2000).

O trauma abdominal associado com isquemia e reperfusão pode afetar órgãos distantes, particularmente os pulmões (Ito et al., 2003). A isquemia intestinal está também associada com a resposta inflamatória sistêmica, sugerindo uma ligação entre a liberação de mediadores inflamatórios e a disfunção pulmonar na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS) (Van Soeren et al., 2000). Essa desordem pulmonar é mediada por neutrófilos, assim como por aumento da atividade de mieloperoxidase, aumento da produção de citocinas, mediadores lipídicos e óxido nítrico (Bhatia et al., 2002). Dados obtidos de modelos experimentais de síndrome do desconforto respiratório indicam que essa síndrome é caracterizada por acúmulo de neutrófilo pulmonar e aumento da permeabilidade microvascular (Desai et al., 2002).

## **2.0 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

Dentre os modelos experimentais utilizados no estudo da ARDS, a administração endovenosa de LPS (endotoxemia), de bactérias como a *E. coli* (bacteremia) e a I/R intestinal são amplamente utilizados, por mimetizar vários efeitos observados em pacientes com sepse, trauma abdominal como, por exemplo, as alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tissular, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, hiper ou hiporreatividade de traquéia frente ao estímulo de agonistas colinérgicos, edema pulmonar, coagulação intravascular disseminada e a produção de grandes quantidades de citocinas na circulação. Além disso, é um modelo prático e reprodutivo em muitas espécies animais, como camundongos (Cintra et al., 2008) e ratos (Cavriani et al., 2004).



### **3.0 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO (ARDS):**

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS) é uma síndrome clínica resultante de uma lesão inflamatória pulmonar aguda de diversas etiologias. Esta síndrome foi primeiramente descrita por Ashbaugh e col. em 1967 a partir de uma série de 12 pacientes; no entanto, o primeiro conjunto de critérios de diagnóstico foi publicado em 1971 por Petty em associação com Ashbaugh. Posteriormente, esta síndrome foi denominada de Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto; porém em 1994 na Conferência de Consenso Anglo-Europeu foi proposto o uso da definição ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome), ou seja, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, pois a patologia não é limitada somente a indivíduos adultos (Dushianthan et al., 2011). Em 2012, numa convenção denominada convenção de Berlim, um grupo seletivo de médicos e pesquisadores estabeleceram a nova nomenclatura para a síndrome, assim como seus critérios de gravidade (The ARDS definition task force, 2012).

A ARDS é uma síndrome da falência respiratória aguda que resultam em edema pulmonar e inflamação (Bernard et al., 1999). A incidência da ARDS é em torno de 58,7 casos por 100.000 pessoas/ano, respectivamente, com uma estimativa de 74,500 mortes e 2.2 milhões de dias no centro de terapia intensiva (CTI) anualmente. A expectativa é que a ARDS se torne um problema ainda maior de saúde (Herridge, et al., 2005). A taxa de mortalidade ARDS é estimada entre 40% e 60% (Hayes et al., 2012). Esta síndrome pode ser agravada pela idade do paciente, pela presença de disfunções orgânicas não pulmonares, além de choque hemorrágico e falência hepática. Esses fatores são grandes preditivos de morte (Lewandoski et al., 2006; Rubenfeld et al., 2005).

Na ARDS, uma complexa rede de citocinas modulam a resposta inflamatória à infecção primária nos pulmões, ou inflamação sistêmica tal como na sepse e pancreatite. Maior destaque no lavado bronco-alveolar de certas citocinas sugerem que os mediadores inflamatórios tem origem pulmonar. Níveis de ambos, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8) e anti-inflamatórias (IL-1ra, IL-10, IL-13) são elevadas no plasma ou lavado na ARDS indicando um equilíbrio entre esses mediadores no desenvolvimento da ARDS. Os biomarcadores pró e anti-inflamatórios são estudados para estabelecer seu papel para prever o desenvolvimento, diagnóstico, e prognóstico da ARDS (Calfee et

al., 2007).

O epitélio alveolar é composto por células do tipo I (90%) e células do tipo II (10%) (Pugin et al., 1999). A função normal das células do tipo II é a produção de surfactante, transporte de íons, e diferenciação em células do tipo I.

Os estágios da ARDS são divididos em três fases: fase inicial inflamatória ou exsudativa (1 a 2 semanas), fibroproliferativa (2 a 3 semanas) e estágio fibrótico (3 a 4 semanas) (Ware & Matthay 2000).

O mecanismo primário de lesão na ARDS é o rompimento da barreira alveolar levando a inflamação e coagulação. A fase inflamatória inicial é caracterizada por dano alveolar devido a lesão epitelial e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar. Isso leva a um acúmulo de fluido no espaço alveolar. O fluido edematoso nos pulmões consiste de proteínas (albumina e fibrina) e células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos). A lesão epitelial durante a fase aguda da doença causa necrose de células alveolares do tipo I, inativação da produção de surfactante, levando a um colapso alveolar e comprometimento da troca gasosa. Durante a fase fibroproliferativa, as células inflamatórias juntamente com células epiteliais pulmonares e fibroblastos, amplificam a resposta inflamatória e ativam as vias pro-coagulantes. A fibrose pulmonar, secundária a deposição de colágeno, é uma característica predominante na fase tardia da ARDS (Ware & Matthay 2000).

Nessa fase inicial, as células epiteliais e endoteliais liberam fatores que levam à lesão e morte celular (particularmente de células estruturais), enquanto aumento a sobrevivência dos leucócitos. A perda da integridade celular resulta em um aumento da concentração de líquido nos alvéolos, com um exsudato rico em proteínas, que causa prejuízo na troca gasosa. A sub-sequente diluição das proteínas do surfactante levam ao colapso alveolar e diminuição da complacência pulmonar. Histologicamente, esse estágio é marcado por proliferação e mudanças fenotípicas em células alveolares tipo II e também nos fibroblastos. Na ausência de recuperação, alguns pacientes progridem para um estágio fibrótico que é caracterizado por fibrose difusa e obliteração da arquitetura normal do pulmão. (Bhargava & Wendt et al., 2012).

Na fase aguda da ARDS, as células do epitélio alveolar são lesadas, um componente chave para apresentação clínica. Uma importante função das células do tipo II é a produção de surfactante. Esta superfície ativa dos complexos de

lipoproteínas diminuem a tensão superficial mantendo os alvéolos abertos e aumentando a complacência. As proteínas do surfactante (SP) A e D também estão envolvidas na resposta imune inata. Observações em uma fase precoce da ARDS revelam uma perda na tensão superficial sugerindo uma perda funcional das proteínas do surfactante. Em um estudo, Greene et al. (1999) descreveram mudanças complexas em várias proteínas do surfactante na ARDS, principalmente SP-A e SP-B tanto antes do seu início e ao longo da fase exsudativa (Greene et al., 1999). Eles observaram que em um estágio precoce da fase exsudativa, SP-A e SP-B diminuem no lavado bronco-alveolar. Eles observaram que não era devido à diluição, pois as concentrações de SP-D permaneciam estáveis. Isso implica que as proteínas do surfactante são ou consumidas e/ou concomitantemente diminuídas na produção devido à lesão celular. Isso sugere que as proteínas do surfactante no lavado bronco-alveolar são marcadores para sobrevivência.

O grau de lesão epitelial e reparo é fundamental em determinar a severidade da ARDS. Proliferação de células alveolares do tipo II durante a fase tardia da ARDS é uma importante fase no reparo. As células alveolares do tipo II promove eliminação de fluidos por transporte ativo, esse processo está associado com o aumento da oxigenação e função dos pulmões. Em seguida, as células do tipo II se diferenciam em células do tipo I, restaurando o epitélio alveolar normal, levando a resolução da doença (Ware & Matthay 2000).

Em poucos dias de lesão pulmonar aguda, as células do tipo II começam o processo de regeneração ao longo do septo alveolar e iniciam a fase proliferativa. A fase exsudativa desaparece devido à melhora da integridade vascular. Vários estágios de proliferação podem ocorrer no pulmão simultaneamente. Com o aumento da duração da ARDS a fase fibroproliferativa pode predominar e o reparo pode ocorrer remodelando o pulmão. Se bem orquestrado, esse processo resulta em reparo de estruturas alveolares e vasculares. A fase de fibroproliferação ocorre em um momento mais tardio, entretanto esse processo pode ter início nas primeiras 24 horas do diagnóstico da ARDS. Alguns estudos demonstraram marcadores de colágenos circulante, pró-colágeno N-terminal peptídeo III elevado em 24 horas de diagnóstico de ARDS, sugerindo uma ativação precoce do processo fibro-proliferativo (Tomashefski et al., 2000).

Além do epitélio, o endotélio é também um local de lesão na ARDS. A

célula endotelial produz uma série de compostos importantes para vaso-regulação e homeostase. Embora a vasoconstrição responsiva na ARDS tenha sido reconhecida, não foi um alvo para definir biomarcadores. Vários fatores endoteliais derivados da homeostasia são elevados na ARDS presumivelmente em resposta a lesão celular, embora não esteja claro qual estímulo ocorra para elevar seus níveis (Bhargava et al., 2012).

Uma das características da ARDS é a formação de membrana hialina, da deposição de fibrina intra alveolar, devido a um desequilíbrio na coagulação e fibrinólise durante a fase exsudativa (Idell et al., 1991). Entretanto, a deposição de fibrina pode também ser prejudicial se excessivo e ocorrer na ausência de re-epitelização (Leavell et al., 1996).

A fase de reparo da ALI/ARDS requer uma reparação bem orquestrada das estruturas alveolares e vasculares. A fase exsudativa da lesão pulmonar resulta em um rico ambiente proteico que pode funcionar como matriz provisória para posterior repovoamento celular. Em uma fase precoce (poucos dias) da ARDS as células do tipo II começam regenerar o septo alveolar e sinalizar o início da fase proliferativa (Tomashefski et al., 2000).

#### **4.0 MODULADORES DA INFLAMAÇÃO:**

**4.1 Moduladores da inflamação pulmonar:** A magnitude da inflamação sistêmica durante o quadro de I/R-intestinal depende da geração de diversos mediadores. Dentre os seus efeitos pulmonares destacam-se o aumento da expressão de moléculas de adesão, o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos), a lesão de células endoteliais e o aumento da permeabilidade vascular (Yamagashi et al., 2002).

**4.1.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ):** Wheeler et al. (1991) e Haddad & Rousell (1998) observaram que o sistema respiratório mostra-se sensível aos efeitos do TNF- $\alpha$  reproduzindo os sinais clínicos observados na ARDS. Esposito e col. (2007) observaram que em animais *knock-out* para o receptor do TNF- $\alpha$  ou tratados previamente com Etanercept® (proteína solúvel que se liga ao TNF- $\alpha$  neutralizando sua ação), reduziram o infiltrado de neutrófilos no intestino. Resultados semelhantes foram descritas por Yamamoto et al., (2001), com o uso de inibidor de síntese de TNF- $\alpha$ , o composto FR167653. Gaines et al., (1999) mostraram que a administração de receptores solúveis para TNF- $\alpha$  reduz a lesão microvascular de animais submetidos a I/R do membro posterior. Além disso,

segmentos de vias aéreas de ratos após exposição ao TNF- $\alpha$  apresentaram redução da capacidade de relaxamento das vias aéreas quando estimulados com o agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (Chen et al., 2003), o que pode ter relação com o que acontece com os indivíduos não responsivos. Em modelo de sepse, ficou demonstrado que o TNF- $\alpha$  é produzido em grande quantidade pelos macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios como LPS e liga-se a receptores virtualmente presentes em todas as células do organismo. O TNF- $\alpha$  é liberado sistemicamente quase que imediatamente após qualquer insulto, modificando as propriedades das células endoteliais, ativando neutrófilos e induzindo a liberação de outras citocinas.

**4.1.2 Interleucina- 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ):** A IL-1 $\beta$  tem destaque não somente no desenvolvimento da resposta inflamatória das vias aéreas e pulmonar, mas também na exacerbação e perpetuação deste tipo de inflamação que acomete o trato respiratório (Broide et al., 1992). Níveis elevados de IL-1 $\beta$  comprometem a função do citoesqueleto pulmonar contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias (principalmente neutrófilos ativados), edema e mais tardiamente proliferação de fibroblastos (Oldman et al., 2004). Além disso, Laporte et al., (1998) demonstraram que a IL-1 $\beta$  estimula células da musculatura lisa das vias aéreas de humanos a liberar elevadas concentrações de prostanóides, contribuindo para a hiporresponsividade aos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos através da dessensibilização desses receptores. Vários de seus efeitos biológicos são semelhantes e sinérgicos aos do TNF- $\alpha$ , mas ela não é capaz de induzir sozinha a lesão celular ou a apoptose. A IL-1 estimula sua própria liberação e a de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , PAF, eicosanóides e fatores de crescimento, além de induzir a ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos e a expressão de moléculas de adesão no endotélio, a coagulação, a hipotensão, febre e anorexia (Raymondos et al. 2012).

**4.1.3 Interleucina 10 (IL-10):** A IL- 10 é uma citocina antiinflamatória capaz de inibir os efeitos pulmonares de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  através do aumento da expressão de seus antagonistas endógenos (Huber et al., 2000). Nesse contexto, já foi demonstrado que em modelo animal de endotoxemia seus níveis plasmáticos são elevados e que esta citocina é capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , e dessa forma, prevenindo subseqüentes danos alveolares (Souza et al., 2001). No que

diz respeito à participação da IL-10 na ARDS experimental induzida por I/R-i, Kabay et al., (2005) demonstraram que o aumento da expressão de IL-10 no plasma de ratos durante o período pré-isquêmico atenuou o edema pulmonar, a migração de neutrófilos, além de reduzir a lesão. Assim esses autores reforçam a idéia de que a produção de IL-10 antes do início da reperfusão pode aliviar os sintomas da inflamação pulmonar aguda induzida por I/R-i.

**4.1.4 Interleucina 6 (IL-6):** A IL-6 é um dos mais importantes mediadores na febre, e na ARDS altos níveis no plasma e BALF são preditivos de piores resultados. A IL-6 ativa tanto mediadores pró e anti inflamatórios, em uma fase precoce da ARDS, está correlacionado com um perfil pró inflamatório, com aumento dos níveis em resposta ao LPS em modelos experimentais (Zhao et al., 2012). Níveis elevados de IL-6 no plasma, foi encontrado em pacientes com risco de desenvolver ARDS com critérios em 48 horas (Bouros et al. 2004). Nesse estudo, altos níveis de IL-6 no plasma, mostram que em pacientes em risco de desenvolver ARDS, é similar a pacientes com ARDS. Outro estudo relatou que altos níveis de IL-6 em pacientes com fatores de risco de desenvolver ALI em comparação aqueles que não desenvolveram (Takala et al., 2002).

## **5.0 REATIVIDADE DAS VIAS AÉREAS**

O principal eixo de resposta constritora para as vias aéreas são os nervos do sistema parassimpático, que estabelecem o controle autonômico da musculatura lisa desse sistema. Esses nervos liberam acetilcolina ativando os receptores muscarínicos, causando contração e broncoconstrição (Nadel & Barnes, 1984). A liberação de acetilcolina dos nervos parassimpáticos é controlada pelos autoreceptores muscarínicos M<sub>2</sub> localizados na superfície dos nervos. Esses receptores são pré-juncionais e regulam a liberação de acetilcolina, através de um mecanismo de retroalimentação negativa. Entretanto, alguns autores acreditam que a despeito de técnicas que possam mensurar as variações funcionais dos receptores muscarínicos que medeiam a contração da musculatura lisa das vias aéreas, é possível que a liberação excessiva de acetilcolina seja um dos mecanismos de desenvolvimento da hiperreatividade (Fryer et al., 1998). De fato, a expressão e o estado funcional dos receptores muscarínicos podem estar alterados durante o processo de inflamação pulmonar (Emala et al., 1997). Tanto

o receptor muscarínico do subtipo 2 ( $M_2$ ), quanto o receptor do subtipo 3 ( $M_3$ ) estão presentes sobre a superfície da musculatura lisa das vias aéreas, e estudos funcionais indicam que os receptores  $M_3$  são os responsáveis pela contração do músculo liso em animais (Eglen et al., 1996) e no homem (Roffel et al. 1990). Embora entre 50% e 80% dos receptores muscarínicos das vias aéreas sejam do subtipo  $M_2$ , sua função na musculatura lisa das vias aéreas ainda não está clara.

O controle colinérgico é anormal com inflamação pulmonar (Barnes et al., 1986), e a hiperreatividade é em parte mediada pela liberação de acetilcolina sobre os receptores  $M_3$  das vias aéreas. Entretanto, não existem evidências quanto ao aumento do número desses receptores ou alterações no seu estado funcional (Schultheis et al., 1994; Evans et al., 1997). Dessa forma, a hiperreatividade parece ser caracterizada muito mais por um aumento da liberação de acetilcolina, do que por um aumento da sensibilidade dos receptores muscarínicos  $M_3$  sobre o músculo liso das vias aéreas. Por fim, a redução da funcionalidade do receptor  $M_2$  aumenta a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, resultando em aumento do tônus e da broncoconstrição, podendo levar a hiperreatividade das vias aéreas (Fryer et al., 1998).

A hiperreatividade das vias aéreas pode estar associada à inflamação pulmonar (Lefort et al., 1996; Asti et al., 1995; Welbourn & Young et al., 1996). Desta forma, alguns autores investigaram a importância das células inflamatórias na perda da função dos receptores muscarínicos  $M_2$ . Esses autores observaram que existem diferentes mecanismos de perda da função do receptor  $M_2$ , incluindo antagonistas endógenos como a proteína eosinofílica conhecida como MBP (major basic protein), infecções e exposição a citocinas inflamatórias (Fryer et al., 1998). Os eosinófilos parecem ser importantes na disfunção dos receptores  $M_2$  no pulmão, visto que a MBP é capaz de bloquear esse tipo de receptor. Tanto as infecções quanto a exposição direta à citocinas pró-inflamatórias, podem levar a disfunção dos receptores  $M_2$  das vias aéreas.

A maioria dos estudos avalia o fenômeno da hiperreatividade observada em outros tipos de inflamação pulmonar, tais como aquelas causadas pela asma, pela administração (Louie et al., 2013) ou inalação (Schwartz et al., 2001) de LPS, pelo choque hemorrágico (Li et al. 2009) ou pelo trauma (Watkins et al., 2008). Em contrapartida, diversos autores têm demonstrado que a permeabilidade

vascular pulmonar e a migração de células inflamatórias para o pulmão estão significativamente elevadas durante a I/R-i. Alguns autores têm proposto mecanismos celulares que norteiam essas alterações, e tudo indica que mediadores inflamatórios gerados localmente são responsáveis por isso (Souza et al. 2003.; Souza et al., 2005; Cavriani et al., 2004; Cavriani et al., 2005). Apesar dos resultados de Coelho et al., (2007), poucos estudos reportam o impacto da inflamação pulmonar induzida por isquemia e reperfusão intestinal sobre a reatividade das vias aéreas frente ao estímulo colinérgico. A compreensão dos mecanismos que norteiam o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas na I/R-i ainda não foi investigada com acuidade.

## **6.0 LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LBP)**

A luz, desde os primórdios da civilização vem sendo utilizada com finalidades terapêuticas. Os gregos a utilizavam na helioterapia e os chineses usavam a luz solar para tratar doenças de pele, câncer e até mesmo quadros de psicose. Miserandino e Pick relataram que foram os indianos em 1400 a.C, os primeiros a utilizar a fotoquimioterapia, empregando um fotosensibilizador exógeno obtido de plantas (*Psoralens*) usado na forma de loção aplicada na pele, capaz de absorver luz solar e resultar em um efeito terapêutico no tratamento do vitiligo. Os egípcios também haviam usado a mesma substância para o tratamento de leucoedema (Pinheiro 1998). Até meados de 1900, o estudo da luz se limitou a verificar seu comportamento. Com o decorrer do tempo, os cientistas identificaram fontes de luz, porém não entendiam como essa luz era gerada.

A teoria da emissão estimulada proposta por Albert Einstein foi baseada na teoria quântica proposta por Planck em 1900, a qual discute as relações entre as quantidades de energia liberadas por processos atômicos. Albert Einstein em 1917 descreveu o fenômeno com extremo detalhe sobre os feixes de luz em sua publicação sobre teoria quântica. O primeiro princípio da teoria quântica compreende que a luz é transportada em pacotes de energia conhecidos como fótons. O segundo princípio implica em que alguns átomos ou moléculas existentes em baixo estado de energia ( $E_0$ ) relativo dos seus níveis energéticos. Entretanto, uma pequena porcentagem de átomos está ao mesmo tempo em um nível energético mais elevado. Isso é possível adicionando energia térmica,



elétrica ou óptica aos átomos no seu estado natural, levando assim esses átomos ao nível energético mais elevado. Essa energia posteriormente é liberada em forma de fótons ou ondas eletromagnéticas que retornam ao estado natural.

Einstein ainda descobriu que quando o fóton ou energia luminosa de mesmo comprimento de onda atinge um átomo excitado, esse fóton e os fótons de luz que são liberados são mudados simultaneamente e depois permanecerão na mesma fase e frequência. Esse é o conceito de emissão estimulada usada na criação do laser (Gross, 2007). Com a aplicação de princípios termodinâmicos, Einstein concluiu que o terceiro processo de interação, a emissão estimulada, deveria existir e nela a radiação eletromagnética deveria ser produzida por um processo atômico. Contudo, outros cientistas atribuem a Gordon Gold o desenvolvimento desse sistema de seleção de ondas que permitiu a obtenção de um feixe de luz altamente concentrado (Pinheiro 1998).

Em 1954 na Universidade de Columbia em New York, Schawlow e Townes, descreveram os princípios do Maser (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Simultaneamente e independente de Townes, Prokhorov e Basov publicaram sua idéia sobre desenvolvimento do Maser em Moscou e subsequentemente construíram um protótipo. O posterior desenvolvimento do Maser para o laser foi realizado por Townes. Nesse estágio o laser era chamado “optical maser” (Hecht, 1991; Gross, 2007). Neste mesmo ano nos Estados Unidos, Robert H. Dicke desenvolveu a “bomba óptica”, na qual um pequeno pulso excitatório poderia produzir uma inversão de população, gerando uma intensa emissão espontânea. Em 1956 ele patenteou o uso de um par de espelhos paralelos, formando o interferômetro Fabry- Perot, ou cavidade óptica ressonante de Fabry- Perot (Gross 2007).

Em 1960, Dr. Theodore Harold Maiman conseguiu pela primeira vez a emissão estimulada de radiação, a qual estava localizada na faixa visível do espectro visual pela excitação de uma roda de rubi com pulsos luminosos intensos, o que resultou na geração do primeiro raio laser. (Pinheiro 1998, Gross 2007). Maiman foi o primeiro a introduzir esse produto- um laser de rubi. Ele relatou a construção do primeiro laser através da revista “Physical Review Letters”. Em maio de 1960, Dr. Theodore Harold Maiman desenvolveu o laser,

após 43 anos da formulação da primeira teoria de Einstein (Maiman, 1960). Ele introduziu um laser de rubi como o primeiro comercialmente disponível.

A geração do raio laser ocorre dentro de uma cavidade conhecida como cavidade de *Perot- Fabry*, que consiste de uma câmara contendo um meio ativo. O meio ativo consiste em um material que pode ser sólido, líquido, gasoso ou semicondutor. No instante em que o meio ativo é excitado, ele faz com que os elétrons contidos na cavidade óptica ganhem e liberem energia para formação da radiação laser. O tamanho e a forma da câmara variam de acordo com o meio ativo e a potência do aparelho laser. Dois espelhos com níveis de reflexão diferentes estão posicionados em cada uma das extremidades da câmara. Um dos espelhos é totalmente reflexivo (100%) e o outro parcialmente reflexivo (98%). A diferença de capacidade de reflexão dos espelhos permite a saída da radiação de dentro da cavidade, formando assim o raio laser. A fonte energética pode ser elétrica ou luminosa, e é o que alimenta o sistema de três maneiras: continuamente (CW), pulsada, que origina ondas pulsadas (RSP) e desencadeadas ou Q-switched. A emissão contínua é resultante da excitação contínua de um meio ativo por uma descarga elétrica, como nos casos dos lasers gasosos, ou por uma fonte contínua de bombeamento óptico. A emissão pulsátil é resultante do bombeamento pulsátil do meio ativo, o qual é progressivamente bombeado até chegar a um nível de excitação suficiente para produzir emissão laser. Já a emissão desencadeada, ou também denominada de destravada ou Q-switched, ocorre em lasers pulsáteis e se verifica quando o bombeamento é feito para além do limiar de funcionamento, permitindo que a emissão ocorra quando tiver alcançado um nível suficiente (Pinheiro, 1998).

A origem da luz ocorre através dos fótons, que são desenvolvidos quando os elétrons que circulam em torno do núcleo atômico mudam seu curso. Normalmente isso ocorre quando uma energia extra é aplicada ao átomo, essa energia pode ser aplicada de diferentes formas, sejam elas, através da oscilação de calor, da colisão de átomos ou elétrons e da energia de reações químicas. A energia que é exercida nos átomos de alguma das formas citadas acima é armazenada pelos elétrons quando são excitados e isso leva a mudança desses elétrons para um nível energético superior ao seu estado natural. Apenas um número particular de elétrons pode ocupar um dado nível energético, e nenhuma

forma de radiação ocorre quando os elétrons se mantêm em seus níveis orbitais. Cada órbita está associada a um nível de energia, sendo o mais baixo deles conhecido como estado fundamental, neste estado os elétrons estão mais próximos do núcleo. O fenômeno da absorção ocorre quando a estrutura atômica estável reage com um fóton, passando a um estado mais energizado. A energia de excitação pode ser do tipo cinética (choque entre átomos, partículas ou moléculas) ou eletromagnética. Nestes casos, a radiação que chega ao átomo foi total ou parcialmente absorvida. O estado estável corresponde ao nível mínimo de energia; e a transferência para o estado excitado se dá pela absorção de energia externa ao sistema atômico. O átomo não pode permanecer em um estado excitado, visto que é bastante instável, e por isso deve retornar ao estado de repouso, liberando espontaneamente a energia. A passagem a um estado de repouso se dá através da liberação de fótons de luz. Esta liberação fotônica caracteriza a emissão espontânea de radiação (Pontinen, 1992; Pinheiro, 1998).

Existe no organismo uma função fotorreguladora a partir de certos fotorreceptores capazes de absorver um fóton de determinado comprimento de onda, o que provoca mudanças na atividade funcional e metabólica da célula. Os fotorreceptores especializados ou pigmentos fotocromáticos fotorreversíveis são: clorofila, rodopsina, bacteriorrodopsina, fitocromo (A, B, C e D). Eles são especificamente fotorreguladores, fotocromáticos e fotorreversíveis, e sua função é enviar à célula informação do meio que a circunda. Dentre os fotorreceptores não específicos podemos citar as flavoproteínas, porfirinas, catalase, citocromos, citocromoxidase, proteínas de cobre, tirosinas, superóxido dismutase, ceruloplasmina e asparinas. Os fotorreceptores não específicos são moléculas que intervêm no metabolismo celular sem necessidade de energia luminosa, porém, ao incidir sobre elas uma radiação com especificidade de comprimento de onda, são capazes de absorver os fótons depositados por essa radiação e provocar uma variação no metabolismo celular (Karu, 2003).

O termo LASER (“light amplification by stimulated emission radiation”) é um acrônimo da versão em inglês de “amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação” (Basford, 1995). As características que diferem a luz laser e a luz de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência (Karu, 1987).

Os lasers são classificados em dois grandes grupos: alta intensidade (LAI) e baixa intensidade (LBI). O termo “low (reactive) intensity laser therapy”, ou simplesmente LILT, é o mais comumente usado para se referir ao efeito do laser de baixa intensidade sobre tecidos biológicos em conduta terapêutica (Karu, 1987). O meio ativo desses lasers pode ser sólido, líquido ou gasoso. Os parâmetros físicos da radiação laser que devem ser considerados na obtenção do efeito biológico ideal e reproduzível são: potência, irradiância (densidade de potência), energia e densidade de energia (fluência), além de frequência do pulso (taxa de repetição), número de tratamentos e dados ópticos do tecido, como características de absorção e espalhamento.

O efeito fotoquímico ocorre devido à presença de biomoléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por biomoléculas intracelulares específicas podem alterar suas atividades e assim, produzir estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Estas mudanças fotodinâmicas em cadeias complexas e moléculas básicas podem alterar processos fisiológicos com conotações terapêuticas. Karu (2003) demonstrou alguns efeitos biológicos importantes associados à terapia com laser de baixa intensidade tais como: estimulação de crescimento celular, reparação celular, efeito antiinflamatório, redução de edema/revascularização, redução da formação de tecido fibroso, maior atividade tissular e estimulação nervosa.

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos do LBI sobre células em diferentes situações metabólicas, é importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do laser não-térmico sobre tecidos biológicos não são conclusivas, mas sim, conflitantes, inconsistentes e escassas. Por isso, estudos de investigação farmacológica que permitam compreender qual o tipo de sinalização celular desencadeada pelo laser, se fazem pertinentes. A partir da compreensão da sinalização celular do LBI e de sua respectiva dosimetria, foi possível estabelecer de fato a eficácia da terapia laser para diferentes doenças. Vale ressaltar ainda que a terapia laser é de baixo custo e indolor.

## **7.0 LASER E INFLAMAÇÃO PULMONAR**

Mikhailov et al., (1998) observaram que a terapia com LBP duas vezes ao dia aumentou a complacência pulmonar e a eficácia de trocas gasosas em

pacientes que apresentavam asma brônquica. Avaliando o efeito do LBP em indivíduos acometidos por inflamação pulmonar crônica não específica, esses autores observaram que o LBP irradiado sobre a pele na região acima do brônquio principal reduz a migração celular para o pulmão (Pidaev, 1997).

Milojevic & Kuruc (2003 a) analisaram o efeito do tratamento com laser de baixa potência em pacientes com pleurisia. Os pacientes foram tratados com laser de baixa potência por 10 dias. Durante o tratamento, foram evidenciadas mudanças nos sinais clínicos, sintomas gerais, achados radiológicos, assim como mudanças em alguns parâmetros bioquímicos. O grupo tratado com laser apresentou rápida reabsorção do derrame pleural, menor adesão pleural, redução mais significativa dos sintomas clínicos, especialmente dor, aumento mais significativo da expressão de cortisol e imunoglobulina A e diminuição de imuno complexos circulantes, leucócitos e taxa de sedimentação.

Milojevic & Kuruc (2003 b), investigaram o efeito terapêutico do laser de baixa potência no tratamento de pacientes asmáticos. Foram tratados 50 pacientes, durante 10 dias, com laser simultaneamente com o tratamento conservador medicamentoso. Durante o tratamento mudanças nos parâmetros funcionais respiratórios foram observadas. Os pacientes asmáticos tratados com laser apresentaram significativo aumento ( $p < 0,00005$ ) de todos os parâmetros funcionais pulmonares estimulados apenas 30 minutos após tratamento com laser. Melhora observada do terceiro ao décimo dia foram ainda maiores ( $p < 0,001$  para  $p < 0,00005$ ) em comparação ao grupo controle. Pacientes asmáticos que foram tratados a cada três meses em um período de um ano, apresentaram significativa diminuição na frequência e intensidade dos episódios de asma. Os efeitos do tratamento com laser foram observados em poucos minutos após início do tratamento e duraram por períodos prolongados de semanas ou meses. Sucessivos tratamentos com laser prolongaram o período de remissão e diminuíram a severidade dos episódios de asma.

Kashanskaia & Fedorov (2009), investigaram o efeito do laser em pacientes com bronquite obstrutiva crônica (BOC). A BOC é caracterizada por sérios distúrbios no sistema cardiorespiratório que manifestam com um moderado enfisema pulmonar e hipertensão associado com um comprometimento geral da resistência. O tratamento com laser de baixa potência combinado com

modalidades terapêuticas convencionais, acelerou a eliminação dos sintomas clínicos, aumento a eficácia, promoveu drenagem funcional dos brônquios, facilitou a normalização do estado imune dos pacientes e contribuiu para otimização dos processos de peroxidação lipídica.

Pacientes com tuberculose foram submetidos ao tratamento com laser. O tratamento com laser foi realizado simultaneamente com o tratamento convencional. O tratamento com laser resultou em uma reabsorção mais rápida do infiltrado pulmonar e resolução dos sintomas da doença. O laser foi eficiente na diminuição do período de eliminação bacteriana (Nikolaeva 2006).

Aimbire et al., (2009) investigaram o efeito do LBP em reduzir a hiperreatividade brônquica induzida por TNF- $\alpha$  modulando o metabolismo do fosfato de inositol em células de músculo liso de brônquio, onde observaram que o LBP pode reduzir sensibilização  $Ca^{2+}$  e acúmulo de fosfato de inositol nas células de músculo liso de brônquio em modelo de hiperreatividade induzida por TNF.

Mafrá de Lima et al., (2009) investigaram o efeito do LBP no relaxamento de músculo liso brônquico inflamado. Os segmentos de brônquio foram incubados 24h com TNF e foi realizada uma curva dose resposta com acetilcolina e pré tratamento com isoproterenol para comparar o efeito de relaxamento do LBP. Observamos que o LBP foi eficiente em reduzir a hiperreatividade colinérgica. Observamos também que o efeito do LBP pode ser dependente dos fatores de transcrição na inflamação experimental de vias aéreas, pois a inibição do NF- $\kappa$ B (BMS 205820) bloqueou o efeito do LBP nas alterações de segmentos de músculo liso brônquico induzido por TNF.

Mafrá de Lima et al., (2010). Observamos nesse estudo que o LBP foi capaz de reduzir a permeabilidade vascular pulmonar em animais desafiados com LPS (lipopolissacarídeo). Essa redução foi comparada à redução apresentada pela dexametasona onde o LBP mostrou-se eficaz assim como o tratamento medicamentoso. Observamos também redução na expressão de mieloperoxidase, expressão do RNAm de TNF e IL-1 $\beta$ .

Mafrá de Lima et al., (2010 a), investigaram se o LBP na inflamação pulmonar aguda (ALI) induzida por LPS é ligada ao fator de necrose tumoral (TNF) em macrófagos alveolares do lavado broncoalveolar (BALF) de ratos. Esse

estudo evidenciou que o LBP potencializou o efeito do rolipram na ALI por um mecanismo que, pelo menos inicialmente, não é diretamente ligado a geração de AMPc mas envolve a redução da expressão do RNAm de TNF em macrófagos alveolares de ratos em modelo de ALI induzida por LPS.

Mafrá de Lima et al., (2010 b) nesse estudo investigou a reatividade de músculo liso brônquico. O objetivo era saber se o LBP poderia reduzir a hiperreatividade de músculo liso brônquico associada com o aumento da sensibilidade de  $Ca^{2+}$  e aumento da expressão do RNAm RhoA em reatividade brônquica induzida por TNF. Os resultados evidenciaram que o LBP pode modular a hiperreatividade brônquica induzida por TNF por mecanismos que podem ser independentes da liberação do  $Ca^{2+}$  gerado pela ativação de receptores acoplados à proteína G.

Mafrá de Lima et al., (2010 c), investigaram o efeito do LBP nos macrófagos alveolares ativados pelo estresse oxidativo e LPS.. Nesse trabalho sugerimos que o LBP pode potencializar o efeito da NAC (*N Acetilcisteína*) na expressão de MIP-2 modulando a geração de ROS (espécies reativa de oxigênio) através de um mecanismo celular que pode ser significativamente influenciado pela sinalização do NF- $\kappa$ B.

A partir desses resultados e sabendo que o LBP é uma ferramenta para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, e que não apresenta efeitos colaterais, é de baixo custo e fácil utilização podendo ser usado de forma não invasiva, tornou-se indispensável um estudo mais aprofundado sobre o mecanismo de ação do LBP em modelo de inflamação pulmonar.

## **8.0 JUSTIFICATIVA:**

A I/R intestinal é caracterizada pela geração de produtos tóxicos durante a isquemia e na vigência da reperfusão esses produtos através da circulação e da linfa tem acesso a circulação sistêmica promovendo importantes alterações no estado funcional do organismo como um todo. De fato, as consequências da I/R não são restritas ao intestino e envolvem a indução de lesão tecidual em órgãos distantes (Sirotkovic-Skerlev et al., 2006) sendo o pulmão o órgão mais afetado (Ito et al., 2003). Como dito anteriormente, a I/R está associada à indução da resposta inflamatória sistêmica, fato que pode indicar uma ligação causal entre a

liberação de mediadores inflamatórios durante a resposta inflamatória sistêmica e a síndrome do desconforto respiratório agudo (Van Soeren et al., 2000). Dados obtidos de modelos experimentais de ARDS mostram que essa síndrome é caracterizada por acúmulo de neutrófilos e aumento da permeabilidade pulmonar (Pelosi et al., 2000; Desai 2002). Muitas citocinas são liberadas durante a I/R intestinal, incluindo TNF- $\alpha$  (Zhou et al., 2003) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 (Deitch et al., 2001; Cavriani et al., 2005) essas citocinas liberadas pela lesão intestinal alcançam a microcirculação pulmonar e contribuem para inflamação apresentada após a I/R. Além disso o estudo da concentração de neutrófilos em tecido pulmonar, edema pulmonar e quantificação das citocinas mais envolvidas na inflamação pulmonar desencadeada pelo modelo de I/R intestinal que são (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) em relação a expressão do RNAm e concentração proteica também se torna relevante para caracterização do modelo em camundongos. Sabendo que o LBP é uma ferramenta eficaz para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, que não apresenta efeitos colaterais, e é de baixo custo e de fácil utilização, podendo ser usado de forma não invasiva, esse projeto se propõe investigar de que forma o LBP atua, descrevendo sua ação em inflamação pulmonar em camundongos, pois de acordo com resultados prévios, sabendo que o laser possui efeito benéfico na inflamação pulmonar e reatividade de vias aéreas no mesmo modelo em ratos, nos parâmetros de 660nm, potência 30mW, dose de 5.4 J, porém mudar o modelo para camundongos se faz necessário, pois a quantidade de opções em relação a animais knock-out, anticorpos, é muito maior para camundongos do que para ratos. E como o objetivo do estudo é descrever a ação do laser e desenvolver um estudo dose – resposta, passamos o modelo de I/R-i para camundongos utilizando as doses de (0.78, 2.37, 3.9, 5.8 J), em um laser de 660 nm, com potência de 30 mW.



## **9.0 OBJETIVO GERAL:**

O presente projeto tem o objetivo caracterizar o efeito do laser na inflamação pulmonar e reatividade de vias aéreas em um estudo de dose resposta em modelo de ARDS induzido por I/R-i.

## **9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Avaliar a concentração de neutrófilos em tecido pulmonar
2. Avaliar a permeabilidade vascular pulmonar
3. Avaliar a concentração das citocinas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) na expressão do RNAm e concentração proteica no tecido pulmonar.
4. Avaliar a reatividade de traqueia frente a estímulo colinérgico
5. Avaliar se há diferença no efeito do laser em diferentes doses (0.78; 2.37; 3.9; 5.8 J)

## 10. Resultados

### 10.1 ARTIGO 1:

**de Lima FM**, Villaverde AB, Albertini R, Corrêa JC, Carvalho RL, Munin E, Araújo T, Silva JA, Aimbire F. 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. doi: 10.1002/lsm.21053.

Esse artigo teve como objetivo verificar se o laser seria capaz de modular os mediadores anti e pró inflamatórios na inflamação pulmonar aguda induzida por modelo de isquemia e reperfusão intestinal.

Verificamos que o laser é capaz de reduzir o edema, expressão de MPO e TNF nos pulmões quando comparados com os grupos controle. Surpreendentemente o laser aumentou a expressão de IL-10 nos pulmões.

## 10.2 ARTIGO 2:

de Lima FM, Vitoretto L, Coelho F, Albertini R, Breithaupt-Faloppa AC, de Lima WT, Aimbire F. Suppressive effect of low-level laser therapy on tracheal hyperresponsiveness and lung inflammation in rat subjected to intestinal ischemia and reperfusion. Lasers Med Sci. 2013 Feb;28(2):551-64. doi: 10.1007/s10103-012-1088-1. Epub 2012 May 5.

O objetivo nesse artigo foi avaliar o efeito do laser na disfunção de reatividade colinérgica e liberação de mediadores inflamatórios no pulmão após I/R-i.

Observamos que, embora o tratamento com laser reduza o edema e a expressão de mieloperoxidase, isso não acontece em todos os períodos de reperfusão. Isso também foi observado na expressão de ICAM-1. Porém ao mesmo tempo que reduz TNF- $\alpha$  e iNOS, o laser aumenta a expressão de IL-10 nos pulmões de ratos submetidos à I/R-i. Os resultados indicam que o laser pode controlar a resposta inflamatória no pulmão e a disfunção da reatividade de vias aéreas por reduzir simultaneamente TNF- $\alpha$  e iNOS.

### 10.3 ARTIGO 3:

**Mafrá de Lima, F.;** Aimbire, F.; Miranda, H.; de Paula Vieira, R.; Ligeiro de Oliveira, A.P.; Albertini, R. Low level laser therapy attenuates the myeloperoxidase activity and inflammatory mediators generation in lung inflammation induced by gut ischemia and reperfusion: a dose response study. Laser in Medical Science, 2013.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti inflamatório do tratamento do laser de baixa potência em modelo de I/R-i em camundongos em um estudo dose resposta.

Observamos que o tratamento com laser foi eficaz ao reduzir a síntese de mediadores pró inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) nos parâmetros de (Dose: 0.78J -5.8J, Tempo: 26 seg – 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm). Interessantemente, com relação à IL-10, o laser no parâmetro de (Dose: 5.8J, Tempo: 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm) não estimula o aumento dessa citocina e sim sua redução. Em relação ao infiltrado de neutrófilos, o laser mostrou –se eficaz ao reduzir os neutrófilos nos parâmetros de (Dose: 2.37J , Tempo: 1 min e 19 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm).

## 11. Discussão

A I/R-i está também associada à indução da resposta inflamatória sistêmica, fato que indica uma ligação casual entre a liberação de mediadores durante a inflamação sistêmica e a disfunção pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS). ARDS é uma síndrome crítica caracterizada por lesão pulmonar aguda, aumento da permeabilidade vascular pulmonar, edema, e falência respiratória (Van Soeren et al., 2000). Os neutrófilos circulantes desempenham um papel importante no desenvolvimento das características clínicas e experimentais de inflamação pulmonar aguda (Cavriani et al., 2004; Yamamoto et al., 2001). Dados obtidos em modelos experimentais mostraram que a interação neutrófilos e células endoteliais pode ser um ponto limitante na patogênese da inflamação pulmonar aguda induzida por I/R-i (Kuzu et al., 2002). Nossos resultados demonstraram que a terapia com laser de baixa potência (Dose: 5.4 J, Tempo: 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm) é capaz de diminuir de maneira significativa o edema pulmonar de animais submetidos à I/R-i comparados aos animais não tratados. Considerando o efeito anti inflamatório do laser na permeabilidade pulmonar vascular é razoável sugerir que o mecanismo de ação do laser envolva a participação do citoesqueleto endotelial que é o motor molecular que move o rearranjo do citoesqueleto não muscular de actina. De fato, isso foi relatado por Mafra de Lima et al. (2009) onde o dano celular endotelial foi diminuído após o tratamento com laser de baixa potência (Dose: 1.3 J, Tempo: 42 seg, Potência: 30mw Comprimento de Onda 660 nm,), em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por E. Coli lipopolysaccharide em rato. Ou seja, podemos dizer que o laser possui efeito benéfico em relação a permeabilidade pulmonar e a interação leucócito- endotélio, envolvendo o rearranjo do citoesqueleto endotelial entre os tempos de 42 seg e 3 min, e entre as doses de 1.3 J e 5.4 J . Os mecanismos que regulam o acúmulo de neutrófilo nos pulmões e aumentam a permeabilidade microvascular, assim como aqueles que exercem efeito protetor contra a severidade de tais disfunções pulmonares, também foi descrito por (Cavriani et al., 2004).

O presente estudo mostrou pela primeira vez o efeito do tratamento com laser de baixa potência na inflamação pulmonar em modelo de I/R-i em ratos e camundongos. A contribuição dessa investigação foi determinar a capacidade da

terapia com laser, de forma não invasiva, aplicada por alguns minutos em modular a expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias nos pulmões que facilita a restauração do equilíbrio entre a ação daquelas citocinas, que são fundamentais para manutenção da homeostasia. E o importante foi que observamos que o tratamento com laser atua de maneira diferente em relação ao seu efeito anti inflamatório quando aplicado em diferentes espécies, por exemplo, rato e camundongo, pois quando utilizamos o tratamento com laser (Dose: 1.3 J , Tempo: 42 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm) em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por E. Coli em ratos, o laser foi capaz de reduzir significativamente a concentração de neutrófilos, observado de forma indireta pela redução da expressão de mieloperoxidase, e foi capaz de reduzir a expressão do RNAm e síntese proteica de IL-1 $\beta$  em comparação ao grupo inflamado. Porém, quando utilizamos o tratamento com laser (Dose: 0.78 J, Tempo: 26seg, Potência: 30mW, Comprimento de Onda: 660nm), em modelo de desconforto respiratório agudo induzido por I/R-i observamos que o laser não foi capaz de reduzir a concentração de neutrófilos pela redução da expressão de mieloperoxidase, e a síntese proteica de IL-1 $\beta$ . Porém, quando observamos a expressão do RNAm e síntese proteica de TNF- $\alpha$  o laser foi capaz de reduzir significativamente essa citocina. Esses resultados podem sugerir que a redução do influxo de neutrófilos e das citocinas pró inflamatórias seja iniciado por um mecanismo dependente da redução dos níveis de TNF- $\alpha$  que é produzido por mastócitos, depois de sintetizado induz a produção de outros mediadores inflamatórios, como por exemplo, IL-1 $\beta$ .

Em relação ao efeito do tratamento com laser sobre a síntese de TNF- $\alpha$  induzido por I/R-i, nossos resultados mostraram que o laser reduz a expressão de RNAm e síntese proteica de TNF- $\alpha$  no tecido pulmonar quando comparados aos animais inflamados. Dessa forma, podemos dizer que o tratamento com laser mostra-se eficaz utilizando os seguintes parâmetros (Dose: de 0.78 – 5.8 J, Tempo: 42 seg – 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) em ratos e camundongos.

De maneira complementar a esses efeitos do laser de baixa potência diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, investigamos também os efeitos do laser de baixa potência sobre a citocina pró-inflamatória IL-10. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória (Pajkrt et al., 1997) presente em níveis elevados no plasma de modelos animais de inflamação pulmonar aguda e inibe a

liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF), prevenindo o dano tecidual (Lo et al., 1998). Esses achados destacam a importância potencial do equilíbrio das citocinas anti versus pró-inflamatórias na inflamação pulmonar aguda, o que corrobora com a relação de IL-10 e TNF nos pulmões.

Nossos resultados a respeito do tratamento com laser na expressão do RNAm e síntese proteica de IL-10 de animais (ratos e camundongos) com desconforto respiratório induzido por I/R-i, mostraram que o laser foi capaz de aumentar significativamente os valores de IL-10 entre os seguintes parâmetros (Dose: 0.78 J– 5.4 J, Tempo: 26 seg – 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm). Interessantemente, quando utilizamos o tratamento com laser (Dose: 5.8 J, Tempo: 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) em camundongos, observamos que o laser possui um efeito contrário ao esperado, ou seja, ele diminuiu a síntese proteica de IL-10 no tecido pulmonar de animais submetidos a I/R-i.

Esses resultados estão de acordo com os resultados de Souza & Teixeira (2005) que evidenciaram um aumento dessa citocina anti-inflamatória no pulmão de animais submetidos à I/R-i severa. Esses resultados são interessantes devido ao fato de, como relatado anteriormente, a presença do TNF- $\alpha$  em condições de inflamação levar ao aumento de IL-10, como um mecanismo de auto-defesa do organismo em resposta à injúria. Além disso, a maioria dos estudos usando modelo animal reconhecem que a diminuição do TNF- $\alpha$  é acompanhada pelo aumento de IL-10 (Inoue et al., 2000). Nossos resultados corroboram com esses autores, uma vez que foi observado que o laser de baixa potência diminuiu a expressão de TNF- $\alpha$  enquanto aumentou a expressão de IL-10. Considerando essa observação, o que era esperado com o tratamento com laser era que os níveis de IL-10 pudesse também ser reduzido, uma vez que com menos TNF- $\alpha$ , a IL-10 anti inflamatória poderia também ser reduzida. Entretanto, o tratamento com laser apresentou resultado oposto. O fato é que, o tratamento com laser reduziu o níveis de TNF- $\alpha$  ao mesmo tempo que aumentou os níveis de IL-10 nos pulmões, sugerindo um efeito não dependente do laser sobre essas citocinas. Possivelmente, o tratamento com laser esteja agindo por mecanismos distintos em cada citocina. Por isso, nesse estudo, os animais submetidos à I/R-i foram tratados com anticorpo anti- TNF- $\alpha$ , irradiados com laser (Dose: 5.4 J, Tempo: 3 min, Potência: 30 mw, Comprimento de

Onda:660 nm) e então foi mensurado os níveis de IL-10 nos pulmões. Nossos resultados mostraram que as concentrações de IL-10 foram nitidamente reduzidas pelo anticorpo anti TNF- $\alpha$ , entretanto, as concentrações de IL-10 foram aumentadas quando comparadas aos animais do grupo basal. Isso pode ser explicado pelo fato de que o TNF- $\alpha$  não é a única citocina capaz de induzir a formação de IL-10. Souza et al. (2005) demonstraram que a citocina pró inflamatória IL-1 $\beta$  é muito importante para a geração de IL-10. Esses resultados mostraram que apesar do tratamento com anticorpo anti TNF- $\alpha$  o efeito do laser é mantido, aumentando a concentração proteica de IL-10 nos pulmões de ratos 4h após a reperusão intestinal. Isso reforça a hipótese de que o laser possa agir sobre a IL-10 por um mecanismo independente do efeito do TNF- $\alpha$ . Considerando que o tratamento com laser poderia reduzir as concentrações de TNF- $\alpha$  via aumento de IL-10, nós bloqueamos a participação da IL-10 na inflamação pulmonar aguda induzida por I/R-i usando anticorpos anti IL-10. Curiosamente, nossos resultados demonstram que na ausência de IL-10, as concentrações de TNF- $\alpha$  foram aumentadas pós I/R-i em comparação ao grupo basal. Entretanto, os níveis de TNF- $\alpha$  nos pulmões de animais pré tratados com anticorpo anti IL-10 e submetidos a I/R-i foi nitidamente aumentado em relação aos animais submetidos a I/R-i mas não tratados com laser. Esses resultados sugerem que o laser tenha ação sobre o TNF- $\alpha$  e a IL-10 de maneira independente, ou seja, o laser reduziu os efeitos do TNF- $\alpha$  na inflamação pulmonar aguda por uma sinalização celular que não depende do efeito do aumento dos níveis de IL-10.

Ao mesmo tempo, tentamos identificar a possível relação entre os mediadores da inflamação pulmonar liberados nos pulmões e a disfunção de reatividade das vias aéreas durante a I/R-i a fim de determinar se o efeito do laser, diminuindo a expressão de TNF e iNOS e aumentando a expressão de IL-10 teria algum efeito sobre a reatividade pulmonar.

No que diz respeito à disfunção da reatividade de vias aéreas, Coelho et al., (2007), afirmam que observaram uma redução da reatividade brônquica 2 horas após a reperusão intestinal e isso é dependente da circulação linfática que drena IL-1 $\beta$  produzido localmente no intestino e carregado para os pulmões através da circulação pulmonar. Ainda sobre a reduzida reatividade brônquica, Coelho et al., (2007) relata que a IL-1 $\beta$  derivada da reperusão intestinal pode



estimular iNOS pulmonar, e a aumentada ativação da iNOS é responsável por diminuir a resposta de reatividade das vias aéreas à agonistas colinérgicos. Relatos sobre os efeitos do NO na I/R-i foram descritos por Cuzzocrea et al., (2002), que mostrou que em resposta à I/R-i, o NO causa hipotensão e hiporesponsividade a agentes vasoconstritores. Nesse sentido, Amaredes et al., (2005), demonstraram que o aumento da produção de NO está associado com a hipo-reatividade de vias aéreas na ausência de IL-10 e esse efeito é reversível pela inibição do NO. Na ausência de IL-10, que também é capaz de minimizar a hiper-reatividade de vias aéreas induzida por TNF- $\alpha$  de acordo com Guiki (2011), a produção de NO é aumentada por um mecanismo compensatório para controlar o tônus das vias aéreas contra a hiper-reatividade.

Nosso resultados mostraram que em relação à INOS, quando mensuramos a expressão do RNAm de INOS de animais (ratos) submetidos a I/R-i o grupo inflamado os valores referentes ao grupo inflamado foram significativamente maiores quando comparados ao grupo basal. Quando tratamos os animais com laser (Dose: 5.4 J , Tempo: 3 min, Potência: 30 mw, Comprimento de Onda: 660 nm), observamos que o laser foi capaz de reduzir os valores de INOS nos tempos de 2h e 4h de reperfusão, porém não foi capaz de reduzir a expressão do RNAm de INOS no tempo de 30 min. Possivelmente esse resultado seja devido ao curto período de tempo que o laser teve para exercer sua ação no grupo de 30 min.

No que diz respeito ao efeito anti-inflamatório da citocina IL-10 e NO na disfunção da reatividade de vias aéreas, Amaredes et al., (2005), demonstraram que o aumento da produção de NO está associado com a hipo-reatividade de vias aéreas na ausência de IL-10 e esse efeito é revertido pela inibição de NO. Curiosamente, 2 horas após a reperfusão intestinal, a produção dessa citocina anti-inflamatória foi maior que em outros tempos estudados. Isso pode ser explicado pela ausência de cNOS derivado de NO, desde que Coelho et al., (2007) demonstrou que após 2 horas de reperfusão intestinal, a expressão cNOS pulmonar não aumenta e o sistema pulmonar tenta controlar a disfunção de vias aéreas pelo aumento da produção de IL-10, o que é capaz de modular a exacerbação da síntese de iNOS derivado de NO.

No tempo de 4 horas de reperfusão intestinal, a hiper-reatividade traqueal apresenta-se ainda maior do que no tempo de 30 minutos após a

reperfusão. Nesse período, a expressão proteica e RNAm de IL-10 estão elevados porém menores do que os valores observados no tempo de 2 horas após a reperfusão. Com uma menor concentração de IL-10, a reatividade traqueal tende a aumentar. Nossos resultados mostram que a I/R-i induz disfunção de músculo liso que culmina em hiper-reatividade.

O iNOS derivado de NO está relacionado a mudanças funcionais de reatividade traqueal, e nossos resultados sugerem que isso pode ser uma resposta adaptativa do sistema pulmonar à I/R-i, que modula o tônus do músculo liso. Nossos resultados também sugerem que iNOS participou na hiper-reatividade observada 30 minutos e 4 horas após a reperfusão intestinal mas que a IL-10 desempenhou um importante papel na resposta compensatória para contrabalancear o aumento na reatividade de vias aéreas observada 2 horas após a reperfusão. Quatro horas após a reperfusão intestinal, a hiper-reatividade traqueal tornou-se aguda novamente, provavelmente porque a continuidade dos níveis altos de ambos, TNF e iNOS e o fato da expressão proteica e RNAm de IL-10, que é capaz de controlar o efeito das citocinas pró-inflamatórias, que foram reduzidas a níveis menores em comparação aos outros períodos de reperfusão. Com base nessas observações, podemos dizer que os melhores parâmetros para aumentar a expressão do RNAm e síntese proteica de IL-10 são entre os valores de (Dose: 0.78 J– 5.4 J, Tempo: 26 seg – 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm). Um dado importante que observamos é que utilizando os parâmetros de (Dose: 5.8 J, Tempo: 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm) o tratamento com laser em inflamação pulmonar em camundongo, não estimula o aumento de IL-10 e sim, sua redução. No que diz respeito a expressão de iNOS observamos que o tratamento com laser (Dose: 5.4 J, Tempo: 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) em inflamação pulmonar induzida por I/R-i em ratos, esses parâmetros foram eficientes em redução a expressão da enzima iNOS nos tempos de 2h e 4h de reperfusão.

ICAM-1 é uma molécula de adesão que facilita o tráfico de neutrófilos para os pulmões e tem sua expressão aumentada na superfície endotelial dos pulmões durante ALI/ARDS. Em pacientes com ALI/ARDS altos níveis solúveis de ICAM-1 em fluido de edema pulmonar são associados com mortalidade, de acordo com McClintock et al. (2008). Com relação a inflamação pulmonar induzida por modelo animal de I/R-i, alguns autores relatam a expressão do

RNA<sub>m</sub> de ICAM-1 (Tian et al. 2006; Souza et al. 2004). Nossos resultados mostraram que utilizando o tratamento com laser (Dose: 5.4 J , Tempo: 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm), o laser foi eficaz ao reduzir a expressão de ICAM-1 no tecido pulmonar de ratos submetidos à I/R-i. Esse resultado sugere fortemente que uma diminuição na concentração de neutrófilos pulmonares pelo laser pode estar diretamente relacionado ao efeito dessa terapia na interação leucócito –endotélio, tanto que, o laser reduziu a expressão do RNA<sub>m</sub> de ICAM-1 nos pulmões após I/R-i, e no mesmo período estudado, reduziu a expressão de mieloperoxidase e permeabilidade vascular pulmonar.

A IL-6 é um dos mais importantes mediadores na febre, e na ARDS altos níveis de IL-6 no plasma e BALF são preditivos de piores resultados. A IL-6 ativa tanto mediadores pró e anti inflamatórios, com aumento dos níveis em resposta ao LPS em modelo experimental (Zhao et al., 2012). Níveis elevados de IL-6 no plasma, foi encontrado em pacientes com risco de desenvolver ARDS, com critérios em 48 horas (Bouros et al., 2004). Nossos resultados mostraram que o tratamento com laser (Dose: 0.78 J - 5.8 J , Tempo: 26 seg – 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660nm) foi eficaz ao reduzir a expressão do RNA<sub>m</sub> e síntese proteica de IL-6 em inflamação pulmonar induzida por I/R-i em camundongos.

De acordo com nossos resultados, concluímos que a terapia com laser de baixa potência pode ser utilizada como coadjuvante no tratamento da inflamação pulmonar, pois é eficaz ao reduzir os níveis de citocinas pró inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, INOS) e ao mesmo estimula a síntese de citocina anti inflamatória (IL-10). O laser também atua na melhora da interação leucócito endotélio pois vimos que foi capaz de reduzir os níveis de ICAM-1, a concentração de neutrófilos em tecido pulmonar por medida direta e indireta, e a permeabilidade vascular pulmonar. O tratamento com laser também se mostrou eficaz em relação a reatividade de músculo liso de traquéia, ao diminuir e hiperreatividade apresentada nos tempos de 30 min e 4h de reperfusão e ao reverter a hiporreatividade no tempo de 2h de reperfusão, isso também está diretamente relacionado ao efeito do laser sobre a expressão da enzima INOS. Esses resultados foram observados em modelo experimental de inflamação pulmonar induzida por I/R-i em ratos e camundongos.

## 12. Conclusão:

Concluimos que o tratamento com laser de baixa potência, nas doses estudadas foi eficaz na inflamação pulmonar induzida por I/R-i. Nossos resultados mostram que o laser reduziu a migração de células inflamatórias e o edema. Em relação à expressão de iNOS o laser também mostrou-se eficaz ao reduzir sua expressão, e isso indica um efeito do tratamento com laser na reatividade de traquéia, visto que na I/R-i a reatividade de traquéia está diretamente relacionada as concentrações de NO e IL-10. Em relação à expressão do RNAm e síntese proteica de mediadores pró inflamatórios (IL-1, IL-6 e TNF-) o laser mostrou reduzir esses valores, e aumentar a síntese proteica de IL-10, por mecanismos distintos, mostrando seu efeito anti-inflamatório, e reparador das disfunções da reatividade de vias aéreas. A dose de 3.9 J foi a que apresentou resultados significantes para todos os parâmetros estudados em modelo de camundongo.

Para detalhamento do resultado, descrevemos em tópicos os efeitos, os parâmetros utilizados do laser com dose, tempo, potência, comprimento de onda.

### Detalhamento dos resultados: estudo dose-resposta

1. O tratamento com laser apresenta efeito no citoesqueleto endotelial, que é o motor molecular que move o rearranjo do citoesqueleto não muscular de actina, no parâmetro de (Dose:  $1.3 \text{ J/cm}^2$  , Tempo: 42 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) em ratos.
2. Em relação ao infiltrado de neutrófilos (direto e indireto), o laser mostrou –se eficaz (Dose:  $1.3 \text{ J/}$  - $5.4 \text{ J/}$  , Tempo: 42 seg- 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) ao reduzir a expressão de mieloperoxidase e concentração direta de neutrófilos em inflamação pulmonar em ratos.
3. Em relação ao infiltrado de neutrófilos em camundongos, o laser mostrou –se eficaz ao reduzir a expressão de mieloperoxidase nos parâmetros de; (Dose:  $2.37 \text{ J}$  -  $5.8 \text{ J}$ , Tempo: 1 min e 19 seg- 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm).
4. Ainda em relação a interação leucócito endotélio, observamos o efeito do laser na expressão de ICAM-1 onde os melhores parâmetros foram (Dose:  $1.3 \text{ J/cm}^2$  -

- 5.4 J/cm<sup>2</sup> , Tempo: 42 seg – 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) para o redução da expressão do RNAm de ICAM-1 em ratos.
5. O efeito do laser sobre a IL-1 $\beta$  em ratos foi significativo com os seguintes parâmetros (Dose: 1.35 J/cm<sup>2</sup> - 5.4 J/cm<sup>2</sup> , Tempo: 42 seg- 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm).
  6. O efeito do laser sobre a expressão do RNAm e síntese proteica de IL-6 em ratos mostrou uma redução significativa com os parâmetros (Dose: 1.3 J/cm<sup>2</sup> – 5.4 J/cm<sup>2</sup> ,Tempo: 42 seg – 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm). Em relação a irradiação em camundongos, observamos que os melhores parâmetros estão entre (Dose: 0.78 J/ - 5.8 J/ , Tempo: 26 seg – 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm).
  7. O laser mostrou –se eficaz também ao estimular a síntese de citocina anti inflamatória (IL-10) em ratos e camundongos. Em ratos, o melhor parâmetro (Dose: 5.4 J, Tempo: 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) nos tempos de 2h e 4h de reperusão . Em camundongos, as melhores doses são: (Dose: 0.78 J/cm<sup>2</sup> - 3.9 J/cm<sup>2</sup> , Tempo: 26 seg – 2 min e 10 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm).
  8. Uma conclusão importante é que o laser não estimula o aumento e sim a redução da síntese de IL-10 com o parâmetro de (Dose: 5.8 J, Tempo: 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) em camundongos.
  9. O laser mostrou-se eficaz ao reduzir os valores de IL-6 com os seguintes parâmetros (0.78 J - 5.8 J, Tempo: 26 seg – 3 min e 16 seg, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) em camundongos.
  - 10.O laser mostrou –se eficaz ao reduzir a expressão de INOS em homogenato de pulmão de rato com parâmetro de: (Dose: 5.4 J/cm<sup>2</sup> , Tempo: 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm).
  - 11.Em relação a reatividade de traqueia frente a estímulo colinérgico, o parâmetro de (Dose; 5.4 J, Tempo: 3 min, Potência: 30 mW, Comprimento de Onda: 660 nm) o laser reduz a hiperreatividade apresentada nos tempos de 30 min e 4h de reperusão e restaura a hiporreatividade apresentada em 2h de reperusão, em modelo de inflamação pulmonar inuzida por I/R-i em ratos.

### 13. Referências Bibliográficas:

1. AIMBIRE, F., DE LIMA, F.M., COSTA, M.S. et al. Effect of low level laser therapy on bronchial hyperresponsiveness. **Lasers Med Sci.** v. 24, n. 4, p. 567-576, 2009.
2. AMAREDES, B.T.; SETHI, J.M.; LIU, H.L.; et al. Enhanced nitric oxide production associated with airway hyperresponsiveness in the absence of IL-10. **Am Physiol Lung Cell Mol Physiol.** n.288, p.868-873, 2005.
3. ASHBAUGH, D.G., BIGELOW, PETTY, T.L., et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet.** v. 12, n. 2, p. 319-323, 1967.
4. ASTI, C., MELILLO, G., CASELLI, G.F., et al. Effectiveness of carbocysteine lysine salt monohydrate on models of airway inflammation and hyperresponsiveness. **Pharmacol Res.** v. 31, n. 6, p. 387-392, 1995.
5. BARNES, P.J. Neural control of human airway in health and disease. **Am Rev. Respir Dis.** n.134, p.1289-1314, 1986.
6. BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med.** v.16, n.4, p.331-342, 1995.
7. BATHIA, M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. **Curr Drug Targets – Infl Allergy** v.1, p. 343-351, 2002.
8. BERNARD, G.R. Research in sepsis and acute respiratory distress syndrome: are we changing course? **Crit Care Med.** v.27, n.2, p. 434-436, 1999.
9. BHARGAVA, M., WENDT, C.H. Biomarkers in acute lung injury. **Transl. Res.** v. 159, n. 4, p. 205-217, 2012.
10. BOUROS, D., ALEXANDRAKIS, M.G., ANTONIOU, K.M. et al. The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. **BMC Pulm Med.** v. 17, n. 4, p.6, 2004.
11. BROIDE, D.H.; LOTZ, M.; CUOMO, A.J.; et al. Cytokines in symptomatic asthma airway. **J Allergy Clin Immunol.** V.89, n.5, p. 958-967, 1992
12. CALFEE, C.S., EISNER, M.D., WARE, L.B. et al. Trauma associated lung injury differs clinically and biologically from acute lung injury due to other clinical disorders. **Crit Care Med.** v. 35, n. 10, p. 2243-2250, 2007.

13. CAVRIANI, G.; DOMINGOS, H.V.; SOARES, A.L.; et al. Lymphatic system as a path underlying the spread of lung and gut injury after intestinal ischemia reperfusion in rats. **Shock**. v.23, n.4, p.330-336,2005.
14. CAVRIANI,G.;OLIVEIRA-FILHO,RM.;TREZENA,A.G.;DA SILVA,ZL.;DOMINGOS,H.V.;ARRUDA,M.J.C.;JANCAR,S.;TAVARES DE LIMA,W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in rat modelo f intestinal ischemia – reperfusion. **Eur. J. Pharmacol.** v.494,p.241-249,2004.
15. CAVRIANI,G.;OLIVEIRA-FILHO,RM.;TREZENA,A.G.;DA SILVA,ZL.;DOMINGOS,H.V.;ARRUDA,M.J.C.;JANCAR,S.;TAVARES DE LIMA,W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in rat modelo f intestinal ischemia – reperfusion. **Eur. J. Pharmacol.** v.494,p.241-249,2004.
16. CERQUEIRA, N.F.;HUSSNI, C.A.; YOSHIDA, W.B. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir. Bras** v.20, n.4, p. 336-343,2005.
17. CHEN,L.W.;EGAN,L.;LI,Z.W.;GRETEN,F.R.;et al. The two faces of IKK and NF-KB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia reperfusion. **Nature medicine**. v.9, n.5, 2003.
18. CINTRA,A.E.;MARTINS,J.L.;PATRICIO,F.R.;HIGA,E.M.;MONTERO,E.F. Nitric oxide levels in the intestines of mice submitted to ischemia and reperfusion. v.40,n.3,p.830-835,2008.
19. COELHO, F.R.; CAVRIANI, G.; SOARES, A.L.; et al. Lymphatic borne IL 1 beta and the inducible isoform of nitric oxide synthase trigger the bronchial hyporesponsiveness after intestinal reperfusion in rats. **Shock**. v.28, n.6, p.694-699,2007.
20. CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P.; MAZZONE, A.; et al. Role of induced nitric oxide in the inhibition of the inflammatory response after postischemia injury. **Shock** v.18, p.169-176,2002
21. DEITCH, E.A. Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure. **Curr Opin Crit Care**. v. 7, p.92-98,2001.
22. DESAI, S.R. Acute respiratory distress syndrome: imaging of the injured lung. **Clin Radiol** v.57, p.8-17,2002.
23. DUSHIANTHAN, A., GROCOTT, M.P., POSTLE, A.D. et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. **Postgrad Med J**. v. 87, n. 1031, p. 612-622, 2011.

24. EGLEN,R.;HEGDE,S.;WATSON,N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacol Rev.** n.48, p. 531-565,1996.
25. EMALA,C.;CLANCY,J.;HIRSHMAN,C. Glucocorticoid treatment muscarinic receptor expression in canine airway smooth muscle. **Am. J. Physiol.** n.272,p.745-751,1997.
26. ESPOSITO,E.;MAZZON,E.;GENOVESE,T.;et.al. Splanchnic ischemia and reperfusion injury is reduced by genetic or pharmacological inhibition of TNF-alpha. **J Leukoc Biol.** v. 81, n. 4, p.1032-1043,2007.
27. EVANS,C.;JACOBY,B.;GLEICH,J, et al. Antibody to eosinophil major basic protein protects M2 receptor function in antigen challenged guinea pigs in vivo. **J Clin Invest.** n.100, p.2254-2262,1997
28. FRYER,A.;JACOBY,D. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. **Am J Respir Crit Care Med.** n.158,p.154-160,1998.
29. GAINES, G.C.; WELBORN, M.B.; MOLDAWER, L.L.; ET.AL. Attenuation of skeletal muscle ischemia reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. **J Vasc Surg.** v.29, n.2, p. 370-376,1999
30. GRACE, P.A. Ischemia reperfusion injury. **Br J Surg.** v.81, p.637-647,1994.
31. GREENE, K.E., YE, S., MASON, R.J. et al. Serum surfactant protein- A levels predict development of ARDS in at risk patients. **Chest.** n. 116, p. 90-91, 1999.
32. GROSS, A.J.; HERRMANN, T.R.W. History of lasers. **World J Urol.** v.25, p. 217-220,2007.
33. HADDAD, E.B.; ROUSSEL, J. Regulation of expression and function of the M<sub>2</sub> muscarinic receptor. **Trends Pharmacol Sci.** v.19, n.8, p.322-327; 1998.
34. HALLDORSSON, A.O.; KRONON, M.T.; ALLEN, B.S.; RAHMAN, S.; WANG, T. Lowering reperfusion pressure reduces the injury after pulmonary ischemia. **Ann Thorac Surg.** v.69, n.1, p.198-203;2000.
35. HAYES, M.; CURLEY, G.; ANSARI, B.; et al. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome- hope or hype? **Crit Care.** v.16, n.2, p. 205. 2012.
36. HECHT, J. Laser pioneers. **Rev Sub edition.** Elsevier,Oxford, 1991.



37. HERRIDGE, M.S., ANGUS, D.C. Acute lung injury-affecting many lives. **N Engl J. Med.** v. 353, n. 16, p. 1736-1738, 2005.
38. HUBER, T.S.; GAINES, G.C.; WELBORN, M.B.R.D.; ROSENBERG, J.J.; SEEGER, J.M.; MOLDAWER, L.L. Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. **Shock.** v.13, n.6, p.425-434,2000.
39. IDELL, S., KOENIG, K.B., FAIR, D.S. et al. Serial abnormalities of fibrina turnover in evolving adult respiratory distress syndrome. **Am. J. Physiol.** v.261, n.4, p.240-248, 1991.
40. INOUE, G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS induced acute lung injury. **J. Infect Chemother.** .v. 6, n. 1, p. 51-60, 2000.
41. ITO, K.; OZASA, H.; KOJIMA, N.; ET AL. Pharmacological preconditioning protects lung injury induced by intestinal ischemia/ reperfusion in rats. **Shock** v.19, p.462-468, 2003
42. KABAY, B.; AYTEKIN, F.O.; AYDIN, C.; OZER, A.; KABAY, N.; TEKIN, K.; SUNGURTEKIN, U.; ERDEM, E.; OZDEN, A. Interleukin-10 gene therapy attenuates pulmonary tissue injury caused by mesenteric ischemia-reperfusion in a mouse model. **Tohoku J Exp Med.** v.207, n.2, p.133-142,2005.
43. KARU, T. Low Power Laser Therapy. **Biomedical Photonics Handbook**, v.3, p. 1-25, 2003
44. KARU, T.I.; PIATIBRAT, L.V.; KALENDU, G.S. Radiation-modifying effect of UV and visible laser light. **Radiobiologia.** v.27, n.6, p.804-809,1987.
45. KASHANSKAIA, E.P., FEDOROV, A.A. Low intensity laser radiation in the combined treatment of patients with chronic obstructive bronchitis. Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. n. 2, p. 19-22, 2009.
46. KUZU, M.A., KOKSOY, C., KUZU, I., et al. Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia reperfusion. **Am. J. Surg.** v. 183, n.1, p. 70-74.
47. LAPORTE, J.D.; MOORE, P.E.; PANETTIERI, R.A.; et al. Prostanoids mediate IL1 $\beta$  induced  $\beta$  adrenergic hyporesponsiveness in human airway smooth muscle cells. **Am J Physiol** v.275, n.3, p. 491-501, 1998
48. LEAVELL, K.J., PETERSON, M.W., GROSS, T.J. The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 14, n.1, p. 53-60, 1996.

49. LEFORT, J., NAHORI, M.A., RUFFIE, C., et al. In vivo neutralization of eosinophil-derived major basic protein inhibits antigen induced bronchial hyperreactivity in sensitized guinea pigs. **J. Clin Invest.** v. 97, n. 4, p. 1117-1121, 1996.
50. LEWANDOWSKI,K.;LEWANDOSKI,M. Epidemiology of ARDS. **Minerva Anesthesiol.** v.72,n.6,p.473-477,2006.
51. LI,Y.;XIANG,M.;YUAN,Y.;XIAO.;ZHANG,J.;JIANG,Y.;VODOVOTZ,Y, et al. Hemorrhagic shock augments lung endothelial cell activation: role of temporal alterations of TLR4 and TLR2. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.297,n.6,p.1670-1680,2009.
52. LO, C.J., FU, M., CRYER, H.G. Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome. **J. Surg. Res.** v. 79, n. 2, p. 179-184, 1998.
53. LOUIE, S., ZEKI, A.A., SCHIVO, M. et al. The asthma chronic obstructive pulmonar disease overlap syndrome: pharmacotherapeutic considerations. **Expert Rev Clin Pharmacol.** v. 6, n. 2, p. 197-219, 2013.
54. MAFRA DE LIMA, F.; COSTA, M.S.; ALBERTINI, R. Low level laser therapy (LLLT): Attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta adrenergic hyporesponsiveness and TNF alpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli Lipopolysaccharide- induced airway inflammation by a NF-KB dependent mechanism. **Lasers in Surgery and Medicine.** 41: 68-74,2009.
55. MAFRA DE LIMA, F.; MOREIRA, L.M.; VILLAVERDE, A.B. Low level laser therapy (LLLT) acts as cAMP elevating agent in acute respiratory distress syndrome. **Lasers Med Sci.** DOI: 10.1007/s10103-010-0874-x. 2010
56. MAIMAN, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature.** v.187, p.493-494,1960.
57. MCCLINTOCK, D., ZHUO, H., WICKERSHAM, N., et al. Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury. **Crit Care Med.** 12:R41, 2008.
58. MIKHAILOV, V.A., ALEKSANDROVA, OLU., GOLDINA, E.M. The immunomodulating action of low energy laser radiation in the treatment of bronchial asthma. **Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.** n. 4, p. 23-25, 1998.

59. MILOJEVIĆ, M.; KURUC, V. Low Power laser biostimulation in the treatment of bronchial asthma. **Med Pregl.** v.56, n.9-10, p.413-418,2003.
60. MINNICH, D.J., BRYANT, A.S., DOOLEY, A. et al. Photodynamic laser therapy for lesions in the airways. **Ann Thorac Surg.** v. 89, n. 6, p. 1744-1748, 2010.
61. NADEL,J.;BARNES,P. Autonomic regulation of the airways. **Ann Rev. Med.** v.35,p.451-467,1984.
62. NIKOLAEVA, O.D. Use of electropuncture diagnostics and laseropuncture in patients with pulmonary tuberculosis. **Lik Sprava.** n. 1-2-, p.31-34, 2006.
63. OLDMAN, M.A.; WHITE, E.; WARE, L.B.; ET.AL. Pulmonary edema from patients with early lung injury stimulates fibroblast proliferation through IL 1 $\beta$  induced IL6 expression. **J Immunol.** v.172, n.4, p.2668-2677,2004
64. PAJKRT, D., VAN DER POLL, T., LEVI, M., et al. Interleukin-10 inhibits activation of coagulation and fibrinolysis during human endotoxemia. **Blood.** v. 89, n. 8, p.2701-2705, 1997
65. PELOSI, P. What about primary and secondary ARDS. **Minerva Anesthesiol.** v. 66, n. 11, p. 779-785, 2000.
66. PIDAEV, A.V. A mathematical assessment of the efficacy of the methods for treating patients with chronic nonspecific lung diseases at a health resort. **Lik Sprava.** v.6, p.168-172,1997
67. PINHEIRO, A.L.B.; JR, A.B. **Laseres na odontologia moderna.** Ed. Pancast. São Paulo. 1998.
68. PONTINEN, P.J. Low level laser therapy as a medical treatment modality. **Art Urpo Ltda.**
69. PUGIN, J., VERGHESE, G., WIDMER, M.C. et al. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med.** v. 27, n. 2, p. 304-312, 1999.
70. RAYMONDOS, K., MARTIN, M.U., SCHMUDLACH, T., et al. Early alveolar and systemic mediator release in patients at different risks for ARDS after multiple trauma. **Injury.** v. 43, n. 2, p. 189-195, 2012.
71. ROFFEL, A.;ELZINGA,C.;ZAAGSMAN,J. Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. **Pulm Pharmacol.** n.3, p. 47-51,1990.

72. RUBENFELD, G.D. Epidemiology of acute lung injury. **Crit Care Med.** v.31, n.4, p.S 276-284. 2003.
73. RUBENFELD, G.D.; CALDWELL, E.; PEABODY, E.; WEAVER, J.; MARTIN, D.P.; NEFF, M. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med.** n.353, p.1685-1693, 2005.
74. SCARABELLI, T.M.; STEPHANOU, A.; PASINI, E.; COMINI, L.; RADDINO, R.; KNIGHT, R.A.; LATCHMAN, D.S. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. **Circ Res. Apr** v.90, n.6, p.745-748, 2002.
75. SCHULTHEIS, A.; BASSETT, D.; FRYER, A. Ozone induced airway hyperresponsiveness and loss of neural M2 muscarinic receptor function. **J Appl Physiol.** n.76, p.1088-1097, 1994.
76. SCHWANTZ, D.A.; CHRIST, W.J.; KLEEBERGER, S.R.; WOHLFORD-LENANE, C.L. Inhibition of LPS induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation by LPS antagonist. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.280, n.4, p.771-778, 2001.
77. SIROTKOVIĆ-SKERLEV, M.; PLESTINA, S.; BILIĆ, I.; KOVAC, Z. Pathophysiology of ischaemia –reperfusion injury. **Lijec Vjesn.** v.128, n.3-4, p.87-95, 2006.
78. SOUZA, D.; LOMEZ, E.; PINHO, V. et al. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. **J Immunol.** 172:2542-2548, 2004.
79. TAKALA, A., NUPPONEN, I., KYLANPAA-BACK, M.L. et al. Markers of inflammation in sepsis. **Ann Med.** v. 34, n. 7-8, p. 614-623, 2002.
80. TIAN, X.; YAO, J.; ZHANG, X.; et al. Effect of nuclear factor kappa B on intercellular adhesion molecule-1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. **World J Gastroenterol.** 12:288-392, 2006.
81. TOMASHEFSKI, J.F. JR. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clin Chest Med.** v.21, n.3, p.435-466, 2000.
82. VAN SOEREN, M.H.; DIEHL-JONES, W.L.; MAYKUT, R.J.; HADDARA, W.M. Pathophysiology and implication for treatment of acute respiratory distress syndrome. **AACN Clin Issues** v.11, p.179-197, 2000.
83. WARE, L.B.; MATTHAY, M.A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med.** v.342, n.18, p.1334-1349, 2000.

84. WATKINS,A.C.;CAPUTO,F.J.;BADAMI,C.; et al. Mesenteric duct lymph ligation attenuates lung injury and neutrophil activation after intraperitoneal injection of endotoxin in rats. **J Trauma.** v. 64,n.1, p.126-130,2008.
85. WELBORN, M.B.; DOUGLAS, W.G.; ABOUHAMZE, Z.; AUFFENBURG, T.; ABOUHAMZE, A.S.; BAUMHOFER, J.; SEEGER, J.M.; PRUITT, J.H.; EDWARDS, P.D.; CHIZZONITE, R.; MARTIN, D.; MOLDAWER, L.L.; HARWARD, T.R. Visceral ischemia reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. **Shock** v. 6, p.171-176,1996.
86. WHEELER,H.R.;ROCKETT,E.J.;CLARK,I.; et.al. Actinomycin D upregulates lipopolysaccharide induction of macrophage procoagulant expression and tumor necrosis factor alpha production. **Clin Exp Immunol.** v.86,n.2,p.304-310,1991
87. YAMAGASHI, Y.; HORIES, Y.; KATOS, S.; et al. Ethanol modulates gut ischemia reperfusion induced liver injury in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v.282, n.4, p.640-646,2002.
88. YAMAMOTO, S.M.; TANABE, G.; WAKABAYASHI, M.; SHIMAZU, M.; MATSUMOTO, K.; KITAJIMA, M. The role of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  in ischemia reperfusion injury of the rat small intestine. **J Surg Res** v.99, p.134-137,2001.
89. YASUHARA, H. Acute mesenteric Ischemia: The Challenger of Gastroenterology. **Surgery Today.** v.35 p. 185-195, 2005
90. ZHAO, F.; WANG, W.; FANG, Y. et al. Molecular mechanism of sustained inflation in acute respiratory distress syndrome. **J. Trauma Acute Care Surg.** v. 73, n. 5, p. 1106-1113., 2012.