

Universidade Nove de Julho
Departamento de Biofotônica

Clariana Rodrigues Soares

**EFEITO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM ESTUDO CLÍNICO E
EXPERIMENTAL DE ASMA BRÔNQUICA**

São Paulo

2018

Clariana Rodrigues Soares

**EFEITO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM ESTUDO CLÍNICO E
EXPERIMENTAL DE ASMA BRÔNQUICA**

Trabalho de doutorado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Biofotônica da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biofotônica.

Orientador: Ana Paula Ligeiro

Co- orientador: Maria Cristina Chavantes

São Paulo

2018

Soares, Clariana Rodrigues.

Efeito da terapia com laser de baixa intensidade em estudo clínico e experimental de asma brônquica. / Clariana Rodrigues Soares. 2017.

61 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira.

***1. Laser. 2. Asma. 3. LBI. 4. Inflamação pulmonar.
I. Oliveira, Ana Paula Ligeiro de. II. Título***

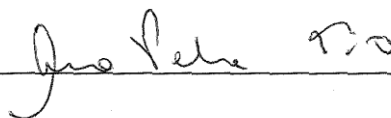
Sgo Paulo, 19 de dezembro de 201a.

TERMO DE APROVA(ÁO)

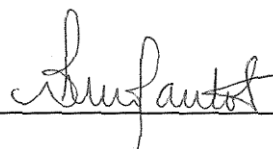
Aluno (a). CLARIANA RODRIGUES SOARES

Titulo da Tese: "Efeito da terapia com laser de baixa intensidade em pacientes portadores de asma brénquica"

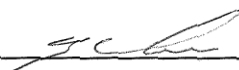
Presidente: PROE'. DRª AGAPAULA LIGETRO DE OLIVEIRA



Membro: PROFª. DRª. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



Membro PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROFª. DRª. BEAIRIZ MANGUEIRA SARAIVA ROMANHOLO

Membro: PROFª. DRª. JUCIANE MARIA DE ANORADE CASTRO



Agradecimentos

À Deus por colocar na minha vida tudo que precisei na hora certa.

À meus pais pelo incentivo, apoio e cuidados de forma incondicional e por estarem ao meu lado em todas as situações. Gostaria de retribuir tudo que fizeram por mim mas não sei se um dia conseguirei.

Ao meu irmão pelo amor e paciência.

À minha orientadora, Ana Paula Ligeiro, por ter me ajudado durante esses três anos.

À Léia e suas pupilas pela disponibilidade, por toda ajuda nos experimentos.

À Alana por ter me ajudado com a citometria.

À professora Cristiane Porta pelo seu incentivo e compreensão.

À Luana Marques pela disponibilidade irrestrita e ajuda para atender os pacientes.

À Nathali Cordeiro por está junto no projeto contribuindo com os atendimentos dos pacientes e intelecto.

À minha iniciação científica, Nayla Cavalcante, por me ajudar nos atendimentos, processamentos das amostras e ainda por ser o meu " lembretinho ".

Agradecimento especial à professora Chavantes pelos seus ensinamentos, por toda sua atenção, apoio, pelas reuniões realizadas nos finais de semana, disponibilidade irrestrita de me ajudar a finalizar este trabalho. Sinceramente, não tenho palavras para dizer o quanto a admiro e o quanto sou grata por tudo. Obrigada por acreditar em mim!!!

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

1. Introdução	1
1.1 Asma brônquica	1
1.1.1. Definição de asma brônquica	2
1.1.2. Epidemiologia	2
1.1.3. Mecanismos celulares e moleculares da asma brônquica	3
1.1.4 Células inflamatórias na asma	6
1.1.5 Citocinas envolvidas na asma	8
1.2 Tratamento convencional: terapia farmacológica	11
1.2.1 Efeitos colaterais dos corticóides	11
1.3. Terapia com laser de baixa intensidade (LBI)	12
1.3.1 Classificação de laser, de acordo com a potência	14
1.3.1.1 Laser de alta potência ou laser cirúrgico (LAP)	14
1.3.1.2 Laser empregando uma potência baixa	14
1.3.2.1 Terapia Fotodinâmica (PDT)	13
1.3.2.2 Estudos celulares <i>in vivo</i>	13
1.3.2.3 Efeitos do laser de baixa intensidade (LBI) em modelos animais “<i>in vivo</i>”	16
1.3.2.4 Efeitos laser de baixa intensidade na clínica	17
1.4 Justificativa	19
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Materiais e métodos	20
3.1 Fase 1	20
3.1.1 Protocolo 1	20

3.1.2 Protocolo 2	21
3.1.3 Critérios de inclusão	21
3.1.4 Critérios de exclusão	21
3.1.5 Emprego da laserterapia	21
3.1.6 Protocolo 1	22
3.1.7 Protocolo 2	22
3.1.8 Espirometria pré e pós broncodilatador	23
3.1.9 Pico de fluxo expiratório	23
3.2 Coleta de sangue periférico	24
3.2.2 Avaliação de citocinas e quimiocinas	24
3.2.3 Fase2	25
3.2.4 Protocolo 3	25
3.2.5 Animais	25
3.2.6 Indução da asma: modelo de inflamação pulmonar. Alergia crônica usando ovoalbumina	25
3.2.7 Terapia com laser de baixa intensidade	25
3.3 Emprego da laserterapia	23
4. Resultados	28
4.1 Protocolo 1- Estudo piloto	
4.1.2 Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número de células recuperadas do escarro induzido	28
4.1.2.3 Protocolo 2 clínico	38
4.1.2.4 Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número de células recuperadas do escarro induzido	
4.2 Fase 2- Protocolo 3	44
5. Discussão	47
6. Conclusão	51
7. Referência	
8. Anexos	
3.6. Coleta e análise do sangue periférico	25
3.7. Coleta e análise do escarro induzido	25

3.8. Avaliação de citocinas e quimiocina no sobrenadante do escarro	25
3.9. Análise estatística	26
4. Resultados	27
5. Discussão parcial	41
6. Referências bibliográficas	45
Anexos	

Lista de Abreviaturas

DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
AB	Asma Brônquica
LBI	Laser de Baixa Intensidade
NO	Oxido Nítrico
IgE	Imunoglobulina E
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
ALAT	Associação Latino Americana de Tórax
Th1	Linfócitos tipo 1
Th2	Linfócitos tipo 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alfa
mW	miliWatts
mW/cm ²	miliWatts por centímetro quadrado
DRC	Doenças respiratórias crônicas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
IL	Interleucina
TNF- α	Fator de necrose tumoral
M1	Macrófago 1
M2	Macrófago 2
TRL	Toll Like Receptors
IFN- γ	Intérferon
TGF- β	Transforming growth factor beta
MMP	Metaloproteinase
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
LAP	Laser de alta potência
PDT	Terapia fotodinâmica
COX	Ciclooxigenase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
LPS	Lipopolissacarídeo

Figura 1. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre o número total de células recuperadas do escarro induzido.....	29
Figura 2. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre o número macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos recuperadas do escarro induzido.....	31
Figura 3. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre a porcentagem de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos recuperados do escarro induzido.....	31
Figura 4. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre a porcentagem de linfócitos totais (follow up).....	32
Figura 5. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade a porcentagem de linfócitos CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ recuperadas do escarro induzido	33
Figura 6. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade o número total de leucócitos circulantes.....	34
Figura 7. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre o número de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos circulantes.....	35
Figura 8. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre o pico de fluxo expiratório e volume expiratório forçado no primeiro minuto.....	36
Figura 9. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre os linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ presentes no escarro induzido.....	38
Figura 10. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre o número total de células recuperadas do escarro induzido.....	39
Figura 11. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre os níveis de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante do escarro induzido	40
Figura 12. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre os níveis de IL 1 β , IL-6, IL-8.....	41
Figura 13. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade sobre o pico de fluxo expiratório	42
Figura 14. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar.	44
Figura 15. Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar.	45

Resumo

SOARES-RODRIGUES,C. **Efeito da Terapia com Laser de Baixa Intensidade em Estudo Clínico e Experimental de Asma Brônquica** (Tese Doutorado). Programa de Pós Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo 2017.

Asma brônquica afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo, trazendo um grande impacto socioeconômico, sendo que 100 milhões de novos indivíduos apresentarão asma brônquica em todo mundo até 2025. A taxa de mortalidade e morbidade se mantém em níveis intoleráveis, associado tanto as altas taxas de hospitalizações quanto os custos com medicação, que se encontram em níveis inaceitáveis. A resistência a medicação e os efeitos colaterais associados a estes têm levado a procura de outras formas de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos adversos. O laser de baixa intensidade (LBI) vem sendo cada vez mais utilizado em estudos experimentais e clínicos para o tratamento de inúmeras patologias inflamatórias, tanto em medicina quanto em áreas afins. Inúmeros estudos revelam que a terapia de fotobiomodulação com Laser e LED, tem sido capaz de reduzir os sintomas da inflamação em várias situações, desde hipertensão arterial crônica, bem como em doenças autoimunes, auxiliando a cicatrização em cirurgia de grande porte. Alguns trabalhos na área pulmonar vêm sinalizando uma resposta eficiente e segura através da redução da expressão de mediadores inflamatórios em animais, tanto na fase aguda quanto na fase tardia com sucesso. O objetivo desse trabalho foi avaliar a terapia de fotobiomodulação em pacientes com asma brônquica moderada e em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar. O estudo foi dividido em 2 fases (**Fase 1- Estudo Clínico Translacional e Fase 2- Estudo Experimental**). Na Fase 1 foi dividido em 2 protocolos: **Protocolo 1 - Estudo Piloto** em um paciente para determinação da dose, sendo que no **Protocolo 2** se consistiu de estudo prospectivo, descritivo, longitudinal, não controlado em pacientes de ambos os sexos, em adultos jovens com diagnóstico de asma brônquica por no mínimo 3 anos, em uso de medicação (broncodilatadores). No Protocolo1 foi utilizado um aparelho CW laser de diodo As-Ga-Al (Arsenieto de Gálio e Alumínio, λ - 660nm, Fluencia-15 J/cm², Energia por ponto de 0,6 J, Potencia - 30 mW, Tempo - 20 segundos por ponto). O número de pontos irradiados foram 16 na região de boca e narinas. Nesta primeira parte, o tratamento constou de 1 aplicação por semana, totalizando 10 semanas de aplicações. No Protocolo 2 foi feito a 1º aplicação com laser de diodo (λ - 660nm, DE- 6,3 J/cm², P - 35 mW, T - 30 segundos por ponto e 1 J de energia acumulada por ponto) e logo em seguida, foi realizada a 2º aplicação com os seguintes parâmetros: (λ - 780nm, DE - 26,3 J/cm², P - 35 mW, T - 30 segundos por ponto, E - 1 J energia acumulada por ponto). O tratamento constou de 2 aplicações por semana, usando os dois parâmetros no mesmo dia, totalizando 22 pontos irradiados. O total foram de 5

semanas de aplicações. Todos os pacientes foram reavaliados após 5 sessões através da análise do escarro induzido por citometria de fluxo e avaliação de citocinas por ELISA. **Na Fase 2 : Experimentação Animal**. Os grupos consistiram de 25 animais, divididos em 5 grupos. Grupo não manipulado (Basal), animais desafiados com ovoalbumina (OVA(72)), animais desafiados com OVA e irradiados com LBI (OVA+L(72h)), animais desafiados com OVA e irradiados com LBI e a aplicação de laser interrompida 2 semanas antes da eutanásia. (OVA+L(2s)), animais desafiados com OVA e irradiados com LBI e a aplicação com laser interrompida 2 semanas antes da eutanásia. (OVA+L(2s)). Foi realizada aplicação em ratos, conforme descrito a seguir : 1° (λ - 660nm, P- 100 mW, T- 30 segundos por ponto); 2° (λ - 808nm, P- 100mW, T- 30 segundos por ponto). Em nosso estudo clinico os resultados demonstraram que a terapia de fotobiomodulação foi capaz de reduzir de forma estatisticamente significativa, o número total de macrófagos, eosinófilos e aumento de linfócitos T CD4 no escarro induzido. Além disso, houve um aumento dos níveis de IL-10 e redução nos níveis de IL-5 no sobrenadante do escarro do Protocolo 1 (Fase 1). No Protocolo 2 observamos também incremento dos níveis de IL-10 e IFN- γ , ademais com redução IL-5, significando uma ação anti-inflamatória do LBI. Nossos resultados experimentais corroboram com os efeitos do laser nos trabalhos apontados na literatura com animais. No estudo em animais foram evidenciados resultados que apontam para um efeito duradouro da laserterapia. Sendo assim, através de nossos dados pode-se concluir que a fotobiomodulação produziu uma ação favorável tanto em animais quanto em pacientes. Desta forma, este trabalho pioneiro denotou uma resposta clínica dinâmica e eficaz sem efeitos colaterais, não obstante se faz necessário uma maior amostra. Nossos resultados, contribuíram para o sucesso do tratamento da asma brônquica com LBI, mostrando, assim, ser uma possível terapia segura, não invasiva e de baixo custo, que poderá vir a ser adotada em políticas públicas no país.

Palavras chaves: asma brônquica, fotobiomodulação, laser de baixa intensidade, inflamação pulmonar, citocinas, Balb/C, resposta clínica.

Abstract

SOARES-RODRIGUES, C. **Effect of Low Level Laser Therapy in Clinical and Experimental Study of Bronchial Asthma** (Doctoral Thesis). Postgraduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Universidade Nove de Julho, São Paulo 2017.

Bronchial asthma affects more than 300 million people worldwide and poses a large socioeconomic burden and over 100 million new asthma patients will be present worldwide by 2025. The morbidity and mortality rate remain at unacceptable levels; associated hospitalization rate and medical costs are still on the upsurge as well. Overreliance on medication and associated adverse drug effects have led to exploration of alternative management modalities. Photobiomodulation therapy (PBMT) has been used in experimental and clinical studies for the treatment of inflammatory diseases. The literature using Low-level laser therapy (LLLT) has been reported against inflammatory diseases, such as chronic hypertension and in autoimmune problems as well as cicatrization processes in major surgeries. Some papers had been employed modulating pro and anti-inflammatory cytokines in secure matter with success in acute lung disorders. The LLLT can relieve the late and early symptoms of airway and lung inflammations by reducing inflammatory mediators. The aim of this study was to evaluate LLLT response in animal's models and in patients with bronchial asthma. This work was divided in 2 phases: Phase 1- Translational Clinical Study and Phase 2 – Experimental Model. In the **1st part a pilot study (Protocol 1)** were done for dose determination and the **2nd. Patients** were their **own controls**. For all patients the sputum analysis induced by flow cytometry and cytokines evaluation by ELISA were collected. The study was divided in two phases. Phase1 was a case study: CW Diode Laser Ga-Al-As (Gallium-Aluminum-Arsenide, $\lambda=660$ nm, P=30 mW, fluence=15 J/cm², total energy= J; time= 20 sec irradiation for each point). A 16 spots into mucosa of mouth and intra nasal region were irradiated. In this first part, the treatment was 10 weeks of applications, once a week. The **2nd Protocol consisted of clinical study** with 6 patients. 1st irradiation: Diode Laser ($\lambda=660$ nm, P=35 mW fluence=26,3 J/cm², 30 sec irradiation for each point) and a 2nd irradiation: ($\lambda =780$ nm, P= 35 mW, fluence=26,3 J/cm², total energy= J; time= 30 sec irradiation for each point). In this cases the treatment was twice a week, one application with red laser at 660 nm wavelength and another with infrared at 780 nm wavelength on the same day, totaling 22 irradiated points. It was in total of 5 weeks applications. All patients were reevaluated after 5 sessions by sputum analysis induced by flow cytometry and cytokines evaluation by ELISA. **Phase 2 : Experimental Study**. The groups consisted on 52 animals, divided in 5 groups, as: No manipulation Group (Basal), challenge animals with ovoalbumina (OVA(72)), challenge animals with OVA and irradiation

with LLLT (OVA+L/ 72h), challenge animals desafiados with OVA and irradiation with LLLT and laser application were interrupted for a week before eutanasia. (OVA+L(1s), challenge animals with OVA and LLLT was applied and laser application were interrupted for 2 weeks before eutanasia (OVA+L(2s)). It was employed into mice, as it was described in following matter: 1° (λ - 660nm, P- 100 mW, T- 30 s per point); 2° (λ - 808nm, P- 100mW, T- 30 s per point). Our experimental data also corroborated the photobiomodulation effects as it was pointed out from the literature. Our work showed that LLLT was able to reduce significantly the total number of cells, macrophages, eosinophils and increased CD4 T lymphocytes in induced sputum. Besides, there was an increase in the levels of IL-10 and IFN- γ in the patients' sputum supernatant. Our animals' data indicated some signals of mechanism action involved in patients; therefore it was possible to conclude that the photobiomodulation therapy had favorable effects both in animals and human beings. Thus, this study may contribute to the asthma treatment, with no side effects, a non-invasive and cost effectiveness treatment that may be adopted for health police in our country.

Key words: bronchial asthma, low level laser therapy, photobiomodulation therapy, lung inflammation.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência e incidência de doenças inflamatórias crônicas vêm aumentando nas últimas décadas, principalmente a partir da década de 50. Desde então houve um aumento das alterações somáticas crônicas e uma redução da incidência de doenças infecciosas¹. Estas doenças crônicas incluem asma e alergias, doença pulmonar obstrutiva crônica e artrite reumatóide. Essa inversão observada está associada as alterações sócio, econômicas e ambientais. Sociedades ocidentais são caracterizadas por redução da exposição a estímulos patogênicos ou não, os quais são cruciais no desenvolvimento de mecanismos de tolerância do sistema imune e sua ausência acaba por resultar em redução ou perda da tolerância e o desenvolvimento de alergias, favorecendo processos inflamatórios crônicos².

Nesse contexto de doenças inflamatórias crônicas podemos inserir a Asma Brônquica (AB). Esta afecção, dentre as doenças pulmonares, ocupa o segundo lugar no *ranking* de gastos com tratamentos em todo mundo³. A asma, pela sua cronicidade e alterações pulmonares, apresenta consequências sociais e econômicas mundialmente, seja devido ao absenteísmo escolar⁷² ou de ausência da força laboral na vida cotidiana. Ademais, tal fato incorre em acréscimo dos custos com medicamentos e internações⁴.

Atualmente, têm-se investido muito em pesquisa na procura de novos fármacos para o tratamento dessa doença, que não tenham efeitos colaterais e sejam de baixo custo. Além do tratamento com broncodilatadores, glicocorticóides, antagonista de leucotrienos e terapia anti-IgE, novas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas, como a imunoterapia específica e atividade física controlada⁵.

Vale ressaltar, o reconhecimento global da importância desta doença, bem como o aumento de sua prevalência têm levado a esforços no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, particularmente para o controle da inflamação respiratória e do processo crônico da enfermidade^{6, 3}.

Embora, a terapia medicamentosa seja classicamente a primeira opção para o tratamento das doenças pulmonares crônicas, um crescente número de estudos tem demonstrado que a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) pode ser uma opção eficaz, segura, de baixo custo e sem efeitos adversos no auxílio do tratamento de doenças inflamatórias e fibróticas, em geral⁷.

1.1. Asma Brônquica

1.1.1. Definição de Asma Brônquica

A AB é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação das vias aéreas e definida pela história dos sintomas respiratórios, assim como: dispneia, chiado e tosse, os quais variam ao longo do tempo em intensidade, juntamente com a variação da limitação de fluxo aéreo ³. Esta afecção revela fortes componentes genéticos e ambientais, com susceptibilidade à polarização imune específica para o alérgeno na indução e expressão subsequente do fenótipo da doença ⁸.

1.1.2. Epidemiologia

De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), a asma afeta 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, sendo as mulheres as mais acometidas por esta enfermidade, cerca de 3,9 milhões. Somente no ano de 2014, de janeiro a novembro, foram 105 mil internações por AB, gerando um custo de cerca de 57,2 milhões para a rede pública de saúde (SUS). Há registro de indícios, que a prevalência da asma esteja crescendo em todo o mundo, inclusive em nosso país (PNS, 2015). Um estudo multicêntrico (International Study for Asthma and Allergies in Childhood, ISAAC) realizado em 56 países demonstrou uma variabilidade de asma ativa de 1,6% a 36,8%, estando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência média de 20% ⁹. Nos países em desenvolvimento, a mortalidade por asma vem aumentando nos últimos 10 anos, correspondendo a 5-10% das mortes por causa respiratória, com elevada proporção de óbitos domiciliares ⁷³.

1.1.3. Mecanismos Celulares e Moleculares da Asma Brônquica:

Sabe-se que seu desencadeamento está relacionado a vários fatores, os quais se classificam em predisponentes, causais e de contribuição¹⁰. Fundamentalmente, os fatores predisponentes se relacionam à propensão de indivíduos sintetizarem quantidades exacerbadas de imunoglobulinas do tipo E (IgE). Os fatores causais se associam à exposição a alérgenos ambientais, como: agentes ocupacionais, pólenes, ácaros, fungos, entre outros. Em adição a esses fatores, estão os de contribuição representados pela poluição atmosférica, fumaça do cigarro, infecção viral e alterações hormonais femininas^{11, 12, 13,14}.

Do ponto de vista de indução da asma, para que o organismo seja sensibilizado, é necessário o seu contato prévio com o agente imunogênico.

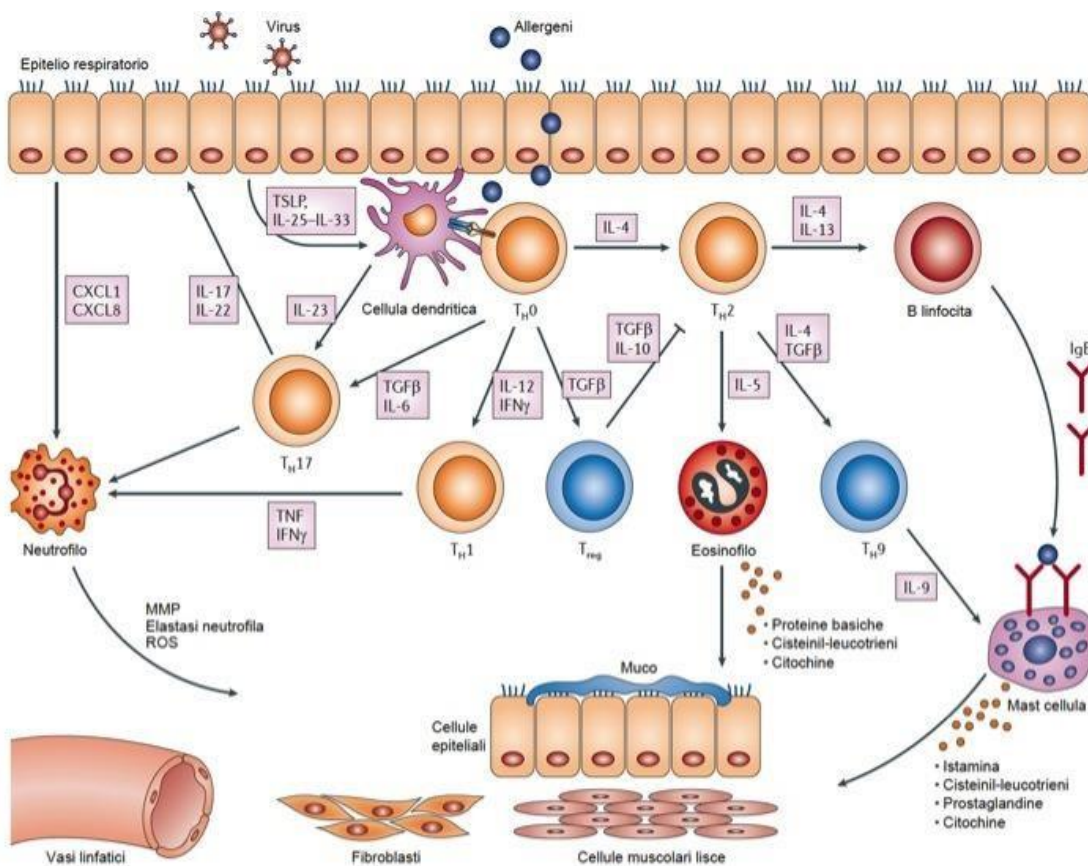
O processo de sensibilização se inicia quando alérgenos ou poluentes ambientais entram em contato com o organismo¹⁵, onde ocorre uma interação entre as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) das vias aéreas e linfócitos T. Esse mecanismo envolve a fragmentação do alérgeno em fragmentos de peptídeos, como também o complexo de principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), o qual fará a apresentação destes peptídeos aos linfócitos T *naive*. Ainda, para a ativação e proliferação de linfócitos Th2, é necessário a interação entre moléculas coestimuladoras e linfócitos T *naive*.

Os linfócitos Th2 secretam grandes quantidades de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A IL-4 e IL-13 que estimulam a maturação dos linfócitos B e a síntese de Ig-E. Além destes, e em conjunto com a IL-9, estas ajudam no desenvolvimento de mastócitos, enquanto a IL-5 induz ao crescimento e diferenciação dos eosinófilos na medula óssea.

Após o segundo contato com o alérgeno, a IgE liga-se aos receptores Fc nos mastócitos¹⁶. Enquanto, a IgE ligada aos receptores faz ligação cruzada com o antígeno, as células são ativadas e liberam mediadores, tais como: histamina, leucotrienos, citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, fator de necrose tumoral (TNF- α)), prostaglandinas e proteases. Esses mediadores são responsáveis por broncoconstrição, obstrução do fluxo aéreo, incremento na produção de muco e aumento da permeabilidade vascular, incorrendo em edema das vias aéreas inferiores, sendo esta fase caracterizada como: fase imediata da asma¹⁷.

Após esta etapa, inicia-se a fase tardia, onde vários mediadores inflamatórios são liberados pelos eosinófilos (MBP, ECP, EPO, mediadores lipídicos e citocinas). Segundo Pelaia, outras substâncias também são liberadas pelos neutrófilos (elastase) e pelas

células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos, óxido nítrico- NO) ¹⁸. Através de seus mediadores, todas as células envolvidas provocam lesões e alterações na integridade epitelial do tecido respiratório. Também foi observado anormalidades, no controle neural autonômico (substância P, neurocinina A), alterações na permeabilidade vascular, aumento da reatividade do músculo liso das vias aéreas (no tônus), hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar, de acordo com Al-Muhsen, como observado na Figura1¹⁹.



Fonte: juniormemberssiaip.wordpress.com/2013/05/29/il-potenziale-dei-farmaci-biologici-nel-trattamento-dellasma.

Figura 1. Aspectos Celulares e Moleculares da Asma. Células e mediadores que participam da fisiopatologia da asma brônquica.

Esses mediadores, podem ainda atingir o epitélio ciliado, causando-lhe dano e ruptura. As células que recobrem e pavimentam as vias aéreas inferiores são pneumócitos tipo I, que facilitam a difusão e troca de CO₂ e O₂ entre o ar ambiente que chegam aos alvéolos e os capilares, que o envolvem. Já os pneumócitos tipo II são responsáveis pela

produção de surfactantes. Como consequência, células epiteliais e miofibroblastos, presentes abaixo do epitélio, proliferam e iniciam o depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal. Este fato, explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes asmáticos ²⁰. Outras alterações, incluindo hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, elevação no número de células calciformes, incremento das glândulas submucosas e alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular. Todos esses fatores são constituintes do remodelamento, que interferem na arquitetura da via aérea, levando à irreversibilidade do dano pulmonar e a obstrução que se observa frequentemente em vários pacientes portadores de AB ²¹.

1.1.4 Células Inflamatórias na Asma

Os três principais processos responsáveis pelos aspectos clínicos da asma são bem definidos: inflamação das vias aéreas, hipersecreção de muco e broncoconstrição. Entretanto, a compreensão da fisiopatologia responsável por esses processos é mais complexa por envolver muitos tipos celulares e citocinas ²².

Além disso, a atividade e o impacto clínico de cada célula e de seus componentes variam consideravelmente entre indivíduos e podem alterar o tempo todo, bem como em resposta a terapia medicamentosa e influências de fatores ambientais e estilo de vida ²³.

A) Macrófagos

Os macrófagos desempenham um papel na inicialização e perpetuação das respostas imunes pulmonares locais ²⁴. Os macrófagos alveolares são as células apresentadoras de antígeno mais abundantes no pulmão e desempenham um papel crítico na regulação de respostas imunes pulmonares à inalação de patógenos e alérgenos. Entretanto, quando comparados com macrófagos em outros locais, os macrófagos alveolares apresentam um fenótipo incomum que se assemelha o de células dendríticas ²⁵.

A linhagem de célula monócito-macrófago é caracterizada pela considerável diversidade e plasticidade. Em tecidos, os macrófagos respondem fatores ambientais, com a aquisição de fenótipos (M1 ou M2). Dependendo da sinalização, os macrófagos podem sofrer uma ativação clássica M1 (estimulado por TLR (*Toll like receptors* e IFN- γ) ou alternativa para M2 (estimulado por IL-4/ IL-13), sendo que estes estados refletem a polarização Th1/ Th2.

Os macrófagos M2 também apresentam em seu perfil a expressão de citocinas, sendo que as pró-inflamatórias são secretadas em níveis reduzidos em relação as anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β ²⁶.

B) Células Dendríticas

As células dendríticas desempenham um papel decisivo na iniciação de respostas imunes adaptativas contra agentes estranhos. São células especializadas em reconhecer corpos estranhos, com capacidade para processar antígenos e apresentá-los ao MHC-1 ou MHC-2, além de ativar a polarização de linfócitos T *naive* ²⁷. Seu papel fundamental pode ser evidenciado em pessoas que apresentam falta de células dendríticas por defeitos genéticos ou ainda em camundongos *knockout*, elevando a suscetibilidade a infecções por prejudicar a polarização dos linfócitos T ou prejudicar a resposta adaptativa de linfócitos T e B ²⁸.

C) Eosinófilos

Estes contêm um grande número de mediadores capazes de induzir a inflamação e lesionar o tecido. A predominância de substância é de proteína básica maior, proteína catiônica eosinofílica, eosinófilo peroxidase e eosinófilo derivado de neurotoxina ²⁹. Os corpúsculos lipídicos são particularmente importantes, quando consideramos o papel dos eosinófilos na asma, devido ao envolvimento deles na produção de eicosanoides, incluindo cisteinil leucotrienos, prostaglandinas e tromboxano. Estes são a chave da esterificação do ácido araquidônico e produção de eicosanoides devido a altas concentrações de enzimas, bem como o ciclo oxigenase, 5-lipooxigenase e leucotrieno C4 sintase ³⁰.

D) Neutrófilos

Os neutrófilos estão associados com quadros mais graves de asma, pois estas células estão relacionadas com o maior recrutamento tanto de neutrófilos quanto de macrófagos, contribuindo com a perpetuação da inflamação pulmonar e o remodelamento das vias aéreas inferiores ³¹. Estes granulócitos produzem Metaloproteinase-9 (MMP9) e elastase, as quais fazem parte do remodelamento das vias aéreas ³².

1.1.5 Citocinas envolvidas na Asma Brônquica

Do ponto de vista da participação dos mediadores inflamatórios na asma, o envolvimento de citocinas no controle e perpetuação da doença é bem estabelecido³³.

A) Interleucina 4 (IL-4)

A IL-4 medeia a síntese de IgE³⁴, além de estimular a produção de muco e de fibroblastos, estando, portanto, envolvida na patogênese do remodelamento³⁵. A inalação de IL-4 humana recombinante induz a eosinofilia das vias aéreas e aumento da hiperreatividade brônquica em asmáticos atópicos. Além disto, estudos realizados em biópsias brônquicas em pacientes asmáticos atópicos e não atópicos demonstraram elevação de IL-4 nas vias aéreas, quando comparados com pacientes não asmáticos. Estudos realizados em animais *knockout* (IL-4^{-/-}) demonstram supressão de linfócitos Th2, de síntese de IgE, de eosinofilia e de hiperreatividade das vias aéreas³⁶.

B) Interleucina 5 (IL-5)

A IL-5 regula o recrutamento de eosinófilos através da sinalização quimiotática de eosinófilos da medula óssea em direção ao trato respiratório, determinando, assim a perpetuação de uma infiltração inflamatória eosinofílica (37). Em resposta a atração destas células, os eosinófilos entram para o tecido pulmonar do espaço vascular através de moléculas de adesão, como o VCAM-1, que se acumulam nos espaços perivasculares e peribrônquico do tecido pulmonar e então migram para a luz das vias aéreas. Estudos realizados em animais deficientes de IL-5 demonstram que há redução da infiltração eosinofílica no pulmão e nas vias aéreas.

C) Interleucina 9 (IL-9)

Estudos realizados em camundongos transgênicos demonstram elevação na expressão de IL-9 induz a hiperreatividade das vias aéreas, levando desta forma a um fenótipo asmático genuíno. Tal fato, pode ser corroborado por estudos que sugerem que anticorpo anti-IL-9 inibe a hiperreatividade das vias aéreas, bem como a eosinofilia e aumenta também a produção de muco em ratos sensibilizados³⁸. O papel endógeno da IL-9 pode ser demonstrado em um estudo realizado em camundongos vacinados com anti-IL-9. Os animais desenvolveram anticorpos anti-IL-9 e então foram infectados com parasitas.

Entretanto, estes animais não demonstraram inflamação eosinofílica, indicando que a IL-9 é um fator crucial no desenvolvimento da eosinofilia *in vivo* ³⁹.

D) Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 está envolvida na resolução da inflamação atuando como uma citocina anti-inflamatória. É produzida por células como macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos T e B. A IL-10 prejudica a maturação de células dendríticas, reduzindo a capacidade co-estimulatória destas células para indução da resposta Th2. Nestas circunstâncias, a IL-10 vem demonstrando ser importante na manutenção da homeostase e prevenção a respostas alérgicas em indivíduos saudáveis ⁴⁰. Alguns estudos demonstram que macrófagos alveolares de pacientes asmáticos secretam baixos níveis de IL-10, quando comparados com indivíduos saudáveis (John *et al.*, 1998). Entretanto, outros estudos correlacionam a redução dos níveis dessa citocina em pacientes asmáticos ⁴¹.

E) Interleucina 13 (IL-13)

A IL-13 estimula a produção e secreção de muco, como também de fibrose, contribuindo com a perpetuação de danos ao tecido ³⁴. Sendo, este evento, corroborado por estudos que demonstram que a administração de IL-13 recombinante, no pulmão de camundongos induz a hiperplasia de células produtoras de muco, recrutamento eosinofílicos e hiperreatividade das vias aéreas ⁴².

F) Fatores de Transcrição

As células que expressam o fator de transcrição GATA3 estão correlacionadas com o aumento da resistência das vias aéreas e hiperreatividade brônquica em asmáticos. A expressão de GATA3 é regulada pelo fator de transcrição STAT6, via ativação do receptor de IL-4. Enquanto na asma, o STAT6 e GATA3 regem a secreção de IL-4 durante uma resposta Th2. Já nas respostas de Th1, o STAT1 e STAT4, induzem a síntese de IFN- γ através da ativação de T-bet, o qual suprime a resposta Th2 ⁴³.

Podemos destacar que o fator de transcrição GATA3 é crucial para a diferenciação de células T naive em células Th2 (Ho *et al.*, 2007). É relevante mencionar que há uma elevação no número de células T GATA3+ nas vias aéreas dos indivíduos asmáticos estáveis ⁴⁴.

Na asma, todas as características da inflamação pulmonar e da desregulação fisiológica são os resultados finais dos eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização, na ativação de células Th2 e na ativação dos mecanismos efetores dessas citocinas¹⁴. Assim, por possuir um impacto sócio-econômico muito relevante, sendo uma das doenças que mais consome recursos, terapias que melhorem o desconforto respiratório do paciente, bem como reduzam os custos despendidos com esta doença, são de grande importância.

Tabela 1. Citocinas envolvidas na asma alérgica		
Pró inflamatórias	Anti inflamatórias	Principais mecanismos
IL-4		Aumento da produção de IgE
	IL-10	Diminuição de linfócitos Th2
IL-5		Eleva o recrutamento de eosinófilos
IL-9		Eleva o recrutamento de mastócitos
IL-13		Induz remodelamento das vias aéreas e aumento de IgE

1.2 TRATAMENTO CONVENCIONAL: TERAPIA FARMACOLÓGICA

Entre os fármacos mais potentes para o tratamento de doenças respiratórias crônicas, podemos citar os corticosteroides. Estes possuem uma terapêutica anti-inflamatória altamente potente devido sua ação biológica no organismo ⁴⁵. Sua ação predominante é suprimir os efeitos das citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, as quais são liberadas durante o processo inflamatório ⁴⁶. O papel das drogas corticosteróides é mimetizar os glicocorticóides endógenos. Estes, por sua vez, são liberados no organismo em decorrência de processos inflamatórios, incorrendo em quadros de dor, infecções, estresse e etc, estimulando o eixo hipotálamo – hipófise – adrenal, o qual estimula a produção de cortisol pelo córtex da adrenal, liberando, diretamente, na corrente sanguínea ¹¹.

A ação anti-inflamatória dos corticosteroides no organismo ocorre através da inibição de fatores de transcrição, como os STATs e o NF-κB ^{21,47} e da inflamação eosinofílica, reduzindo, assim, os sintomas da asma, tais como: hiperreatividade, tosse, dispneia, incremento da produção de muco. No entanto, o uso de corticosteroides, não têm se mostrado efetivo no que diz respeito à deterioração da função pulmonar no curso da AB, bem como na obstrução do fluxo aéreo irreversível, sugerindo que mesmo em uso controlado deste fármaco, não consegue conter o remodelamento das vias aéreas ⁴⁸. Por fim, esse medicamento denota inúmeros efeitos colaterais, comprometendo ainda mais o quadro do paciente.

Em contrapartida, temos a terapia com anti-leucotrienos, como, por exemplo, o montelucaste sódico. Estes fármacos representam um grupo de medicamentos de última geração que podem bloquear a ligação dos leucotrienos cisteínicos a seus receptores e, conseqüentemente, melhorar os sintomas clínicos da doença ⁷⁴.

1.2.1 EFEITOS COLATEIRAIS DOS CORTICÓIDES:

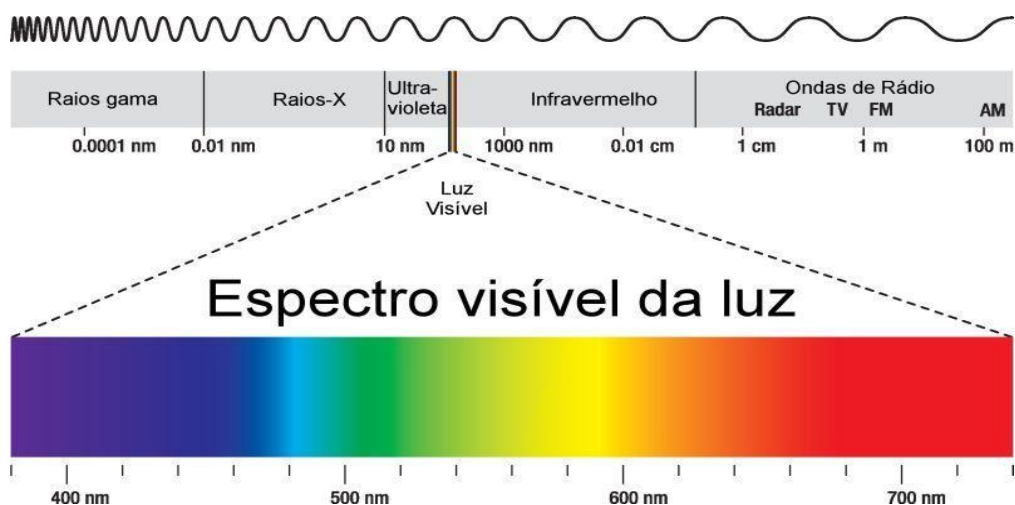
- Efeitos inibitórios sobre o sistema imunológico;
- Infecções por fungos, bactérias, vírus e parasitas, podendo gerar infecções disseminadas graves;
- Alteração tireóidea;
- Alteração da função gonádica;
- Hiperglicemia;
- Redução de massa muscular;

- Retardo do crescimento de crianças;
- Hipertricose;
- Insuficiência renal;
- Descompensação cardíaca;
- Depressão grave.

1.3. Terapia com Laser de Baixa Intensidade (LBI)

O uso médico da terapia com LBI já vem ocorrendo há décadas. Inicialmente, o Laser foi desenvolvido por Theodore Maiman, em 1960, sob a forma de um laser de rubi. Entretanto, as investigações dos efeitos terapêuticos começaram com Mester et al em 1967, que relataram aceleração da cicatrização de feridas e melhora na capacidade de regeneração das fibras colágenas e musculares após lesão utilizando o mesmo. Desde então, vários estudos vêm demonstrando uma grande variedade de efeitos terapêuticos ⁴⁹, como redução de edema, diminuição do processo inflamatório, modulação da síntese de colágeno, ativação da síntese de proteína, auxiliando na reparação tecidual ^{50,51}.

A palavra Laser é um acrônimo de amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Dentre as características físicas do laser podemos citar: feixe de luz monocromático (mesmo comprimento de onda), coerente, ou seja, seus feixes de luz estão na mesma fase e no mesmo espaço de tempo e colimado (mesma direção). Por possuírem a mesma natureza física, as ondas eletromagnéticas diferem entre si apenas pela frequência e comprimento de onda. Estas frequências abrangem uma extensa faixa de luz, o qual é denominado espectro eletromagnético, bem como podemos verificar na Figura 3 (espectro). A palavra espectro (do latim "spectrum", que significa fantasma ou aparição) foi usada por Issac Newton, no século XVII, para descrever uma faixa de cores que apareceu quando, em uma experiência, a luz do sol atravessou um prisma de vidro em sua trajetória (http://www.arquivos.ufs.br/mlalic/UAB_livro/Fisica_C_Aula_07.pdf).



Fonte: <http://www.infoescola.com/fisica/espectro-eletromagnetico>

Figura 3: Espectro eletromagnético e respectivos comprimentos de onda em nanômetros (nm).

O processo físico da função do laser é chamado de emissão estimulada de radiação, no qual o dispositivo de laser emite uma luz através de um processo de amplificação óptica por emissão estimulada de fótons ⁴⁹.

Os lasers que emitem luz entre o vermelho e o infravermelho do espectro eletromagnético são os mais utilizados uma vez que a hemoglobina, nesta região do espectro, não absorve a luz e esta então, pode ser absorvida pelo tecido alvo, ocasionando os efeitos desejados do laser ⁵⁰.

1.3.1 Classificação de Laser, de acordo com a Potência.

1.3.1.1 Laser de Alta Potência ou Laser Cirúrgico (LAP)

Segundo Chavantes (2009) os lasers de alta potência (LAP) ou laser cirúrgico apresentam potência acima de 1 Watt, ou seja, podendo promover aquecimento do tecido, acima de 45^o C, e por apresentarem uma densidade de potência elevada que promove danos ao tecido alvo. Por esta característica, possuem propriedades precisas de cortes delicados, carbonização, vaporização, coagulação, ablação de pedra dentro do organismo, sendo muito utilizados em procedimentos cirúrgicos com a capacidade de reduzir sangramento, dor e infecção ⁷⁵.

Tipos de Efeitos do LAP:

- Fototérmico: coagulação, carbonização e vaporização.
- Fotomecânico-acústico: corta com alta precisão.
- Fotoablativo: destrói para disrupção.
- Fotoionizante: quebra na cadeia quaternária do DNA.

1.3.1.2 Laser empregando uma Potência Baixa:

- **Efeito Fotofísicoquímico**

Ao contrário dos outros procedimentos de laser, a terapia com laser de baixa intensidade (LBI), não possui efeito ablativo ou térmica, ou seja, apresenta simplesmente alterações fotofísico-químicas, uma vez que, quando a luz é absorvida provoca alterações bioquímicas e biomoleculares no tecido ⁵¹. Segundo Chavantes, LBI são lasers com potência em miliWatt e cuja temperatura local no tecido alvo não ultrapasse 1°C, não sendo dependentes de calor e destruição tecidual.

1.3.2.1 Terapia Fotodinâmica (PDT)

A absorção do laser pelo tecido pode ocorrer através de fotoceptores exógenos. Estes são moléculas especializadas na absorção de fótons (luz). Podem ser chamados de fotoceptores endógenos (LBI), quando estão dentro da própria célula ou ainda fotoceptores exógenos, quando administrados substâncias ou corantes, por via endovenosa, inalatória e transdérmica, produzindo a Terapia Fotodinâmica (PDT). Nessas circunstâncias, são absorvidos por células com alta atividade mitótica, como: tecidos tumorais ou com alta atividade microbiana (bactérias, vírus e fungos) ⁵².

1.3.2.2 Estudos Celulares – “In Vitro”

A biomodulação é o efeito biomolecular do laser de baixa intensidade ou laserterapia. Quando irradiamos o laser sobre o tecido no comprimento de onda visível, ocorre uma reação fotofísicoquímica localizada dentro da mitocôndria, no citocromo C oxidase. Os fótons podem ainda provocar alterações no potencial de membrana, tanto na transmissão de impulsos nervosos (bomba Na^+/K^+ e canais de Ca^{++}), quanto no aumento da permeabilidade da membrana aos íons Na^+ , alterando o potencial de membrana celular e da membrana interna mitocondrial, proporcionando o incremento da síntese de ATP. Logo, num primeiro momento temos o aumento da síntese de ATP, na glicólise e na oxidação fosforilativa e transcrição e replicação de DNA ⁸¹.

A Biomodulação pode levar tanto a bioestimulação quanto a bioinibição de processos fisiológicos em células, tecidos e órgãos. A bioinibição da dor é em muitos casos o efeito esperado. Karu (1988) descreveu a ação primária e secundária do laser, sendo esta última importante na resposta anti-edematosa, anti-inflamatória, analgésica e na reparação tecidual.

Como resultado da irradiação do laser, uma das mais importantes reações celulares observadas é a excitação cadeia respiratória na mitocôndria, a qual resulta da absorção de fótons que absorvem radiação (cromóforos) entre o vermelho e o infravermelho, como, por exemplo, a enzima citocromo c oxidase, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ⁵³. O aumento da produção de ROS em resposta a irradiação do LBI ativa a tirosina-quinase, a qual é responsável pelo incremento da produção da proliferação de vários tipos celulares (54). Neste cenário, são também observados acréscimo da síntese de trifosfato de adenosina (ATP), aumento do potencial de membrana da mitocôndria e celular ⁵⁵, além da elevação da atividade celular/tissular e no

restabelecimento da homeostase ⁸². A principal manifestação de bioestimulação é o aumento de síntese de DNA e RNA ⁵⁶.

1.3.2.3 Efeitos do LBI em Modelos Animais “In Vivo”

O impacto da irradiação com LBI vem sendo observado em vários modelos experimentais. Na literatura, vários trabalhos apontam para um papel anti-inflamatório da terapia com LBI sobre a inflamação pulmonar. Em um estudo realizado em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), no qual camundongos foram expostos a fumaça de cigarro por 75 dias. A aplicação do LBI (30mW/3J/660 nm) foi realizada durante 180 s sobre a pele do brônquio superior direito. A partir do 60° dia até o 75°, foram feitas duas aplicações de laser/ dia e do dia 60° ao dia 67° foi feita a administração de células mesenquimais. Os grupos experimentais receberam células mesenquimais intraperitoneal ou intranasal e/ou aplicação de LBI somente ou em associação. Neste estudo foi observado a redução da inflamação pulmonar, a redução da produção de muco, colágeno, a produção de citocinas pro- inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e KC), bem como o aumento da produção de IL-10 ⁵⁷.

A terapia com LBI também demonstrou reduzir a inflamação via Th2, a hiperreatividade brônquica e o remodelamento das vias aéreas em modelo experimental de asma quando irradiado sobre a pele na parte superior do brônquio direito em ratos ⁵⁸.

Da mesma forma, foram investigados os efeitos da LBI em modelo de síndrome da angustia respiratória induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Uma hora após a administração de LPS os animais foram tratados com laser 830nm, 9J/cm², 35 mW, 80s por ponto (3 aplicações por ponto), um ponto foi na parte superior da traquéia, o segundo foi no pulmão direito e o terceiro ponto foi no pulmão esquerdo, em contato direto com a pele. Os grupos receberam 3 aplicações por ponto com intervalo de 1h entre cada aplicação. Os resultados revelaram que o LBI reduziu a inflamação pulmonar, diminuído o número total de células e de eosinófilos, bem como os níveis de IL- 1 β , IL-6, KC e TNF- α no lavado broncoalveolar. No parênquima pulmonar foi observado redução do número de neutrófilos ⁵⁹.

Em um estudo realizado por Wang (2014) e colaboradores foi avaliado o efeito do LBI, em modelo experimental de asma alérgica, comparado com a administração de glicocorticoide (budesonida). Os animais foram tratados com LBI 8 J/cm², diariamente por 21 dias ou suspensão de budesonida. Os resultados demonstraram que o LBI reduziu os

níveis de IL-4 e IgE, e ainda aumentou os níveis de IFN- γ no lavado broncoalveolar, sugerindo que o LBI pode regular o balanço Th1/Th2 em modelo experimental de asma.

1.3.2.4 Efeitos do LBI na Clínica

Estudos clínicos em pacientes portadores de hipotireoidismo crônico, induzido por tireoidite autoimune, foram tratados com LBI com o objetivo de verificar o processo de modulação da glândula, já que estes pacientes apresentavam alteração da vascularização da tireoide. Como resultado do processo autoimune, 43 pacientes foram submetidos a 10 sessões de LBI (n=23) e outro grupo placebo (n=20) a 10 sessões com a simulação de LBI. Para verificar a vascularização do parênquima tireoidiano foi realizado ultrassom com Doppler colorido, através do qual pode ser observado a melhora da vascularização do parênquima tireoidiano com laserterapia ⁵².

Em outro estudo de Holanda *et al.* (2016) realizado com pacientes em dor lombar crônica foi avaliado a eficácia da terapia com LBI em comparação com administração de lidocaína e o tratamento de radiofrequência. Estes pacientes neurocirúrgicos foram divididos em três grupos: injeção de lidocaína, radiofrequência e laser. Em um mês após os tratamentos, o grupo de laser terapia teve maior número de pacientes com resposta de 75% do quadro algico, demonstrando que a irradiação com laser promoveu analgesia imediata e sustentada. A injeção de lidocaína ocasionou uma diminuição da dor lombar crônica em 50% dos pacientes, enquanto o tratamento com radiofrequência foi só capaz de reduzir o processo algico em menos de 33% dos enfermos tratados ⁶⁰.

A irradiação do laser sublingual foi aplicada em crianças com artrite idiopática juvenil destinado a induzir a remissão da doença. Os pacientes foram divididos em três grupos: 36 pacientes foram tratados com laser sublingual (635 nm, 5 mW por 20min diariamente) por 7 sessões sucessivas, repetindo por 7 semanas em três tempos. O grupo II consistiu de também de 36 pacientes que receberam tratamento placebo e o grupo III foi composto por 33 pacientes tratados com Metotrexato. O LBI sublingual demonstrou reduzir a dor, melhorou a limitação de movimento articular, melhorando a qualidade de vida dos pacientes, sendo assim, possível evitar a administração de agentes biológicos ⁶¹.

Embora existam uma grande quantidade de estudos demonstrando os efeitos do LBI sobre células em diferentes situações metabólicas, como na Diabetes, mas pouco tem sido aplicado em pacientes através de estudos clínicos randomizados. Outra possibilidade terapêutica de terapia eficaz com LBI foi no controle da hipertensão arterial sistêmica, que é um processo inflamatório generalizado, denotou ter uma resposta hemorreologica e hemodinâmica ⁶². A continuação deste estudo com LBI em pacientes hipertensas e normotensas evidenciou uma importante resposta hemodinâmica, com modulação no sistema simpático/ parassimpático ⁷⁷. O uso do LBI foi capaz de propiciar uma proteção da bomba cardíaca, avaliados pelo Índice Cardíaco e na Resistência Vascular periférica, após uma única aplicação de laserterapia só nos hipertensos estudados. Em trabalho realizado por Madi (2015) em hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia evidenciou a redução da resistência vascular sistêmica e, conseqüentemente, queda da pressão arterial sistólica e diastólica, pressão arterial média com resposta estatisticamente significativa. A resposta foi eficaz após uma única aplicação de fotobiomodulação em gestantes hipertensas/ pré-eclâmpsia, mas sem alteração em normotensas, ademais uma melhora do fluxo placentário para os fetos.

Estudos realizados na Rússia observaram que a terapia com LBI duas vezes ao dia aumentou a complacência pulmonar e a eficácia de trocas gasosas em pacientes asmáticos ⁷⁹. Avaliando o efeito do LBI em indivíduos acometidos por inflamação pulmonar crônica foi observado que o LBI irradiado sobre a pele na região acima do brônquio principal reduz a migração celular para o pulmão ⁸⁰. Chavantes (2009) demonstrou em estenose traqueal severa o efeito biomodulador do LBI nas vias traqueobrônquicas, que não haviam respondido a outros tipos de tratamentos cirúrgicos prévios ⁷⁵.

Em um estudo realizado por Elseify, o laser acupuntura foi aplicado em 50 crianças com asma brônquica, entre 7 e 18 anos. Cada paciente recebeu 10 aplicações (3 vezes na semana). Após o tratamento, 48 pacientes relataram melhor tolerância a exercícios, a dose de esteroides inalatórios foi reduzida e o volume expiratório forçado em 1s e o pico de fluxo expiratório aumentaram ⁶³.

É importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do LBI sobre tecidos biológicos nestes casos ainda são exíguos. Por isso, estudos que permitam compreender qual o tipo de sinalização celular desencadeada pelo laser, se fazem pertinentes. A partir da compreensão de processos celulares envolvidos do LBI, e sua respectiva dosimetria, será possível estabelecer de fato a eficácia da terapia laser para diferentes doenças respiratórias. Portanto, investigações cujo intuito de melhor

compreender os mecanismos moleculares e celulares resultantes da terapia com LBI durante a inflamação pulmonar crônica se revestem de importância adicional.

1.4 Justificativa

Os estudos realizados em modelos animais, no que diz respeito aos efeitos do laser de baixa intensidade em modelos de inflamação pulmonar, evidenciaram redução da inflamação pulmonar, bem como melhora da hiper-reatividade das vias aéreas e mecânica respiratória. Todavia, ainda são escassos estudos que têm como objetivo analisar os fenômenos do laser de forma sistêmica na resposta inflamatória de doenças pulmonares em estudos clínicos. Logo, no contexto do seu papel anti-inflamatório e biomodulador, buscamos a compreensão de possíveis mecanismos de ação que o laser possa gerar e possíveis repercussões na asma brônquica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito da terapia de fotobiomodulação sobre a inflamação alérgica pulmonar em pacientes com asma brônquica e a perduração do efeito do laser em modelo experimental de asma brônquica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a migração de células para o tecido pulmonar pela análise total e diferencial do escarro induzido e lavado broncoalveolar, por citometria de fluxo e por contagem em câmara de *Newbauer* antes e após o tratamento com LBI;
- Quantificar a resposta inflamatória pulmonar através da modificação de citocinas e quimiocina no escarro induzido;
- Avaliar a obstrução pulmonar em paciente através da análise do pico de fluxo expiratório e os sintomas do asmático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fase 1

3.1.1 Protocolo 1

Trata-se de trabalho prospectivo, descritivo , realizado na Universidade Nove de Julho, um estudo piloto com uma paciente, adulto (29 anos), com diagnóstico de asma brônquica moderada, desde a infância.

3.1.2 Protocolo 2

Trata-se de um estudo prospectivo, descritivo, onde foram estudados 6 pacientes, de ambos os sexos, entre 18 e 36 anos, com diagnóstico de asma brônquica leve e moderado, controlados, desde a infância. Os pacientes foram provenientes do Ambulatório da Universidade Nove de Julho.

3.1.3 Critérios de Inclusão

Paciente com diagnóstico comprovado de asma leve ou moderada em uso de broncodilatadores há mais de 3 anos. Sob uso de medicamentos: corticoides: 4 pacientes, anti-leucotrienos: 1 paciente e broncodilatadores: 1 paciente.

3.1.4 Critérios de Exclusão

Pacientes com outras co-morbidades, tais como: insuficiência pulmonar aguda, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência hepática, insuficiência renal aguda e crônica ou que necessitam de métodos dialíticos. Portadores de neoplasias, imunodeprimidos, discrasias sanguíneas; septicemia ou síndrome da angústia respiratória aguda; tromboembolismo pulmonar; ou cirurgia de grande porte recente; pacientes portadores de fibrose cística e síndrome de Kartagener.

3.1.5 Emprego da Laserterapia

3.1.6 Protocolo 1

Paciente pré terapia com laser foi avaliado através da análise do escarro por citometria, bioquímica sanguínea, avaliação de citocinas por ELISA e espirometria. Para irradiação da paciente foi utilizado um aparelho CW laser de diodo Ga-Al-As (Arsenieto de Gálio e Alumínio), da marca MMOptics Ltda (São Carlos, SP), modelo Twin Laser, com comprimento de onda de 660nm, densidade de energia de 15 J/cm², potência de saída de 30 mW, energia total por ponto de 0,6 Joules, tempo de aplicação de 20 segundos por ponto, área do feixe de 0,04 cm², e em modo de emissão contínuo. Nesta primeira parte, o tratamento constou de 1 aplicação por semana, totalizando 10 semanas de aplicações. A aplicação do LBI foi realizada em 2 pontos intra-nasal direito e 2 pontos esquerdo; 6 pontos no palato (2 do lado direito, 2 do lado esquerdo e 2 na úvula), 6 pontos sob a língua (3 do

lado esquerdo e 3 do lado direito), glabella (1 ponto) e na região da cricóide (1 ponto). O paciente foi reavaliado antes e após 10 sessões através da análise do escarro por citometria, bioquímica sanguínea, avaliação de citocinas por ELISA e nova espirometria, pick flow pre e pos aplicação de LBI.

3.1.7 Protocolo 2

Para irradiação dos pacientes foi utilizado um aparelho CW laser de diodo Ga-Al-As (Arsenieto de Gálio e Alumínio), da marca MMOptics Ltda (São Carlos, SP), modelo Twin Laser. O equipamento de laser foi aferido e calibrado antes de cada procedimento no Laboratório de Biofotônica da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), a fim de se obter confiabilidade na potencia efetiva da emissão laser.

1° Aplicação: comprimento de onda de 660nm, densidade de energia de 26,3 J/cm², potência de saída de 35 mW, energia por ponto de 1 Joule, tempo de aplicação de 30 segundos por ponto, área do feixe de 0,04 cm², e em modo de emissão contínuo. A aplicação do LBI foi realizada 2 pontos intranasal direito e 2 pontos esquerdo; 6 pontos no palato (2 do lado direito, 2 do lado esquerdo e 2 na úvula), 6 pontos sob a língua (3 do lado esquerdo e 3 do lado direito).

2° Aplicação: comprimento de onda 780nm, densidade de energia de 26,3 J/cm², potência de saída de 35 mW, energia por ponto de 1 Joule, tempo de aplicação de 30 segundos por ponto, área do feixe de 0,04 cm², e em modo de emissão contínuo. A aplicação do LBI foi realizada entre as sobrancelhas (3 pontos), zigomático (1 ponto de cada lado), cricóide (1 ponto).

O tratamento constou de 2 aplicações por semana, com intervalo de 48hs entre as aplicações, sendo uma aplicação com laser vermelho no comprimento de onda 660nm e outra com infravermelho no comprimento de onda de 780nm no mesmo dia. O total foram de 5 semanas de aplicações. Todos os pacientes foram reavaliados após 5 sessões através da análise do escarro por citometria, avaliação de citocinas por ELISA.

3.1.8 Espirometria Pré e Pós Broncodilatador

Foi utilizado um aparelho de espirômetro para realização da espirometria pré e após 20 minutos da administração do broncodilatador. O principal parâmetro de avaliação foi a

variação no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), expressa pela variação absoluta do VEF1 em relação ao previsto (VEF1 pós-broncodilatador - VEF1 pré-broncodilatador \times 100/VEF1 previsto). A prova broncodilatadora foi considerada positiva se demonstrada uma variação > 200 mL e $> 7\%$ do previsto, em pacientes com obstrução ao fluxo aéreo, ou uma variação $> 10\%$ do previsto em pacientes com espirometria normal, de acordo com as diretrizes brasileiras para testes de função pulmonar.

3.1.9 Pico de Fluxo expiratório (PFE)

Foi utilizado um aparelho de ***peak flow meter*** para avaliação do pico de fluxo expiratório (PEF), sempre no antes e após cada aplicação de LBI (laserterapia).

3.2 Coleta e Análise do Sangue Periférico

Foi realizado a coleta do sangue da paciente para a realização do hemograma completo (avaliação da contagem de eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos).

3.2.1. Coleta e Análise do Escarro Induzido

Foi realizado o escarro induzido na paciente para avaliação das células totais e diferenciais, nebulizando com 4% de soro fisiológico por 15 minutos. O escarro foi processado e as células obtidas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo, como descrito abaixo:

Utilizamos os anticorpos monoclonais de superfície anti-CD3 FITC, anti-CD11b PercP e anti-Ly6G (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA) para caracterização fenotípica dos linfócitos, macrófagos e grânulos (neutrófilos e eosinófilos), respectivamente. Também foi feita a fenotipagem para caracterização dos linfócitos T (anti-CD3Fitc, anti-CD4 APC e anti-CD8Percp). As células foram incubadas por 20 minutos a 4° C. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS, contendo 0,01% de BSA e azida sódica e ressuspendidas em 200 µl do mesmo tampão. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD Accuri analisadas no software CSampler (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA).

Para a contagem total e diferencial de células, o botão celular foi ressuspendido em 1 ml de PBS+DTT, para número total utilizamos a Câmara de Neubauer e para a diferencial realizamos a confecção da lâmina em cytopspin, coradas com Diff Quick (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), conforme previamente descrito por Vieira et al. 2011.

3.2.2 Avaliação de Citocinas e Quimiocina no Sobrenadante do Escarro

O sobrenadante do escarro induzido foi utilizado para a medida de IL-4, IL-5, IL-10, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-23 e IFN-γ através de kits de ELISA Duo Set da R&D System e Biolegends, conforme instruções do fabricante.

3.2.3 Fase 2

3.2.4 Protocolo 3

3.2.5 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c, machos, adultos, com peso médio de 20g, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, em condições padrão de alimento e água ad libitum. Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Nove de Julho (AN0006/2013).

3.2.6 Indução da Asma: Modelo de Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica usando Ovalbumina (OVA)

Para indução de inflamação alérgica pulmonar crônica usando Ovalbumina (OVA), os animais foram sensibilizados com injeção subcutânea (S.C.) de 4 µg de OVA (Sigma), juntamente com solução de Alum gel nos dias 0 e 14.

A partir do dia 21, os animais foram submetidos ao desafio orotraqueal com 10 µg de OVA, 3 vezes por semana durante 5 semanas.

Para esse procedimento os animais foram submetidos à imobilização adequada em uma posição que permite o acesso apropriado a via de administração, para aplicação da anestesia com injeção intramuscular (I.M.) de xilazina 2% (0,06ml/100g) + cetamina 10% (0,08ml/100g). Minutos após foi realizada a instilação de OVA.

3.2.7 Terapia com Laser de Baixa Potência (LBI)

Após a 2ª semana, uma hora após cada desafio os animais receberão aplicação pontual com um laser de diodo (potência de saída: 100 mW, comprimento de onda de 660 nm e 808nm, área do feixe de 0.785 cm², densidade de energia: 0,045 J/cm², energia total por ponto 3 Joules.



Figura 1 - Laser de diodo utilizado na terapia com laser de baixa intensidade (LBI).

Foram irradiados em três regiões: uma abaixo da traqueia, e as outras 2 em cada lobo pulmonar (direito e esquerdo) com um tempo de 30s em cada ponto, uma vez ao dia.

3.2.8 Eutanásia

Cada grupo foi submetido à aplicação da anestesia com injeção intramuscular (I.M.) de xilazina 2% (0,06ml/100g) + cetamina 10% (0,08ml/100g), comumente utilizada na experimentação com roedores. A substância foi administrada minutos antes da exsanguinação, utilizando uma seringa de 1mL e agulha hipodérmica 25x5 mm. Após as coletas, todos foram acondicionados e descartados como lixo hospitalar (ou resíduo de serviço de saúde).

3.3.9 Avaliação da Inflamação Pulmonar no Lavado Broncoalveolar (LBA)

Após anestesia os animais foram traqueostomizados e canulados, os pulmões lavados com 3 x 0,5 ml de tampão fosfato salino (PBS). O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1600 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante será armazenado a -70°C para análise das citocinas por meio de ELISA. O botão celular foi ressuspensionado em 1 ml de tampão fosfato salino (PBS) e utilizado para a determinação do número de células totais no LBA realizado por meio de contagem na Câmara de *Neubauer*^{4, 5, 6}. O restante do material ressuspensionado foi utilizado para preparação de lâminas de *cytospin*.

Foram utilizados 200µl de amostra de cada animal para contagem diferencial das células, centrifugadas por 10 minutos, 450 rpm no equipamento de modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA. As lâminas foram coradas através da técnica de coloração Instant Prov: 1) colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov I, deixar por 10 segundos, retirar e deixar escorrer por 5 segundos. (2) Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov II, deixar por 10 segundos, retirar e deixar escorrer por 5 segundos. (3) Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov III, deixar por 20 segundos, retirar, deixar escorrer por 5 segundos e lavar as lâminas em água corrente. Após a coloração 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial.

4. RESULTADOS

4.1 Protocolo 1 – Estudo Piloto

4.1.2 Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de células recuperadas do escarro induzido

Nossos resultados evidenciaram que o LBI não alterou significativamente o número total de células no escarro induzido (Figura 1), porém foi capaz de reduzir significativamente o número de macrófagos e eosinófilos recuperados no escarro induzido da paciente. Por outro lado, observamos aumento significativo de neutrófilos e linfócitos após a laserterapia, quando analisados através da câmara de new bower (Figura 2). Após o término da aplicação de terapia com laser na paciente, com 3 meses de intervalo no pós LBI, foi observado redução estatisticamente significante de eosinófilos (Figura 3), enquanto neutrófilos e macrófagos reduziram, porém não significativamente, quando analisados por citometria de fluxo. Na Figura 4 foi observado redução significativa de linfócitos totais e CD8⁺ entretanto com aumento significativo de linfócitos CD4⁺. Os níveis de citocinas representados na Figura 5 demonstraram inibição da liberação de IL-4, IL-5 e IL-23 e incremento de IL-10 de forma significativa no sobrenadante do escarro. Com relação ao número de linfócitos totais circulantes no sangue não foi observado uma redução significativa, contudo foi observado diferença estatisticamente significante de eosinófilos e linfócitos na análise diferencial (Figura 7). O volume expiratório forçado no primeiro minuto (VEF1) aumentou, porém não foi significativo, todavia o pico de fluxo expiratório cresceu de forma significativa (Figuras 8, B e A, respectivamente).

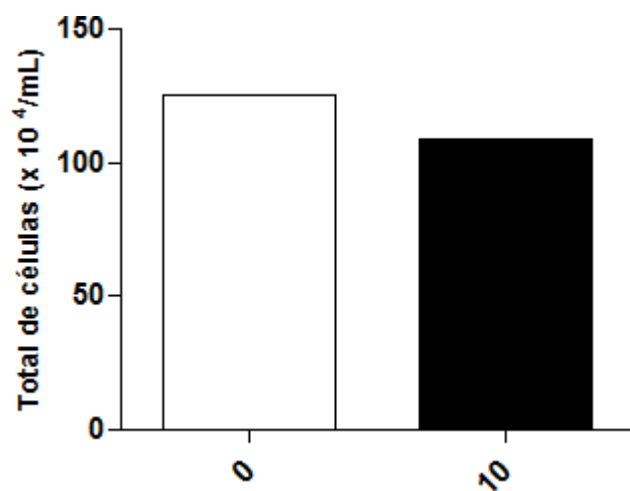


Figura 1. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de células recuperadas do escarro induzido. Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas.

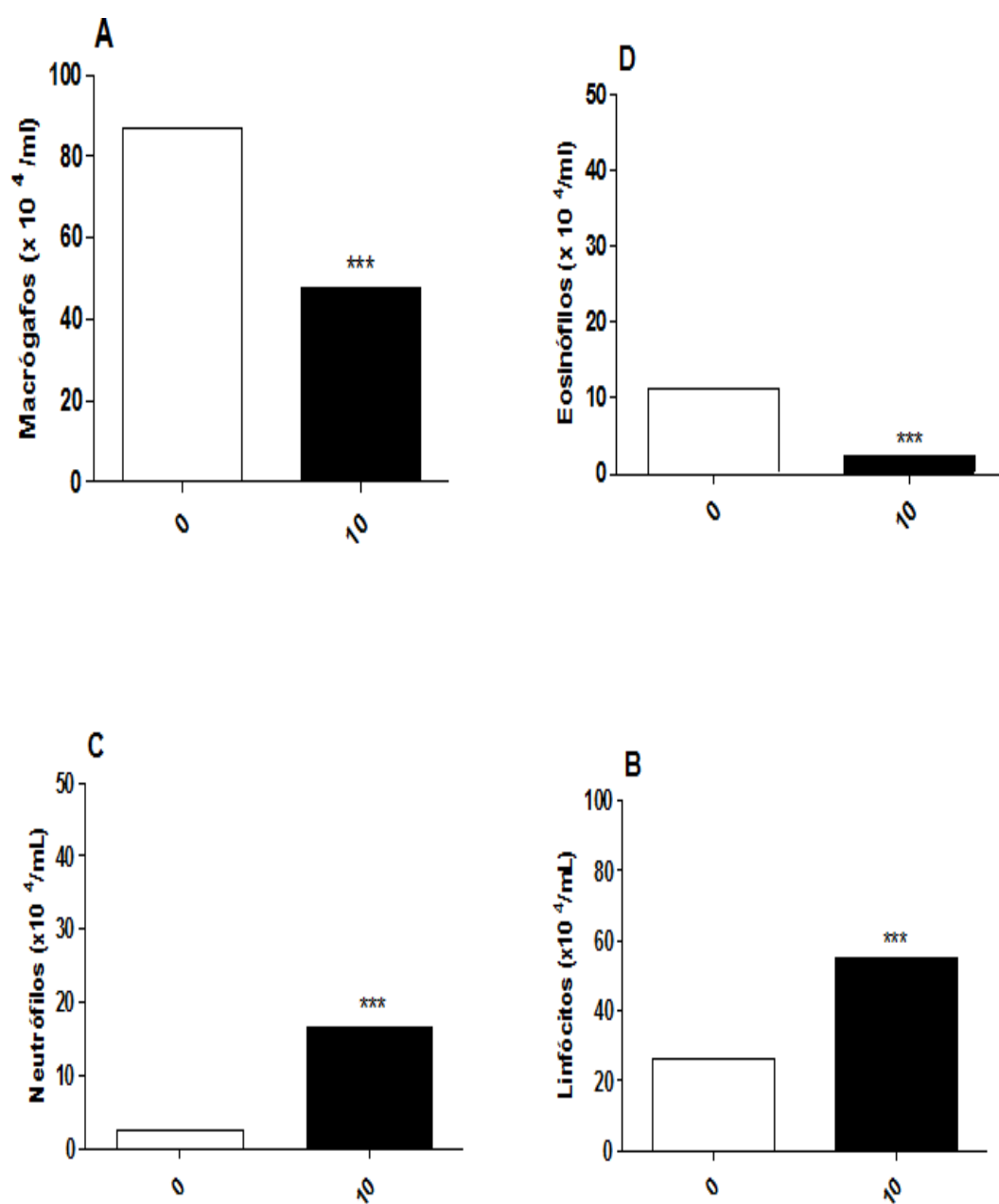


Figura 2. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número de macrófagos (A), eosinófilos (B), neutrófilos (C) e linfócitos (D) recuperadas do escarro induzido, analisadas na câmara de *newbauer*. Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas. . *** p<0,001 quando comparado com o dia 0.

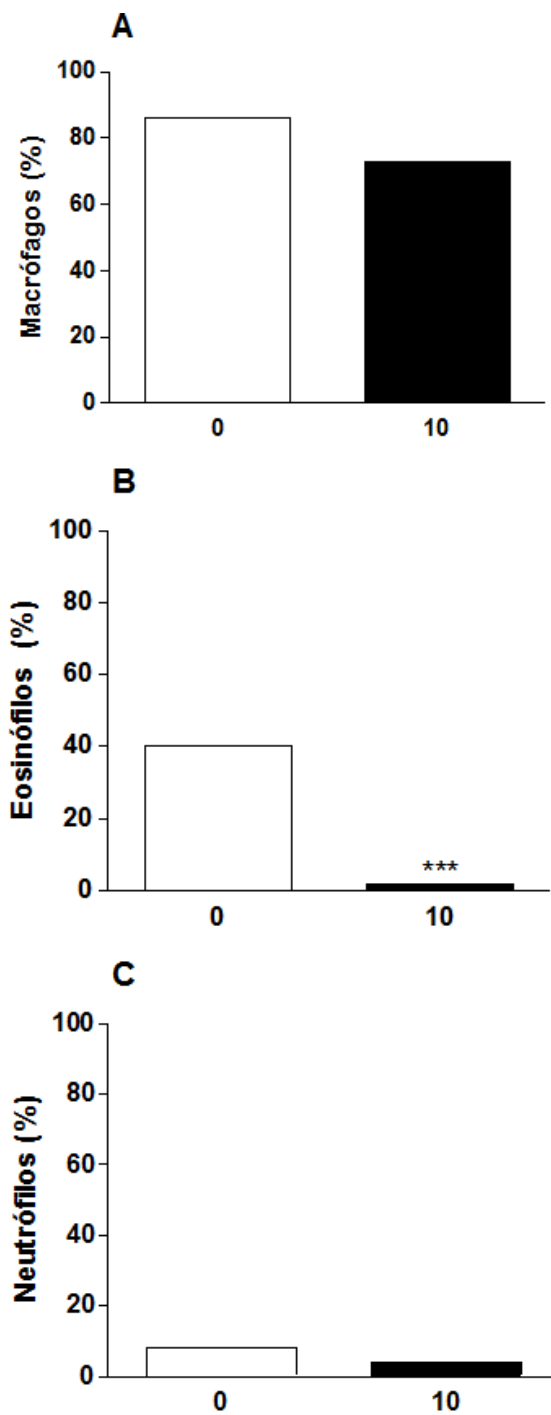


Figura 3. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a porcentagem de macrófago (A), eosinófilo (B) e neutrófilo (C) recuperadas do escarro induzido (*follow up*). Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas. As células foram processadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo. *** $p < 0,001$ quando comparado com o dia 0.

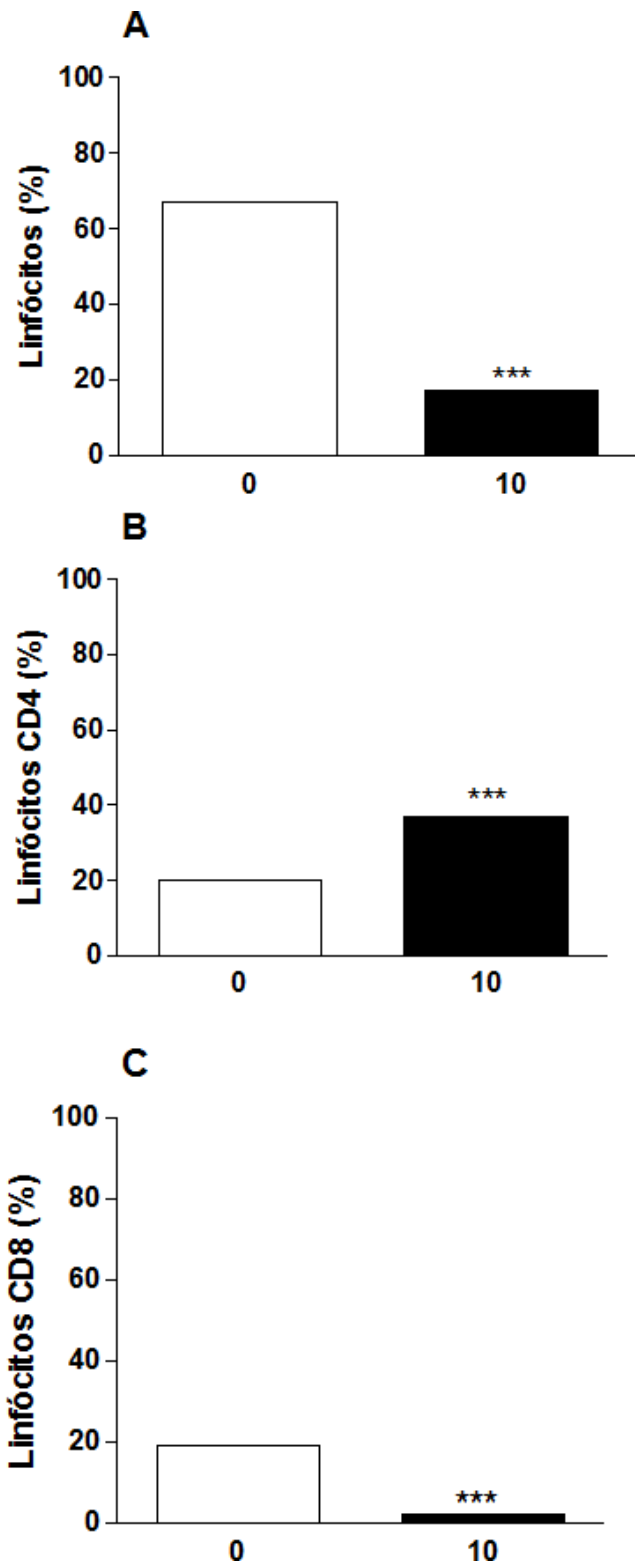


Figura 4. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a porcentagem de linfócitos (CD3⁺) (*follow up*) totais (A), linfócitos CD4 (B) e linfócitos CD8 (C) recuperadas do escarro induzido. Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas. As células foram processadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo. *** $p < 0,001$ quando comparado com o dia 0.

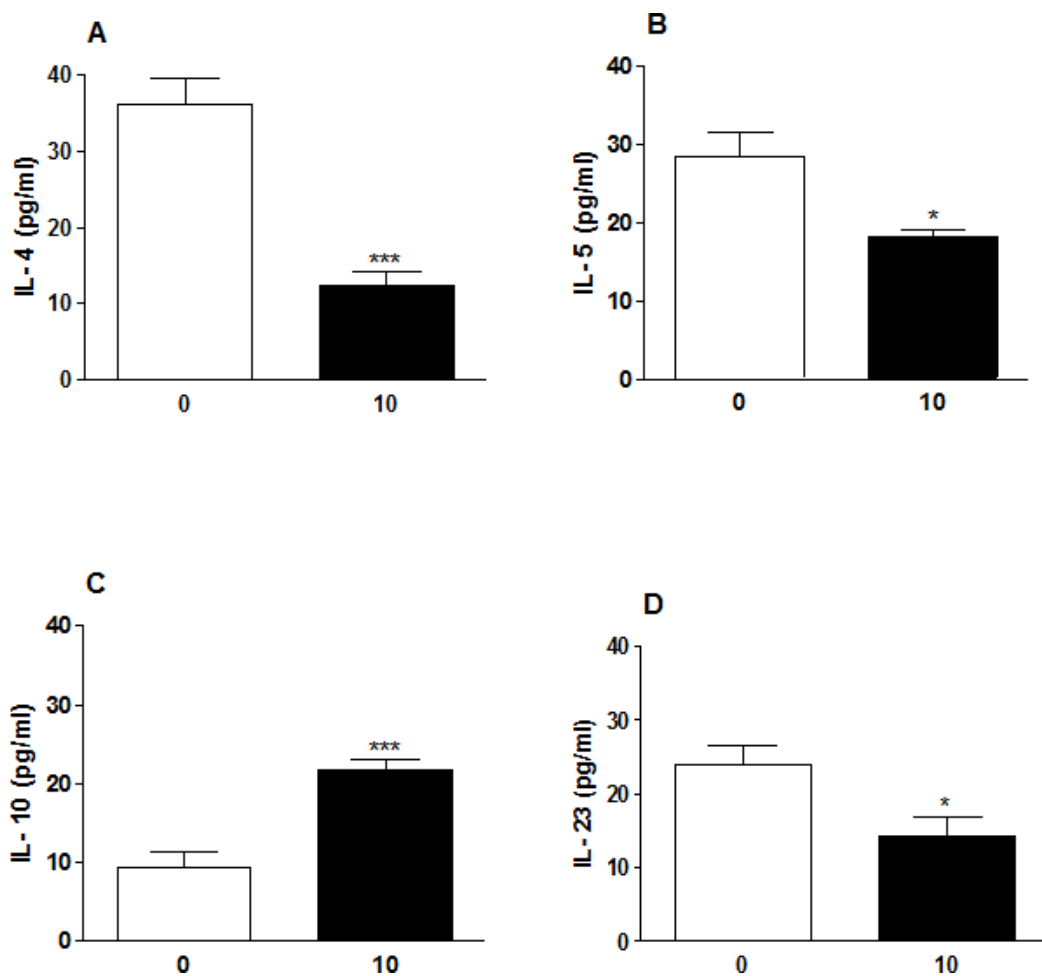


Figura 5. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre os níveis de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) e IL-23 recuperadas do escarro induzido (*follow up*). Paciente asmática fazendo uso de montelukaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas. * $p < 0,001$ quando comparado com o dia 0.**

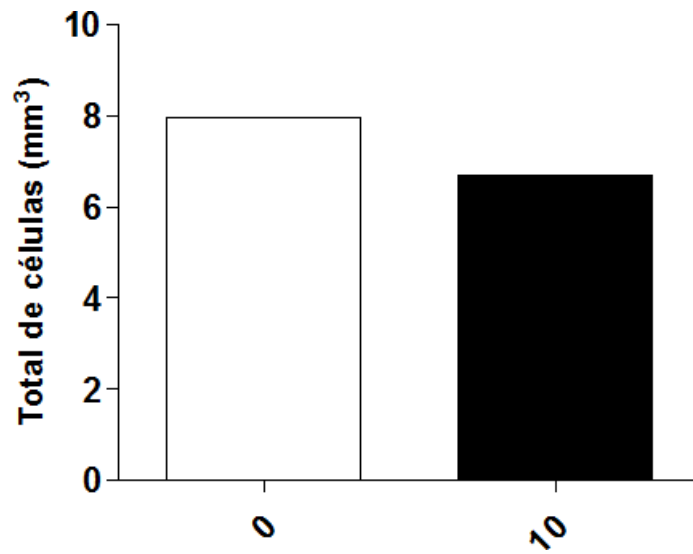


Figura 6. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de leucócitos circulantes (*follow up*). Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas.

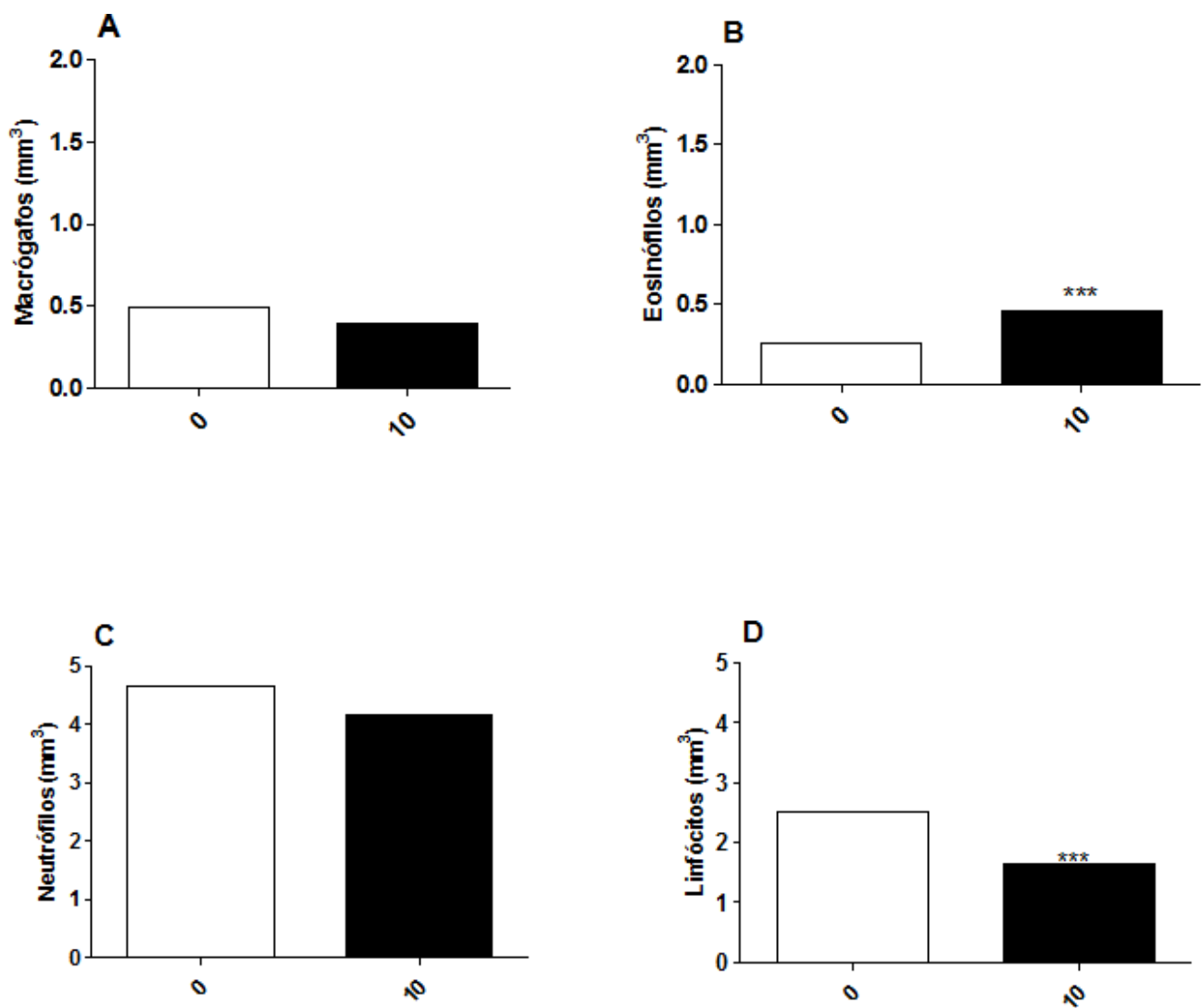


Figura 7. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número de macrófagos (A), eosinófilos (B), neutrófilos (C) e linfócitos (D) circulantes (*follow up*). Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas. *** $p < 0,001$ quando comparado com o dia 0.

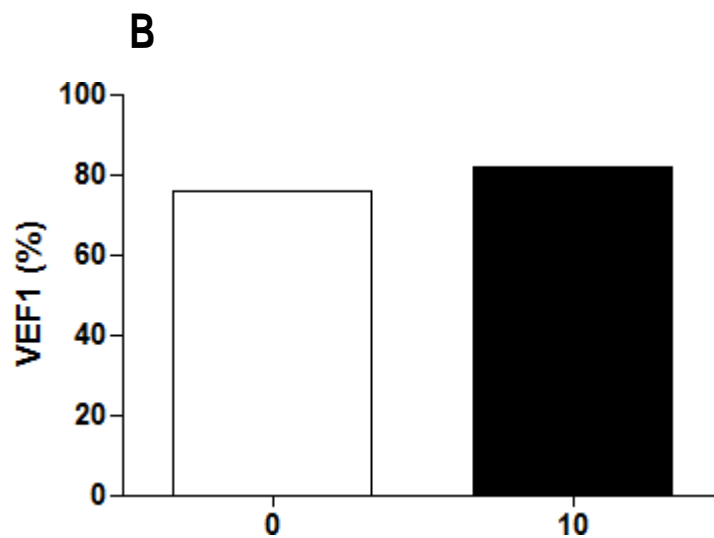
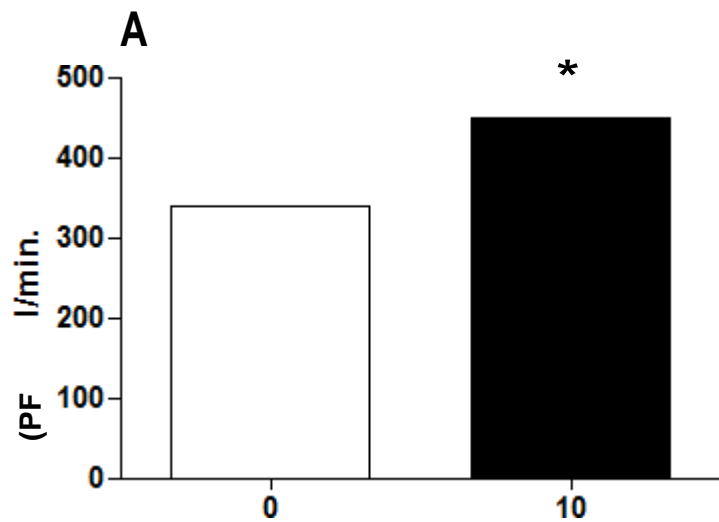


Figura 8. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o pico de fluxo expiratório e volume expiratório forçado no primeiro minuto (*follow up*). Em A foi analisado pico de fluxo expiratório e em B a espirometria. Paciente asmática fazendo uso de montelucaste, irradiada com LBI uma vez por semana por 10 semanas. *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle.

4.1.2.3 Protocolo 2 – Estudo Clínico

4.1.2.4 Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de células recuperadas do escarro induzido

De maneira a avaliar a inflamação alérgica pulmonar, determinamos o número de células totais no escarro induzido. Como pode ser observado na Figura 9, o número total de células aumentou no escarro induzido dos pacientes após a aplicação do LBI. Em relação ao número de macrófagos no escarro induzido foi verificado que houve redução nos pacientes após a aplicação com LBI (Figura A), bem como a redução de eosinófilos (Figura B).

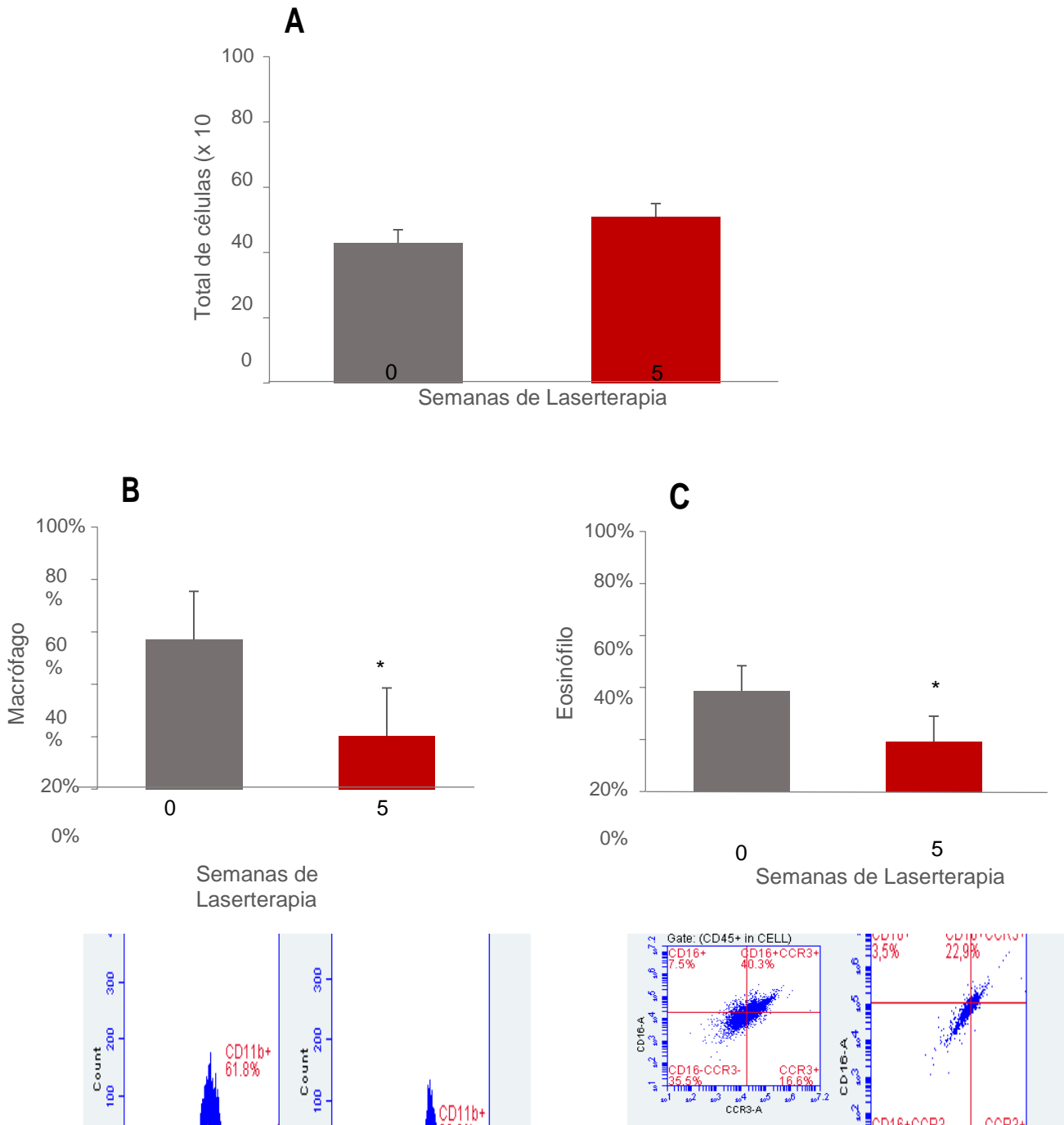


Figura 9. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número total de células (A), macrófagos (B) e eosinófilos (C) presentes no escarro induzido. Os grupos usados no estudo foram de pacientes asmáticos (cinza) e os mesmos após 5 semanas de terapia com laser (vermelho). As células pulmonares foram analisadas por citometria de fluxo. Valores expressos como média e desvio padrão de 6 pacientes. * $p < 0,05$ em relação ao dia 0.

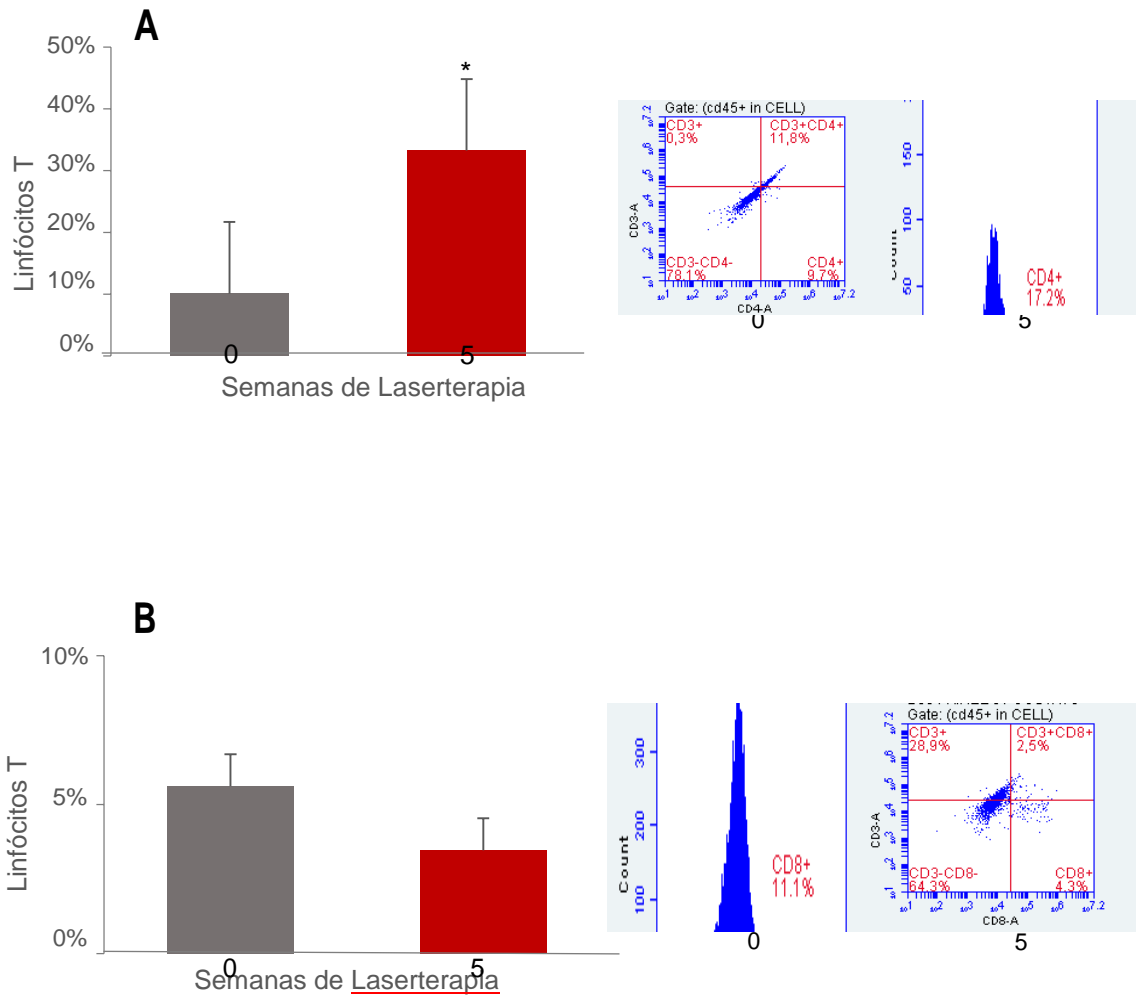


Figura 10. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o número de linfócitos CD4⁺ (B) e linfócitos CD8⁺ (C) presentes no no escarro induzido. Os grupos usados no estudo foram de pacientes asmáticos (cinza) e os mesmos após 5 semanas de terapia com laser (vermelho). As células pulmonares foram analisadas por citometria de fluxo. Valores expressos como média e desvio padrão de 6 pacientes. . * p < 0,05 em relação ao dia 0.

Os níveis de citocinas foram quantificados e como pode ser observado houve aumento significativo dos níveis de IFN- γ (Figura 11 a), bem como dos níveis de IL-10 (Figura 11b) após 5 semanas de aplicação do LBI, mostraram-se aumentados.

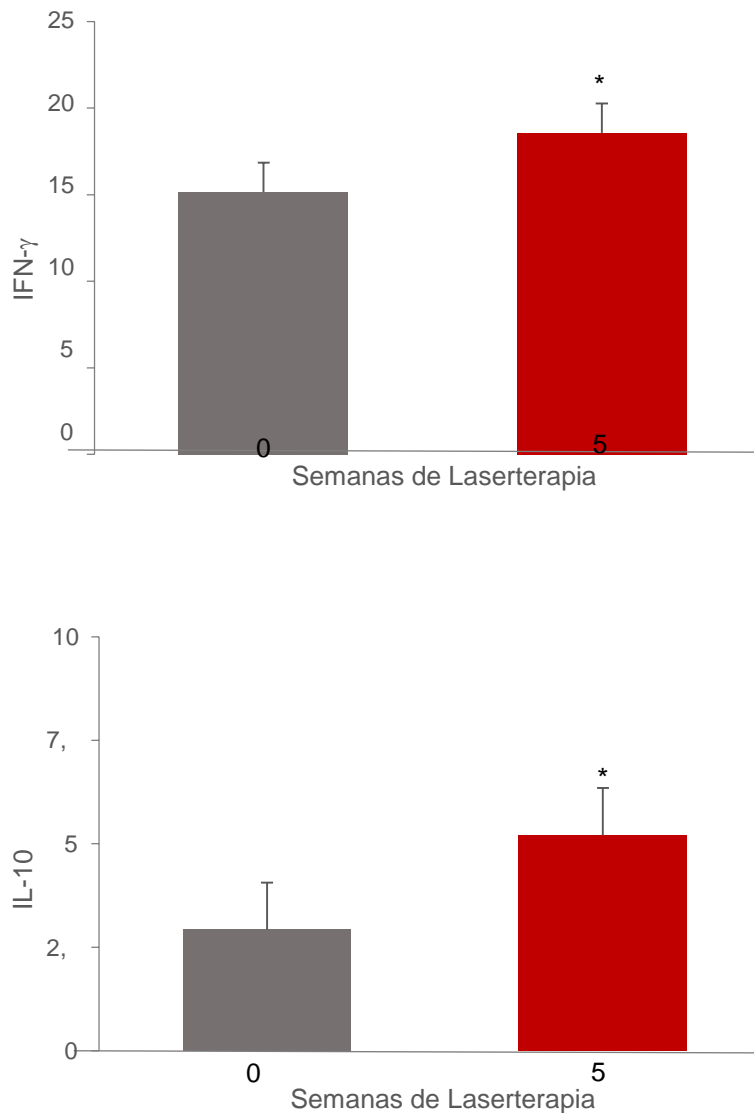


Figura 11. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre os níveis de IFN- γ (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de escarro induzido. Os grupos usados no estudo foram de pacientes asmáticos (cinza) e os mesmos após 5 semanas de terapia com laser (vermelho). As células pulmonares foram analisadas por citometria de fluxo. Valores expressos como média e desvio padrão de 6 pacientes. . * p < 0,05 em relação ao dia 0.

Na Figura 12A, verificamos aumento nos níveis de IL-1 β e IL-6 (Figura 12B) após a laserterapia. Já em relação aos níveis de IL-8, esta quimiocina demonstrou estar reduzida nos pacientes após a aplicação do LBI (Figura 12C).

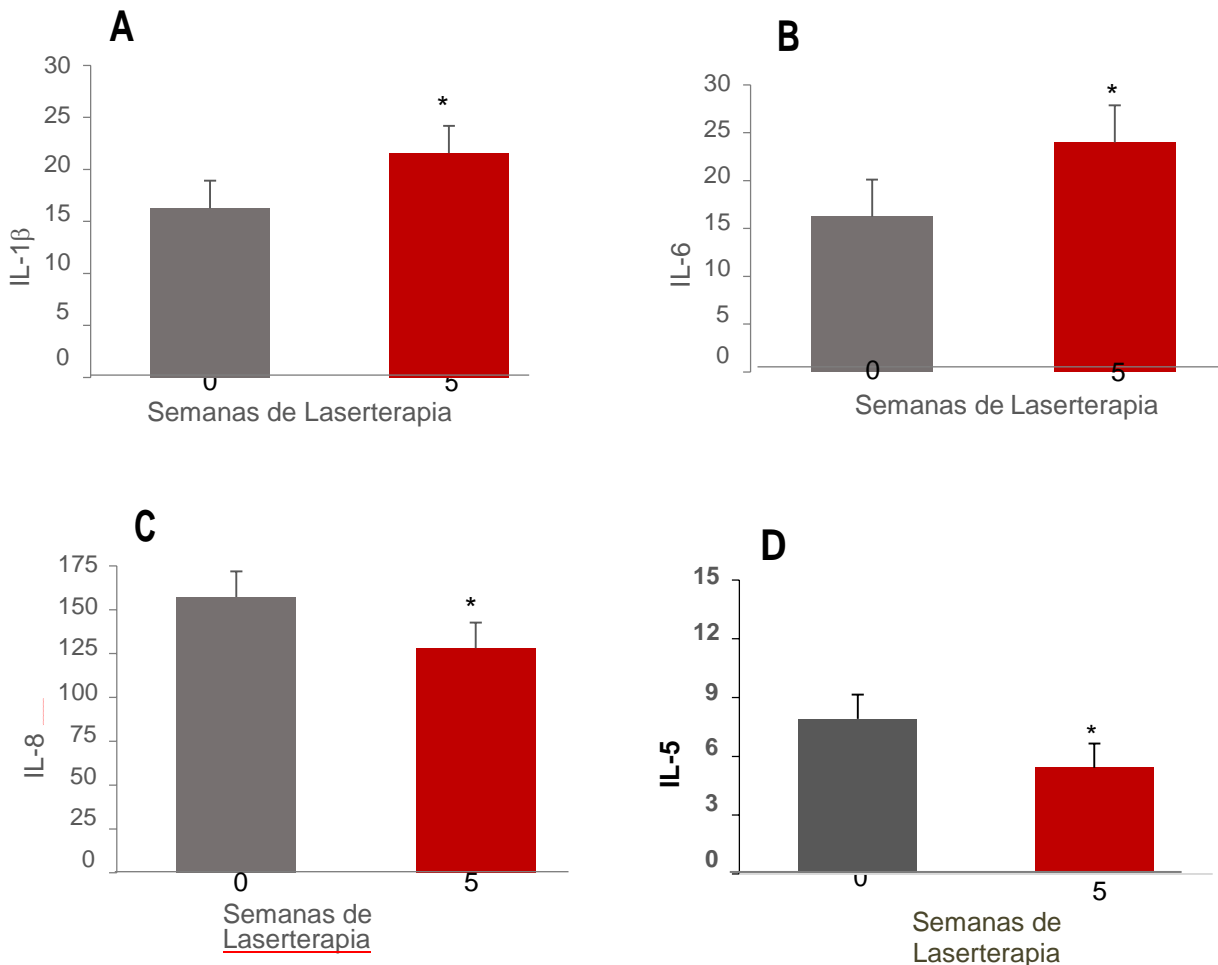


Figura 12. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre os níveis de IL-1 β (A), IL-6 (B) IL-8 (C) e IL-5 (D) no sobrenadante de escarro induzido. Os grupos usados no estudo foram de pacientes asmáticos (cinza) e os mesmos após 5 semanas de terapia com laser (vermelho). As células pulmonares foram analisadas por citometria de fluxo. Valores expressos como média e desvio padrão de 6 pacientes. * p < 0,05 em relação ao dia 0.

O pico de fluxo respiratório foi verificado a cada sessão de laserterapia e como podemos observar houve um aumento significativo do pico de fluxo respiratório após 5 semanas de terapia com laser.

Figura 12. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre os níveis de IL-1 β (A), IL-6 (B)

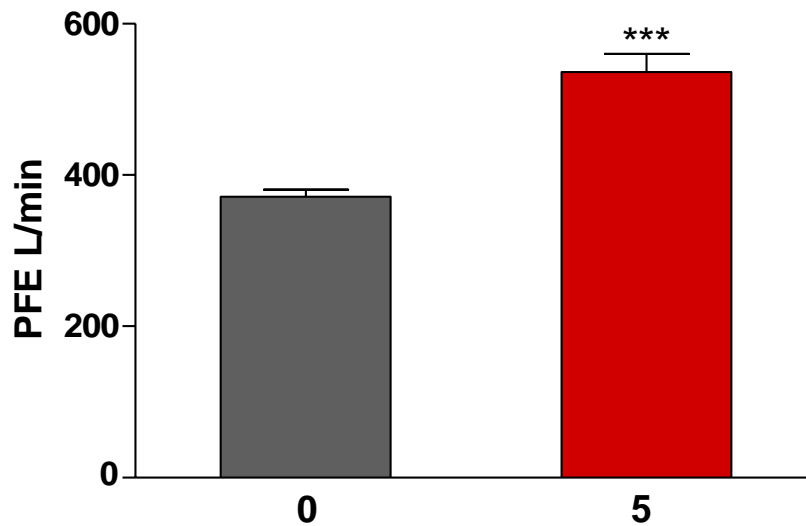


Figura 13. Efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre o pico de fluxo expiratório. Foi analisado peak flow. Os grupos usados no estudo foram de pacientes asmáticos (cinza) e os mesmos após 5 semanas de terapia com laser (vermelho). * $p < 0,05$ quando comparado com o dia 0.

4.2 Fase 2 – Procolo 3

4.2.1 Efeito da terapia com laser de baixa intensidade (LBI) sobre o número total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA).

Na Figura 14 analisamos o total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais não manipulados (Basal), desafiados com ovoalbumina (OVA(72h)) e eutanasiados 72h após o último desafio. Animais desafiados com OVA e irradiados com laser (OVA+L(72h)) e eutanasiados 72h após o último desafio. Podemos redução significativa do número total de células do grupo OVA+L(72h) em relação ao grupo OVA(72h). Em relação ao número de macrófagos não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos OVA(72h) e OVA+L(72h). Já em relação ao número de linfócitos e eosinófilos no grupo OVA+L(72) houve redução significativa em relação ao grupo OVA(72h).

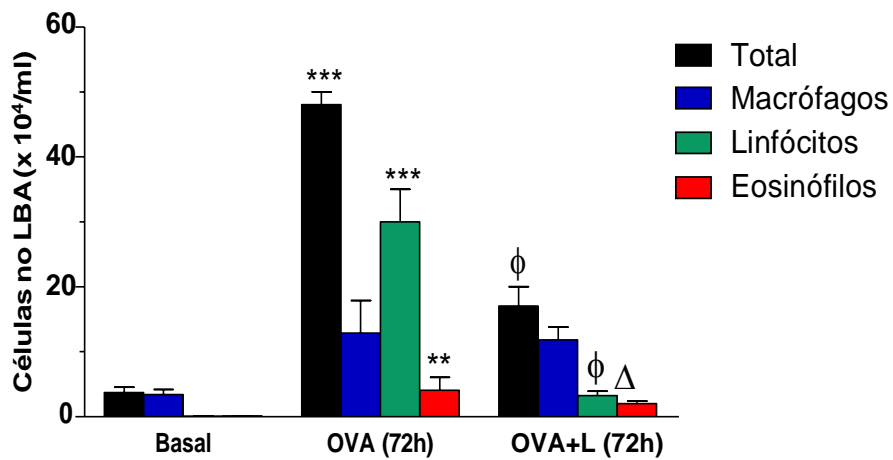


Figura 14. Efeito da terapia com LBI em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA(72h) (animais desafiados com OVA e sacrificados após 72h do último desafio), OVA+L(72h) (animais desafiados com OVA, irradiados com LBI, sacrificados após 72h do último desafio). Foram avaliadas as células recuperadas do LBA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Basal; $\phi p < 0,001$ em relação ao grupo OVA(72h); $\Delta p < 0,05$ em relação ao grupo OVA(72h).

Na Figura 15 avaliamos o número total e diferencia de células no (LBA) dos animais não manipulados (Basal), animais desafiados por 5 semanas (OVA(2s)), OVA+L(2s) animais desafiados por 5 semanas, tratados com laser apenas na 3ª semana. Os resultados permitiram observar o aumento do número total de células no grupo OVA(2s) em relação ao grupo basal de forma significativa. Já o grupo OVA+L(2S) apresentou redução significativa do número total de células em relação ao grupo OVA(2s). No que diz respeito ao número de eosinófilos, macrófagos e linfócitos houve uma redução significativa em relação ao grupo OVA (2s).

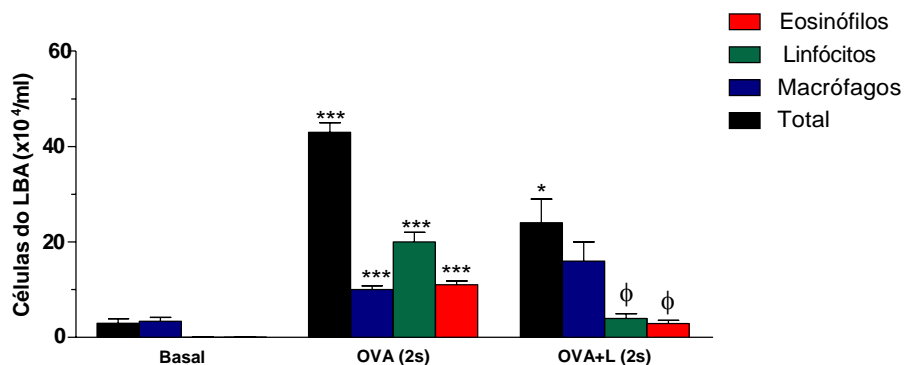


Figura 15. Duração do efeito da terapia com LBI em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA(2s) (animais desafiados com OVA e sacrificados após 24 h do último desafio), OVA+L(2s) (animais desafiados com OVA, irradiados com LBI, sacrificados após 24 h do último desafio). Foram avaliadas as células recuperadas do LBA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Basal; $\phi p < 0,001$ em relação ao grupo OVA(2s); $\Delta p < 0,05$ em relação ao grupo OVA(2s).

5. DISCUSSÃO

A terapia de fotobiomodulação vem demonstrando ser eficaz no tratamento clínico pós-cirúrgico, auxiliando a cicatrização de feridas complexas operatórias, bem como no reparo tecidual (pós-cirurgias de grande porte), reparo ósseo, redução de edema e na analgesia de inúmeros processos ^{63,64,80,85}. Entretanto, estudos acerca da terapia com LBI em pacientes asmáticos ainda são escassos. Os dados observados em nosso estudo demonstraram que houve promoção de uma resposta anti-inflamatória bem como pode auxiliar na redução da obstrução de vias aéreas inferiores em pacientes com asma brônquica tratados com LBI. Sendo assim, os resultados do nosso estudo piloto realizados com uma paciente asmática sob uso de antagonista de leucotrieno (montelucaste sódico) corroboram com os dados dos estudos experimentais realizados anteriormente em nosso laboratório, tais como, melhora da inflamação e função pulmonar após a laserterapia ⁵⁸.

Mediante os resultados observados, a curto e a longo prazo no estudo de caso resolvemos avaliar se este mesmo comportamento poderia ser encontrado em outro grupo de pacientes asmáticos com grau leve e moderado, sob uso de broncodilatadores, corticóides e antagonista de leucotrienos. Sendo assim, um grupo maior de pacientes foi avaliado a fim de confirmar tal hipótese. Neste grupo, foram realizadas 10 sessões de laser durante 5 semanas consecutivas (2 vezes por semana), semelhante às 10 sessões realizados no estudo de caso prévio.

A localização anatômica das aplicações desta terapia é original e baseada em estudos prévios. Utilizamos laser vermelho (660nm) de forma pontual na cavidade nasal, na mucosa palatina, na úvula e diretamente sobre os vasos sublinguais ⁸². Como os pacientes asmáticos geralmente apresentam rinite e infecção de repetição nos seios da face foi decidido utilizar também a terapia com infravermelho sobre estes pontos da face. Nestes foram aplicados o infravermelho (780nm) no ponto dos seios estomoidal, frontais e maxilares, além da região da cricóide.

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram que a terapia com LBI não alterou significativamente o número de células totais no escarro induzido. Entretanto, na análise diferencial foi verificada uma redução do número de macrófagos, bem como de eosinófilos. Em estudo realizado por Cury et al (2013), em modelo experimental de lesão pulmonar foi relatado que a laserterapia também reduziu o número de macrófagos no lavado broncoalveolar, assim como no estudo de Silva et al (2014) onde foi observado redução no número de eosinófilos após aplicação do LBI em modelo de asma ^{58,86}.

Pode se notar que tanto os eosinófilos como os linfócitos TCD4⁺ desempenham um papel fundamental na patogênese da inflamação alérgica pulmonar por liberação de mediadores inflamatórios, tendo influência direta no perfil inflamatório da asma, uma vez que, secretam citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13. Além disso, os linfócitos CD4⁺ estão relacionados com a diferenciação de linfócito Th1, Th2, Th17 e T reguladores. Nesse contexto, avaliamos a porcentagem de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no escarro induzido. Nossos resultados apontaram para um incremento de células CD4⁺ nos pacientes após o tratamento com LBI. Nesse cenário, o aumento encontrado poderá estar relacionado às células T reguladoras (regs), o que justifica os níveis elevados de IL-10 do escarro induzido dos pacientes após a aplicação do laser, com uma ação anti-inflamatória efetiva ⁽⁶⁵⁾. Da mesma maneira, em estudo realizado por Miranda Silva et al (2015) em modelo experimental de inflamação pulmonar, o LBI foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 ⁸³. A literatura descreve que a IL-10 tem um importante papel no controle da magnitude da inflamação pulmonar, já que esta regula a produção de IL-4 e IL-5 pelos linfócitos Th2 ⁽⁶⁷⁾, além da regulação da ativação de IgE mediada por mastócitos ⁸⁴. Outros estudos realizados em modelos animais de asma relatam também que esta citocina (IL-10) é capaz de inibir a inflamação das vias aéreas e a hiperreatividade ⁸⁵. Já em pacientes asmáticos os níveis de IL-10 se mostram reduzidos quando comparados a indivíduos saudáveis ^{41, 66}.

É notável que, as concentrações de IL-10 demonstraram estarem elevadas nos pacientes após a aplicação do LBI como observado na literatura. Com esses achados, podemos inferir que ocorre um potencial anti-inflamatório do laser, via linfócito T_{reg}, liberando níveis aumentados de IL-10, para controlar a inflamação pulmonar.

Em relação a quantificação de CD8⁺, não foram encontradas diferenças antes e após a aplicação do LBI. Os linfócitos TCD8⁺ (citotóxicos) estão relacionados com a liberação de citocinas Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-8. Muito embora não se tenha observado alterações nos níveis de CD8⁺, os níveis de IL-8 se mostraram reduzidos nos pacientes após a aplicação do LBI.

Envolvida na produção, maturação e ativação de eosinófilos, a IL-5 quando administrada em modelos *in vivo*, denota promover a eosinofilia ⁴⁴. Ainda, em animais *Knockout* para IL-5, a mesma demonstra reduzir o número de eosinófilos circulantes em resposta ao desafio com ovoalbumina (OVA) ⁴⁸. Em relação aos níveis de IL-5, os resultados revelaram redução estatisticamente significativa após a irradiação do laser, o que contribui por justificar a redução do número de eosinófilos no escarro induzido de nossos pacientes. Os dados da literatura em modelos experimentais confirmam com os dados da análise do escarro dos pacientes em relação aos níveis de IL-5 após a terapia

com laser. Este foi sendo capaz de melhorar de forma eficaz os sinais e sintomas que todos os nossos pacientes referiam ⁸⁶. Os achados deste estudo, portanto, corroboram com o estudo de caso (piloto) realizado inicialmente. Não obstante, optamos por dosar outros mediadores como o IFN- γ .

Ademais, os baixos níveis de IFN- γ estão correlacionados com pacientes asmáticos, podendo traduzir a persistência do padrão de linfócitos Th2 na resposta imunológica ⁸⁷. Segundo Prescott *et al.* (1999), o IFN- γ apresenta propriedades imunoreguladoras e contribui com a redução de citocinas precursoras dos linfócitos Th2, como: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e com a diferenciação de linfócitos Th1, sugerindo que a sua falta pode favorecer o desenvolvimento de respostas alérgicas. Em contrapartida, estudos realizados com pacientes asmáticos graves demonstram altos níveis de IFN- γ na fase aguda ^{69, 43}. Nesse sentido, nossos resultados demonstraram um incremento dos níveis de IFN- γ , podendo sugerir que houve um desvio de resposta para Th1, alterando, assim, a resposta Th2 nos pacientes asmáticos tratados com LBI.

Na literatura são encontrados altos níveis de IL-6, sendo esta citocina um modulador da produção de IgE dependente de IL-4, além de mediar a diferenciação de linfócitos B. Além disso, é considerada um marcador de inflamação em conjunto com o TNF- α e a IL-1 β ⁷⁰. Nossos resultados apontaram para um aumento tanto na produção de IL-6 quanto de IL1- β . A IL1- β induz a secreção de muco e está relacionada com a diferenciação de células T. Com relação ao aumento de IL-6 em nossos resultados, estes dados não eram esperados e não estão de acordo com os aspectos anti-inflamatórios da IL-10 e a melhora do pico de fluxo inflamatório observado nos pacientes. Podemos dizer que o LBI facilitou todo o processo de cascatas anti-inflamatórias e buscou conduzir as células para a homeostase.

O pico de fluxo expiratório (PFE) é indicado pelo guia global de diretrizes para o controle da asma, como medida de controle indireto de obstrução das vias aéreas⁸². O PFE avalia o pico máximo de fluxo expiratório atingido em uma expiração forçada e pode detectar o estreitamento das vias aéreas, funcionando como um alerta sobre a redução da função respiratória ⁷¹. Em nossos resultados, o PFE encontrou-se aumentado nos pacientes asmáticos após a terapia com LBI, ou seja, podemos inferir uma melhora da função pulmonar nos nossos pacientes com asma.

Após o término do tratamento com a laserterapia (após 5 semanas) os pacientes relataram melhora dos sintomas como redução de sensação de aperto no peito, tosse, falta

de ar e ainda, redução do uso de broncodilatadores. Logo, levando-se em consideração os relatos dos pacientes resolvemos avaliar, através de um modelo experimental de asma, por quanto tempo perduraria o efeito do laser no organismo dos animais induzidos a asma e tratados com laser. Sendo assim, uma parte experimental com animais Balb/C foi realizada e os resultados apontaram para uma redução da inflamação pulmonar nos animais que foram irradiados com laser e eutanasiados após 72h, bem como nos animais que foram tratados com laser e eutanasiados após duas semanas. Estes dados sugerem a perduração dos efeitos do laser mesmo após duas semanas, contribuindo com a manutenção da redução da inflamação pulmonar.

Contudo, nossos achados corroboram com os estudos em modelos experimentais realizados em nosso laboratório anteriormente. Nesse sentido, Brito et al (2014) realizaram estudos em modelo experimental de asma induzido por OVA, com a terapia de LBI sozinha ou associada ao tratamento com antagonista de leucotrieno. Os resultados demonstraram redução dos parâmetros avaliados com o tratamento com LBI sozinho ou quando associado ao tratamento convencional⁸³. Uma vez que os resultados em modelos animais evidenciaram diminuição da inflamação pulmonar mediante a irradiação do laser.

Na literatura, os dados referentes à inflamação pulmonar em modelos experimentais de asma utilizando a laserterapia demonstram diminuição da migração de células totais no pulmão, bem como a redução de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo, dessa forma, com a diminuição da inflamação pulmonar^{79,81, 59, 57}.

Cada fase do estudo teve sua importância principalmente no que concerne aos efeitos do laser a curto e à longo prazo. O estudo piloto foi importante para nos direcionar em relação ao protocolo clínico aplicado em pacientes asmáticos, verificando a resposta a curto e a longo prazo da terapia com fotobiomodulação nestes pacientes. Enquanto no estudo em animais conseguimos avaliar a resposta do efeito da terapia com laser sob a inflamação pulmonar a longo prazo, confirmando os achados do estudo piloto no *followup* e o relato de melhora dos pacientes semanas após o término do tratamento.

Embora, os resultados dos nossos pacientes tenham sinalizado um efeito seguro e eficaz do LBI no que tange a inflamação pulmonar sem a promoção de efeitos colaterais e de forma não-invasiva, estudos adicionais se fazem necessários com uma maior amostragem, a fim de se estabelecer os achados como uma terapia coadjuvante, já que a laserterapia conseguiu amenizar os sintomas dos pacientes com asma brônquica.

6. Conclusão

Em conjunto, nossos resultados evidenciam que a terapia de fotobiomodulação foi capaz de reduzir os sintomas da doença como dispneia, sibilos, obstrução das vias aéreas e sensação de cansaço a pequenos esforços em pacientes asmáticos e ainda, manter um efeito duradouro do laser após duas semanas da aplicação conforme os achados do estudo experimental.

- Pós-administração de LBI pode-se observar uma atenuação do influxo de células inflamatórias e aumento das citocinas anti-inflamatórias com resposta celular eficiente;
- Os sintomas, relativos à asma, foram reduzidos após serem tratados com laser, bem como melhorou a efetividade da obstrução pulmonar neste estudo clínico;
- A redução da inflamação alérgica pulmonar no modelo experimental de asma perpetuou-se por duas semanas após a aplicação do LBI.

Sendo assim, através de nossos dados pode-se concluir que a fotobiomodulação produziu uma ação favorável tanto em animais quanto em pacientes. Desta forma, este trabalho pioneiro denotou uma resposta clínica dinâmica e eficaz sem efeitos colaterais, não obstante se faz necessário uma maior amostra. Nossos resultados contribuirão para o sucesso do tratamento da asma brônquica com LBI, mostrando, assim, ser uma possível terapia segura, não invasiva e de baixo custo, que poderá vir a ser adotada em políticas públicas no país.

7. Referências

1. Harris RE. Global Epidemiology of Chronic Diseases : The Epidemiologic Transition. *Epidemiol Chronic Dis*. 2013;1–24.
2. Von Mutius E, Vercelli D. Farm living: Effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010;10(12):861–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2871>
3. O’Byrne PM. Global guidelines for asthma management: summary of the current status and future challenges. *Pol Arch Med Wewnętrznej* [Internet]. 2010;120:511–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178908>
4. Barreto ML, Ribeiro-Silva RDC, Malta DC, Oliveira-Campos M, Andreazzi MA, Cruz AA. Prevalence of asthma symptoms among adolescents in Brazil: National Adolescent School-based Health Survey (PeNSE 2012). *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2014;17 Suppl 1(PeNSE 2012):106–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054257>
5. Hinds DR, DiSantostefano RL, Le H V, Pascoe S. Identification of responders to inhaled corticosteroids in a chronic obstructive pulmonary disease population using cluster analysis. *BMJ Open* [Internet]. 2016;6(6):e010099. Available at: <http://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2015-010099>
6. Menezes A, Macedo S. Pharmacological treatment of COPD. *J Bras Pneumol*. 2011;37(June 2011):527–43.
7. Mamalis A, Siegel D, Jagdeo J. Visible Red Light Emitting Diode Photobiomodulation for Skin Fibrosis: Key Molecular Pathways. *Curr Dermatol Rep* [Internet]. 2016;5(2):121–8. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13671-016-0141-x>
8. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2010;690(1–2):24–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005>
9. Hardy E, Smith J. International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Eur Respir*. 1998;12(315–35):93–5.
10. Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2005;60(1):23–9.
11. Delfino RJ, Zeiger RS, Seltzer JM, Street DH, McLaren CE. Association of asthma

symptoms with peak particulate air pollution and effect modification by anti-inflammatory medication use. *Environ Health Perspect.* 2002;110(10):607–17.

12. Ligeiro De Oliveira AP, Oliveira-Filho RM, Da Silva ZL, Borelli P, Tavares De Lima W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: Interaction between estradiol and corticosterone. *Neuroimmunomodulation.* 2004;11(1):20–7.
13. Oliveira a PL De, Page CPÃ, Spina DÃ, Tavares-de-lima W. Clinical and Experimental Allergy. 2007;459–70.
14. de Oliveira APL, Peron JPS, Damazo AS, Franco AL dos S, Domingos HV, Oliani SM, et al. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung E-selectin in rats. *Respir Res* [Internet]. 2010;11(1):115. Available at: <http://respiratory-research.com/content/11/1/115>
15. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(September):1–22.
16. Bax HJ, Keeble AH, Gould HJ. Cytokinergic IgE action in mast cell activation. *Front Immunol.* 2012;3(AUG):1–16.
17. Barnes PJ. Review series The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3546–56.
18. Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, Gallelli L, Calabrese C, Terracciano R, et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm.* 2015;2015.
19. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2011;128(3):451–62. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.047>
20. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int* [Internet]. 2008;57(1):1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.R-07-154>
21. Maneechotesuwan K, Xin Y, Ito K, Jazrawi E, Lee K-Y, Usmani OS, et al. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J Immunol.* 2007;178:2491–8.
22. The lungs at the frontlines of immunity. *Nat Immunol.* 2015;16(1):17.

23. McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med* [Internet]. 2017;4(June). Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00093/full>
24. Nayak D, Roth TL, MCGAVERN DB. Early local immune defenses in the respiratory tract. 2014;17(2):367–402.
25. Guth AM, Janssen WJ, Bosio CM, Crouch EC, Henson PM, Dow SW. Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages. *AJP Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2009;296(6):L936–46. Available at: <http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.90625.2008>
26. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu Q-L, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl Res* [Internet]. 2017; Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524417302682>
27. Cook PC, MacDonald AS. Dendritic cells in lung immunopathology. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2016;38(4):449–60. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-016-0571-3>
28. Spence LE. To the editor : Connecting the dots : monocyte / DC and NK subsets in human peripheral blood. 2016;116(15):2859–61.
29. Giembycz M a, Lindsay M a. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1999;51(2):213–340. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10353986>
30. Shamri R, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophils in innate immunity: An evolving story. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):57–83.
31. Ciepiela O, Ostafin M, Demkow U. Neutrophils in asthma-A review. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. 2015;209:13–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.004>
32. Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):559–65.
33. Shannon J, Ernst P, Yamauchi Y, Olivenstein R, Lemiere C, Foley S, et al. Differences in airway cytokine profile in severe asthma compared to moderate asthma. *Chest* [Internet]. 2008;133(2):420–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.07-1881>

34. Montero Vega MT. New aspects on inflammation in allergic diseases. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2006;34(4):156–70.
35. Poulain M, Doucet M, Major GC, Drapeau V, Sériès F, Boulet L-P, et al. The effect of obesity on chronic respiratory diseases: pathophysiology and therapeutic strategies. *CMAJ* [Internet]. 2006;174(9):1293–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1435949&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Shi HZ, Deng JM, Xu H, Nong ZX, Xiao CQ, Liu ZM, et al. Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(6 Pt 1):1818–21.
37. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1618–23.
38. Renauld J-C. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001;54(8):577–89.
39. May RD, Fung M. Strategies targeting the IL-4/IL-13 axes in disease. *Cytokine* [Internet]. 2015;75(1):89–116. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.018>
40. Duez C, Kips J, Pestel J, Tournoy K, Tonnel AB, Pauwels R. House dust mite-induced airway changes in hu-SCID mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):200–6.
41. Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, De Klerk N, Suriyaarachchi D, et al. An immunoepidemiological approach to asthma: Identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. 2005;365(9454):142–9.
42. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(1):50–6.
43. Persky ME, Murphy KM, Farrar JD. IL-12, but not IFN- α , promotes STAT4 activation and Th1 development in murine CD4⁺ T cells expressing a chimeric

murine/human Stat2 gene. *J Immunol* [Internet]. 2005;174(1):294–301. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15611252&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/CAC61E6B-8015-4560-8BB8-53174DE5B7F3>

44. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* [Internet]. 2006;203(3):755–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118252&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Campos HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. *Rev Bras Pneumol Sanitária*. 2007;15(1):47–60.
46. Yudit MR, Cidlowski JA. The Glucocorticoid Receptor: Coding a Diversity of Proteins and Responses through a Single Gene. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2002;16(8):1719–26. Available at: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2002-0106>
47. Barnes PJ. mechanisms. 1998;572:557–72.
48. Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pacific J Allergy Immunol*. 2013;31(1):3–10.
49. Chung H, Dai T, Sharma S, Huang Y, Carroll J, Hamblin M. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516–33.
50. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochem* [Internet]. 2004;69(1):81–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972023>
51. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy – an Update. *Dose-Response* [Internet]. 2011;9(4):dose-response.1. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
52. Höfling DB, Chavantes MC, Juliano AG, Cerri GG, Knobel M, Yoshimura EM, et al. Assessment of the effects of low-level laser therapy on the thyroid vascularization of patients with autoimmune hypothyroidism by color Doppler ultrasound. *ISRN Endocrinol* [Internet]. 2012;2012:126720. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3534372&tool=pmcentrez&>

rendertype=abstract

53. Rola P, Doroszko A, Derkacz A. The Use of Low-Level Energy Laser Radiation in Basic and Clinical Research. *Adv Clin Exp Medecine*. 2014;23(5):835–42.
54. Chen AC-H, Arany PR, Huang Y-Y, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-Level Laser Therapy Activates NF- κ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(7):e22453. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022453>
55. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with HeNe laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1995;27(3):219–23.
56. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):237–49.
57. Peron JPS, De Brito AA, Pelatti M, Brandão WN, Vitoretto LB, Greiffo FR, et al. Human tubal-derived mesenchymal stromal cells associated with Low level laser therapy significantly reduces Cigarette smoke-induced COPD in C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2015;10(8):1–18.
58. Silva VR, Marcondes P, Silva M, Villaverde AB, Castro-Faria-Neto HC, Vieira RP, et al. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol* [Internet]. 2014;194(1):37–48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.01.008>
59. Oliveira MC, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Custódio RWA, Silva VR, Damaceno-Rodrigues NR, et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2014;134:57–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.03.021>
60. Ökmen K, Metin Ökmen B. One-year follow-up results of intradiscal diode laser, radiofrequency, and pulsed radiofrequency therapies: a retrospective study. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2017;32(1):137–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-2095-4>
61. Ailioaie LM, Litscher G, Weber M, Ailioaie C, Litscher D, Chiran DA. Innovations and Challenges by Applying Sublingual Laser Blood Irradiation in Juvenile Idiopathic Arthritis. 2014;2014.

62. Tomimura S, Silva BP, Sanches IC, Canal M, Consolim-Colombo F, Conti FF, et al. Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(2):161–4.
63. Elseify MY, Mohammed NH, Alsharkawy AA, Elseoudy ME. Laser acupuncture in treatment of childhood bronchial asthma. *J Complement Integr Med [Internet].* 2013;10(1):199–203. Available at: <https://www.degruyter.com/view/j/jcim.2013.10.issue-1/jcim-2012-0006/jcim-2012-0006.xml>
64. Chaves ME de A, Piancastelli ACC, de Araujo AR, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):616–23.
65. Cotler HB, Chow RT, Hamblin MR, Carroll J, Hospital MG. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJ Orthop Rheumatol.* 2015;2(5).
66. Hoffmann F, Ender F, Schmutde I, Lewkowich IP, K??hl J, K??nig P, et al. Origin, localization, and immunoregulatory properties of pulmonary phagocytes in allergic asthma. *Front Immunol.* 2016;7(MAR):1–16.
67. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol [Internet].* 1996;97(6):1288–96. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674996701975%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8648025>
68. Tsai T-C, Lu J-H, Chen S-J, Tang R-B. Soluble interleukin-10 and transforming growth factor-beta in children with acute exacerbation of allergic asthma. *J Asthma [Internet].* 2009;46(1):21–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191132>
69. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672–88.
70. Kankaanranta H, Kauppi P, Tuomisto LE, Ilmarinen P. Emerging Comorbidities in Adult Asthma: Risks, Clinical Associations, and Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2016;2016(Cvd).
71. Boaventura CDM, Amuy FF, Franco JH, Sgarbi ME, Matos LB De, Matos LB De. Valores de referência de medidas de pico de fluxo expiratório máximo em escolares.

Arq Medicos do ABC. 2007;32(Supl.2):30–4.

72. Milton B, Whitehead M, Holland P, Hamilton V T he social and economic consequences of childhood asthma across the lifecourse: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jun;119(6):1337-48. Epub 2007 Apr 9
73. Chanez P¹, Wenzel SE, Anderson GP, Anto JM, Bel EH, Boulet LP, Brightling CE, Busse WW, Castro M, Dahlen B, Dahlen SE, Fabbri LM, Holgate ST, Humbert M, Gaga M, Joos GF, Levy B, Rabe KF, Sterk PJ, Wilson SJ, Vachier I. Severe asthma in adults: what are the important questions? *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2002;(40):1-23.
- .75. Chavantes MC, Tomimura S. Princípios básicos da luz e fundamentos do laser. In Chavantes MC, editor. *Laser em biomedicina: princípios e práticas*. São Paulo: Atheneu; 2009.
76. Barnes PJ. Glucocorticoids and asthma. *Lasers Med Sci*. 2014;29(3):1043-50. doi: 10.1007/s10103-013-1456-5. Epub 2013 Oct 26.
77. Wang XY, Ma WJ, Liu CS, Li YX. Effect of low-level laser therapy on allergic asthma in rats. *Child Care Health Dev*. 2004 Nov;30(6):711-28.
78. Mafra de Lima. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg Med*. 2009 Jan;41(1):68-74. doi: 10.1002/lsm.20735.
79. Mafra de Lima F, Costa MS, Albertini R, Silva JA Jr, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):189-97.
- 80- Ojea AR, Madi O, Neto RM, Lima SE, de Carvalho BT, Ojea MJ, Marcos RL, da Silva FS, Zamuner SR, Chavantes MC. Beneficial Effects of Applying Low-Level Laser Therapy to Surgical Wounds After Bariatric Surgery. *Photomed Laser Surg*. 2016 Nov;34(11):580-584.

81. Aimbire F, Santos FV, Albertini R, Castro-Faria-Neto HC, Mittmann J, Pacheco-Soares C. Low-level laser therapy decreases levels of lung neutrophils anti-apoptotic factors by a NF-kappaB dependent mechanism. *Int Immunopharmacol*. 2008 Apr;8(4):603-5. doi: 10.1016/j.intimp.2007.12.007. Epub 2008 Jan 15.
82. Page PM. *Global Strategy for*. 20017.
83. Miranda da Silva C, Peres Leal M, Brochetti RA, Braga T, Vitoretti LB, Saraiva Câmara NO, et al. (2015) Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS ONE* 10(11): e0142816. doi:10.1371/journal.pone.0142816
84. Pinto NC et al. World Association for Laser Therapy Meeting - WALT. Photobiomodulation effect in spontaneously hypertensive rats and humans: hemodynamic response and oxidative stress. 2016. (Congresso).
85. Pinto NC, Pereira MHC, Tomimura S, De Magalhães AC, Pomerantzeff PM, Chavantes MC. Low-Level Laser Therapy Prevents Prodromal Signal Complications on Saphenectomy Post Myocardial Revascularization. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 32, p. 330-335, 2014.
86. Cury V. Efeito fotobiomodulador da terapia com laser de baixa intensidade na transição inflamação reparo em modelo de lesão pulmonar. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.

ANEXOS

TCLE - Termo de Consentimento para Participação em Pesquisa Clínica:

Nome do Voluntário: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____ Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

1. Título do Trabalho Experimental: Estudo do laser de baixa intensidade em doenças pulmonares inflamatórias.

2. Objetivo: Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade em doenças inflamatórias agudas em pacientes portadores de asma brônquica e DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica), buscando-se determinar os mecanismos de ação envolvidos, além de estabelecer dosimetrias confiáveis e eficazes.

3. Justificativa: As estimativas mostram que a morbi-mortalidade por asma brônquica e DPOC vem se elevando em muitas regiões do Brasil e do mundo. Com a taxa de mortalidade e o tempo de internação elevada, gera-se para o tratamento um alto custo, onerando o Sistema de Saúde (SUS). Além disso, os efeitos colaterais das medicações disponíveis, os corticosteróides são muito comprometedores e há situações em que não é possível administrar esse tipo de tratamento. Por conseguinte, há uma necessidade urgente de se encontrar e/ou desenvolver novas terapias anti-inflamatórias com atividade imunomoduladora, fornecendo novas opções terapêuticas para tratar a asma brônquica e a DPOC.

4. Procedimentos da Fase Experimental: Serão realizados na primeira semana (antes do início do tratamento), na 5ª semana de tratamento e na 10ª semana, a avaliação clínica que consta das seguintes etapas: espirometria antes do broncodilatador e após 15 minutos de broncodilatador, que consiste do paciente soprar dentro de um tubo com duração de 1 minuto, exame de sangue (duração de 5 minutos), amostra de secreção do nariz e escarro através da tosse (duração de 5 a 10 minutos) sempre realizadas pela médica Maria Cristina Chavantes. A avaliação do fluxo de pico expiratório e inspiratório no qual o paciente

sopra todo o ar dentro de um tubo será realizada duas vezes por semana antes e após tratamento com a laserterapia, aplicado pela fisioterapeuta Nathali Cordeiro Pinto, durante 1 minuto. Para avaliar a presença de sinais e sintomas de asma e DPOC, um modelo padronizado de questionário será aplicado diariamente nos pacientes pela fisioterapeuta Nathali Cordeiro Pinto, durante 3 minutos. Em todos os grupos de laser será aplicado a irradiação em 6 pontos embaixo da língua do paciente e em 4 pontos na região do nariz, durante 2 minutos e 40 segundos. O tratamento constará de 2 aplicações de laserterapia por semana, com intervalo de 2 dias entre uma e outra aplicação, totalizando 10 semanas de aplicações. Todos os pacientes serão monitorados antes e após a laserterapia por meio de oxímetria digital que mede a quantidade de oxigênio no sangue de forma não invasiva (como um clipe no dedo), assim como a medição da temperatura, da pressão arterial e da frequência cardíaca.

5. Desconforto ou Riscos Esperados: Pode haver riscos e desconforto na punção do sangue, como por exemplo, ardência e hematoma no braço. Há também desconforto na inalação da solução salina e lavado, como por exemplo, irritação da garganta e tosse. Os pacientes podem se beneficiar do tratamento com laserterapia e contribuir para melhora dos sintomas a curto e em longo prazo. Mas somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes no futuro.

6. Métodos Alternativos Existentes: Não há.

7. Retirada do Consentimento: É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. A sua participação neste estudo é voluntária e caso deseje sair ou desistir de participar, basta informar-nos a qualquer momento. Isto não trará nenhum problema para o seu acompanhamento ou para o tratamento da sua doença.

8. Garantia do Sigilo: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Você terá, a qualquer tempo, direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

9. Formas de Ressarcimento das Despesas decorrentes da Participação na Pesquisa: Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10. Local da Pesquisa: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores poderão ser encontrados no endereço Av. Rua. Vergueiro nº 235/249 – 2º subsolo - Liberdade – São Paulo – SP, CEP. 01504-001, Fone: 3385-9197.

11. Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos participantes de pesquisas em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12). O Comitê de Ética é responsável pela avaliação e acompanhamento dos protocolos de pesquisa no que corresponde aos aspectos éticos.

Endereço do Comitê de Ética da Uninove: Rua. Vergueiro nº 235/249 – 3º subsolo - Liberdade – São Paulo

– SP CEP. 01504-001 Fone: 3385-9197

comitedeetica@uninove.br

12. Nome Completo e telefones dos Pesquisadores (Orientador e Alunos) para Contato:

Prof. Dr^a Maria Cristina Chavantes - (011) 3288-4246, Dr^a Nathali Cordeiro Pinto - (011) 971600512.

13. Eventuais intercorrências que vierem a surgir no decorrer da pesquisa poderão ser discutidas pelos meios próprios.

15. Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____, após leitura e compreensão deste termo de informação e consentimento, entendo que minha participação é voluntária, e que posso sair a qualquer momento do estudo, sem prejuízo algum. Confirmando que recebi uma via deste termo de consentimento, e autorizo a realização do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos somente neste estudo no meio científico.

São Paulo, de _____ de XXXX.

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM DOENÇAS PULMONARES INFLAMATÓRIAS

Pesquisador: Nathali Cordeiro Pinto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51587215.7.0000.5511

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.440.848

Apresentação do Projeto:

A asma brônquica e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) encontram-se entre as doenças respiratórias crônicas (DRC) mais comuns. Milhões de pessoas de todas as idades sofrem dessas doenças. A prevalência da asma se eleva em algumas populações e permanece alta em países em desenvolvimento, correspondendo a 5% a 10% das mortes por causa respiratória. A DPOC encontra-se entre a quinta e sexta das principais causas de morte no Brasil. Ambas geram uma resposta inflamatória pulmonar que são amenizados por tratamentos não-curativos e que apresentam sérios efeitos colaterais. O Laser de baixa intensidade (LBI) ou laserterapia tem sido utilizado há cerca de 50 anos com o objetivo de

auxiliar o processo de cicatrização, revelando eficientes respostas antiinflamatórias e analgésicas, assim como em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica. Entretanto, pouco se sabe sobre sua resposta em doenças pulmonares inflamatórias, em especial, a asma brônquica e DPOC. Alguns relatos referem que a laserterapia pode interferir positivamente aliviando os sinais clínicos, o início e os sintomas finais da inflamação pulmonar. O presente projeto tem como objetivo estudar os efeitos do LBI em doenças inflamatórias agudas em pacientes com processos pulmonares, determinar seus mecanismos de ação, além de estabelecer dosimetrias confiáveis e eficazes.

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Continuação do Parecer: 1.440.848

As doenças respiratórias crônicas (DRC) são doenças crônicas tanto das vias aéreas superiores quanto das inferiores. A asma brônquica, a rinite alérgica e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são as DRC mais comuns. Representam um dos maiores problemas de saúde mundialmente. Centenas de milhões de pessoas de todas as idades sofrem dessas doenças e de alergias respiratórias em todos os países do mundo e mais de 500 milhões delas vivem em países em desenvolvimento. As DRC estão aumentando em prevalência particularmente entre as

crianças e os idosos. Afetam a qualidade de vida e podem provocar incapacidade nos indivíduos afetados, causando grande impacto econômico e social. As limitações físicas, emocionais e intelectuais que surgem com a doença, com consequências na vida do paciente e de sua família, geram sofrimento humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade em doenças inflamatórias agudas em pacientes portadores de asma brônquica e DPOC, buscando-se

determinar os mecanismos de ação envolvidos, além de estabelecer dosimetrias confiáveis e eficazes.

Objetivo Secundário:

- Analisar a resposta inflamatória pulmonar através dos marcadores inflamatórios (IgE, TNF-, IL-1, IL-6) e da infiltração de células do sistema imune

do tecido pulmonar bem como realizar o lavado nasal antes e após o tratamento com LBI;

- Estudar a resposta da função pulmonar pré e pós tratamento com LBI;

- Determinar se a Laserterapia poderá alterar a resposta imune pulmonar através da modificação no perfil de marcadores Th1 (TNF-, IL-1, IL-6) e Th2 (IL-10);

- Investigar se o LBI é capaz de atuar sobre os macrófagos, alterando o fenótipo pró-inflamatório das células M1(TNF-,HIF-1) para o fenótipo M2 (PGC-1).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Pode haver riscos e desconforto na punção do sangue, como por exemplo, ardência e hematoma no braço. Há também desconforto na inalação da solução salina e lavado, como por exemplo, irritação da garganta e tosse. Os pacientes podem se beneficiar do tratamento com laserterapia e contribuir para melhora dos sintomas a curto e em longo prazo. Mas somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes no futuro.

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Continuação do Parecer: 1.440.848

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pela metodologia proposta, a pesquisa parece factível e reprodutível. Os voluntários devem ser alertados do tempo necessário da realização de toda a pesquisa e quantas vezes retornarão para os procedimentos. E, também, esclarecer a todos os sujeitos, detalhadamente, todas as etapas experimentais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados de forma adequada, de forma bem escrita e detalhada.

Recomendações:

O cronograma de execução diz que a coleta será no primeiro trimestre de 2016. Apenas sugiro começar a coleta após a aprovação do Comitê de Ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_600129.pdf	18/02/2016 13:10:57		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.doc	18/02/2016 13:10:20	Nathali Cordeiro Pinto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termodeconsentimento2016.doc	18/02/2016 13:08:32	Nathali Cordeiro Pinto	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	POSDOC.doc	02/12/2015 21:08:25	Nathali Cordeiro Pinto	Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasil.pdf	02/12/2015 16:08:54	Nathali Cordeiro Pinto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	02/12/2015 16:01:21	Nathali Cordeiro Pinto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	02/12/2015 15:58:07	Nathali Cordeiro Pinto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Continuação do Parecer: 1.440.848

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Março de 2016

Assinado por:

Stella Regina Zamuner

(Coordenador)

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br

Low level laser therapy ameliorates the lung tissue remodeling and inflammation in experimental model of idiopathic pulmonary fibrosis

Auriléia Aparecida de Brito^a, Elaine Cristina da Silveira^a, Alana Santos-Dias^b, Nicole Cristine Rigonato-Oliveira^a, Stephanie Souza Soares^a, Maysa Alves Rodrigues Brandao-Rangel^{b,c}, Clariana Rodrigues Soares^a, Manoel Carneiro Oliveira-Junior^b, Flavio Aimbire^d, Adriana Lino-dos-Santos-Franco^a, Rodolfo Paula Vieira^{b,c,e}, Ana Paula Ligeiro de Oliveira^a.

^aPost Graduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo-SP, Brazil.

^bBrazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), São José dos Campos-SP, Brazil. ^bPost Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo-SP, Brazil.

^cPost-Graduation Program in Sciences of Human Movement and Rehabilitation, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Santos-SP, Brazil.

^dInstitute of Science and Technology - ICT, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São José dos Campos-SP, Brazil.

^eUniversidade Brasil, São Paulo-SP, Brazil.

Corresponding Author:

Ana Paula Ligeiro de Oliveira, PhD.

Post Graduate Program in Biophotonics Applied to Health Sciences

Nove de Julho University (UNINOVE), São Paulo, Brazil

Rua Vergueiro, 235/249, São Paulo, SP

CEP 01504-000, Brazil

E-mail: apligeiro@gmail.com

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive lung disease of unknown etiology, without any efficient treatment, presenting high morbidity and mortality rates (1). IPF is an interstitial lung disease characterized by inflammation and excessive extracellular matrix deposition in the lung parenchyma, culminating in worsening of pulmonary function (1).

The pathogenesis of IPF is associated with exacerbated inflammatory response as well as development of fibrosis in the lung parenchyma (1,2). Although there are controversies, a relevant number of studies show an important role of inflammation in disease progression (2), while another attributes the development of disease to aberrant activation of epithelial cells, inducing fibroblasts migration, proliferation and activation (3). Anyway, the major problem of IPF is the inexistence an effective treatment to control disease progression, particularly, the aggressive development of fibrosis. In this context, great efforts have been made to understand the cellular and molecular mechanisms underlying IPF pathogenesis, as well as to develop new pharmacological and non-pharmacological therapies (4-10).

Accordingly, low level laser therapy (LLLT) is being considered a promising approach for chronic inflammatory diseases, with low cost and no adverse effects. In this way, several studies have reported the positive effects of LLLT in experimental settings of different lung diseases, except for lung fibrosis (11-15).

Considering that IPF is a complex and progressive lung disease whose pathogenesis is not well established, without effective therapy, the present study aimed to investigate the effects of LLLT on lung tissue remodeling and inflammation in an experimental model of IPF induced by bleomycin.

Materials and Methods

Animals

Male C57Bl/6 mice (~20g) were obtained from the Nove de Julho University, and maintained in a light and temperature-controlled room (12/12-hour light-dark cycle, $21 \pm 2^\circ\text{C}$), with free access to food and water. The experiments were approved by the Institutional Animal Care Committee.

The mice ($n = 2 \times 6$ mice/group) were divided into 3 experimental groups: Basal, non-manipulated mice, which were used to investigate the parameters at basal level; Bleo, identified as mice with pulmonary fibrosis and, Bleo+L, identified as mice with pulmonary fibrosis treated with LLLT. The mice were killed by sectioning the abdominal aorta under deep anesthesia with ketamine-xylazine by intraperitoneal route (100 mg/kg and 20 mg/kg, respectively) 22 days after bleomycin administration. .

Experimental model of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)

The induction of fibrosis induced by bleomycin is an experimental model widely used to investigate the physiopathology of IPF (Moore et al., 2008). Thus, after anesthesia, the animals received single administration of bleomycin (1,5U/Kg; Meizler Biopharma, SP, Brazil) by orotracheal route (9,10).

Laser therapy

14 days after bleomycin administration, Bleo+L group received LLLT (continuous wave, 780 nm, 3 J/cm², 30 mW, 60 s per point) administration during 7 consecutive days. Mice received LLLT administration in three points: end of trachea and in right and left lungs. Additionally, LLLT (same laser parameters described above) was used in *in vitro* studies, performed using primary type II pneumocytes and fibroblasts obtained from 3 male C57Bl/6 mice.

Isolation and culture of mice type II pneumocytes and fibroblasts

Type II pneumocytes and fibroblasts were isolated from 3 C57Bl/6 male mice, as previously described (7,8). Briefly, the lungs were removed, shredded and immersed in sterile enzymatic solution for digestion comprises dispase II (dispase II 2.5 mg/ml and 50 ug/ml DNase I), penicillin (1%) and streptomycin (1%) at 37°C for 60 min. After digestion, the material was filtered and the cells resuspended in RPMI 1640 and placed in petri dishes for 20 min. Non-adherent cells were removed and discarded. Adherent cells were carefully collected and resuspended in RPMI 1640 plus fetal bovine serum, penicillin and streptomycin and maintained in culture until the third passage. The immunohistochemical analysis for phenotypic characterization of the population in culture was performed. For this test we used antibodies to α -actin (myofibroblastic population). Subsequently, the cells were counted and plated at a concentration of (1×10^5 cells) at 37° C in CO₂ incubator for 24 hours with or without stimulus (bleomycin 250 ug/mL) (16). Thereafter, the supernatant was collected for analysis of inflammatory and anti-inflammatory mediators.

Quantification of leucocytes in the lung and in the blood

Under tracheostomy, the lungs were flushed with PBS (1,5 ml total volume), and the collected bronchoalveolar lavage (BAL) was centrifuged (900 g for 7 min at 4°C), and the resulting cell pellet resuspended in 1 ml of PBS. The cell suspensions were stained with crystal violet, and the total cell number was determined microscopically using a Neubauer chamber (9,10).

The whole blood cells analysis was performed using an automated hematology analyzer (Sysmex XS-800i, Roche, USA).

Quantification of cytokines in supernatant of bronchoalveolar lavage (BAL) and in supernatant of mice type II pneumocytes and fibroblasts cell culture

Cytokines levels were determined in the supernatants of BAL and of cells culture. The results are expressed as pg of cytokine produced per ml. The levels of IL-6, IL-1 β , TNF, KC, IFN- γ and IL-10

were quantified using ELISA kits purchased from BD Biosciences (USA). Determinations were made in duplicate for every sample using standard curves according to the manufacturer's specifications.

Lung histological analyses for quantification of cell migration and collagen fibers

The left lung was removed and fixed in formalin (10%) for 24 hours and embedded in paraffin. Five- μm thick sections were stained with hematoxylin and eosin for leukocytes quantification in the lung parenchyma and with Picrosirius for collagen fibers. The lung histology and morphometry were performed accordingly (17).

TGF- β quantification in lung cells

Right lungs were obtained after right heart perfusion of 10 mL of cold PBS. The tissue was minced with scissors and incubated for 45 minutes at 37°C with 2,5 mg/mL of Collagenase D (Roche) in HBSS. To stop collagenase activity, cells were suspended in Ca²⁺/Mg²⁺ free HBSS and centrifuged at 450 g and 4°C for 5 minutes. Further, cells were suspended in PBS 2% FBS, counted and stained with 5 μg of anti-CD45 APC in 25 μL of PBS 2% FBS for 20 minutes at 4°C. Cells were washed and stimulated for 6 hours with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10 ng/mL) and ionomycin (400 ng/mL) in the presence of brefeldin A (5 mg/mL). Cells were then washed twice in wash buffer, permeabilized, washed again and stained with anti-TGF- β for 30 minutes at room temperature in the dark. After being washed twice, the cells were resuspended in 1% formaldehyde in PBS and analyzed within 24 hours by means of four-colour flow cytometry (Accuri flow cytometer, BD Biosciences). 5×10^3 events were collected after elimination of cell doublets by FSH-height x FSC-area plot analysis.

Statistical analysis

Data are expressed as the means \pm SD, and comparisons among the experimental groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the Student's Newman-Keuls test for multiple

comparisons using GraphPad software 5.0. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

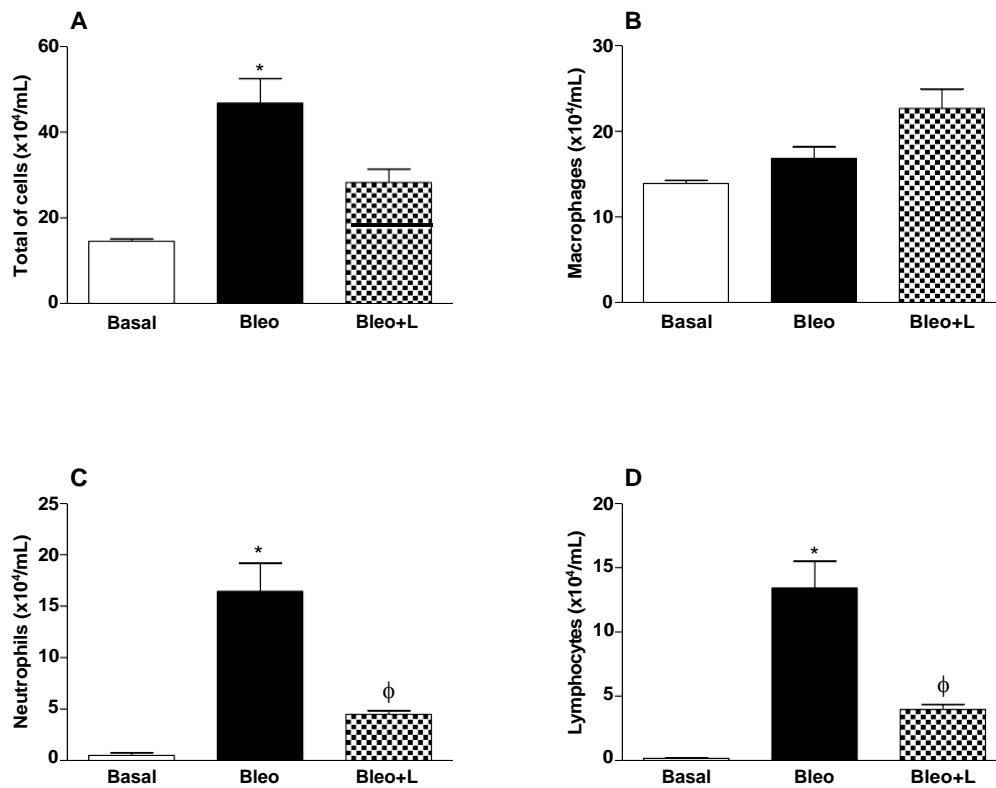


Figure 1: Reduced cellular infiltration in the lungs of Bleomycin and LLLT treated animals. Bleomycin animals were submitted to therapeutic protocols as described in materials and methods. Further, all animals were euthanized and BAL obtained for cytopsin and the quantification of total cells (A), macrophages (B), neutrophils (C) and lymphocytes (D). Data representative of three independent experiments. n=5-8 animals per group. One-way ANOVA.

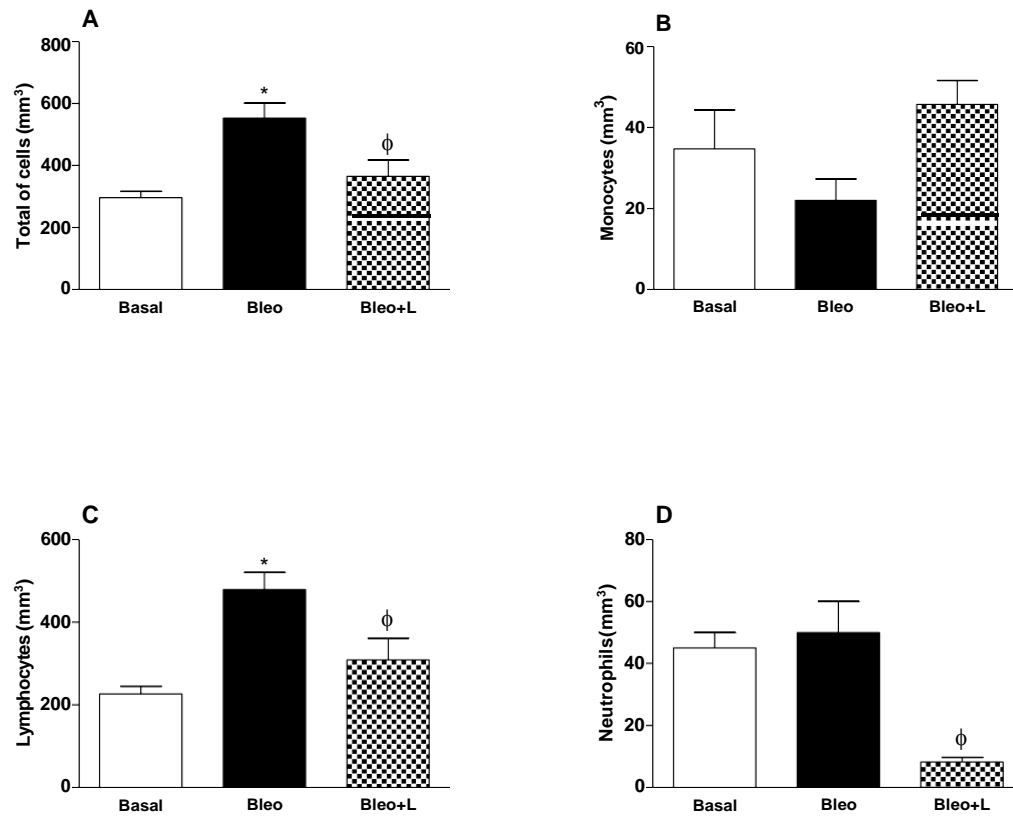


Figure 2: Reduced cellular infiltration in the blood of Bleomycin and LLLT treated animals. **Bleomycin** animals were submitted to therapeutic protocols as described in materials and methods. Further, all animals were euthanized and blood obtained for quantification of total cells (A), monocytes (B), lymphocytes (C) and neutrophils (D). Data representative of three independent experiments. n=5-8 animals per group. One-way ANOVA.

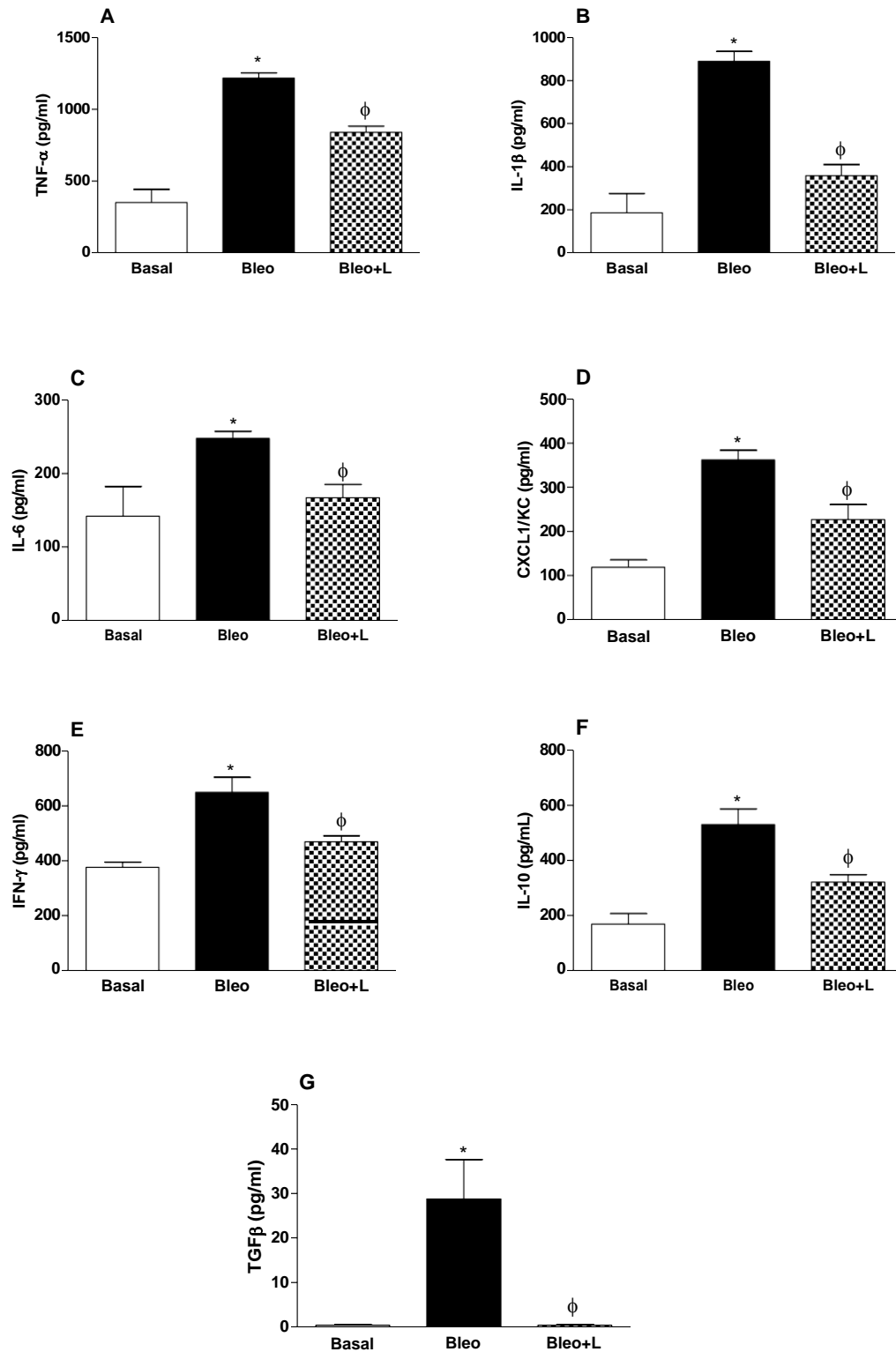


Figure 3: Reduced levels of cytokines in the BAL of Bleomycin and LLLT treated animals. Bleomycin animals were submitted to therapeutic protocols as described in materials and methods. Further, all animals were euthanized and BAL obtained for the quantification of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), CXCL1/KC (D), IFN- γ (E), IL-10 (F) and TGF- β (G). Data representative of three independent experiments. n=5-8 animals per group. One-way ANOVA.

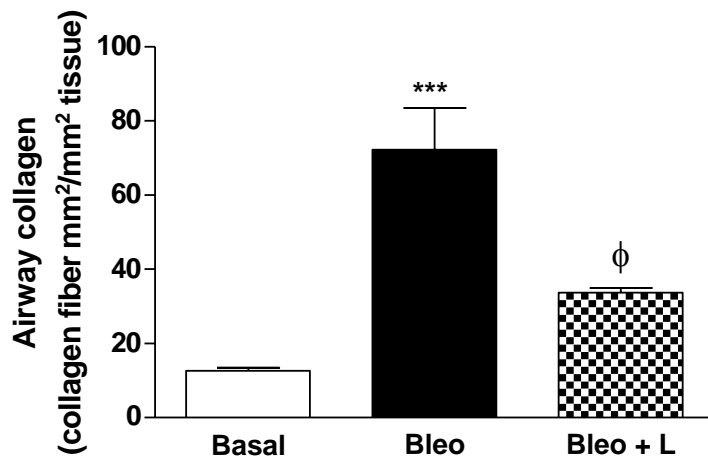
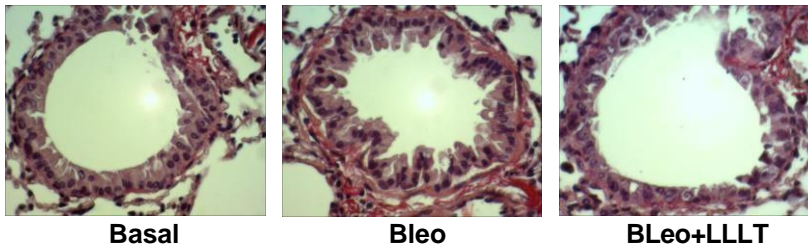


Figure 4: Reduced airway collagen in the lungs of Bleomycin and LLLT treated animals. **Bleomycin** animals were submitted to therapeutic protocols as described in materials and methods. Further, all animals were euthanized and lungs obtained for histological analysis. Data representative of three independent experiments. n=5-8 animals per group. One-way ANOVA.



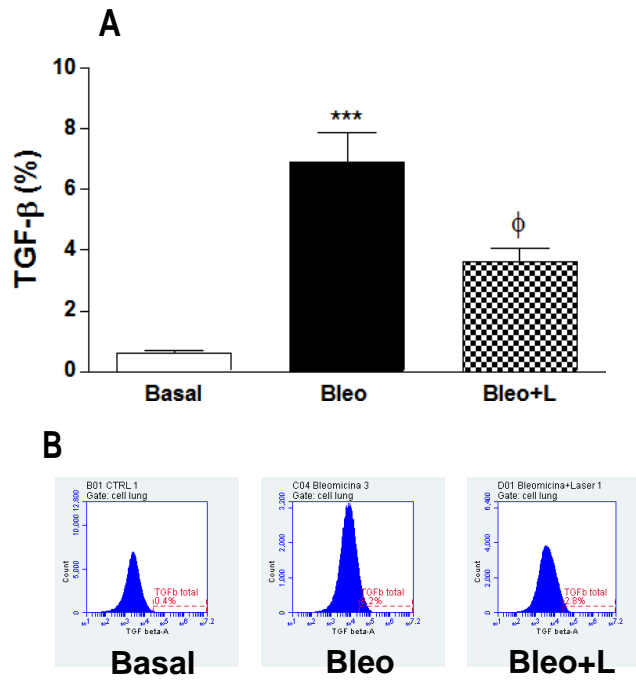


Figure 5. Quantification of TGF-β in lung by flow cytometry. TGF-β was quantified in total cells of lung (A) and dot plots representative of graphs (B). Data represent the mean ± SD of eight animals. *** p<0,001 when compared to Basal group and φ P<0,01 when compared to Bleo group.

The total number of cells, neutrophils and lymphocytes was higher in Bleo group than in Basal group (Fig 1A, 1C and 1D) in LBA. Interestingly, a significant reduction in total cell counts, neutrophils and lymphocytes were observed in Bleo+L group in comparison to Bleo, there was no difference in the number of macrophages in all groups (Fig 1B).

Figure 2 showed that Bleo group had an increased number of total cells (2A) and lymphocytes (2D) circulating when compared to non-treated group (Basal). In addition, no differences were observed among the monocytes and lymphocytes in Bleo group when compared to Basal group. Moreover, we showed that Bleo+L group had reduced total, neutrophils (2C) and lymphocytes circulating when compared to Bleo group. No differences were observed between Bleo+L and Bleo groups (Fig 2D).

To understand the effects of laser therapy on the lung fibrosis, we evaluated inflammatory and anti-inflammatory cytokines released in the BAL fluid. In Fig. 3, we showed increased levels of TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10 and TGF- β (panels A, B, C, D and E respectively) in Bleo group when compared to the Basal group. On the other hand, the Bleo+L group showed reduced TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10 and TGF- β levels when compared to Bleo group.

Bleomicyn treatment induced significant accumulation of collagen fibers in the airway wall of the animals (Figure 4) compared to Basal group. In contrast, laser therapy significantly reduced the accumulation of collagen fibers in airway wall in the Bleo+L group when compared to Bleo group.

Next, we performed flow cytometry analysis in the lung from all experimental groups to evaluate changes in the frequency of CD45+TGF- β + cells in the lungs (Fig 5). We observed increased in TGF- β of total cells of Bleo group when compared to Basal group. However, we findings from the frequency of TGF- β in total cells were significantly reduced of the laser therapy when compared to Bleo group.

Discussion

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a devastating disease with no cure or effective treatment available (1-3). The inflammatory pattern in the lungs of IPF patients are characterized by accumulation and activation of leukocytes in the lung interstitium (1-3; 18-20). Leukocytes hyperactivation in the lungs are related with disease severity and progression (18). In addition, experimental models using bleomycin to induce lung fibrosis have reported, similarly to human findings, increased number of neutrophils, macrophages and lymphocytes in the lung interstitium (19). In agreement with the literature, the present study demonstrated increased number of neutrophils, macrophages and lymphocytes in bleomycin-treated mice. On the other hand, the results also demonstrated that LLLT significantly reduced the number of these cells, pointing out the anti-inflammatory effects of Laser in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. These findings are especially important considering the relation of pulmonary inflammation with disease severity and progression (20). A study from Peron *et al.* (2015), have demonstrated similar findings concerning the anti-inflammatory effects of laser in a model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke (11).

Beyond pulmonary inflammation, IPF is mainly characterized by multiple foci of accumulation of extracellular matrix proteins (i.e. collagen fibers) in the lung interstitium and disruption of lung alveolar architecture (1-3). These characteristics are directly related to decline of lung function, leading to a poor health-related quality of life (19). These histopathological features are presented in models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis (20), and were observed in the present study. So, is very important to reinforce that LLLT significantly reduced the collagen fibers accumulation in the lung parenchyma, demonstrating the anti-fibrotic effects of laser in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. These anti-fibrotic effects of LLLT have been demonstrated in other models of pulmonary diseases, such as in asthma (12) and COPD (11).

Cytokines and growth factors play a key role in the pathophysiology of IPF (1, 3, 21, 22). IL-1beta is a pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokine, primarily released by activated macrophages and

epithelial cells (21). This cytokine is centrally involved in the pathophysiology of IPF and induces the release of other cytokines, such as IL-6 and TNF-alpha (23). In agreement with the literature, we have found increased levels of IL-1beta in BAL of bleomycin-treated mice (3, 23). Of note, LLLT have significantly reduced the levels of IL-1beta, pointing out its anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Beyond IL-1beta, IL-6 have been also accounted to an important role in IPF pathophysiology, contributing both to inflammation and remodelling, inducing the conversion of fibroblasts to myofibroblasts (1-3, 23). In the present study, we found increased levels of IL-1 β in BAL of bleomycin-treated animals. These increased levels of IL-1 β were totally abrogated in bleomycin-treated animals submitted to LLLT treatment.

IL-8 is a potent chemokine attracting neutrophils to the lungs of IPF patients and its levels are increased in BAL of IPF patients (22). In the present study, increased levels of CXCL1/KC, a murine homologue of IL-8 was found in BAL of bleomycin-treated mice, which were significantly reduced in LLLT mice. Another important cytokine involved in the fibrosis response is the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), which is considered a profibrotic cytokine, especially for its effects inducing TGF-beta expression in fibroblasts (23). Herein, in the present study we demonstrated that TNF-alpha levels were increased in bleomycin-treated mice and significantly reduced in laser treated mice. Similarly to TNF-alpha, the levels of TGF-beta were found increased in BAL of bleomycin-treated mice and reduced by LLLT. TGF-beta is key growth factor involved in IPF pathophysiology, which is responsible for fibroblast activation and differentiation to myofibroblast, resulting in increased extra-cellular matrix proteins synthesis and accumulation (22, 23). In the present study, exercise inhibited TGF-beta release and accumulation in the lungs of bleomycin-treated mice, which is particularly important to justify, at least partially, the antifibrotic effects of LLLT.

At least, IL-10, an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine is found at very low levels in IPF patients (24). IL-10 is capable to inhibit TGF-beta synthesis and activation and it was thought as a really good promise to IPF treatment (24). In the present study, we found that LLLT, in

bleomycin-treated mice significantly increased the BAL levels of IL-10. This stimulating effect of LLLT on IL-10 synthesis and release is very important considering the beneficial effects of IL-10 controlling inflammation and fibrosis in the lungs, as previously demonstrated in models of asthma (12) and COPD (11).

LLLT reduces both features of lung fibrosis, inflammation and remodeling, becoming a promising strategy for further clinical trials for idiopathic pulmonary fibrosis patients.

References

1. Meltzer E.B, Noble P.W. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. In: Fishman's Pulmonary Disease and Disorders. 4a edição. p. 1143-60, 2008.
2. Moore B.B, Hogaboam C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(2):L152-60, 2008.
3. Miyoshi K., Yanagi S., Kawahara K., et al. Epithelial pten controls acute lung injury and fibrosis by regulating alveolar epithelial cell integrity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 187(3):262–275, 2013
4. Waid-Jones M.I, Coursin D.B. Preoperative considerations for patients treated with bleomycin, 1991 *Chest.* 99: 993-9.
5. Willis B.C, Liebler J.M, Luby-Phelps K, Nicholson A.G, Crandall E.D, du Bois R.M, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol,* 2005 166 (5):1321-32.
6. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med,* 2011 208 (7):1339-1350.
7. Müller T, Fay S, Vieira RP, Karmouty-Quintana H, Cicko S, Ayata CK, Zissel G, Goldmann T, Lungarella G, Ferrari D, Di Virgilio F, Robaye B, Boeynaems JM, Lazarowski ER, Blackburn

MR, Idzko M. P2Y6 Receptor Activation Promotes Inflammation and Tissue Remodeling in Pulmonary Fibrosis. *Front Immunol.* 2017 Aug 22;8:1028.

8. Müller T, Fay S, Vieira RP, Karmouty-Quintana H, Cicko S, Ayata K, Zissel G, Goldmann T, Lungarella G, Ferrari D, Di Virgilio F, Robaye B, Boeynaems JM, Blackburn MR, Idzko M. The purinergic receptor subtype P2Y2 mediates chemotaxis of neutrophils and fibroblasts in fibrotic lung disease. *Oncotarget.* 2017 May 30;8(22):35962-35972.

9. Andrade-Sousa AS, Rogério Pereira P, MacKenzie B, Oliveira-Junior MC, Assumpção-Neto E, Brandão-Rangel MA, Damaceno-Rodrigues NR, Garcia Caldini E, Velosa AP, Teodoro WR, Ligeiro de Oliveira AP, Dolhnikoff M, Eickelberg O, Vieira RP. Aerobic Exercise Attenuated Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Th2-Dominant Mice. *PLoS One.* 2016 Sep 27;11(9):e0163420.

10. Pereira PR, Oliveira-Junior MC, Mackenzie B, Chiovatto JE, Matos Y, Greiffo FR, Rigonato-Oliveira NC, Brugemman TR, Delle H, Idzko M, Albertini R, Ligeiro Oliveira AP, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Fernandez IE, Castro-Faria-Neto HC, Dolhnikoff M, Eickelberg O, Vieira RP. Exercise Reduces Lung Fibrosis Involving Serotonin/Akt Signaling. *Med Sci Sports Exerc.* 2016 Jul;48(7):1276-84.

11. Peron JPS, de Brito AA, Pelatti M, Brandão WN, Vitoretti LB, Greiffo FR, et al. Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice. *PLoS ONE*; 10(8): e0136942, 2015.

12. Silva V.R, Marcondes P, Silva M, Villaverde A.B, Neto H.C.C.F, Vieira R.P, Aimbire F, Ligeiro de Oliveira A.P. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 194: 37-48, 2014.

13. De Lima F.M., Villaverde A.B., Albertini R, Corrêa JC, Carvalho RL, Munin E, Araújo T, Silva J.A., 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.* 43(5):410-20, 2011.

14. Mafra De Lima F, Costa M.S, Albertini R, Silva JA.Jr, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism. *Lasers Surg Med.*41: 68-74, 2009.

15. Aimbire F, Ligeiro De Oliveira A.P, Albertini R, Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 β Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. *Inflammation* 31: 189-197, 2008.

16. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Sep 15;182(6):774-83.

17. Vieira R.P, Andrade V.F, Duarte A.C.S, Santos B.A.G, Mauad T, Martins M.A, Dolhnikoff M, Carvalho C.R.F. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung CelMolPhysiol* 295: L670-79, 2008.

18. Wynn T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.*, 208 (7):1339-1350, 2011.

19. Yagoda A, Mukherji B, Young C, Ectubanas E, Lamonte C, Smith J.R, Tan C.T, Krakoff I.H. Bleomycin, an antitumor antibiotic: Clinical experience in 274 patients. *Ann Intern Med*, 77: 861-70, 1972.

20. Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, Hartl D. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 55(3):309-322, 2016.

21. O'Dwyer DN, Ashley SL, Moore BB. Influences of innate immunity, autophagy, and fibroblast activation in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 311(3):L590-601, 2016.
22. Papiris SA, Tomos IP, Karakatsani A, Spathis A, Korbila I, Analitis A, Kolilekas L, Kagouridis K, Loukides S, Karakitsos P, Manali ED. High levels of IL-6 and IL-8 characterize early-on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbations. *Cytokine.* 25: S1043-4666 (17)30252-12017, 2017.
23. G Siwik D.A, Chang D.L, Colucci W.S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res.* 86(12):1259-65, 2000.
24. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax* 61(10):886-94, 2006

