

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

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO
EXPERIMENTAL *IN VITRO* DA SÍNDROME DE SOBREPOSIÇÃO
DE ASMA E DPOC**

Marina Bertoni Guerra

**São Paulo
2022**

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

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO EM MODELO
EXPERIMENTAL *IN VITRO* DA SÍNDROME DE SOBREPOSIÇÃO
DE ASMA E DPOC**

Marina Bertoni Guerra

*Tese apresentada à Universidade Nove de
Julho para obtenção de título de Doutora em
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.*

*Orientadora: Profª Dra. Ana Paula Ligeiro de
Oliveira*

**São Paulo
2022**

Guerra, Marina Bertoni.

Efeito da fotobiomodulação em modelo experimental in vitro da síndrome de sobreposição de asma e DPOC. / Marina Bertoni Guerra. 2022.

55 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

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

1. Asma. 2. DPOC. 3. Síndrome de sobreposição asma e DPOC. 4. Laser de baixa intensidade. 5. Fotobiomodulação.

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

CDU 615.831

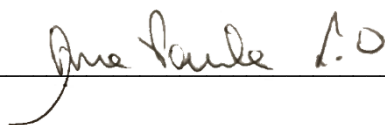
São Paulo, 20 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Marina Bertoni Guerra

Título da Tese: “Efeito da fotobiomodulação em modelo experimental “in vitro” da síndrome da sobreposição da asma e DPOC”.

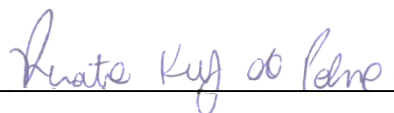
Presidente: PROF^a. DR^a. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Membro: PROF^a. DR^a. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA



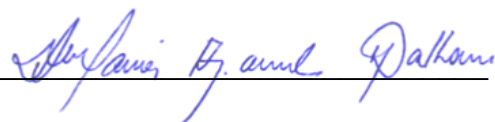
Membro: PROF^a. DR^a. RENATA KELLY DA PALMA



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^a. DR^a. MARIA APARECIDA DALBONI



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu saúde e permitiu finalizar mais esta etapa com determinação, superando as dificuldades ao longo desta trajetória.

Aos meus pais, Ricardo e Salete, que compreenderam a minha ausência em momentos importantes e me apoiaram em todas as minhas decisões e momentos de dificuldades.

Ao meu namorado, Marcos, que esteve sempre ao meu lado, me ajudando na escolha dos melhores caminhos, me apoiando e me dando força pra seguir em frente.

Aos amigos que tive o prazer de conhecer, por me acolherem tão bem e por fazerem parte da minha família na cidade de São Paulo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira, pela oportunidade de participar e finalizar este projeto. Agradeço por todo conhecimento transmitido e dedicação para que eu pudesse estar finalizando nosso estudo.

À Prof^a. Dr^a. Anna Carolina Ratto Horliana, que sempre se disponibilizou em ajudar e teve um papel importante no meu crescimento pessoal e no meio científico.

Aos membros da banca, desde já, agradeço pela disponibilidade em participar desse dia tão importante na minha trajetória.

RESUMO

A asma e a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) são patologias inflamatórias crônicas das vias aéreas com alta prevalência nos dias atuais. Os pacientes que apresentam características de ambas as doenças podem ser diagnosticados com a Síndrome da Sobreposição Asma e DPOC (ACOS - *Asthma-COPD overlap syndrome*). Embora essa síndrome venha sendo crescentemente reconhecida, suas características clínicas, critérios diagnósticos e tratamento ainda não são bem estabelecidos. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da fotobiomodulação (FMB) com laser sobre o processo inflamatório em modelo experimental *in vitro* de ACOS. O estudo foi composto por 4 grupos: células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B) - controle negativo, células BEAS-2B estimuladas com extrato de fumaça de cigarro (EFC) + *House Dust Mite* (HDM) - controle positivo, células BEAS-2B estimuladas com EFC + HDM e tratadas com dexametasona, células BEAS-2B com incubação de EFC + HDM e irradiadas com laser (660nm, 30mW, 5,4J). Após 24 horas do estímulo, foram quantificadas as citocinas do sobrenadante da cultura celular. Observou-se redução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, e aumento da IL-10 e IFN- γ nas células do grupo ACOS irradiadas com laser quando comparado ao grupo controle positivo. Com estes resultados, podemos sugerir que a fotobiomodulação atua na modulação da inflamação observada na ACOS, podendo ser uma opção no tratamento da doença.

Palavras-chave: asma, DPOC, síndrome de sobreposição asma e DPOC, laser de baixa intensidade, fotobiomodulação.

ABSTRACT

Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) are chronic inflammatory pathologies of the airways with high prevalence nowadays. Patients who present features of both diseases can be triggered with the Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS - Asthma-COPD Overlap Syndrome). Although this syndrome has been increasingly recognized, its clinical characteristics, diagnostic criteria and treatment are still not well defined. The objective of the study was to evaluate the effect of laser photobiomodulation (FMB) on the inflammatory process in an experimental in vitro model of ACOS. The study consisted of 4 groups: human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) - negative control, BEAS-2B cells stimulated with cigarette smoke extract (CSE) + House Dust Mite (HDM) - positive control, BEAS-2B cells stimulated with EFC + HDM and treated with dexamethasone, BEAS-2B cells incubated with EFC + HDM and irradiated with laser (660nm, 30mW, 5.4J). After 24 hours of stimulation, cytokines in the cell culture supernatant were quantified. There was a reduction in the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23, and an increase in IL-10 and IFN- γ in cells from the laser-irradiated ACOS group when compared to the positive control group. With these results, we can suggest that photobiomodulation acts in the modulation of inflammation observed in ACOS, and may be an option in the treatment of the disease.

Keywords: asthma, COPD, asthma-COPD overlap syndrome, LLLT, photobiomodulation.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1. Asma.....	1
1.2. DPOC.....	7
1.3. Sobreposição de Asma e DPOC	11
1.4. Fotobiomodulação.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Secundários	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Células Epiteliais Brônquicas Humanas (BEAS-2B)	17
3.2. Preparação do Extrato de Fumaça de Cigarro.....	18
3.3. Preparação de HDM.....	18
3.4. Irradiação com Laser.....	19
3.5. Tratamento com Corticoide	19
3.6. Protocolo Experimental	20
3.7. Quantificação das citocinas.....	21
4. ANÁLISE DE RESULTADOS	22
5. RESULTADOS	22
5.1. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de BEAS-2B ..	22
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO	39
8. BIBLIOGRAFIA.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reconhecimento do antígeno pelas células T	3
Figura 2 – Fases e células da resposta mediada por IgE	4
Figura 3 – Representação da via aérea normal e via aérea na asma	5
Figura 4: Efeito celular dos corticosteroides	6
Figura 5 - Hospitalização por Asma no SUS/Brasil por ano	7
Figura 6 – Células T CD8 na DPOC	8
Figura 7 – Fisiopatologia da DPOC	10
Figura 8 – Hipóteses da associação Asma e DPOC	12
Figura 9 – Curva Básica de Arndt-Schultz	16
Figura 10 – Representação esquemática para obtenção do extrato da fumaça de cigarro	18
Figura 11 - Disposição dos grupos de culturas de células nas placas	21
Figura 12 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de TNF- α na cultura de BEAS-2B	23
Figura 13 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-1 β na cultura de BEAS-2B	24
Figura 14 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-6 da cultura de BEAS-2B	25
Figura 15 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-4 da cultura de BEAS-2B	26
Figura 16 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-5 da cultura de BEAS-2B	27
Figura 17 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-13 da cultura de BEAS-2B	28
Figura 18 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-17 da cultura de BEAS-2B	29
Figura 19 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-21 da cultura de BEAS-2B	30
Figura 20 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-23 da cultura de BEAS-2B	31
Figura 21 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IFN- γ da cultura de BEAS-2B	32

Figura 22 - Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-10 da cultura de BEAS-2B	33
Figura 23 - Resultados da aplicação da LBI em células BEAS-2B estimuladas com associação de EFC + HDM	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características asma, DPOC e ACOS	14
Tabela 2 – Parâmetros dosimétricos do laser	19

LISTA DE SIGLAS

DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ACOS	Síndrome da Sobreposição de Asma e DPOC
FBM	Fotobiomodulação
BEAS-2B	Células epiteliais brônquicas humanas
EFC	Extrato de fumaça de cigarro
HDM	<i>House Dust Mite</i>
Th 2	<i>T helper 2</i>
Der p	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
CD4	Grupamento de diferenciação 4
Th	<i>T helper</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
FcεR1	Receptores de alta afinidade para IgE
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TARC	<i>Thymus and activation-regulated cytokine</i>
TSLP	Linfopietina Estromal Tímica
Th 17	<i>T helper 17</i>
HDAC2	Enzima nuclear histona desacetilase 2
NF-κB	κB
SUS	Sistema único de saúde
CXCL	Quimiocina
CXCR	Receptor de quimiocinas
IFNγ	Interferon γ
Tc1	células citotóxicas tipo 1
CCR2	Receptor de quimiocinas
CCL2	Quimiocina
MMP9	Metaloproteinase 9
TGF-β	Fator de Crescimento transformador beta
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

CVF	capacidade vital forçada
LBI	Laser de baixa intensidade
LED	Diodo emissor de luz
nm	nanômetros
ATP	Adenosina Trifosfato
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
J	Joules
mW	miliwatts
Treg	células T reguladoras
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
U	Unidades
ml	mililitros
s	segundos
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
DMSO	dimetilsulfóxido
CEL EPL	célula epitelial
DEXA	Dexametasona

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Asma

A asma é uma doença que afeta cerca 10% da população mundial, desde crianças a idosos, e é considerado um problema de saúde pública por sua alta prevalência, morbidade e custo (1). É uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual há uma hiperresponsividade a diversos estímulos, inflamação e broncoconstrição (2,3). A resposta inflamatória leva a uma lesão tecidual, edema e produção de muco, que podem causar obstrução de ar. Além disso, a hiperresponsividade das vias aéreas leva ao aumento exagerado da contração do músculo liso da traqueia e dos brônquios, causando obstrução transitória das vias aéreas (4) e sintomas como tosse, sibilos, dispneia e aperto no peito (3).

A asma tem um importante fator genético associado, porém, aparentemente, os genes relacionados não são ativados na ausência de fatores ambientais e de exposições específicas a determinados alérgenos (5). Dentre os fatores agravantes estão: poluentes atmosférico, infecções respiratórias, mudanças na temperatura climática, atividade física, estresse, alterações hormonais, e principalmente, fatores alérgicos (ácaros, fungos, baratas, pólen) (1). O ácaro da poeira doméstica, em inglês, *House Dust Mite*, é a fonte doméstica mais importante para doenças alérgicas, sendo o *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*) o mais frequentemente encontrado (6). O HDM é utilizado na experimentação animal, pois leva à inflamação brônquica com perfil T *helper* 2 (Th 2), remodelação de vias aéreas e danos epiteliais semelhantes aos identificados na asma humana (7).

A asma é considerada uma doença Th2-mediada, com aumento de IgE por células B e inflamação eosinofílica (2), apresentando níveis elevados de interleucinas, entre elas a IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 são as principais (5).

Para que haja uma ativação dos linfócitos, é necessário que o antígeno seja reconhecido pelas células dendríticas, células apresentadoras de antígenos. Na superfície dessas células, existem as moléculas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade), que se ligam aos receptores de

antígeno localizados nos linfócitos. Os linfócitos T CD4 reconhecem as moléculas MHC da classe II (figura 1) (5,8), e são subdivididos em dois grupos, Th1 e Th2, de acordo com as citocinas que produzem.

Dentre as citocinas citadas, está a IL-4, que juntamente com a IL-13 impulsiona a produção de IgE pelas células B (8), em conjunto com outras citocinas, aumenta a secreção de muco, promove a superexpressão de células caliciformes e hiperresponsividade das vias aéreas. A IL-4 induz a secreção de IL-5 e eotaxinas, contribuindo para o recrutamento de eosinófilos.

A IL-5 é secretada pelos linfócitos Th2 e mastócitos tem um papel fundamental sobre os eosinófilos, atuando na sua ativação, maturação e sobrevivência (8). Eosinófilos ativados liberam grânulos altamente tóxicos, o que tem como função matar invasores. As substâncias derivadas dos eosinófilos danificam a superfície das células epiteliais, o que afrouxa a ligação entre elas e resulta no desprendimento de células em direção ao lúmen das vias aéreas, onde se misturam a eosinófilos, neutrófilos e muco (9).

As células Th2 também são capazes que incitar a produção de IgE através da interação com células B. Após, a IgE se liga a receptores de alta afinidade para IgE (FcεR1) nos mastócitos, e o *cross-linking* da IgE na superfície de mastócitos por alérgenos específicos causa ativação do mastócito e liberação de mediadores, como a histamina, o fator ativador de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos. Estas substâncias são responsáveis pelo broncoespasmo, produção de muco e edema de vias aéreas, e conseqüentemente, pelas manifestações clínicas da crise asmática. Os mastócitos são uma fonte de citocinas Th2, fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e quimiocinas. O TNF-α, em conjunto com a IL-4 e a IL-13, aumenta a produção de *thymus and activation-regulated cytokine* (TARC), linfopoietina estromal tímica (TSLP) e eotaxina nas células epiteliais. Isso resulta no aumento da infiltração de células Th2 e eosinófilos. O TNF- α também promove neutrofilia dependente do antígeno e da célula Th17 após estímulo alérgênico e induz a migração das células dendríticas(9).

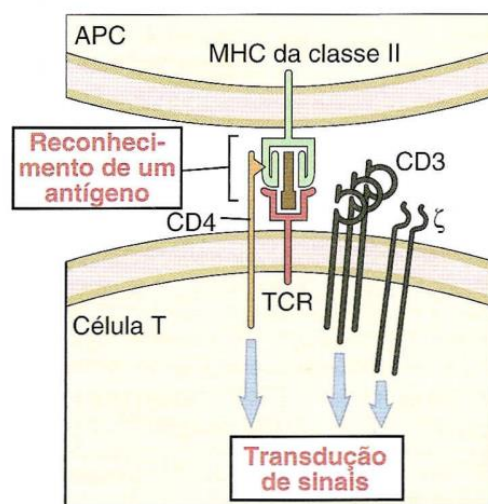


Figura 1 – Reconhecimento do antígeno pelas células T

TCR: receptor de células T; MHC: complexo de histocompatibilidade principal, APC: células apresentadoras de antígeno.

Fonte: Abbas. Imunologia Básica, 2015.

Sabe-se que a estimulação alérgica das vias aéreas em pacientes asmáticos leva a um aumento dos linfócitos Th, com predominância de Th2. Porém a asma é resultante da ruptura do equilíbrio Th1/Th2(9), e os pacientes respondem aos alérgenos com aumento tanto da resposta Th2, como da Th1 (5). Estudos mostram que os sistemas regulatórios previnem a expressão exagerada das respostas Th1 e Th2, e para tal, a IL-10 tem um papel fundamental. Apesar de ser classificada como uma interleucina Th2, a IL-10 é produzida por diversos tipos celulares, entre eles, células dendríticas, monócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais; e tem como função modular e controlar respostas imunes exageradas, inibindo a ativação de linfócitos T, a produção de IgE e o recrutamento de eosinófilos (5).

Outras citocinas relevantes envolvidas na resposta inflamatória da asma, são a IL-1 β e o TNF- α , citocinas pró-inflamatórias Th1-mediadas (10).

Pouco se sabe sobre o papel das células Th17 (subpopulação de células CD4+) na asma, mas níveis aumentados de IL-17 e IL-23 - citocinas do subtipo Th17 - foram encontrados em concentrações aumentadas. A IL-17 é responsável por liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e recrutar neutrófilos. A IL-23 é expressada em linfócitos T, células *natural killer*, células dendríticas e monócitos (11). A IL-23 integra o sistema imune inato e adaptativo (12). Pode

funcionar em células dendríticas para modular sua atividade na diferenciação de células Th2, e é responsável pela inflamação eosinofílica nas vias aéreas (11).

Na asma, também ocorre resposta da imunidade inata. Como mostra na figura 2, ocorre a ligação do alérgeno diretamente com a IgE na membrana dos mastócitos na mucosa e submucosa brônquica, levando à liberação de mediadores inflamatórios.

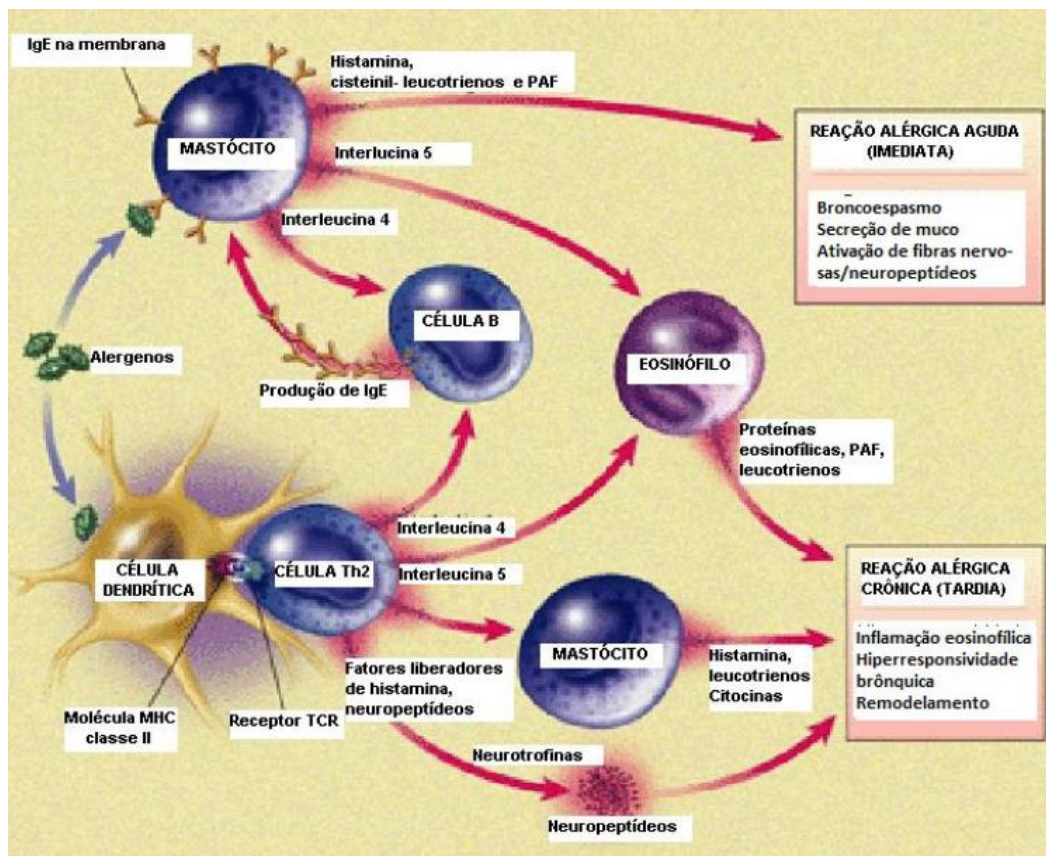


Figura 2 – Fases e células da resposta mediada por IgE.

PAF: fator ativador de plaquetas; TCR: receptor de células T; MHC: complexo principal de histocompatibilidade.

Fonte: New Eng J Med (adaptado)

Acredita-se que exacerbações da asma perpetuam o ciclo inflamatório e explicam a progressão e a cronicidade da asma, levando a um processo de remodelação dos tecidos (2,5,13). No processo inflamatório crônico, as células epiteliais e miofibroblastos se proliferam, ocorrendo depósito de colágeno e proteoglicanos na membrana basal, levando ao espessamento brônquico. Além

disso, a hipertrofia e hiperplasia do músculo liso e o aumento das células caliciformes, das glândulas e dos vasos sanguíneos interferem na arquitetura das vias aéreas. A célula muscular lisa tem a capacidade de se transformar numa célula pró-inflamatória, produzindo citocinas e expressando moléculas de superfície importantes na inflamação crônica (14).

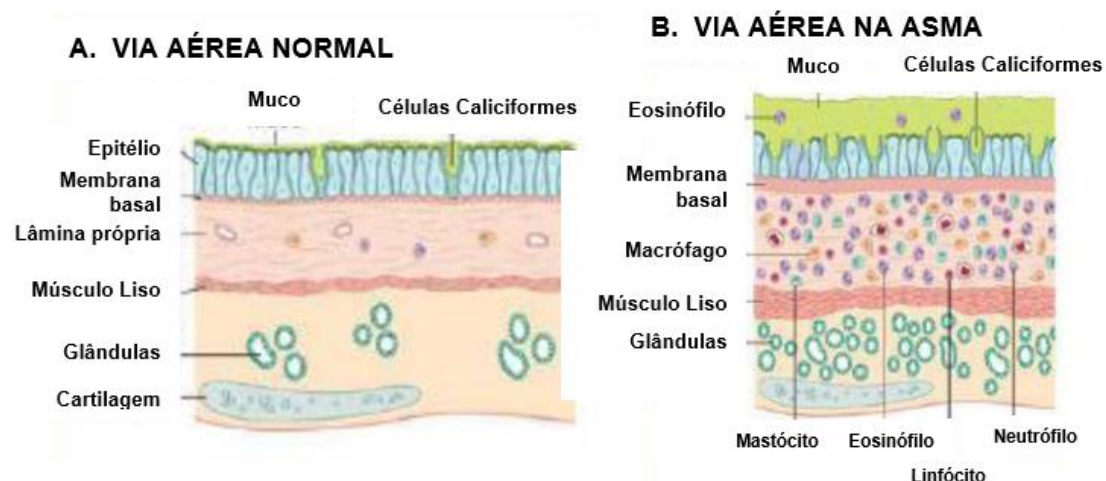


Figura 3 – Representação da Via Aérea normal (A), e via aérea na asma (B).
 Fonte: Adaptado de Robins. *Patologia Básica*, 2018.

O diagnóstico de asma pode ser realizado através da avaliação da sintomatologia clínica e exame físico. E quando necessário, a espirometria pode ser útil para confirmação e avaliação do controle da doença (1).

Os objetivos do manejo da asma são alcançar um bom controle dos sintomas e minimizar os riscos futuros de complicações relacionadas à doença. O tratamento da asma deve incluir controle dos fatores de risco modificáveis, além de medicações, as quais variam conforme a frequência e gravidade da sintomatologia, e função pulmonar. Entre as drogas estão os glicocorticoides inalatórios e orais, beta-agonistas de curta e longa duração, antagonistas dos receptores de leucotrienos, antagonistas muscarínicos, anti-imunoglobulina E, anti-IL-5, anti-IL-5R, anti-IL-4R (anti-IL-4/IL-13) e anti-linfopoietina estromal tímica (anti-TSLP) (3,15) Para os casos da asma em que os sintomas são

persistentes, recomenda-se inicialmente o uso de glicocorticoides associados ou não a outras classes farmacológicas, conforme sintomatologia. Ou seja, os corticoesteroides são a base no manejo e fundamentais para o sucesso do tratamento.

Os glicocorticoides exercem uma potente ação anti-inflamatória. Sua ação é “desligar” diversos genes inflamatórios ativados. Sabe-se que a inflamação crônica é caracterizada pela expressão aumentada de genes inflamatórios regulados por fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kapa-B (NF-kb) e o ativador de proteína-1 que, ao se ligarem a moléculas coativadoras, promovem sua ativação, causando a acetilação de histonas e consequente transcrição genética (12). Os corticosteroides induzem o recrutamento da enzima nuclear histona desacetilase 2 (HDAC2) para os genes inflamatórios ativados, levando à supressão da transcrição e à desacetilação destes genes, com consequente supressão da inflamação (16).

Como consequência, há uma redução da produção de mediadores quimiotáticos e moléculas de adesão, e inibição da sobrevivência de células inflamatórias, como eosinófilos, linfócitos T, mastócitos, macrófagos e células dendríticas, representados na figura 4 (17).

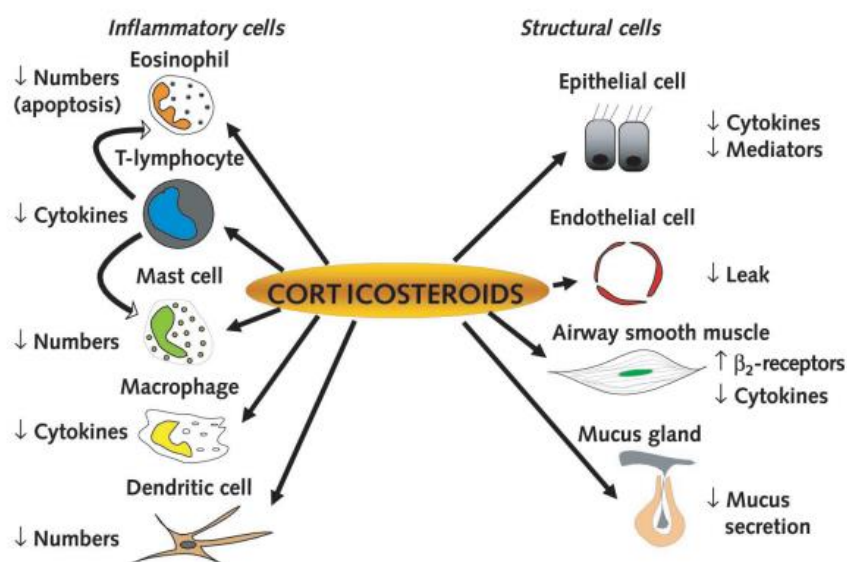


Figura 4 - Efeito celular dos corticosteroides.
Fonte: Barnes, PT., Adcock, IM., 2023

Nos últimos anos, houve uma queda no número de internações por asma no Brasil. Conforme mostra a figura 5, observou-se uma redução de aproximadamente 75% no número de internações no Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente após o acesso da população aos corticoides inalatórios. No entanto, a mortalidade pela doença ainda é considerada alta, atingindo 5 a 7 pessoas por dia (18).



Figura 5 - Hospitalização por Asma no SUS/Brasil por ano.

¹ Pacientes tem acesso aos corticoides inalatórios pelo SUS.

² Medidas de prevenção para a COVID também acarretam diminuição das infecções respiratórias e, por conseguinte, das crises de asma.

Fonte: datasus.gov.br

1.2. DPOC

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma das três principais causas de morte em todo o mundo, sendo um importante desafio de saúde pública.(19) No Brasil, a DPOC acomete cerca de 12% dos indivíduos com mais de 40 anos.(20) Estima-se que a prevalência irá aumentar nas próximas décadas, tendo em vista o envelhecimento da população e a exposição contínua aos fatores de risco (19).

A DPOC é caracterizada pela obstrução crônica progressiva do fluxo de ar. Essa obstrução está associada a uma resposta inflamatória anormal dos

pulmões decorrente da inalação de partículas nocivas ou gases tóxicos, combinado com fatores do hospedeiro (genética, hiperresponsividade das vias aéreas e baixo crescimento pulmonar durante a infância) (19,20). Este processo inflamatório pode levar a alterações nos brônquios (bronquite crônica), bronquíolos (bronquiolite obstrutiva) e parênquima pulmonar (enfisema pulmonar) (20).

A fisiopatologia do DPOC engloba uma série de fatores inflamatórios e processos lesivos às vias aéreas. A exposição a algumas substâncias, como fumo e agentes nocivos leva a uma migração de linfócitos T e macrófagos para as paredes das vias aéreas, e neutrófilos para a luz alveolar(21,22) Lá são ativados e geram uma reação inflamatória, que ao longo dos anos, geram consequências na estrutura e funcionalidade pulmonar (22).

As células epiteliais e os macrófagos são estimulados por interferon γ (IFN- γ) a liberar quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que juntas atuam sobre o receptor CXCR3, expresso em células Th1 e células T citotóxicas tipo 1 (Tc1) para atraí-las para os pulmões. As células Tc1 e as Th1 (subtipo CD4) secretam IFN γ e expressam CXCR3, sugerindo que são atraídas para os pulmões através de quimiocinas de ligação a CXCR3. Tanto a inflamação causada pelas células Tc1, quanto Th1, se autoperpetuam, pois o IFN γ estimula a liberação de ligantes CXCR3, que atraem mais Th1 e Tc1 (figura 6). As células Tc1, por meio da liberação de perforina e granzima B, induzem a apoptose de pneumócitos tipo I, contribuindo assim para o enfisema. As células Th2 também foram encontradas nas vias aéreas de pacientes com DPOC, e secretam IL-4 (16).

Os macrófagos representam a maioria das células inflamatórias encontradas nas vias aéreas tanto de pessoas saudáveis quanto em pacientes com DPOC. No entanto, neste último grupo, o número de macrófagos é 5 e 10 vezes maior (21). Os macrófagos migram para os pulmões em resposta a quimioatrativos, como CCL2 atuando em CCR2, e CXCL1 agindo sobre CXCR2. Alguns estudos evidenciam que os macrófagos orquestram a inflamação da DPOC através da liberação de quimiocinas que atraem neutrófilos, monócitos e células T, e a liberação de proteases, principalmente a metaloproteinase 9

(MMP9) (16), as quais são responsáveis pela degradação da matriz extracelular, levando a destruição do tecido (23).

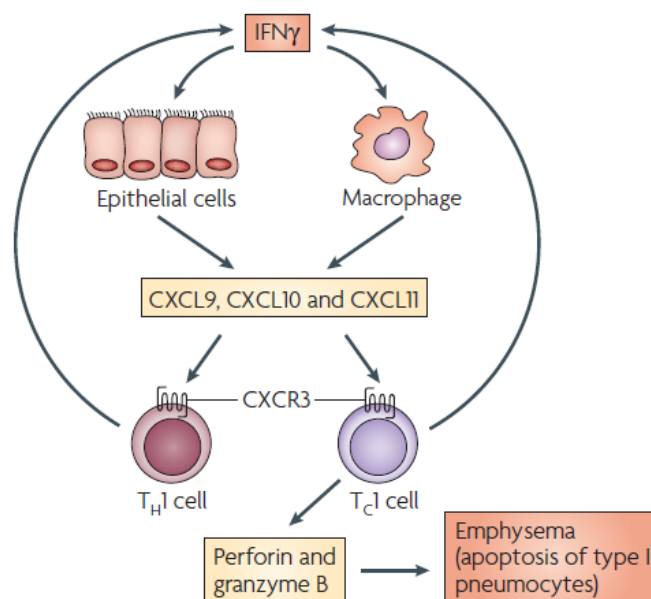


Figura 6 – Células T CD8 na DPOC
Fonte: *Barnes et al., 2008*.

Já os neutrófilos são identificados principalmente na luz alveolar (21), e o seu aumento está relacionado ao aumento na produção de quimiocinas CXCL1 e CXCL8, que atuam no receptor CXCR2, que é expresso principalmente por neutrófilos (16). Eles são responsáveis pela liberação de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e enzimas que promovem hipersecreção de muco e dano tecidual (21). O aumento dos neutrófilos no escarro de pacientes com DPOC se correlaciona com a gravidade da doença (16).

Em resumo, a inflamação no DPOC é caracterizada pela presença de macrófagos, neutrófilos, linfócitos T – com predomínio de CD8 – associado à alteração de fibras colágenas e elásticas, hipersecreção de muco e ao aumento do diâmetro dos alvéolos pulmonares, diminuindo a capacidade respiratória dos indivíduos. Esse processo tem a participação de diversos mediadores inflamatórios, entre eles TNF- α , IL-1 β , IL-6 e outros que promovem uma cadeia inflamatória, que degrada o parênquima pulmonar (23).

espirometria é um teste não invasivo que melhor reproduz de forma objetiva a limitação do fluxo de ar (19).

O tratamento da DPOC visa melhorar os sintomas, reduzir as exacerbações e melhorar a qualidade de vida do paciente(19). As medidas terapêuticas incluem mudanças comportamentais, redução de exposições a fatores de risco, reabilitação, oxigenoterapia, manejo de comorbidades e tratamentos farmacológicos (24). A farmacoterapia a ser escolhida será guiada conforme a gravidade e risco de exacerbação da doença. Os pilares do tratamento são broncodilatadores inalatórios (beta-agonistas e antagonistas muscarínicos) em combinação ou não com os glicocorticoides inalatórios. Apesar do uso de corticoides isolados não modificar a longo prazo o declínio de VEF1 e a mortalidade dos pacientes com DPOC, sabe-se que há benefício do seu uso em termos de função pulmonar e taxas de exacerbação da doença (19).

1.3. Sobreposição de Asma e DPOC

Tanto a asma, como a DPOC são doenças inflamatórias crônicas, que afetam as vias aéreas, e se caracterizam pela presença de obstrução brônquica, com produção de diversos mediadores e recrutamento de diferentes células. A asma frequentemente surge na infância, apresenta crises repetitivas e tem obstrução reversível das vias aéreas. Já a DPOC é de aparecimento tardio, e a obstrução é geralmente irreversível, levando a piora progressiva dos sintomas. No entanto, alguns pacientes apresentam características de ambas as doenças, o que é chamado de Síndrome de Sobreposição Asma e DPOC (25). Provavelmente não se trata de uma doença única, e existem diversos fenótipos para esses pacientes, porém é importante que sejam diagnosticados, com vistas a otimizar o tratamento (26).

Embora essa síndrome de sobreposição tenha sido crescentemente reconhecida, as suas características clínicas ainda não são bem definidas (27), e é difícil estimar a sua prevalência. Estudos estimam que acometa cerca de 13 a 55% dos pacientes com DPOC (28–30). Algumas linhas de pesquisa acreditam que o tabagismo em pacientes asmáticos pode desencadear aumento da

inflamação neutrofílica, obstrução permanente do fluxo aéreo e DPOC. Por outro lado, também é possível que o paciente comece com quadro de DPOC, e com o tempo, desenvolva uma hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas mediada por células tipo Th 2 (26). Já uma terceira hipótese, a hipótese britânica, sugere que a ACOS seja uma doença com um perfil genético e molecular único, diferente da asma e do DPOC. A figura 4 mostra algumas das possibilidades da explicação da ACOS (31).

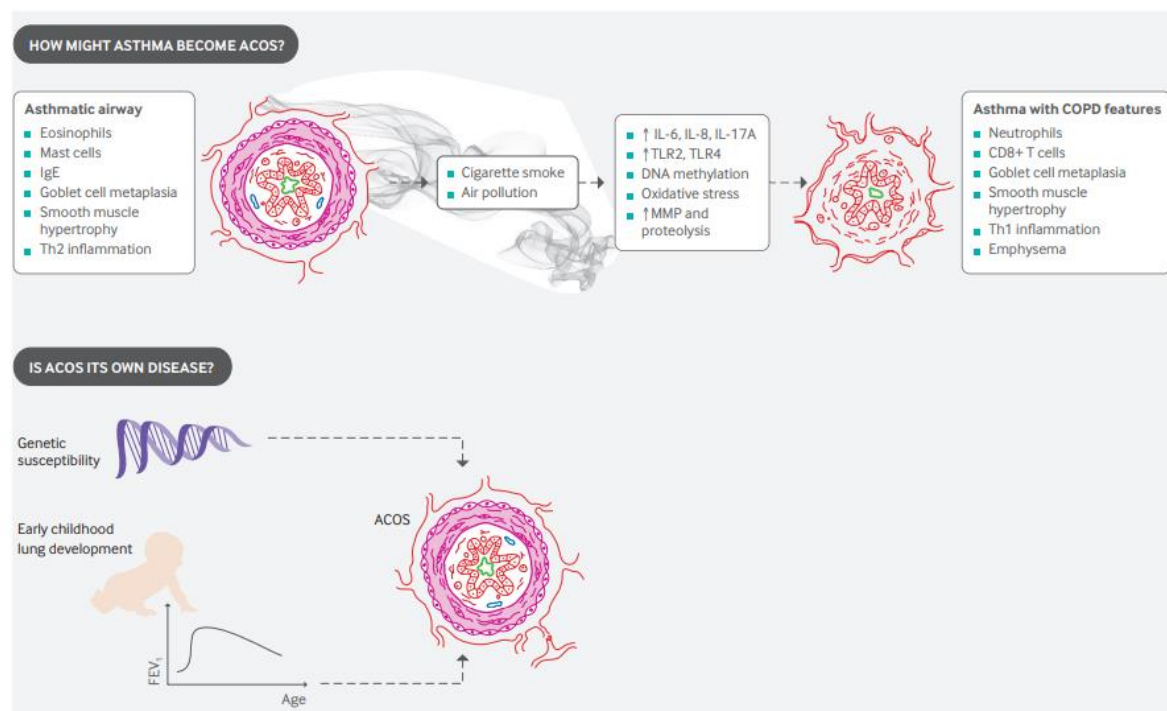


Figura 8 – Hipóteses da associação Asma e DPOC.
Fonte: Leung *et al.*, 2017

A fisiopatologia da ACOS não está bem definida. Sabe-se que nos pacientes com asma, a inflamação na maior parte dos casos envolve eosinófilos e células Th2, e as vias aéreas apresentam hiperreatividade e reversibilidade. Estes pacientes, em geral, respondem bem ao tratamento com corticoides e imunobiológicos dirigidos a inflamação Th2 ou eosinófilos. No entanto, muitas citocinas e quimiocinas são secretadas tanto na asma quanto na DPOC, reguladas pelo fator de transcrição nuclear κB (NF- κB), que é ativado nas células epiteliais das vias aéreas e macrófagos em ambas as doenças, e pode ter um papel importante papel na inflamação das vias aéreas (16).

O diagnóstico da ACOS é um desafio, pois os critérios ainda não estão bem definidos uma vez que existem diversos fenótipos da doença. Na tabela 1 são descritos os principais aspectos da asma, DPOC e ACOS.

Um estudo mostrou que os gastos em cuidados de saúde de pacientes com sobreposição asma DPOC foram cinco vezes maior do que com pacientes com apenas um dos diagnósticos - asma ou DPOC (32). Assim, a identificação desse subgrupo de pacientes torna-se importante para intensificar a terapêutica, com vistas à redução do número de exacerbações e de internações, e consequente melhora da qualidade de vida (27).

O tratamento da ACOS baseia-se em medidas comportamentais e farmacológicas. Recomenda-se cessar tabagismo, manter calendário vacinal em dia uma vez que infecções respiratórias podem exacerbar a doença, evitar exposição a alérgenos e participar de programas de reabilitação pulmonar.(26) As estratégias farmacológicas atuais são baseadas em opinião de especialistas, e inicialmente recomenda-se uso de glicocorticoides inalatórios em doses baixas a moderadas. Porém pode ser necessário uso de um beta-agonista e/ou antagonista muscarínico de ação prolongada para controle dos sintomas (3,26).

Ainda são necessários estudos para entender melhor os fenótipos da ACOS e quais os tipos de biomarcadores fisiológicos, radiológicos e biológicos estão envolvidos e ajudam a distinguir os pacientes e definir a terapia mais adequada.

Tabela 1 – Características asma, DPOC e ACOS.

Aspecto	Asma	DPOC	ACOS
Idade de início	Usualmente infância, mas pode começar em qualquer idade.	Usualmente >40 anos de idade.	Usualmente, ≥40 anos, mas pode ter tido sintomas na infância ou no início da idade adulta.
Padrão dos sintomas respiratórios	Sintomas podem variar ao longo do tempo (de dia para dia ou em períodos maiores), geralmente limitando a atividade. Geralmente desencadeados por exercício, emoções incluindo risadas, poeira ou exposição a alérgenos.	Sintomas crônicos, usualmente contínuos, particularmente durante exercícios, com dias “melhores” e “piores”.	Sintomas respiratórios, incluindo dispneia com exercício, são persistentes, mas a variabilidade pode ser proeminente.
Função pulmonar	Limitação variável ao fluxo aéreo atual ou histórica, reversibilidade com BD, HRB.	VEF ₁ pode melhorar com o tratamento, mas VEF ₁ /CVF <0,7 pós-BD persiste.	Limitação ao fluxo aéreo não totalmente reversível. Mas, geralmente, com variabilidade histórica ou atual.
Função pulmonar entre sintomas	Pode ser normal entre sintomas.	Limitação ao fluxo aéreo persistente.	Limitação ao fluxo aéreo persistente.
História passada ou história familiar	Muitos pacientes têm alergia e uma história pessoal de asma na infância e/ou história familiar de asma.	História de exposição a partículas e gases nocivos (principalmente fumaça de tabaco e de queima de biomassa).	Frequentemente, uma história de asma diagnosticada por médico (atual ou prévia), alergias e história familiar de asma, e/ou história de exposição nociva.
Evolução temporal	Geralmente, melhora espontaneamente ou com tratamento, mas pode resultar em limitação fixa ao fluxo aéreo.	Geralmente, lentamente progressiva ao longo dos anos, apesar do tratamento.	Sintomas são parcialmente (mas significativamente) reduzidos pelo tratamento. Progressão é usual e as necessidades terapêuticas altas.
Raio X de tórax	Usualmente normal.	Hiperinsuflação grave e outros sinais da DPOC.	Parecido com DPOC.
Exacerbações	Exacerbações ocorrem, mas o risco reduz consideravelmente com o tratamento.	Exacerbações podem ser reduzidas com o tratamento. Se presentes, comorbidades contribuem para o comprometimento.	Exacerbações podem ser mais comuns que na DPOC, mas são reduzidas pelo tratamento. Comorbidades contribuem para o comprometimento.
Inflamação das vias aéreas	Eosinófilos e/ou neutrófilos.	Neutrófilos ± eosinófilos no escarro. Linfócitos nas vias aéreas. Pode haver inflamação sistêmica.	Eosinófilos e/ou neutrófilos no escarro.

Fonte: GINA

1.4. Fotobiomodulação

Em 1967 a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) foi descoberta por Endre Mester, pesquisador Húngaro que observou melhora da cicatrização de feridas e aumento do crescimento de pelos em experimentos com ratos. Esta foi a primeira aplicação benéfica da luz de baixa intensidade na Medicina (33). Além do laser monocromático coerente, constatou-se que poderia ser utilizado o diodo emissor de luz (LED) com parâmetros comparáveis para obter os mesmos efeitos biológicos. Desta forma, optou-se pelo uso do termo “fotobiomodulação” para esse tipo de terapia (33,34). Uma das diferenças do LED é que este permite a irradiação de uma área grande do corpo quando comparada ao sistema laser, o qual é necessário aplicar ponto a ponto (35).

A Fotobiomodulação (FBM) é a utilização da luz com objetivo de estimular ou inibir funções biológicas (36). Para que isso ocorra, é necessária a interação dos fótons com as células e cromóforos, havendo absorção da energia pelo tecido conforme o comprimento de onda de luz emitido, que varia aproximadamente de 380 a 1000 nm. A FBM trata sem destruir e sem causar efeito térmico no tecido alvo (37,38).

Na área médica, a FBM já desempenha um importante papel na cicatrização de feridas, reparo e prevenção de morte tecidual, redução de inflamação em doenças crônicas e lesões associadas à dor e edema, e melhora da dor neurogênica (35). Ainda não se sabe ao certo quais os efeitos sistêmicos da terapia com LED, mas se acredita que possa haver um efeito sistêmico na inflamação e em células imunes de tecidos não adjacentes ao alvo. Dentre os mecanismos associados à FBM estão: eventos mitocondriais com aumento da produção de ATP, liberação de óxido nítrico, modulação das espécies reativas de oxigênio; proliferação de fibroblastos, com consequente síntese de colágeno e elastina; regulação de citocinas e quimiocinas, com sensibilização de mastócitos; regulação da atividade dos macrófagos; dilatação capilar e estímulo da angiogênese, com aumento do fluxo sanguíneo local; aumento da atividade de queratinócitos na derme e epiderme; aumento de endorfinas, dinorfinas e encelafinas, com melhora do controle da dor; aumento da síntese de RNA e DNA; regulação de fatores de crescimento e interleucinas (35).

A curva básica de Arndt-Schultz (figura 9) mostra diferentes reações celulares frente a diferentes densidades de energia. Se a densidade de energia é muito baixa, não se observam efeitos sobre as células, e quando muito alta, inibe a função celular. Por isso, é necessária uma densidade de energia efetiva para relevância terapêutica, o que ainda é um desafio no meio científico (39).

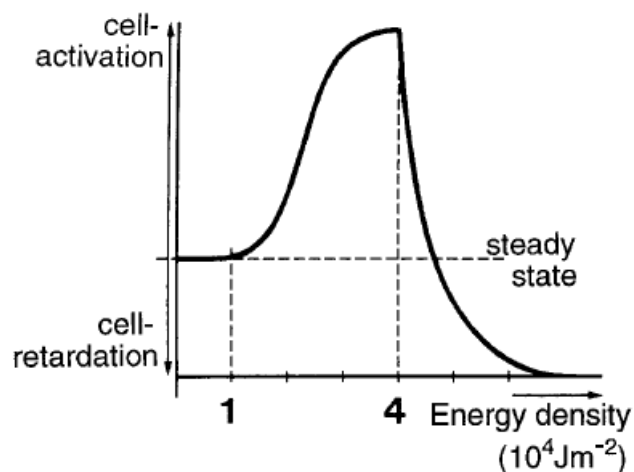


Figura 9 – Curva Básica de Arndt-Schultz
 Fonte: Sommer et al., 2001.

Um crescente número de estudos em modelo experimental de doenças inflamatórias pulmonares vem demonstrando que a terapia com LBI pode ser uma opção terapêutica adjuvante, com baixo custo e sem efeitos colaterais, porém ainda não está bem definido um protocolo com parâmetros da melhor dose da terapia. O estudo em modelo experimental de asma de Silva *et al.* mostrou que o uso de fotobiomodulação utilizando o laser vermelho, com uma potência de 30 mW e energia de 5,4 J durante 3 minutos, trouxe benefícios relacionados a redução da inflamação (40).

Diversos trabalhos mostram que o laser tem um importante papel anti-inflamatório sobre as células. Em modelos experimentais de doenças inflamatórias pulmonares, a terapia com LBI foi capaz de modular a inflamação, com redução de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T (23,41). Além disso, foi capaz de reduzir a produção de muco, eosinófilos peribrônquicos, deposição de colágeno, índice de broncoconstrição e espessamento brônquico e muscular das vias aéreas (41–43). Estudos também demonstram o aumento das citocinas IL-

10, IFN- γ e células Treg, (42–44) e redução da IL-4, IL-5, IL-13, IL-23, IL-1 β e TNF- α (23,41,45).

Um estudo sobre DPOC realizado em humanos evidenciou que a fotobiomodulação aplicada nos músculos respiratórios de pacientes com DPOC foi eficaz em melhorar a capacidade funcional aguda nestes pacientes (46).

Uma vez que os efeitos da FBM sobre o processo inflamatório são evidenciados e tem se mostrado promissores em estudos com asma e DPOC, é importante que estudos experimentais sejam desenvolvidos para avaliar o seu benefício quando estas doenças são sobrepostas, uma vez que a terapia com LBI pode ser uma opção terapêutica adjuvante com baixos custos e sem efeitos colaterais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da fotobiomodulação com laser sobre o processo inflamatório em modelo experimental *in vitro* de ACOS.

2.2. Objetivos Secundários

Quantificar a produção de mediadores liberados por linfócitos T com perfil Th1 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10), Th17 (IL-17, IL-21 e IL-23) em células epiteliais brônquicas humanas estimuladas com EFC e HDM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células Epiteliais Brônquicas Humanas (BEAS-2B)

Essas células foram gentilmente cedidas pelo grupo do Prof. Flávio Aimbire de Carvalho da UNIFESP - São José dos Campos. A linhagem humana de células (BEAS-2B) foi cultivada em meio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/ml de gentamicina, e 1%

glutamina. As células foram contadas (5×10^4 células/poço) e plaqueadas em placas de 24 poços.

3.2. Preparação do Extrato de Fumaça de Cigarro

A indução de DPOC foi realizada através da exposição ao extrato da fumaça de cigarro, e para a sua obtenção, foi utilizado o modelo descrito por Soares, 2018 (51). Foram utilizados cigarros comerciais (alcatrão 13,0 mg, nicotina 1,10 mg, monóxido de carbono 10 mg) os quais foram queimados e a fumaça passada através de uma mangueira onde em uma de suas extremidades foi ligada a um tubo Falcon contendo meio de cultura RPMI-1640, sendo utilizado 1 cigarro para 4 ml do meio. Na outra extremidade da mangueira foi acoplada a uma bomba a vácuo com uma pressão constante. Após a obtenção do extrato de cigarro, 100 μ l (2,5% de EFC) desta solução foi usado para a incubação das células.

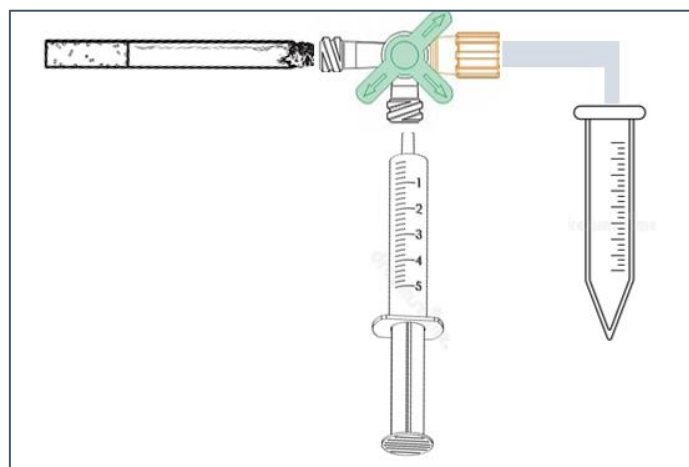


Figura 10 – Representação esquemática para obtenção do extrato da fumaça de cigarro.
Fonte: própria

3.3. Preparação de HDM

Foi utilizado o extrato de *House Dust Mite* (HDM) na concentração de 1 μ g/ml para estimular as células BEAS-2B. Para esse experimento foi utilizado

o HDM *Dermatophagoides pteronyssinus*. O HDM já é usado com sucesso para induzir asma em modelos experimentais (47), e três características o torna adequado: atividade enzimática intrínseca, imunogenicidade e ativação direta de células imunes inatas que promovem inflamação alérgica (61).

3.4. Irradiação com Laser

O laser utilizado foi o diodo (MM Optics®), com comprimento de onda de 660 nm, o qual foi aplicado a 1 cm de distância para evitar contato com o meio de cultura. Os parâmetros utilizados estão descritos na tabela 3, os quais foram baseados em estudos que mostraram redução da inflamação pulmonar com o uso de laser (40).

Tabela 2 – Parâmetros dosimétricos.

Comprimento de onda (nm)	660
Largura espectral	± 20
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média (mW)	30
Exposição radiante (J/cm ²)	120
Área do feixe no alvo (cm ²)	0,045
Energia radiante (J)	5,4
Tempo de exposição (s)	180
Frequência	Única
Pontos de aplicação	1 ponto/poço
Técnica de Aplicação	1 cm distância

3.5. Tratamento com Corticoide

Foi utilizado dexametasona (Sigma), um glicocorticoide sintético, diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 10⁻⁷ M nas células BEAS-2B, baseado no modelo de Burioka *et al.* (48).

3.6. Protocolo Experimental

As culturas celulares foram separadas em 4 grupos experimentais dispostos em placas de 24 poços ocupando 4 poços cada grupo, pois cada condição experimental foi realizada em quaduplicata.

Após a cultura, as células foram estimuladas ou não com EFC e HDM. Depois de 1 hora do estímulo, as placas foram irradiadas com o Laser de Baixa Intensidade (LBI) 660nm ou tratadas com dexametasona (DEXA).

A descrição completa das condições de estímulo da cultura celular está descrita no item abaixo, assim teremos as seguintes condições:

Poço 1: células sem estímulo, com meio de cultura somente (controle negativo – Basal).

Poço 2: células estimuladas com EFC e HDM (grupo ACOS - controle positivo).

Poço 3: células estimuladas com EFC + HDM e tratadas com DEXA (grupo ACOS + DEXA)

Poço 4: células estimuladas com EFC + HDM e irradiadas com LBI (grupo ACOS + LBI)

O grupo ACOS+LBI foi colocado na mesma placa de 24 poços, e os grupos Basal, ACOS e ACOS+DEXA em outra placa com 24 poços. Além disso, os poços com os grupos ACOS+LBI foram dispostos de maneira tal que houve, no mínimo, um poço entre elas, evitando a superdosagem de exposição ao laser.

Decorridas 24 horas do estímulo, o sobrenadante da cultura foi recolhido para a dosagem dos mediadores.

As condições empregadas a cada grupo estão representadas pela figura 11.

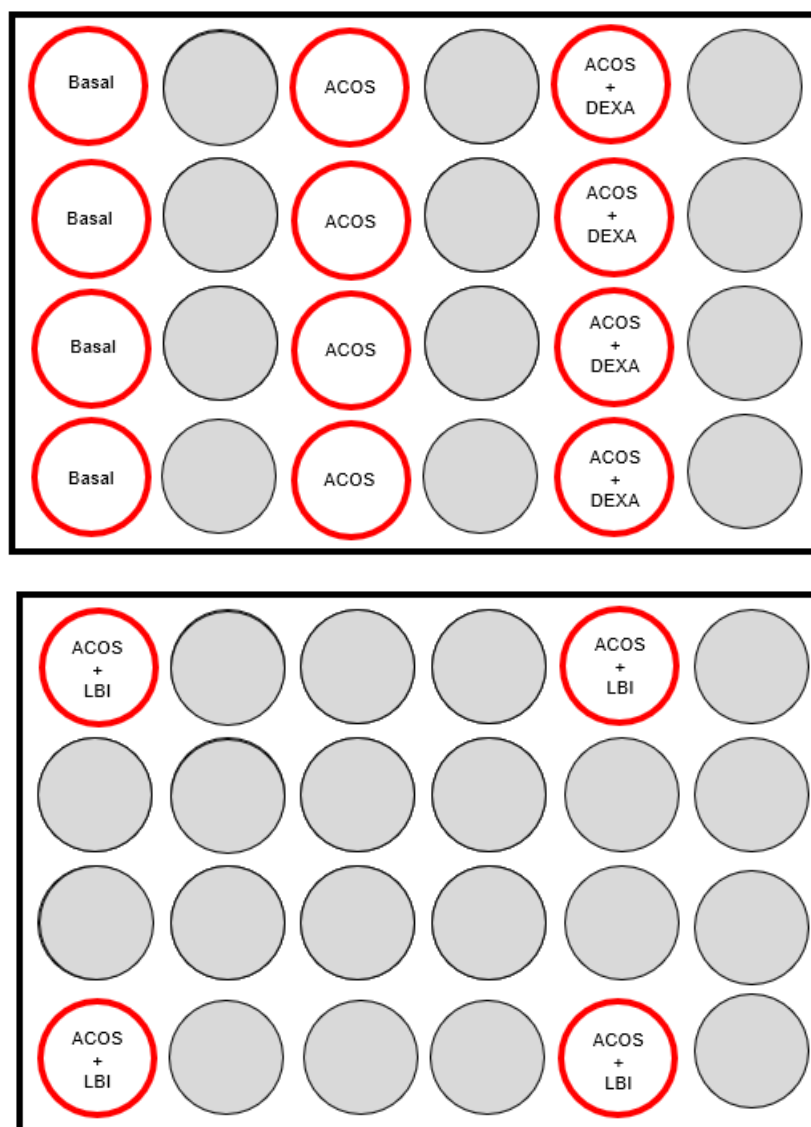


Figura 11 – Disposição dos grupos de culturas de células nas placas.

3.7. Quantificação das citocinas

Foram quantificados os níveis de citocinas com perfil Th1 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) e Th17 (IL-17, IL-21 e IL-23) em sobrenadante de células BEAS-2B recolhido 24h após a fotobiomodulação ou tratamento com dexametasona. Foram utilizados kits de ELISA da BioScience® e R&D System®, e a avaliação realizada conforme descrição do fabricante.

4. ANÁLISE DE RESULTADOS

Os dados de distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Foi utilizado níveis de significância de 5% ($p < 0,05$). Os gráficos e a análise foram elaborados com o software *GraphPadPrism* 5.0 (EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de BEAS-2B

De maneira a avaliar a atividade funcional das células epiteliais brônquicas, quantificamos os níveis de: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-21, IL-23 IFN- γ e IL-10 no sobrenadante da cultura de BEAS-2B estimuladas com EFC e HDM (ACOS), irradiadas com Laser em Baixa Intensidade (LBI - Grupo FBM) ou tratadas com Dexametasona (DEXA).

Como pode ser observado na figura 1, houve um aumento dos níveis de TNF- α no grupo ACOS em relação ao grupo Basal. Por outro lado, após o tratamento com DEXA ou irradiação com LBI (FBM), verificou-se uma redução nos níveis desta citocina quando comparado ao grupo ACOS (Figura 12).

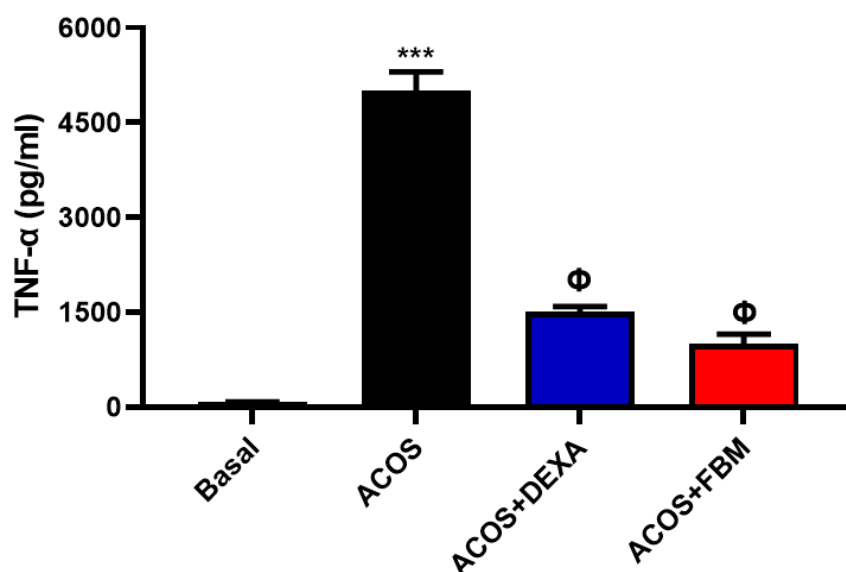


Figura 12. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de TNF- α da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo ACOS.

Na figura 13, observamos aumento nos níveis de IL-1 β na cultura de BEAS-2B no grupo ACOS em relação ao grupo Basal. Por outro lado, verificamos uma diminuição dos níveis desta citocina em relação ao grupo ACOS, em ambos os grupos tratados.

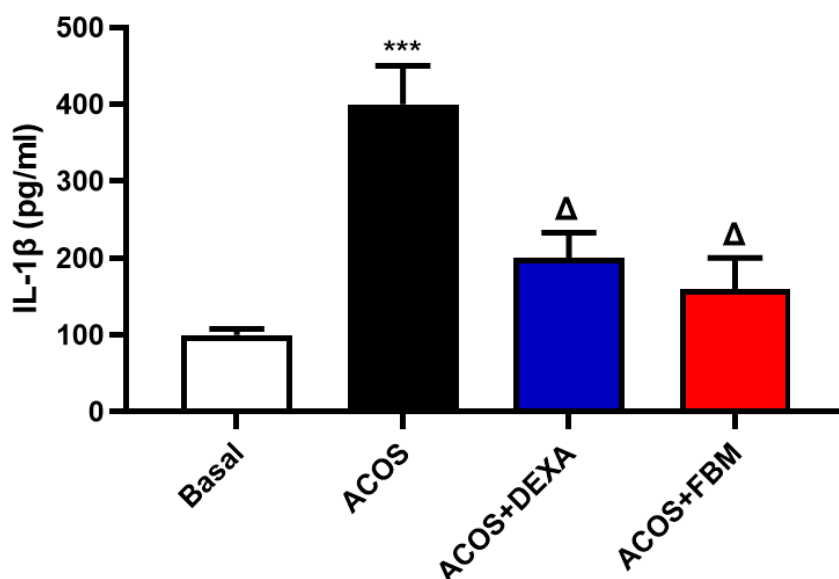


Figura 13. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-1 β da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. ***p<0,001 em relação ao grupo Basal; Δ p<0,05 em relação ao grupo ACOS.

Com relação a IL-6, verificamos que houve um aumento dessa citocina no grupo ACOS, quando comparado com o grupo Basal e apenas o grupo FBM foi capaz de apresentar redução deste mediador quando comparado ao grupo ACOS na cultura de BEAS, (Figura 14).

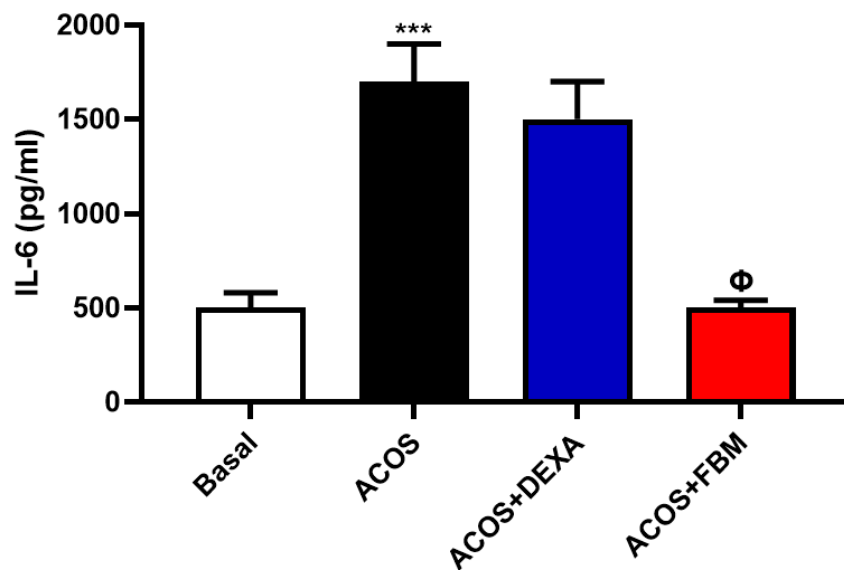


Figura 14. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-6 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo ACOS.

Na figura 15, pode-se observar que os níveis de IL-4 no grupo ACOS apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo Basal. Ambos os tratamentos reduziram os níveis desta citocina no sobrenadante da cultura de BEAS-2B em relação ao grupo ACOS. O mesmo pode ser observado na figura 16 com relação aos níveis de IL-5 na cultura de BEAS-2B.

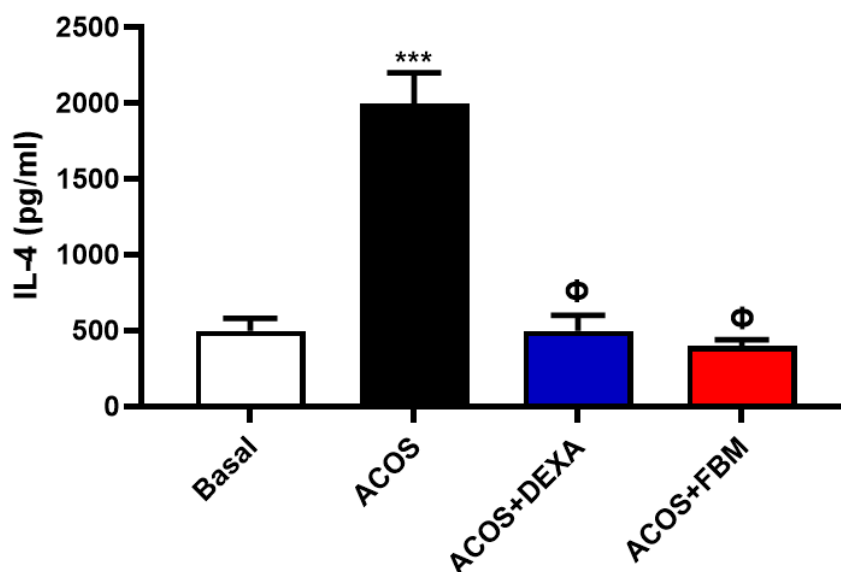


Figura 15. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-4 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo ACOS.

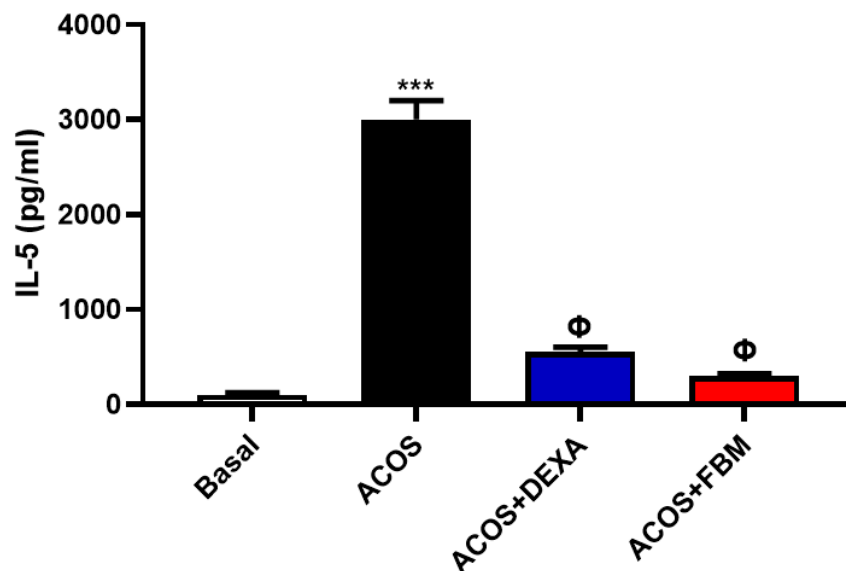


Figura 16. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-5 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo ACOS.

Na figura 17, observamos aumento de IL-13 na cultura de BEAS-2B no grupo ACOS em relação ao grupo Basal. Apenas o grupo tratado com FBM apresentou uma redução significativa nos níveis deste mediador em relação ao grupo ACOS.

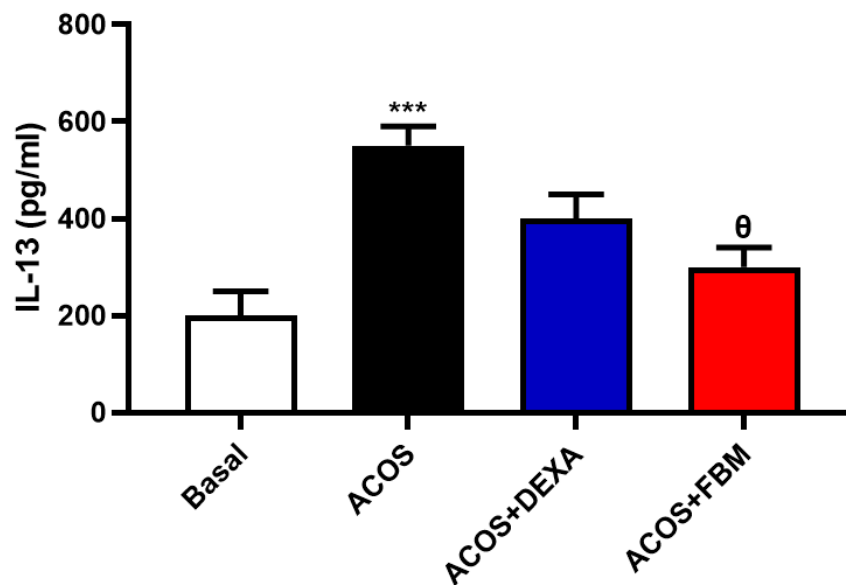


Figura 17. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-13 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; θ $p < 0,01$ em relação ao grupo ACOS.

Na figura 18, verificamos que houve um aumento nos níveis de IL-17 no grupo ACOS em relação ao Basal. Por outro lado, observamos uma redução nos grupos tratados com FBM e no DEXA quando comparados ao grupo ACOS.

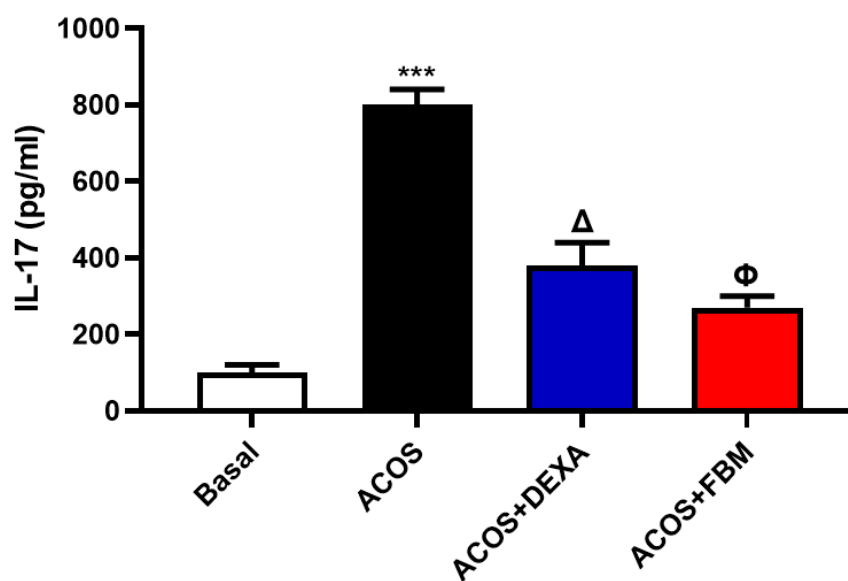


Figura 18. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-17 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; Δ $p < 0,05$; Φ $p < 0,001$ em relação ao grupo ACOS.

Na figura 19, pode-se observar que os níveis de IL-21 no grupo ACOS apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo Basal. Apenas o tratamento com FBM reduziu os níveis desta citocina no sobrenadante da cultura de BEAS-2B em relação ao grupo ACOS. O mesmo pode ser observado na figura 20 com relação aos níveis de IL-23 na cultura de BEAS-2B.

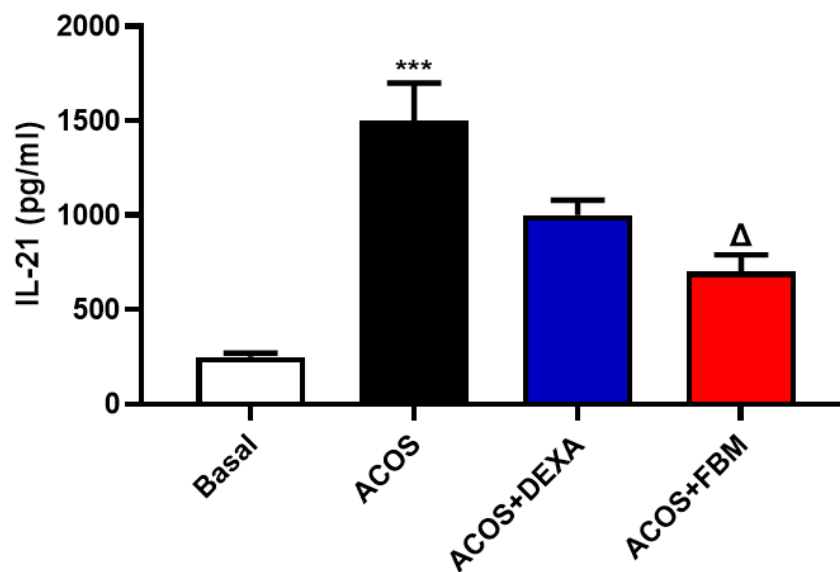


Figura 19. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-21 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Basal; Δ $p < 0,05$ em relação ao grupo ACOS.

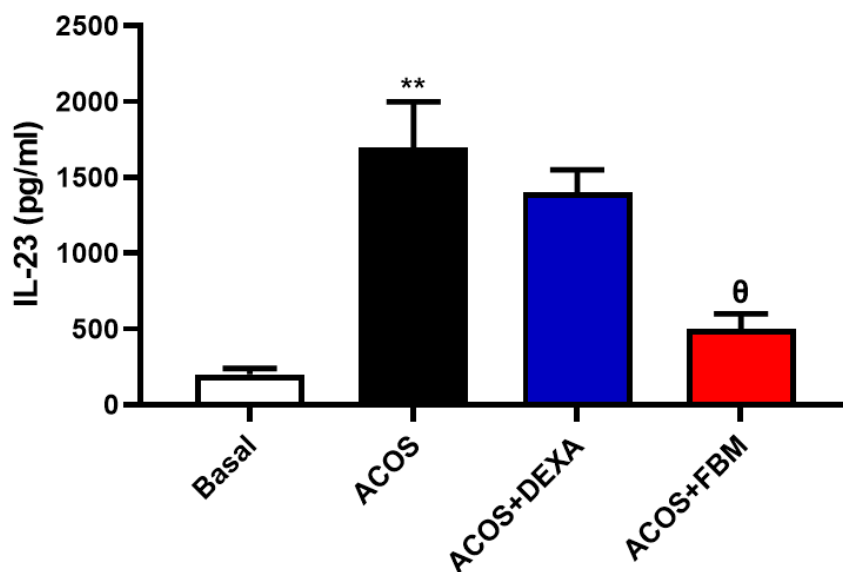


Figura 20. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-23 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Basal; ϕ $p < 0,01$ em relação ao grupo ACOS.

Como pode ser observado na figura 21, não houve diferença significativa dos níveis de IFN- γ entre os grupos ACOS e Basal. Por outro lado, após o tratamento com DEXA ou irradiação com LBI (FBM) verificou-se um aumento nos níveis desta citocina quando comparado ao grupo ACOS.

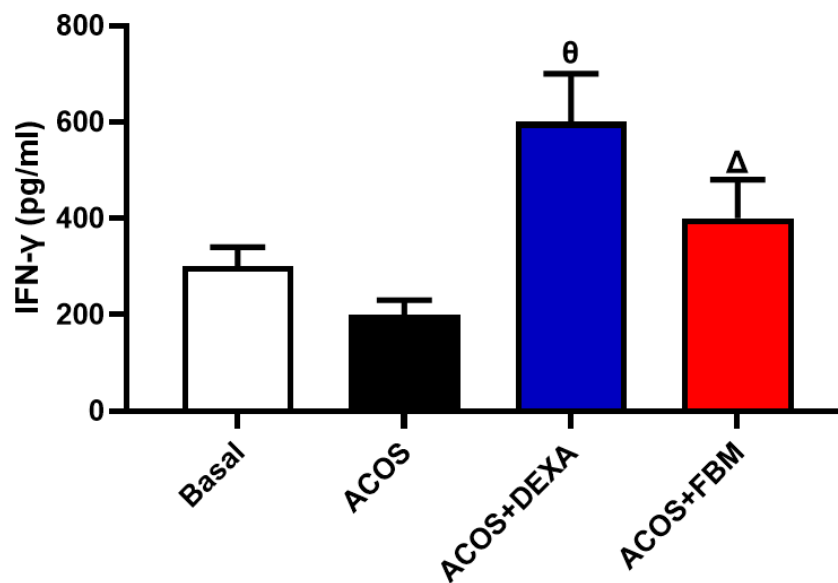


Figura 21. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IFN- γ da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. Δ $p < 0,05$; θ $p < 0,01$ em relação ao grupo ACOS.

Finalizando, verificamos redução dos níveis de IL-10 no grupo ACOS quando comparado ao grupo Basal. Apenas o tratamento com FBM foi capaz de aumentar essa citocina na cultura de BEAS-2B em relação ao grupo ACOS (Figura 22).

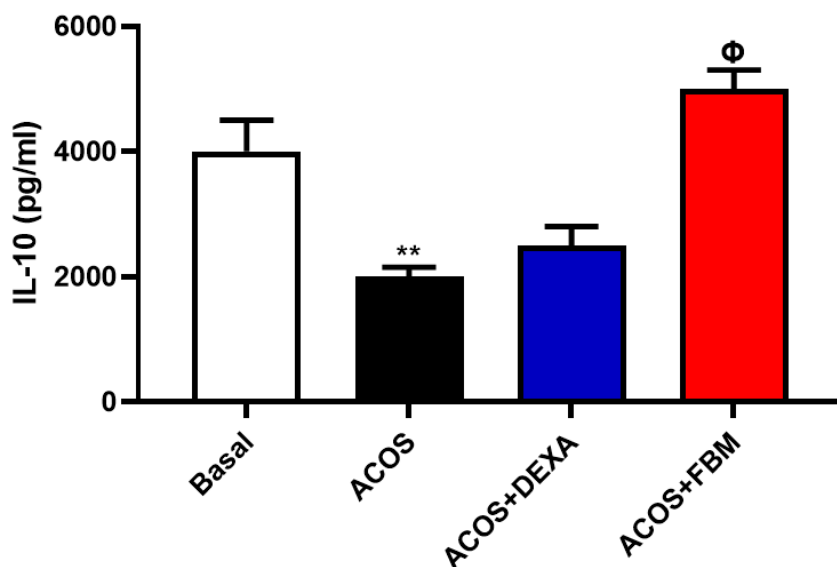


Figura 22. Efeito da fotobiomodulação sobre os níveis de IL-10 da cultura de BEAS-2B estimulada com a associação de extrato de fumaça de cigarro (EFC) e *House Dust Mite* (HDM). Após a incubação com EFC e HDM (Grupo ACOS) as células foram irradiadas com Laser em Baixa Intensidade de 660nm (Grupo ACOS+FBM) ou ainda, incubadas com Dexametasona (Grupo ACOS+DEXA). O sobrenadante da cultura foi recolhido 24 h após o estímulo e armazenado para a dosagem de citocinas por ELISA. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo Basal; Φ $p < 0,001$ em relação ao grupo ACOS.

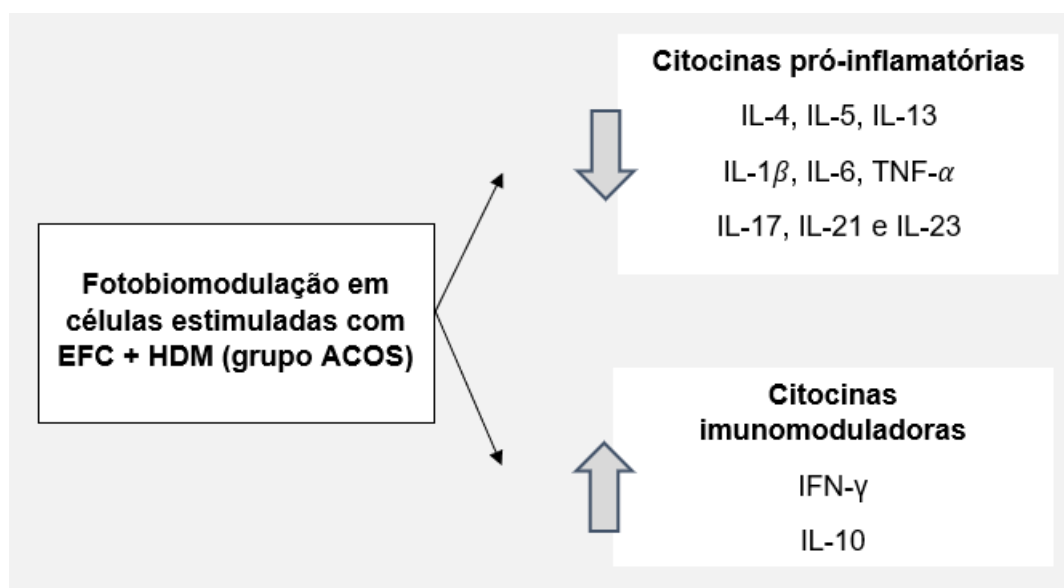


Figura 23 – Resultados da aplicação da FBM em células BEAS-2B estimuladas com associação de EFC + HDM

6. DISCUSSÃO

A asma e a DPOC são doenças inflamatórias crônicas e pode se dizer que atualmente há um domínio acadêmico sobre a fisiopatologia de ambas as doenças. Apesar de apresentarem um perfil inflamatório, as vias da inflamação diferem, o que altera sintomas e tratamento. Recentemente vem se estudando sobre a sobreposição das duas doenças, a ACOS. Embora, vem sendo a cada dia mais reconhecida, as suas características ainda não estão bem definidas. Devido à grande repercussão na qualidade de vida desses pacientes, bem como os altos custos envolvidos, estudos buscando maior compreensão sobre a patologia são necessários.

Em vista disso, achamos pertinente o estudo em modelo *in vitro* utilizando células BEAS estimuladas com EFC e HDM. Nosso objetivo foi avaliar o efeito em mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios da FBM em modelo experimental de ACOS. Foi utilizado o laser (660nm, 30mW, 5,4 J) com parâmetros baseados no estudo de Silva *et al*, o qual mostrou que a terapia com LBI está associada ao controle da hiperresponsividade brônquica e de citocinas pró-inflamatórias Th2 em modelos experimentais *in vivo* de asma (40).

Os resultados acerca do uso do LBI têm se mostrado favoráveis em patologias inflamatórias pulmonares, como na asma e no DPOC, embora ainda existam dúvidas quanto ao mecanismo de ação e dose a ser utilizada. Assim, a FBM pode ser uma importante ferramenta no tratamento ou adjuvância do tratamento da ACOS.

Inicialmente, não realizamos experimentos na cultura de BEAS-2B apenas com LBI, pois o trabalho do nosso grupo de pesquisa verificou que não há diferença entre os grupos de células BEAS com ou sem FBM (51).

O nosso estudo mostrou redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias com perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e aumento de IL-10 no grupo de células BEAS estimuladas com EFC e HDM e irradiadas com LBI quando comparado ao grupo de células BEAS estimuladas com EFC e HDM não irradiadas. Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a terapia com LBI foi promissora em atenuar o processo inflamatório em modelo experimental de asma, com redução das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e aumento dos níveis de IL-10 (41). Outros estudos também corroboram com resultados benéficos anti-inflamatórios da FBM. Silva *et al* mostrou redução da IL-4, IL-5 e IL-13 após laserterapia em modelo experimental de asma, quando comparado ao grupo não irradiado(40).

A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória, e encontra-se em níveis reduzidos em pacientes asmáticos quando comparados a pacientes saudáveis (45). Diversos estudos mostraram o aumento de IL-10 após a laserterapia em doenças pulmonares inflamatórias, tanto em modelos de asma(42–44,49,50), quanto DPOC (51) mostrando que o laser tem um papel importante no controle da inflamação, possivelmente via linfócitos Treg (59).

Além da IL-10, nosso estudo também observou aumento de IFN- γ no grupo da ACOS irradiado com LBI. O IFN- γ apresenta propriedades moduladoras e sua presença contribui para reduzir as citocinas pró-inflamatórias mediadas pelos linfócitos Th2, ou seja, desempenha um papel anti-inflamatório e atenua a exacerbação da resposta alérgica pulmonar. Nos pacientes asmáticos, o IFN- γ é encontrado em baixos níveis, o que está associado à persistência da resposta inflamatória (52). Por outro lado, no DPOC, o IFN- γ

estimula a liberação de quimiocinas que atraem as células Th1 e Tc1 para os pulmões, as quais são responsáveis pela lesão tecidual (16). Embora o IFN- γ atue em diferentes vias na asma e no DPOC, podemos inferir que o seu aumento após a terapia de FBM motivou a redução de citocinas pró-inflamatórias. Nesse sentido, podemos sugerir que a terapia com o laser parece ser uma opção com propriedades anti-inflamatórias em casos onde há sobreposição das duas doenças.

Na DPOC, a inflamação é caracterizada pela presença de linfócitos T, predominantemente CD8, macrófagos e neutrófilos; e as citocinas encontradas em níveis aumentados nesses pacientes são principalmente TNF- α , IL-1 β e IL-6 (53). Nosso estudo, quando avaliou tais citocinas pró-inflamatórias, mostrou redução das mesmas no grupo estimulado com EFC e HDM e irradiado com laser quando comparado ao grupo controle positivo. A IL-1 β desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da injúria pulmonar, participando tanto na resposta inflamatória precoce, quanto tardia, perpetuando a inflamação. A IL-1 β promove recrutamento de neutrófilos, aumentando permeabilidade capilar e lesão epitelial (54%). Citocinas como TNF- α e IL-6 modulam o recrutamento e a ativação de leucócitos em doenças pulmonares. O TNF- α é produzido por células epiteliais, mastócitos e macrófagos, e induz a migração e ativação de leucócitos e hiperreatividade das vias aéreas. A IL-6 desempenha um complexo importante na resposta inflamatória e está associada à inflamação crônica. Miranda *et al.* mostrou redução do TNF- α e IL-6 em camundongos submetidos à inflamação pulmonar induzida com exposição por formaldeído e tratados com a terapia com LBI, quando comparado aos não tratados (50). De Lima *et al.* Mostrou em estudo de 2014 uma redução nas citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 em camundongos submetidos à oclusão arterial mesentérica e irradiados com laser sobre o brônquio superior após o início da reperfusão intestinal (49).

Baseado em alguns estudos, a maioria em modelo animal, a asma persistente está associada a níveis aumentados de IL-23. Esta citocina tem como função auxiliar na diferenciação de células Th17 e manter a produção de IL-17, e atuar em células dendríticas modulando sua atividade na diferenciação das células Th2. Além disso, é responsável por causar inflamação eosinofílica. A IL-17 é responsável por liberar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e

recrutamento de neutrófilos (11). Já a IL-21 é um importante regulador dos linfócitos T e B (60). No nosso estudo, tanto a IL-17, como a IL-21 e IL-23 tiveram sua concentração reduzida nas células irradiadas com laser, mostrando mais uma vez sua ação anti-inflamatória.

Atualmente, o tratamento da ACOS é baseado em opinião de especialista, e inicialmente recomenda-se o uso de corticosteroide, associado ou não a outras medicações, conforme os sintomas do paciente. Sabe-se que os glicocorticoides inalatórios possuem efeitos colaterais, entre eles, hipersensibilidade de contato, candidíase orofaríngea, disfonia, risco aumentado para algumas infecções pulmonares, e menos frequente, supressão adrenal e aumento da pressão intraocular (26). Em estudo *in vitro*, Sato *et al.* traz resultados do uso de dexametasona nas doses de $10^{-7}M$ e $10^{-5}M$ em células epiteliais brônquicas estimuladas com eosinófilos, mostrando que houve supressão da adesão de eosinofílica com o uso do corticoide (55). Outro trabalho que utilizou células humanas pulmonares, mostrou que as células tratadas com dexametasona na dose de $10^{-7}M$ e $10^{-6}M$ inibiu a expressão de mRNAs de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (56). Mullol *et al.* avaliou células epiteliais da mucosa nasal saudável e com pólipos nasais, e mostrou que o uso de dexametasona inibiu a liberação de IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β (57), sugerindo que a dexametasona reduziu citocinas pró-inflamatórias.

No nosso estudo, houve redução da IL-17 no grupo ACOS tratado com dexametasona quando comparado ao grupo ACOS sem tratamento. Sabe-se que asmáticos tem níveis elevados de IL-17 em comparação a pacientes saudáveis, porém é provável que esta citocina contribua à sensibilidade reduzida aos corticosteroides. Rahmawati *et al.* mostrou que 2861 genes foram expressos por IL-17, dos quais a maioria não foi sensível à dexametasona. Por isso efeitos como metaplasia de células caliciformes, secreção e produção de muco, que são induzidos por IL-17, não foram evitados com o uso do corticoide (58). Apesar da literatura mostrar redução da sensibilidade à dexametasona, nosso estudo se mostrou eficaz na redução da citocina IL-17 no grupo ACOS irradiado.

Para concluir, quando quantificamos as citocinas no grupo de células BEAS-2B incubadas com EFC e HDM e tratadas com dexametasona, observamos que também houve redução das citocinas pró-inflamatórias e

aumento de IFN- γ e IL-10. No entanto, essa redução em parte das citocinas não foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle positivo, como a IL-6, IL-13, IL-21 e IL-23. O mesmo ocorreu com a IL-10, que teve seus níveis aumentados neste grupo, porém sem relevância estatística. O que podemos discutir é que o uso dos corticoides como terapia única talvez não consiga modular a resposta inflamatória de forma satisfatória. Assim, provavelmente alguns dos pacientes não terão bom controle da doença, sendo um motivo para a busca de terapias alternativas, como o laser, na adjuvância do tratamento da ACOS, o qual não possui efeitos colaterais, diferentemente da associação com outras medicações.

Nosso estudo, em geral, corroborou com os dados encontrados na literatura até o momento sobre a terapia de FBM, a maioria em modelo experimental de inflamação pulmonar (figura 23). Apesar de não estar bem claro o mecanismo de ação do LBI, ele está envolvido na modulação da inflamação, com redução de marcadores pró-inflamatórios e aumento das citocinas anti-inflamatórias. Podemos sugerir que a FBM atuou aumentando IFN- γ , o qual é responsável por reduzir IL-4; e aumentando IL-10 e provavelmente T reg, suprimindo as citocinas pró inflamatórias, levando a um controle da inflamação.

Enfim, a FBM se mostrou como uma possibilidade terapêutica para ACOS com baixo custo e sem agregar efeitos colaterais. No entanto, ainda são necessários estudos para avaliar qual o mecanismo do controle da inflamação, bem como para avaliar a correlação entre as citocinas pró-inflamatórias e o IFN- γ e a IL-10, com vistas a elucidação da fisiopatologia da ACOS.

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a terapia de FBM em modelo experimental de ACOS levou à redução das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-17, IL-21 e IL-23, e ao aumento das anti-inflamatórias IL-10 e IFN- γ . Assim, podemos sugerir que a terapia de fotobiomodulação tem um potencial benefício na ACOS, e este estudo foi um importante passo para o conhecimento da patologia e para novas pesquisas na área experimental, com vista à avaliação de outras características da doença.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Carvalho, APE., *et al.* Asma e rinite: respirando melhor. Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. 1ª ed, Recife - PE: Mariola, 2022. Disponível em <https://asbai.org.br/>.
2. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol.* 2013;4(Sep):1–16.
3. Reddel, HK., *et al.* Global Strategy for Asthma Management and Prevention – update 2022. Global Initiative for Asthma (GINA). Disponível em www.ginasthma.org.
4. Seeley, RR.; Stephens, TD.; Tate P. Patologia do Aparelho Respiratório: Asma. In: Anatomia e Fisiologia. 6 ed. 2003. p. 864–865.
5. Campos, HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide Asthma. *Rev Bras Pneumol Sanit.* 2007;15(1):47–60.
6. Huang, FL., Liao, EC., Yu. SJ. House dust mite allergy: Its innate immune response and immunotherapy. *Immunobiology* [Internet]. 2018;223(3):300–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.035>
7. Piyadasa, H., Altieri A., Basu S., Schwartz J., Halayko AJ., Mookherjee N. Biosignature for airway inflammation in a house dust mite-challenged murine model of allergic asthma. *Biol Open.* 2016;5(2):112–21.
8. Abbas, AK., ABBAS, Lichtman, AH., Pillai, S. Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico. São Paulo: Guanabara, 2021.
9. Pawankar, R. Perspectivas atuais sobre inflamação e remodelamento das vias aéreas na asma e na rinite alérgica. *Braz J Allergy Immunol.* 2013;1(5):243–52.
10. Barnes, PJ., Drazen JM. Pathophysiology of asthma. In: Asthma and COPD: Basic Mechanisms and clinical management. 2. ed. 2009. p. 401–423.
11. Alyasin, S., Amin, R., Fazel, A., Karimi, MH., Nabavizadeh, SH., Esmaeilzadeh H., *et al.* IL-23 gene and protein expression in childhood asthma. *Iranian Journal of Immunology.* 2017;14(1):73–80.
12. Lee, HS., Park, DE., Lee JW, Sohn KH, Cho SH, Park HW. Role of interleukin-23 in the development of nonallergic eosinophilic inflammation in a murine model of asthma. *Exp Mol Med* [Internet]. 2020;52(1):92–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-019-0361-9>
13. Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, *et al.* Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001;1(1):85–93.

14. Silva, ECF., Dias GAC., Patogenia da asma. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. 2013;12(2).
15. Powell, C., White, R., Primhak, R. 2020 Focused Updates to the Asthma Management Guidelines. National Asthma Education and Prevention Program Coordinating Committee Expert Panel Working Group. 2020;306(6885):1132.
16. Barnes, PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol. 2008;8(3):183–92.
17. Barnes, P. J.; Ian M. Adcock IM. How Do Corticosteroids Work in Asthma?
18. <https://datasus.gov.br>.
19. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. GOLD Pocket Guide 2022 (COPD) [Internet]. Gold. 2022. p. 53. Available from: <https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2/%0Awww.goldcopd.org>
20. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC. Jornal Brasileiro de Pneumologia [Internet]. 2004;30(5):1–52. Available from: http://www.jornaldepneumologia.com.br/pdf/suple_124_40_dpoc_completo_finalimpresso.pdf
21. Costa, CH., Rufino, R., Silva, JRL. Inflammatory cells and their mediators in COPD pathogenesis. Rev Assoc Med Bras. 2009;55(3):347–54.
22. MacNee W, Skwarski K. The pathogenesis of peripheral edema in chronic obstructive pulmonary disease. Clin Pulm Med. 1997;4(6):309–15.
23. Alves, WDS., Oliveira Júnior, GC., Santo, LAE., Beserra, MRDS., Carvalho, FAS. Terapia com laser 670nm no tratamento da DPOC experimental em ratos. ConScientiae Saúde. 2010;9(4):610–7.
24. Fernandes, FLA., Cukier, A., Camelier, AA., Fritscher, CC., da Costa, CH., Pereira, EDB., *et al.* Recomendações para o tratamento farmacológico da DPOC: Perguntas e respostas. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2017;43(4):290–301.
25. Reis, AP., Stirbulov, R. Síndrome de sobreposição asma e DPOC. Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia. 2017;1(2):1–8.
26. Han, MK., Wenzel, S. Asthma and COPD overlap (ACO) [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 7]. Available from: uptodate
27. Tiago Manuel Alfaro, Sara da Silva Freitas CRC. Carta ao Editor. J Bras Pneumol. 2012;38(6):813–6.
28. HS C. ACO: sobreposição de asma e DPOC ou uma forma intermediária? Pulmão RJ. 2017;26(1):45–50.

29. Marsh, SE., Travers, J., Weatherall, M., Williams, M., Aldington, S., Shirtcliffe, PM. Europe PMC Funders Group Proportional classifications of COPD phenotypes. 2010;63(9):761–7.
30. Hardin, M., Silverman, EK., Barr, RG., Hansel, NN., Schroeder, JD., Make, BJ., *et al.* The clinical features of the overlap between COPD and asthma. *Respir Res* [Internet]. 2011;12(1):127. Available from: <http://respiratory-research.com/content/12/1/127>
31. Leung, JM., Sin, DD. Asthma-COPD overlap syndrome: Pathogenesis, clinical features, and therapeutic targets. *BMJ (Online)*. 2017;358:1–14.
32. Soriano, JB., Visick, GT., Muellerova, H., Payvandi N, Hansell AL. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest*. 2005;128(4):2099–107.
33. Hamblin, MR. Photobiomodulation or low-level laser therapy. *J Biophotonics*. 2016;9(11–12):1122–4.
34. Hamblin, MR., Demidova, TN. Mechanisms of low level light therapy. *Mechanisms for Low-Light Therapy*. 2006;6140:614001.
35. Kim, WS., Glen Calderhead, R. Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective? *Laser Ther*. 2011;20(3):205–15.
36. Liu, TC., Liu, R., Zhu, L., Yuan, J., Hu, M., Liu, S. Homeostatic photobiomodulation. *Frontiers of Optoelectronics in China*. 2009;2(1):1–8.
37. Karu, TI. Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy). *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*. 2014;20(2).
38. Lanzaforme, RJ. Photobiomodulation, tissue effects and bystanders. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(8):519–20.
39. Sommer, AP., Pinheiro, ALB., Mester, AR., Franke, RP, Whelan, HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: Lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(1):29–33.
40. 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 from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.01.008>
41. Rigonato-Oliveira, NC., Brito, AA de, Vitoretti, LB., de Cunha Moraes, G., Gonçalves, T., Herculano, KZ., *et al.* Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Pulmonary Inflammation in Asthma Induced by House Dust Mite (HDM): Dosimetry Study. *Int J Inflam*. 2019.
42. Siqueira, VPC, Evangelista, MIS., dos Santos, A., Marcos, RL., Ligeiro-de-Oliveira, AP., Pavani, C., *et al.* Light-Emitting Diode treatment ameliorates

- allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. *J Biophotonics*. 2017;10(12):1683–93.
43. de Brito, AA., Gonçalves, TS., Herculano, KZ., Estefano-Alves, C., Nascimento, CRA., Rigonato-Oliveira, NC., *et al.* Photobiomodulation Therapy Restores IL-10 Secretion in a Murine Model of Chronic Asthma: Relevance to the Population of CD4+CD25+Foxp3+ Cells in Lung. *Front Immunol*. 2022;12(February):1–11.
 44. Alonso, PT., Schapochnik, A., Klein, S., Brochetti, R., Damazo, AS., Destro, MFSS., *et al.* Transcutaneous systemic photobiomodulation reduced lung inflammation in experimental model of asthma by altering the mast cell degranulation and interleukin 10 level. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2022;37(2):1101–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03359-1>
 45. Soares, C. Efeito da terapia de baixa intensidade em estudo clínico e experimental da asma brônquica. 2018. Tese (Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2018.
 46. de Souza, GHM., Ferraresi, C., Moreno, MA., Pessoa, BV., Damiani, APM., Filho-Gasparotto, V., *et al.* Acute effects of photobiomodulation therapy applied to respiratory muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Lasers Med Sci*. 2020;35(5):1055–63.
 47. Park, HJ., Oh, EY., Han, HJ, Park, KH., Jeong, KY., Park, JW., *et al.* Soluble CD93 in allergic asthma. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–8.
 48. Burioka, N., Takata, M, Okano, Y., Ohdo, S, Fukuoka, Y., Miyata, M., *et al.* Dexamethasone influences human clock gene expression in bronchial epithelium and peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Chronobiol Int*. 2005;22(3):585–90.
 49. de Lima, FM., Aimbire, F., Miranda, H., Vieira, RP., de Oliveira, APL., Albertini, R. Low-Level Laser Therapy Attenuates the Myeloperoxidase Activity and Inflammatory Mediator Generation in Lung Inflammation Induced By Gut Ischemia and Reperfusion: A Dose-Response Study. *J Lasers Med Sci*. 2014;5(2):63–70.
 50. da Silva, CM., Leal, MP., Brochetti, RA, Braga, T., Vitoretti, LB., Câmara, NOS., *et al.* Low level laser therapy reduces the development of lung inflammation induced by formaldehyde exposure. *PLoS One*. 2015;10(11):1–16.
 51. Soares, SS. Estudo dos mediadores inflamatórios liberados pelas células estruturais pulmonares incubadas com extrato de fumaça de cigarro: associação da irradiação com laser em baixa intensidade e células-tronco mesenquimais de dente decíduo. 2018. Dissertação (Mestrado em

Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde) – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2018.

52. Nunes, CV., Fortunato, LR., Oliveira, JR., Pereira, ABM., Irie, GRF., Tanaka, SCSV., *et al.* Interferon-gamma signaling is downregulated in peripheral blood mononuclear cells from asthma patients. *Arquivos de Asmas Alergia e Imunologia*. 2020;4(2):198–204.
53. Queiroz, CF., Bastos, MLS., Camelier, AA. Perfil inflamatório e imunológico em pacientes com DPOC: relação com a reversibilidade do VEF1. *J Bras Pneumol*. 2016;42(4):241–7.
54. Aimbire, F., de Oliveira, APL., Albertini, R., Corrêa, JC., de Campos, CBL., Lyon, JP, *et al.* Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1 β levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008;31(3):189–97.
55. Sato, M. *et al.* Eosinophil Adhesion to Human Bronchial Epithelial Cells: Regulation by Cytokines. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;(113):203–5.
56. Griffin, R., Richardson, JB., Kerby, JD. Dexamethasone inhibits inflammatory response via down regulation of AP-1 transcription factor in human lung epithelial cells. *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 2017;2001–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2017.10.031>
57. Mullol, J., Xaubet, A., Gaya, A., Roca-Ferrer, J., Lopez, E., Fernandez, JC., *et al.* Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clinical and Experimental Allergy*. 1995;25(7):607–15.
58. Rahmawati, SF., Vos, R., Bos, IST., Kerstjens, HAM., Kistemaker, LEM., Gosens, R. Function-specific IL-17A and dexamethasone interactions in primary human airway epithelial cells. *Sci Rep*. 2022;12(1):1–13.
59. Brito, A., Santos, T., Herculano, K., Rigonato, NO., Palma, R., Oliveira, APL., *et al.* A Effectiveness of photobiomodulation on increase of Treg cells and IL-10 cytokine in na experimental modelo of chronic asthma. *European Respiratory Journal*. 2019. 54 PA4368.
60. Gong F, Zheng T, Zhou P. T Follicular Helper Cell Subsets and the Associated Cytokine IL-21 in the Pathogenesis and Therapy of Asthma. *Front Immunol*. 2019;10(December):1–12.
61. Clarke, DL., Davis, NH., Foster, ML., Heasman, SC., Lewia, AR., Anderson, IK., Corkill, DJ., Sleeman, MA., May, RD., Robinson, MJ. Dectin-2 sensing of house dust mite is critical for the initiation of airway inflammation. *Mucosal Immunol*. 2014; 7(3): 558-67.