



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

Tawany Gonçalves Santos

**“Efeito da Terapia com Fotobiomodulação sobre  
a inflamação pulmonar em modelo experimental  
de asma crônica”**

São Paulo, SP  
2023



# **“Efeito da Terapia com Fotobiomodulação sobre a inflamação pulmonar em modelo experimental de asma crônica”**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de mestre em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde.

**Orientador(a):** Profa. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira

**Co-orientador:** Profa. Dra. Auriléia Aparecida de Brito

São Paulo  
2023

Santos, Tawany Gonçalves.

Efeito da Terapia com fotobiomodulação sobre a inflamação pulmonar em modelo experimental de asma crônica. / Tawany Gonçalves Santos. 2023.

67 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

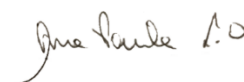
Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ligeiro de Oliveira.

São Paulo, 26 de junho de 2023.

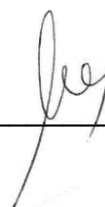
**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Tawany Gonçalves Santos

Título da Dissertação: "Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a inflamação pulmonar em modelo experimental de asma crônica".



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



Membro: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA CRISTINA CHAVANTES \_\_\_\_\_

Membro: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. PATRICIA SARDINHA LEONARDO LOPES MARTINS 

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado me dando forças e iluminando os meus passos.

Agradeço os meus pais, minha mãe Aparecida Gonçalves por sempre me incentivar, e inspirar a ser uma pessoa melhor a cada dia, meu pai Mauricio Domingos Santos por não me deixar desistir e fazer o impossível para que eu continuasse a estudar e seguir meu sonho de ser uma pesquisadora.

A minha irmã por sempre estar me incentivando, assistindo minhas apresentações e mesmo sem entender nada ela estava lá empolgada com as minhas aulas.

Ao meu namorado Lucas Liro Vieira, que ficou do meu lado durante esses 2 anos, com muita paciência, amor, dedicação, incentivo, e sempre me ajudando tanto nas aulas, como também durante o projeto.

A Cintia minha amiga e também colega de laboratório, meu muito obrigada por toda ajuda, e por não me deixar desistir.

A Ana Paula minha orientadora, que desde a época da graduação me deu a oportunidade de ser a sua aluna de iniciação científica, e sempre me incentivou a continuar estudando, e se apaixonando pela pesquisa, sem você nada disso seria possível, meu muito obrigado.

A Auriléia, por todos esses anos de amizade, e cumplicidade, meu muito obrigada por ter tido paciência e ter me ensinado sobre como funciona as coisas no laboratório e como conduzir um projeto de pesquisa.

Aos funcionários e corpo docente da Universidade Nove de Julho pela contribuição, paciência, conhecimento e ajuda.

A Universidade Nove de Julho pela concessão de bolsa de estudos e seu apoio e estímulo a pesquisa.

## RESUMO

A asma afeta uma parcela significativa da população, com elevado custo social e econômico. A terapia com fotobiomodulação (FBM) é um tratamento que demonstra eficácia em doenças pulmonares por reduzir parâmetros inflamatórios, com baixo custo e sem efeitos colaterais. O objetivo foi avaliar os efeitos da terapia FBM em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar crônica induzida por ovalbumina (OVA). Camundongos Balb/C foram divididos em 6 grupos: Controle, OVA, e OVA+FBM (OVA+1J, OVA+3J, OVA+5J, OVA+7,5J). A inflamação foi induzida por sensibilização com OVA (dia 0 e dia 14) e desafio orotraqueal a partir do dia 21 (3 dias/semana por 5 semanas). Uma hora após o desafio foi aplicado a irradiação com laser de diodo (660nm, 100mW), utilizando diferentes tempos de irradiação (10s, 30s, 50s e 75s), em três pontos distintos, um abaixo da traquéia e um em cada lobo pulmonar. Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta de lavado broncoalveolar (LBA) e dos pulmões. Parâmetros como contagem de células totais e diferenciais, níveis de citocinas no LBA, produção de muco, deposição de colágeno, quantificação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos no pulmão, bem como analisamos a porcentagem de linfócitos T (CD4 e CD25) e células T reguladoras (Foxp3) e a liberação de IL-10 por essas células. Os dados foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Níveis de significância ajustados para 5% ( $p < 0,05$ ). A terapia com FBM foi capaz de reduzir a inflamação pulmonar observada pela redução do número total e diferencial de células no LBA, principalmente com relação ao número de eosinófilos, além disso verificamos diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA no grupo tratado com FBM, bem como o aumento dos níveis de IL-10. Observamos o aumento de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> para os grupos tratados com laser (3J, 5J e 7,5J). Já para os valores de linfócitos CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> presenciamos um aumento em todos os grupos tratados com FBM. Esses resultados revelaram que a terapia com FBM apresentou um efeito benéfico na migração celular para o pulmão, bem como a estimulação da produção de IL-10. Notamos também a redução da deposição de muco e de colágeno nas vias aéreas nos grupos submetidos à terapia com FBM com as energias de 3J e 5J. Portanto, concluímos que o uso da terapia com FBM na inflamação crônica das vias aéreas atenuou o processo inflamatório, bem como os parâmetros funcionais e estruturais pulmonares, provavelmente devido ao aumento das células T reguladoras.

Palavras chaves: asma, citocinas, remodelamento, fotobiomodulação, dosimetria.

## ABSTRACT

Asthma affects a significant portion of the population, with a high social and economic cost. Photobiomodulation therapy (FBM) is a treatment that demonstrates efficacy in lung diseases by reducing inflammatory symptoms, with low cost and without side effects. The objective was to evaluate the effects of FBM therapy in an experimental model of chronic lung inflammation induced by ovalbumin (OVA). Balb/C mice were divided into 6 groups: Control, OVA, and OVA+FBM (OVA+1J, OVA+3J, OVA+5J, OVA+7.5J). Inflammation was induced by OVA sensitization (day 0 and day 14) and orotracheal challenge from day 21 (3 days/week for 5 weeks). One hour after the challenge, irradiation with a diode laser (660nm, 100mW) was applied, using different irradiation times (10s, 30s, 50s and 75s), at three different points, one below the trachea and one in each lung lobe. Twenty-four hours after the last treatment, the animals were anesthetized and euthanized for collection of bronchoalveolar lavage (BAL) and lungs. Parameters such as total and differential cell counts, BAL cytokine levels, mucus production, collagen deposition, quantification of macrophages, neutrophils, eosinophils in the lung, as well as analyzing the rate of T lymphocytes (CD4 and CD25) and T controllers (Foxp3) and IL-10 release by cell assays. The data were left to the One-way ANOVA test followed by the Newman-Keuls post-test. Significance levels adjusted to 5% ( $p < 0.05$ ). Therapy with FBM was able to reduce the pulmonary inflammation observed by reducing the total and differential number of cells in the BAL, mainly with regard to the number of eosinophils, in addition we verified the decrease in the levels of the pro-inflammation cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 in BAL in the group treated with FBM, as well as the increase in IL-10 levels. For the values of CD4+IL-10+ lymphocytes we witnessed an increase in all groups treated with FBM. These results revealed that FBM therapy had a beneficial effect on cell migration to the lung, as well as the stimulation of IL-10 production. We also noticed a reduction in the deposition of mucus and collagen in the airways in the groups submitted to FBM therapy with the energies of 3J and 5J. Therefore, we conclude that the use of FBM therapy in chronic airway inflammation attenuated the inflammatory process, as well as related functional and pulmonary parameters, probably due to the increase in regulatory T cells.

Keywords: asthma, cytokines, remodeling, photobiomodulation, dosimetry.

## **Lista de Ilustrações**

<b>Figura 1 – Fisiopatologia da asma brônquica.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 2. Ilustração do esquema de interação do laser com a célula.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3. Fluxograma com os grupos experimentais.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 4. Demonstração de sensibilização e administração orotraqueal (o.t.) de OVA.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5. Laser de diodo utilizado no protocolo experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6. Pontos de aplicação do laser em baixa intensidade. ....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 7. Desenho experimental.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 8. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de macrófagos no LBA(A) e histograma representativo (B).....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de eosinófilos no LBA (A) e histograma representativo (B).....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de linfócitos no LBA (A) e histograma representativo (B).....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 11. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de neutrófilos no LBA (A) e histograma representativo (B).....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 12. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a produção de colágeno nas vias aéreas.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 13. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a produção de colágeno nas vias aéreas.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 14. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre os níveis de IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C) e IL-10 (D) no sobrenadante do lavado broncoalveolar...42</b>	
<b>Figura 15. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no LBA (A) e histograma representativo (B).....</b>	<b>44</b>



Figura 16. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de	
Células Treguladoras CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> no	
LBA.....	45

Figura 17. Efeito da terapia com fotobiomodulação sobre a porcentagem de	
Células T CD4 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> no	
LBA.....	46

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1. Interleucinas e os seus efeitos nas células-alvo.....18**

**Tabela 2. Parâmetros Dosimétricos do Laser em Baixa Intensidade.....28**

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Anti-IgE – Anti-ImunoglobulinaE

APC – Aloficocianina

$\beta 2$  – beta 2

BSA – do inglês, “*Bovine Serum Albumin*”

CD – do inglês, “*Cluster Differentiation*”

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

°C – graus Celsius

cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado

CW – do inglês, “*Continuous Wave*”

DNAse I – desoxirribonuclease

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ECP – Proteína Catiônica eosinofílica

EDTA – do inglês, “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”

EGF – do inglês, “epidermal growth acer”

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

Fc – Fragmento Cristalizável

FBM – Fotobiomodulação

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FGF – do inglês, “*fibroblast growth acer*”

FLBA- Fluido do Lavado Broncoalveolar

GINA – do inglês, “*Global Initiative for Asthma*”

HBSS – solução balanceada de Hank's

ICAM-1 – do inglês, “*Intercellular Adhesion Molecule 1*”

IgE – imunoglobulinas do tipo E

IL – Interleucina

IFN- $\gamma$  - Interferon gamma

J – Joules

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

LTB4 – Leucotrieno B4

LTC4 – Leucotrieno C4

MIP- 1 $\alpha$  – do inglês, “*Macrophage Inflammatory Protein*”

mg/ml – miligrama/mililitros

ml – mililitros

mW – miliwatts

nm – nanômetros

OVA – Ovalbumina

o.t. – orotraqueal

PAF – do inglês, "*Platelet Activating Factor*"

PerCP – do inglês, "*peridinin-chlorophyll-protein*"

PBS – do inglês, "*Phosphate Buferred Saline*"

PSR – do inglês, "Picrosirius red"

PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E2

RANTES – do inglês, "*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*"

rpm – rotações por minuto

s – Segundos

STAT – do acera, "*Signal Transducer and Activator of Transcription*"

TGF-β – do acera, "*transforming growth acer beta*"

Th2 – do inglês, "*Thelper2*"

TNF-α (do inglês, "*Tumor Necrosis Factor – alpha*")

μg – micrograma

μL – microlitros

μm – micrômetros

VCAM -1 – do acera, "*Vascular cell adhesion molecule-1*"

VEGF – do inglês, "*Vascular Endothelial Growth Factor*"

VLA-1 – do inglês, "*Very Late Activation antigen 1*"

## Sumário

1. Introdução.....	14
1.1 Asma - Definição.....	14
1.2 Asma - Dados Epidemiológicos.....	14
1.3 Asma Alérgica - Mecanismos Celulares e Moleculares.....	15
1.4 Asma - Intervenções Terapêuticas.....	19
1.5 Laser de Baixa Intensidade.....	19
1.6 Terapia com Fotobiomodulação em Doenças Pulmonares.....	21
2. Objetivo.....	23
2.1 Objetivos específicos.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1 Animais Experimentais.....	24
3.2 Desenho do Estudo.....	24
3.3 Tamanho da Amostra.....	26
3.4 Randomização.....	26
3.5 Cegamento.....	26
3.6 Procedimentos Experimentais.....	26
3.6.1 Modelo de Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica Usando Ovalbumina (OVA)...	26
3.6.2 Terapia com FBM.....	27
3.6.3 Grupos Experimentais.....	28
3.7 Eutanásia.....	28
3.8 Desfecho.....	28
3.8.1 Avaliação da Inflamação Pulmonar no Lavado Broncoalveolar (LBA).....	28
3.8.2 Identificação de Células Recrutadas para o Pulmão por Citometria de Fluxo.....	30
3.8.3 Fenotipagem.....	30
3.8.4 Avaliação dos Níveis de Citocinas no LBA por ELISA.....	30
3.8.5 Avaliação da Inflamação e Remodelamento das Vias Aéreas Através da Histomorfometria.....	31
3.9 Métodos Estatísticos.....	31
4. Resultados.....	32
4.1 Quantificação das Células Presentes no LBA.....	32
4.2 Quantificação de muco nas vias aéreas.....	37
4.3 Quantificação de Colágeno nas Vias Aéreas.....	39
4.4 Quantificação das citocinas no homogenato de tecido pulmonar.....	41
4.5 Avaliação das células T reguladoras e IL-10 no LBA.....	43

5. Discussão.....	47
6. Conclusão.....	53
7. Referências Bibliográficas.....	54
8. Anexos.....	60
8.1 Aprovação CEUA.....	60
8.2 Checklist.....	63

## **1. Introdução**

### **1.1 Asma – Definição**

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, geralmente associada à hiperresponsividade. É identificada pelos sintomas respiratórios, como sibilos, aperto no peito severo e tosse, que variam com o tempo e intensidade, juntamente com uma limitação variável do fluxo aéreo expiratório, isto é dificuldade de exalar o ar dos pulmões devido a broncoconstrição, espessamento da parede das vias aéreas e aumento na produção de muco, podendo ser reversível espontaneamente ou com tratamento.<sup>1</sup>

### **1.2 Asma – Dados Epidemiológicos**

Nos dias de hoje a asma tem afetado uma parcela significativa da população, sendo considerada um problema de saúde mundial, visto que afeta entre 1 – 18% da população mundial em diferentes países. Aproximadamente 300 milhões de indivíduos são afetados por essa doença em todo mundo. Com um impacto importante na vida dos pacientes, seus familiares e do sistema de saúde <sup>1</sup>.

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, a asma ocupa o quarto lugar em internações no Sistema Único de Saúde, além de ser a terceira principal causa de hospitalizações em crianças e jovens adultos <sup>2</sup>. Os gastos com asma grave, no Brasil, consomem quase 25% da renda familiar dos pacientes de classe menos favorecida e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), esse montante não deve exceder 5% da renda familiar <sup>4</sup>.

A asma possui um alto custo econômico, em termos de custos médicos diretos, seja com uso de medicamentos, com internações hospitalares, ou com o importante agravamento se adicionarmos aos valores despendidos com os

seus efeitos secundários, como o absenteísmo escolar e no trabalho, além da piora na qualidade de vida dos pacientes asmáticos e morte prematura <sup>3</sup>.

### 1.3 Asma Alérgica – Mecanismos Celulares e Moleculares

Existem subtipos de asma, a alérgica e não alérgica, a inflamação é desencadeada por respostas imunes inatas ou adquiridas. Os asmáticos têm linfócitos T ativados, com perfil T helper 2 (Th2) de liberação de citocinas <sup>6</sup>. A ligação de citocinas com perfil Th2 na fisiopatologia da inflamação das vias aéreas, eosinofilia e produção excessiva de muco é bastante conhecida <sup>5-7</sup>. O alérgeno interage com células dendríticas e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, levando ao desenvolvimento de linfócitos Th naive, que dão origem a clones de linfócitos Th2. Estes secretam grandes quantidades de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-9 (IL-9) e interleucina-13 (IL-13) <sup>8-9</sup>. A IL-4 e IL-13 estimulam a maturação dos linfócitos B e a síntese de IgE, além de ajudar no desenvolvimento de mastócitos junto com a IL-9 <sup>6</sup>.

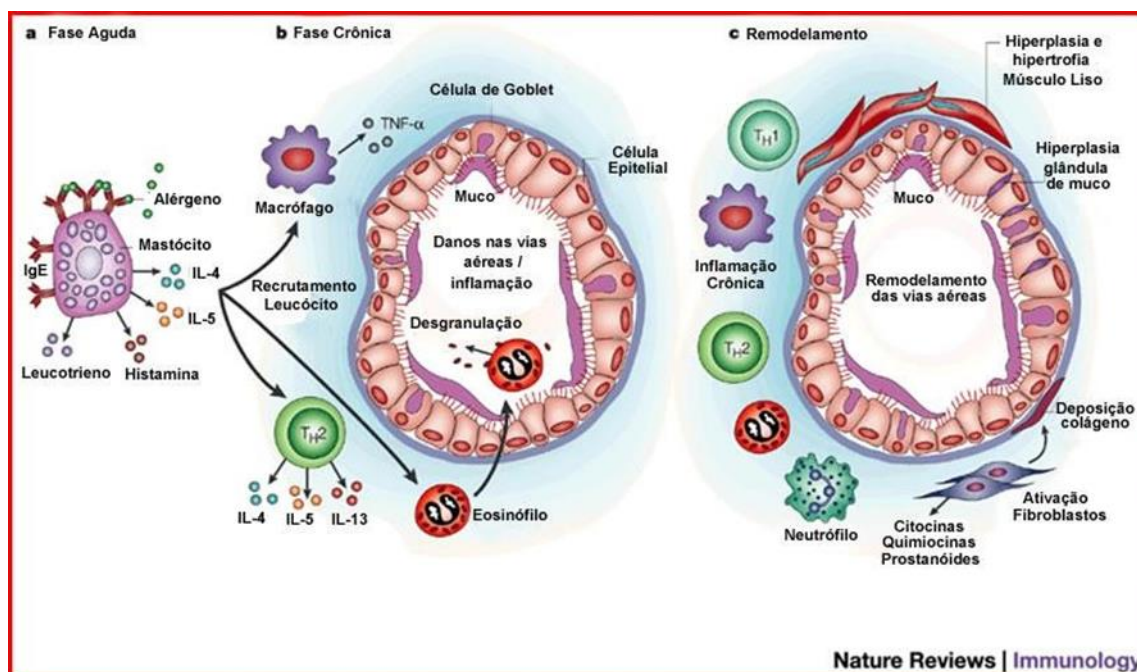
A IL-5 leva ao crescimento e diferenciação dos eosinófilos. Durante a reexposição antigênica, a IgE liga-se aos receptores Fc nos mastócitos e eosinófilos. Quando a IgE ligada aos receptores, faz ligação cruzada com o antígeno, as células são ativadas e liberam mediadores como histamina, leucotrienos, citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, “Tumor Necrosis Factor-alpha” TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas, proteases, que causam broncoconstrição, obstrução do fluxo aéreo, aumento na produção de muco, aumento da permeabilidade e edema, esta fase é caracterizada como fase aguda da asma <sup>6-9</sup>.

Após esses efeitos rápidos segue-se a fase crônica, sendo uma reação inflamatória progressiva caracterizada por infiltrado de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, onde esses últimos têm particular importância. Com o início da fase crônica, o ambiente inflamatório é caracterizado pela presença de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13) (Tabela 1), quimiocinas (eotaxina, RANTES e MIP- 1 $\alpha$ ), moléculas de adesão e seus receptores (VLA-1, VLA-4, ICAM-1, VCAM-1), mediadores lipídicos (PAF, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub>) e diversas substâncias secretadas por eosinófilos como a proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica



eosinofílica (ECP). Através de seus mediadores as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico (substância P, neurocinina A) e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea <sup>11</sup>.

Em alguns indivíduos, há uma maior progressão da inflamação levando ao remodelamento das vias aéreas. O remodelamento leva a alterações na arquitetura das vias aéreas de tal forma que a obstrução do fluxo de ar pode ser irreversível (Figura 1). O que acontece é que a lesão epitelial encontrada na asma deve ser reparada. Ocorre então a liberação de várias citocinas e fatores de crescimento como EGF (epidermal), TGF- $\beta$ , o FGF (fibroblastos), o VEGF (endotelial vascular). O dano epitelial também ativa as próprias células epiteliais, além dos leucócitos em geral e de outras células estruturais, como os fibroblastos e miofibroblastos, resultando em proliferação e estímulo do depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal, o que explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes com asma <sup>13</sup>.



**Figura 1 – Fisiopatologia da asma brônquica.** Adaptado segundo *Nature Reviews Immunology*, 2002.

É importante destacar que na asma, o resultado final dos eventos moleculares e celulares envolvidos desde a sensibilização, na ativação de células Th2 até a ativação dos mecanismos efetores dessas citocinas, formam todas as características de uma inflamação pulmonar.

**Tabela 1 – Interleucinas e os seus efeitos nas células-alvo.**

<b>NOME</b>	<b>FONTE</b>	<b>CÉLULAS-ALVO</b>	<b>EFEITOS NAS CÉLULAS ALVO</b>
<b>IL-4</b>	Células Th2 Mastócitos	Células T Células B Macrófagos	Diferenciação de células T em células Th2  Fator de crescimento de células B Produção de IgG1 e IgE
<b>IL-5</b>	Células Th2	Células B Eosinófilos	Crescimento e diferenciação das células B  Produção de IgA Crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos
<b>IL-9</b>	Células T Mastócitos Células NK	Células T Mastócitos	Sobrevivência das células T e secreção de citocinas Crescimento e ativação de mastócitos
<b>IL-13</b>	Células Th2 Mastócitos Células NK	Células B Monócitos Fibroblastos Células epiteliais	Crescimento e diferenciação das células B  Produção de IgE Aumento da produção de muco Síntese de colagénio Inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias
<b>IL-10</b>	Células Th2 Mastócitos Macrófagos Células B	Macrófagos Células B Células Th1 Células dendríticas	Inibe a produção de citocinas de Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2) Inibe a produção de IL-12 de macrófagos Diminui a expressão de MHC classe II em células dendríticas

## 1.4 Asma – Intervenções Terapêuticas

Os tratamentos atuais para asma são focados em controlar os sintomas e prevenir exacerbações. Podendo ser controlados na maioria dos casos, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do asmático. Esse controle é frequentemente utilizado para manter a doença controlada por períodos prolongados. Os medicamentos são divididos em duas categorias: os para controle e os para alívio dos sintomas momentâneos, sendo que os utilizados para controle devem ser administrados diariamente por longos períodos <sup>1</sup>.

Entre os medicamentos incluem-se agentes broncodilatadores, anti-inflamatórios e antialérgicos. Em tratamentos de manutenção são utilizados, Corticosteróide inalatório, Beta-agonistas de ação prolongada (LABA), Antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos (antileucotrienos), Teofilina, Omalizumabe, Bambuterol (beta-agonista de ação prolongada por via oral), Cromonas, e Imunoterapia específica com alérgenos. No caso de resgate de sintomas agudos são utilizados, Beta-2 agonistas inalatórios de curta duração, aceradossides orais, e anticolinérgicos inalatórios <sup>1</sup>. Embora a terapia medicamentosa seja classicamente a primeira opção para o tratamento das doenças pulmonares crônicas, essa opção ainda desencadeia alguns efeitos colaterais indesejados.

Em busca de terapias alternativas que beneficiem o paciente asmático, está a que não apresente efeito colateral, seja de fácil acesso e baixo custo. Têm-se investigado a utilização da fotobiomodulação como alternativa no tratamento de doenças pulmonares, podendo ser uma opção eficaz, segura, de baixo custo e sem efeitos adversos, auxiliando o tratamento de doenças inflamatórias e fibróticas, em geral <sup>14</sup>.

## 1.5 Laser de Baixa Intensidade

A utilização do laser operando em baixa intensidade é estudada desde os anos sessenta e ganhou seu espaço na medicina por demonstrar eficiência em várias enfermidades, entre estas as feridas e úlceras indolentes, úlceras de estômago, tratamento pós-cirúrgicos, contusões, dor crônica entre outras.<sup>25</sup> Em vários trabalhos vêm sendo realizados para se avaliar os efeitos dessa radiação sobre os tecidos. Onde o alvo da fotobiomodulação é um tecido alterado, na qual a energia absorvida é utilizada para produzir efeitos, fotofísicos, fotoquímicos e/ou fotobiológicos nas células do tecido, que ocorre devido a presença de moléculas sensíveis, onde a radiação restabelece a homeostase energética fazendo com que as células voltem a proliferar, diferenciar e secretar citocinas<sup>15,16,18,19</sup>.

Apesar da terapia com fotobiomodulação ser amplamente utilizada na redução da dor, inflamação, edema e cicatrização, ainda não há um entendimento e concordância quanto a melhor dose a ser utilizada. A teoria estabelecida pela Lei de Arnold Shultz, sugere que estímulos fracos são capazes de acelerar ligeiramente a atividade vital, enquanto estímulos mais fortes irão atingir um pico máximo e suprimir a resposta celular. Propõe que se houver aplicação suficiente de energia, não haverá resposta, porque o limite mínimo não foi atingido. Em segundo momento, se mais energia for aplicada, então um limiar é cruzado e ocorre a bioestimulação. Por último, quando muita energia é aplicada, a estimulação por sua vez desaparece e então será substituída pela bioinibição<sup>22</sup>.

O laser atua através do efeito fotobioquímico que ocorre devido à presença de moléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por moléculas intracelulares específicas, podem alterar suas atividades e assim, produzir estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Existe no organismo uma fotorregulação, com alterações nos fotorreceptores provocando assim, mudanças na atividade funcional e metabólica da célula. Estas mudanças bioquímicas podem alterar processos fisiológicos com conotações terapêuticas. Karu et al. (1999, 2004).

Demonstrou alguns desses efeitos associados à terapia com laser de baixa intensidade tais como: estimulação de crescimento celular, reparação celular, efeito anti-inflamatório, redução de edema/revascularização, redução da formação de tecido fibroso, maior atividade tissular e estimulação nervosa (Figura 2) <sup>20, 21</sup>.

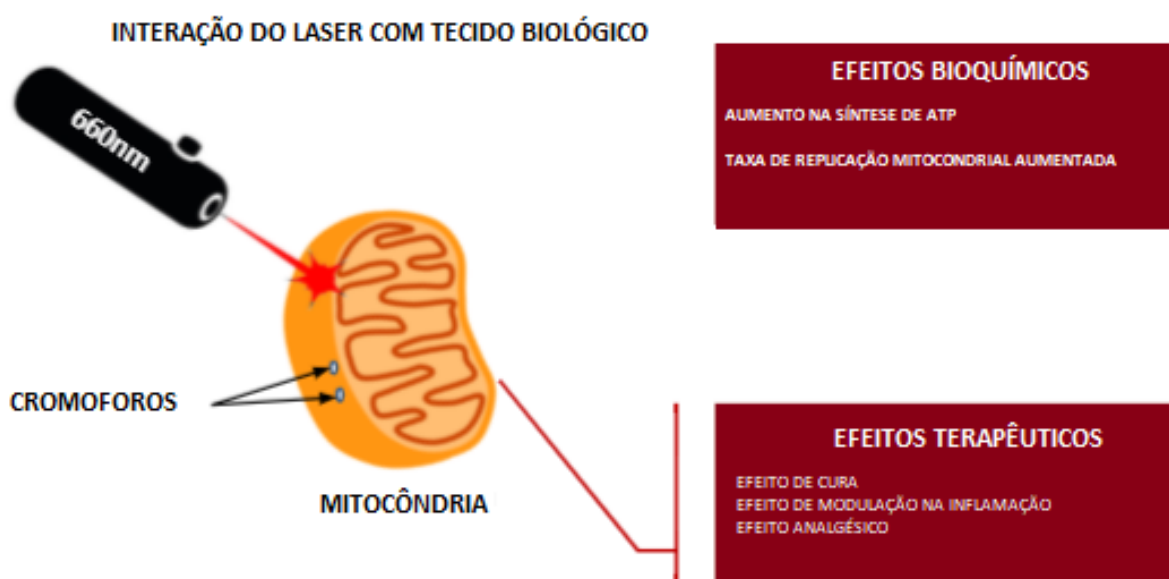


Figura 2. Ilustração do esquema de interação do laser com a célula. Fonte: própria

## 1.6 Terapia com Fotobiomodulação em Doenças Pulmonares

Apesar de a terapia medicamentosa apresentar uma maior eficácia, pois possui em sua composição agentes broncodilatadores, antibióticos, a fotobiomodulação demonstrou efeitos sobre a estimulação de crescimento e reparação celular, efeito anti-inflamatório, redução de edema/revascularização, redução da formação de tecido fibroso e estimulação nervosa. Alguns autores demonstraram o efeito da FBM em doenças que acometem as vias aéreas <sup>23</sup>. Assim, parece-nos razoável que o sucesso dessa terapia com FBM depende de um maior entendimento de processos biológicos associados a seus efeitos anti-inflamatórios no tratamento de doenças pulmonares.

A fotobiomodulação em indivíduos acometidos por inflamação pulmonar

crônica, foi capaz de reduzir a migração celular para o pulmão após irradiação sobre a pele na região acima do brônquio <sup>23</sup>. Porém, vale ressaltar que a FBM representa uma “ferramenta” não farmacológica no tratamento de afecções pulmonares. Assim, parece-nos razoável que o sucesso dessa terapia depende de um maior entendimento de processos biológicos associados a seus efeitos anti-inflamatórios no tratamento de doenças pulmonares.

Evidências recentes sugerem que a terapia com a FBM melhora a inflamação alérgica das vias aéreas <sup>25</sup>. Têm demonstrado que os efeitos da FBM na inflamação pulmonar podem ser mediados pelos aumentos na síntese/produção de IL-10 induzida pela laser terapia. Corroborando com esses achados, dados publicados do nosso grupo de pesquisa apontam aumento nos níveis de IL-10, bem como de sua expressão no pulmão após a terapia com a FBM em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) <sup>24</sup>.

Outros estudos do nosso grupo demonstraram redução na inflamação alérgica pulmonar após a fotobiomodulação. Diminuindo o número de eosinófilos, eotaxina, citocinas de perfil Th2 e molécula de adesão ICAM-1, bem como, do fator de transcrição STAT-6 <sup>25</sup>.

Todos esses dados em conjunto, sugerem papel supressor da terapia com FBM sobre a inflamação pulmonar em diferentes modelos experimentais. Sendo assim, esse trabalho ajudará a esclarecer os efeitos anti-inflamatórios dessa terapia em modelo experimental de asma induzido com ovoalbumina (OVA).

## 5. Objetivo

Avaliar o efeito da terapia com FBM sobre mecanismos celulares da inflamação pulmonar em modelo experimental de asma induzida por OVA.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a inflamação pulmonar através da contagem de células totais e diferenciais no LBA após a terapia com FBM;
- Verificar qual a melhor energia total do laser para promover o melhor efeito anti-inflamatório no pulmão;
- Analisar a fenotipagem das células pulmonares (macrófagos, neutrófilos, células T CD4<sup>+</sup> e eosinófilos);
- Quantificar a liberação de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) pelas essas células após a terapia com FBM;
- Analisar morfometricamente o remodelamento pulmonar (muco e colágeno) após a fotobiomodulação;
- Avaliar a população de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, bem como a produção de IL-10 por essas células.



## **5. Materiais e Métodos**

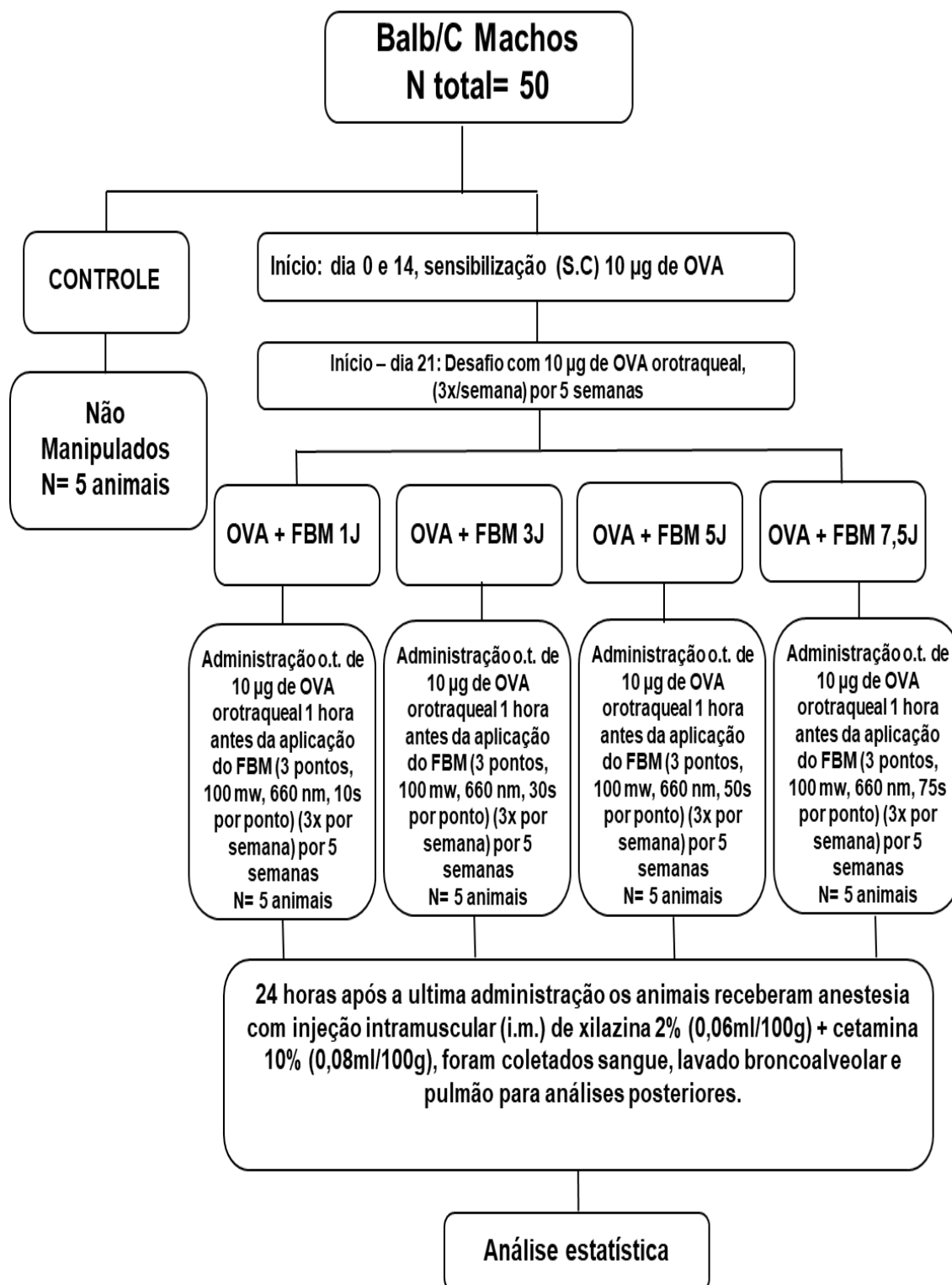
### **3.1 Animais experimentais**

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

Foi utilizado camundongos Balb/C, machos, pesando aproximadamente 20-25 gramas, com idade de 6 semanas, os animais foram obtidos do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12 h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C – 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho.

### **3.2 Desenho do estudo**

O protocolo foi dividido em duas etapas, utilizando 50 camundongos. Ambas as etapas com o mesmo protocolo experimental, os grupos foram divididos como o Controle, OVA, OVA+1J, OVA+3J, OVA+5J, OVA+7,5J, totalizando em 5 grupos experimentais, utilizando 5 animais em cada grupo, escolhido de forma aleatória, (Figura 3).



**Figura 3. Fluxograma com os grupos experimentais.**

### **3.3 Tamanho da amostra**

Foram utilizados aproximadamente para o projeto 50 Camundongos (Balb/C), (realizamos a divisão desse total de animais, de modo que a realização do protocolo experimental seja feita em dois sets diferentes). Para a primeira parte do trabalho, os animais foram separados em 5 grupos experimentais, contendo 05 animais em cada grupo (Figura 6). Os animais foram escolhidos de forma aleatória, o tamanho da amostra foi baseado no estudo de RIGONATO-OLIVEIRA et al 2019.

### **3.4 Randomização**

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

### **3.5 Cegamento**

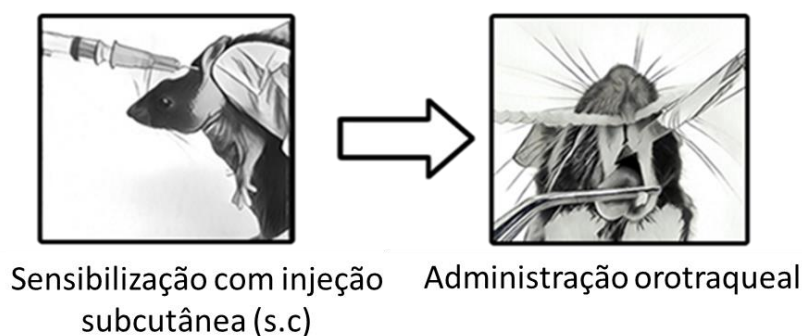
O pesquisador do presente estudo conduziu todo experimento como também a realização da avaliação de todas as análises.

### **3.6 Procedimentos Experimentais**

#### **3.6.1 Modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica usando Ovalbumina (OVA)**

O procedimento para indução de inflamação alérgica pulmonar crônica usando Ovalbumina (OVA), foi baseado estudo de RIGONATO-OLIVEIRA et al 2019, e constituiu das seguintes etapas primeiro 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 (Figura 3) e 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 (Figura 4).



**Figura 4. Demonstração de sensibilização e administração orotraqueal (o.t.) de OVA.**

### 3.6.2 Terapia com FBM

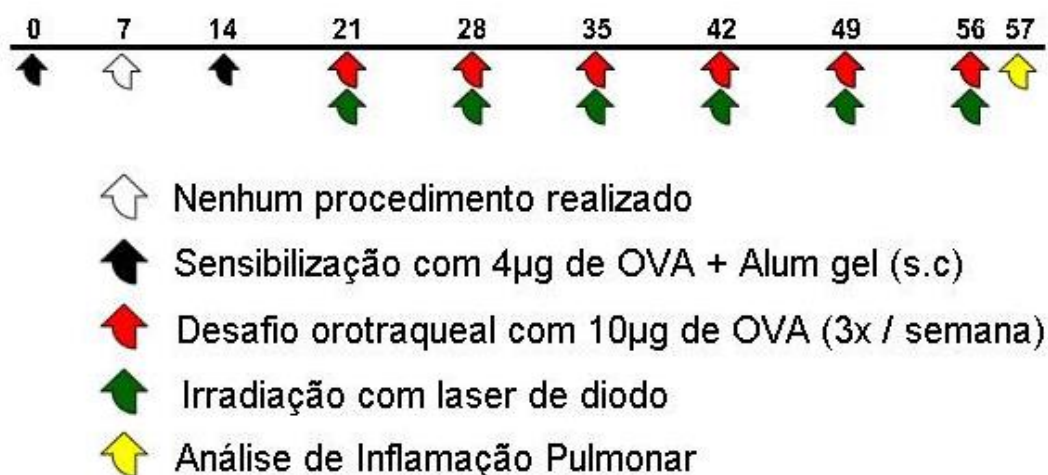
A terapia com FBM foi baseado no estudo de RIGONATO-OLIVEIRA et al 2019, então os animais foram irradiados com um laser de diodo CW *Continuous Wave* (Onda Continua) (Figura 5), com potência de 100 mW e comprimento de onda de 660nm irradiando uma área de 0,045 J/cm<sup>2</sup> com diferentes energias (1, 3, 5, 7,5 J). Uma hora após cada desafio (Grupo Asma+FBM), os animais receberam aplicação pontual em três regiões: uma abaixo da traquéia, e as outras duas em cada lobo pulmonar (direito e esquerdo – Figura 6). Cada grupo terá um tempo de irradiação diferente de acordo com a energia estabelecida previamente, sendo eles respectivamente 10s, 30s, 50s e 75s, conforme a tabela 2.

**Tabela 2. Parâmetros dosimétricos do laser em baixa intensidade.**

Energia Radiante (J)	1J	3J	5J	7,5J
Comprimento de onda (nm)	660	660	660	660
Largura espectral	±20	±20	±20	±20
Modo de operação	Contínuo	Contínuo	Contínuo	Contínuo
Potência radiante média (mW)	100 mW	100 mW	100 mW	100 mW
Exposição radiante (J/cm <sup>2</sup> )	22	66	111	166
Área do feixe no alvo (cm <sup>2</sup> )	0,045	0,045	0,045	0,045
Tempo de exposição (s)	10 s	30 s	50 s	75 s
Frequência	Única	Única	Única	Única
Pontos de aplicação	3 pontos	3 pontos	3 pontos	3 pontos
Técnica de Aplicação	1 cm distância	1 cm distância	1 cm distância	1 cm distância

**Figura 5. Laser de diodo utilizado no protocolo experimental. Marca: MMO Optics/ Modelo: TF Premier PLUS.****Figura 6. Pontos de aplicação do laser em baixa intensidade.**

### 3.6.3 Grupos Experimentais



**Figura 7. Desenho experimental.**

### 3.7 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).

### 3.8 Desfecho

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

Após anestesia os animais foram traqueostomizados e canulados e pulmões lavados com 3x0,5ml de tampão fosfato salino (PBS).

O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1600 rpm a 4°C Por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C Para análise das citocinas por meio de ELISA. O bote Celular foi ressuspendido em 1ml de tampão fosfato salino (PBS) e utilizado para a determinação das células no LBA realizado por citometria de fluxo.

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

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

### **3.8.3 Fenotipagem**

As células do pulmão foram incubadas com 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-CD3 Fitc, anti-CD4 APC e anti-CD8 Percp) (Becton Dickinson – BD®, East Rutherford, NJ, EUA). As células foram incubadas por 20 minutos a 4° C. Também foi feita a análise de fenotipagem para as células T reguladoras com (anti-CD4 FITC e anti-CD25 PE) e com o fator de transcrição (anti-Foxp3 Percp, bem como caracterização de IL-10 (anti-IL-10 APC).

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 Csample (Becton Dickinson – BD®, East Rutherford, NJ, EUA).

### **3.8.4 Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA.**

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, no LBA foram avaliados através do kit Biolegends e R&D Systems. O ELISA é abreviatura para *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*(ensaio do imunoadsorvente ligado à enzima).

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

Como intuito de avaliar os efeitos da terapia com FBM sobre a proporção de volume de fibras colágenas e elásticas na parede das vias aéreas, além da espessura do músculo liso brônquico e da expressão de muco ácido e muco neutro pelas células epiteliais brônquicas, os pulmões esquerdos foram coletados, fixados em formalina 10% e embebidos em parafina, cortes de 4um de espessura foram realizados e as lâminas coradas com Picrossírius para detecção das fibras de colágeno e com ácido periódico de schiff e azul alciano para detecção de muco ácido e neutro.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica morfométrica.<sup>28</sup> Os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software Image Pró Plus (versão 4.5, NIH, Maryland, EUA). Foram analisadas 05 vias aéreas de cada animal.

## **3.9 Métodos Estatísticos**

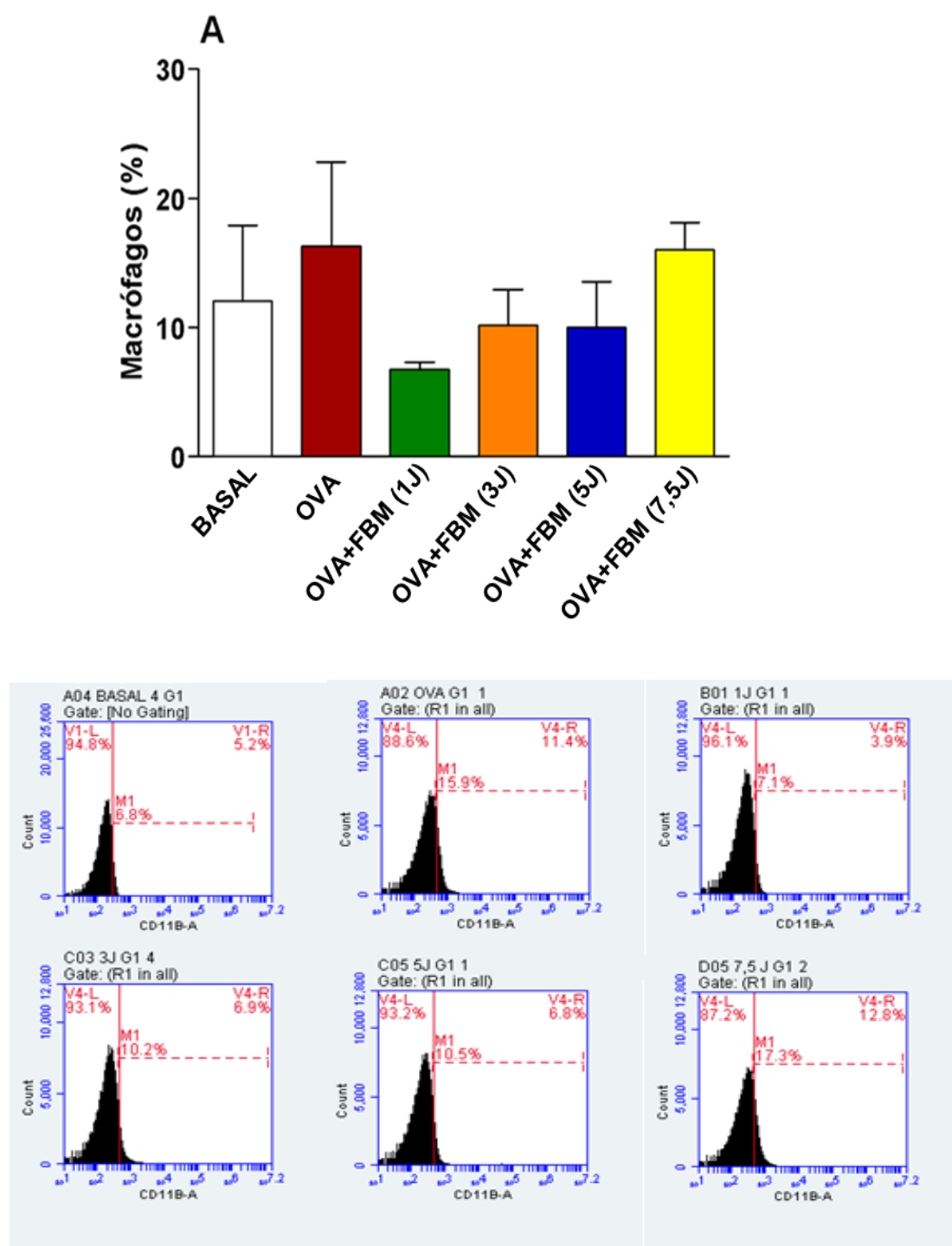
Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism 5.0 (EUA) com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ( $p < 0.05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (EUA). Os níveis de significância foram ajustados para 5% ( $p < 0.05$ ). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (Califórnia, EUA).



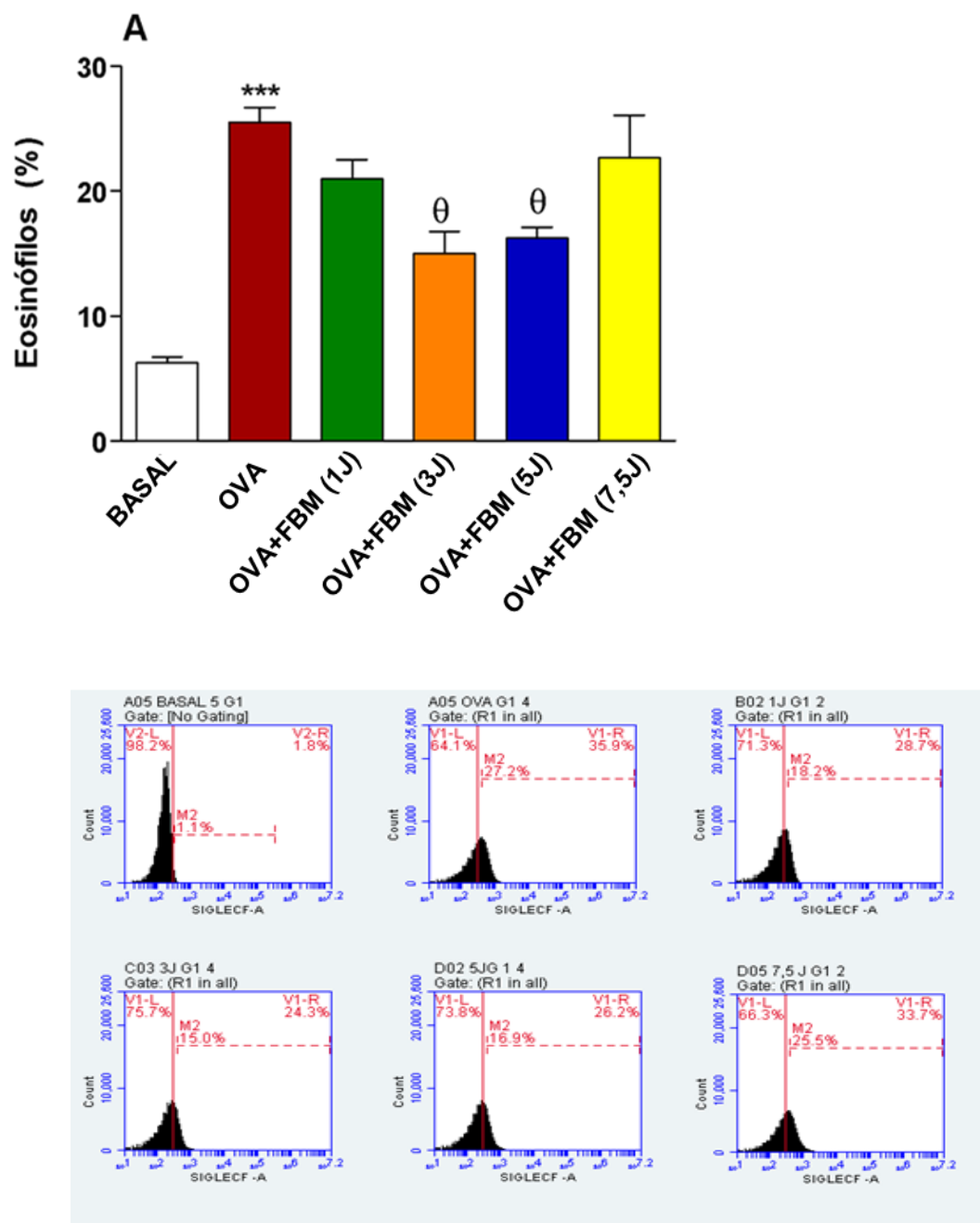
## **4. Resultados**

### **4.1 Quantificação das células presentes no LBA**

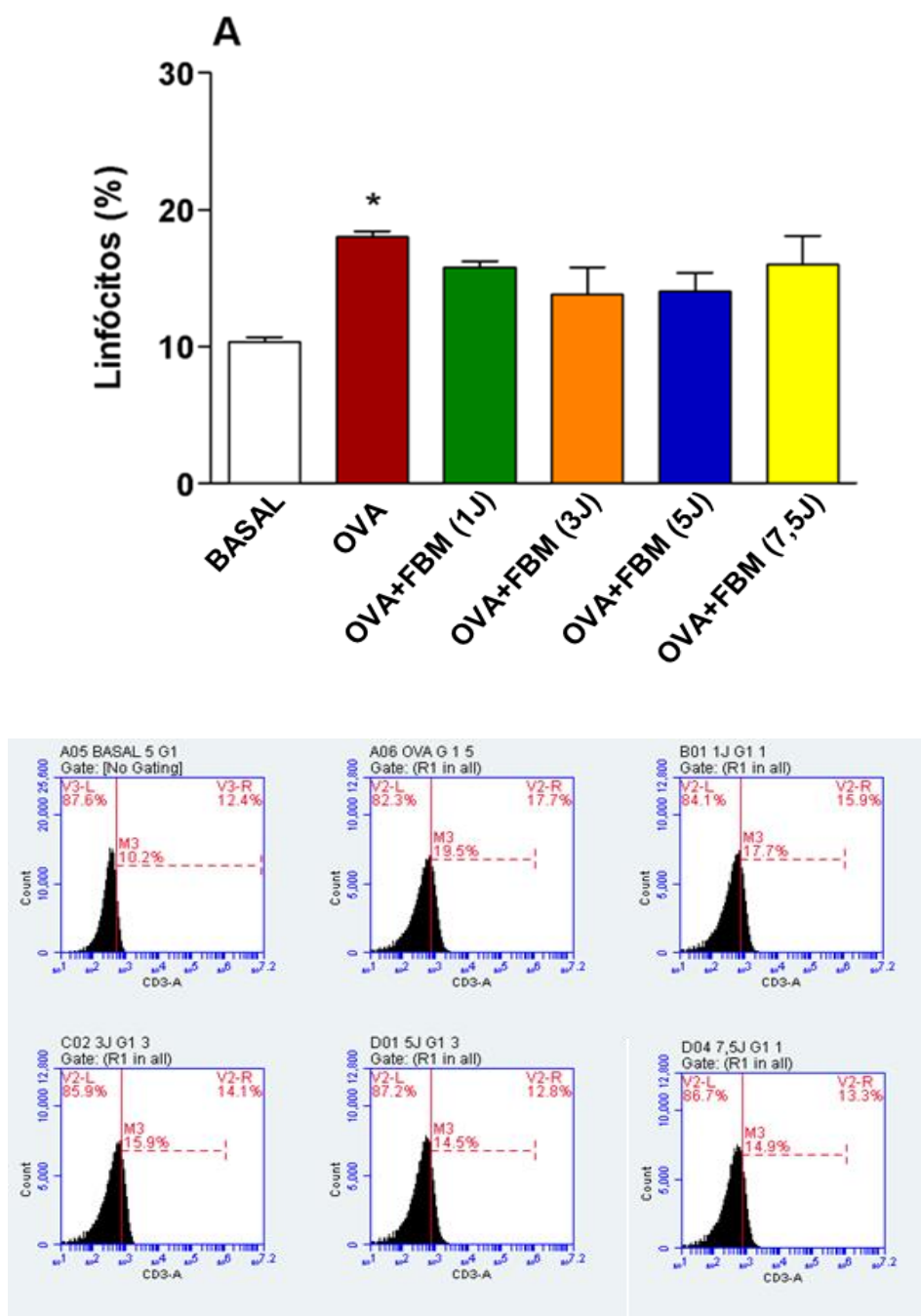
Os resultados estão relacionados à porcentagem de células no lavado broncoalveolar (LBA) determinada por citometria de fluxo. Verificamos aumento significativo no número de eosinófilos (Figura 9), linfócitos (Figura 10) e neutrófilos (Figura 11) no grupo asmático (OVA) quando comparado ao grupo Basal. Quando analisamos o grupo asmático submetido ao tratamento com fotobiomodulação (OVA+FBM 3J e 5J), observamos diminuição significativa do número de eosinófilos e neutrófilos (Figura 9 e 11) em relação ao grupo OVA. Por outro lado, com relação à porcentagem de macrófagos (Figura 8) no LBA não observamos diferenças significativas em nenhum dos grupos avaliados.



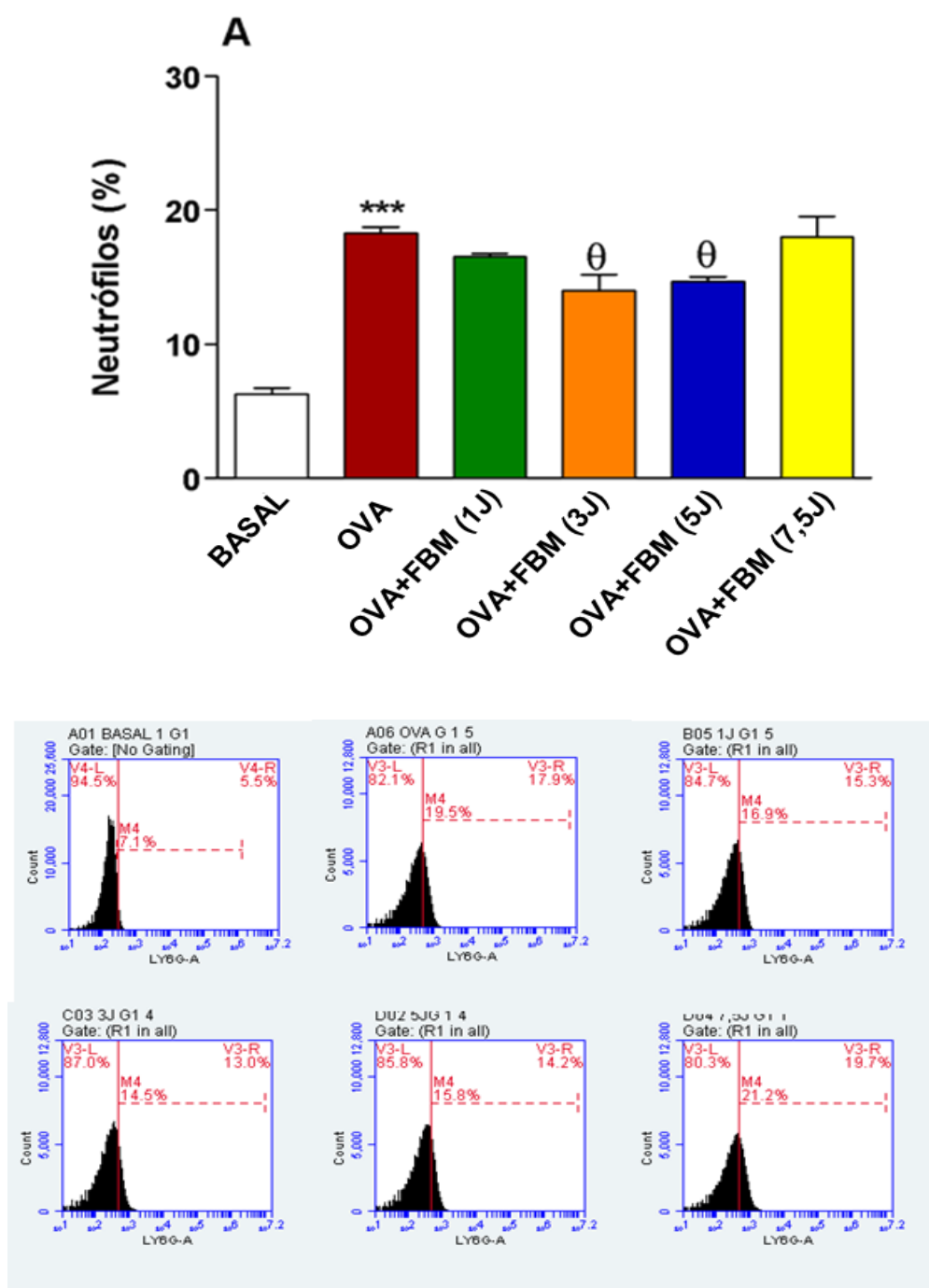
**Figura 8. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de macrófagos no LBA (A) e histograma representativo (B).** Os grupos utilizados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), asmático (OVA) (animais imunizados e desafiados com OVA) e OVA+FBM (animais sensibilizados e desafiados com OVA e posteriormente tratados com laser). Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi$   $p < 0,01$  quando comparados ao grupo asmático (OVA).



**Figura 9. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de eosinófilos no LBA (A) e histograma representativo (B).** Os grupos utilizados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), asmático (OVA) (animais imunizados e desafiados com OVA) e OVA+FBM (animais sensibilizados e desafiados com OVA e posteriormente tratados com laser). Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi$   $p < 0,01$  quando comparados ao grupo asmático (OVA).



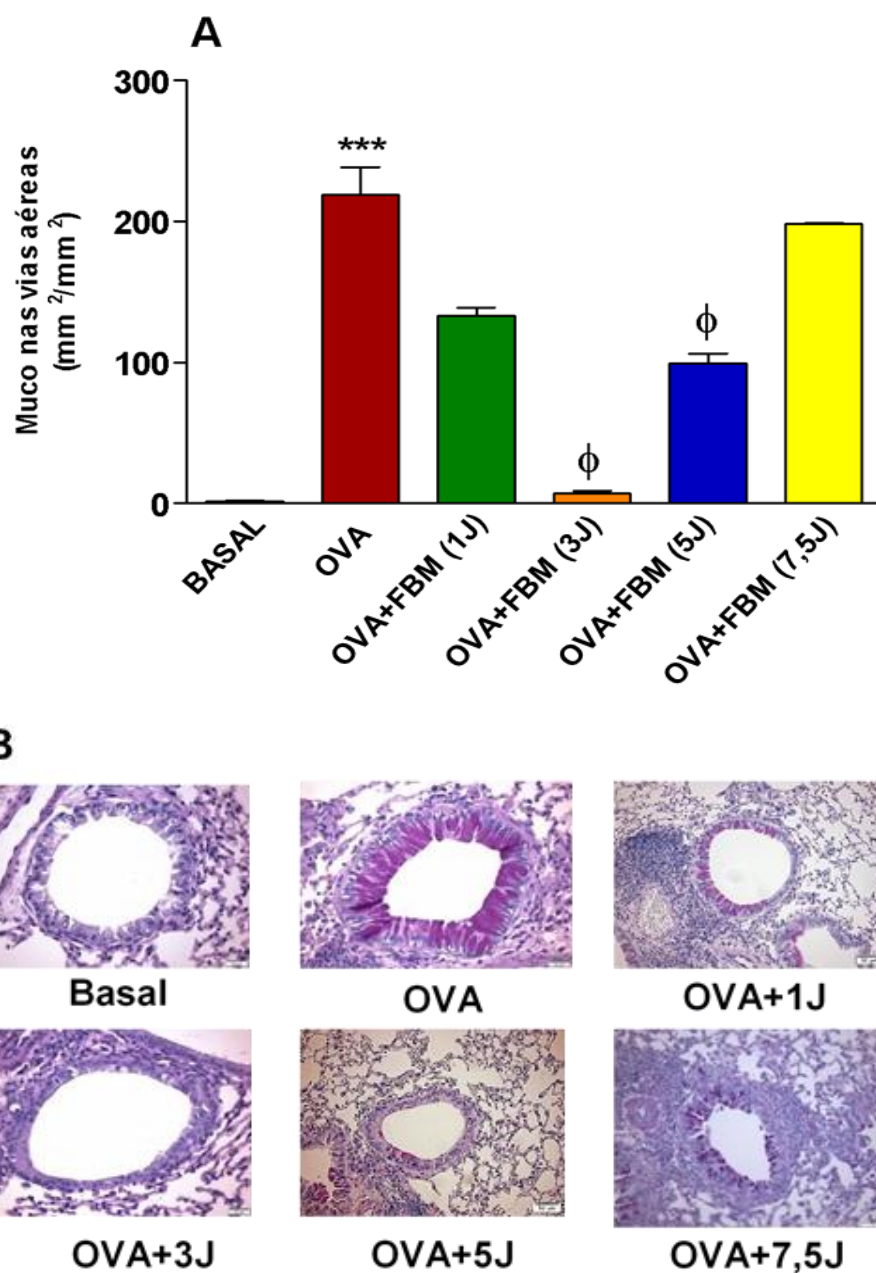
**Figura 10. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de linfócitos no LBA (A) e histograma representativo (B).** Os grupos utilizados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), asmático (OVA) (animais imunizados e desafiados com OVA) e OVA+FBM (animais sensibilizados e desafiados com OVA e posteriormente tratados com laser). Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\varphi$   $p < 0,01$  quando comparados ao grupo asmático (OVA).



**Figura 11. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de neutrófilos no LBA (A) e histograma representativo (B).** Os grupos utilizados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), asmático (OVA) (animais imunizados e desafiados com OVA) e OVA+FBM (animais sensibilizados e desafiados com OVA e posteriormente tratados com laser). Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\theta$   $p < 0,01$  quando comparados ao grupo asmático (OVA).

## **4.2 Quantificação de muco nas vias aéreas**

Os resultados relacionados à quantificação de muco nas vias aéreas estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo na deposição de muco no grupo asmático (OVA) quando comparado ao grupo Basal. Quando comparamos os grupos asmáticos, com os que foram submetidos ao tratamento com o laser 3J e 5J, observamos um efeito significativo na redução de muco nas vias aéreas desses animais (Figura 12).

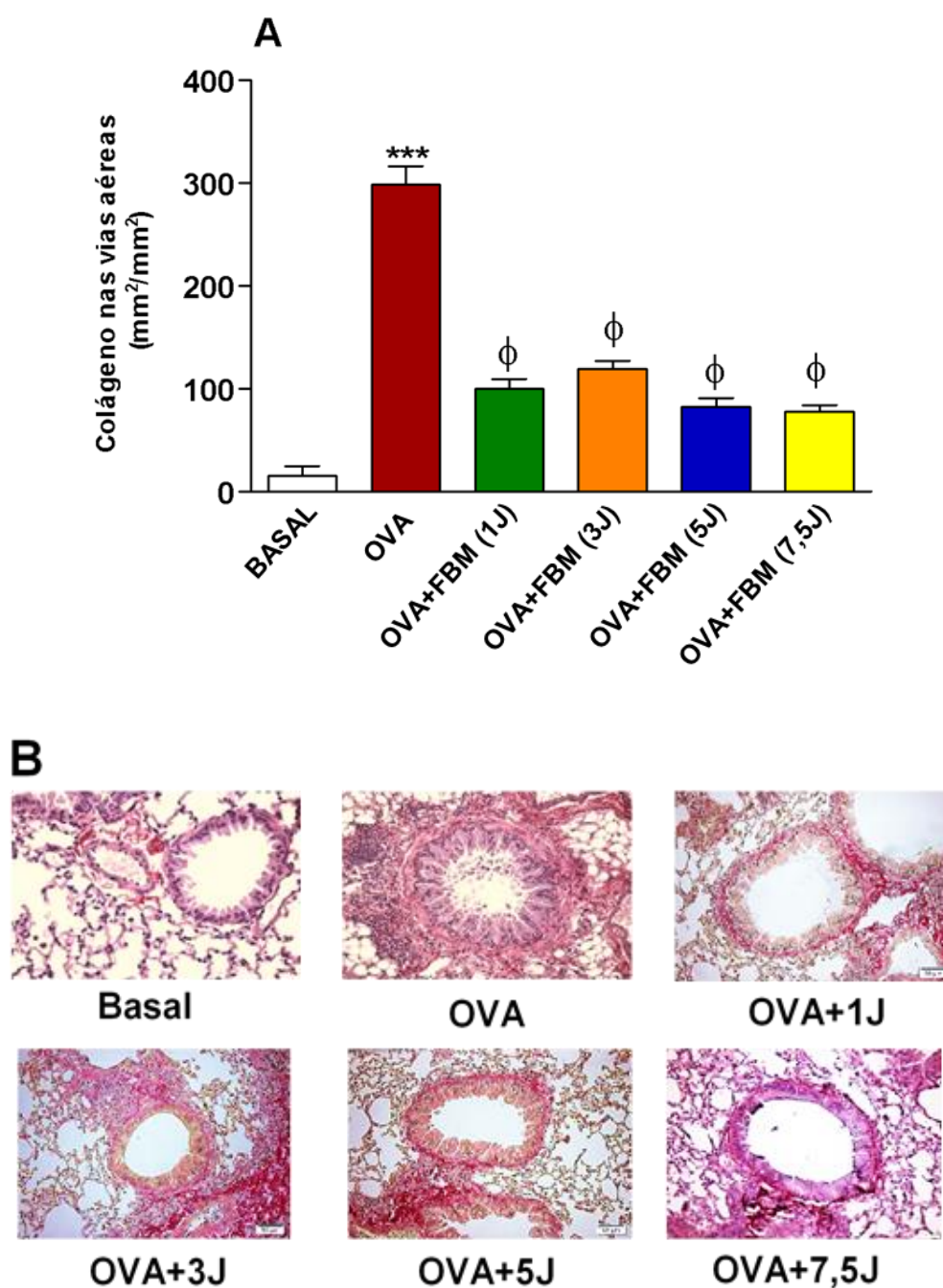


**Figura 12. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a produção de muco nas vias aéreas.** Os pulmões foram fixados, preparados e corados com PSR para a análise do colágeno nas vias aéreas. Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com OVA. Aumento de  $\times 200$ . Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal e  $\phi$   $p < 0,01$  quando comparado ao grupo asmático (OVA).

### **4.3 Quantificação de colágeno nas vias aéreas**

Os resultados relacionados à quantificação de colágeno nas vias aéreas estão apresentados a seguir. Verificamos aumento significativo na deposição de colágeno no grupo OVA quando comparado ao grupo Basal. Quando avaliamos todos os grupos asmáticos que foram submetidos ao tratamento com o laser 1J, 3J, 5J e 7,5J, observamos um efeito significativo na redução da deposição de fibras de colágeno nas vias aéreas (Figura 13).

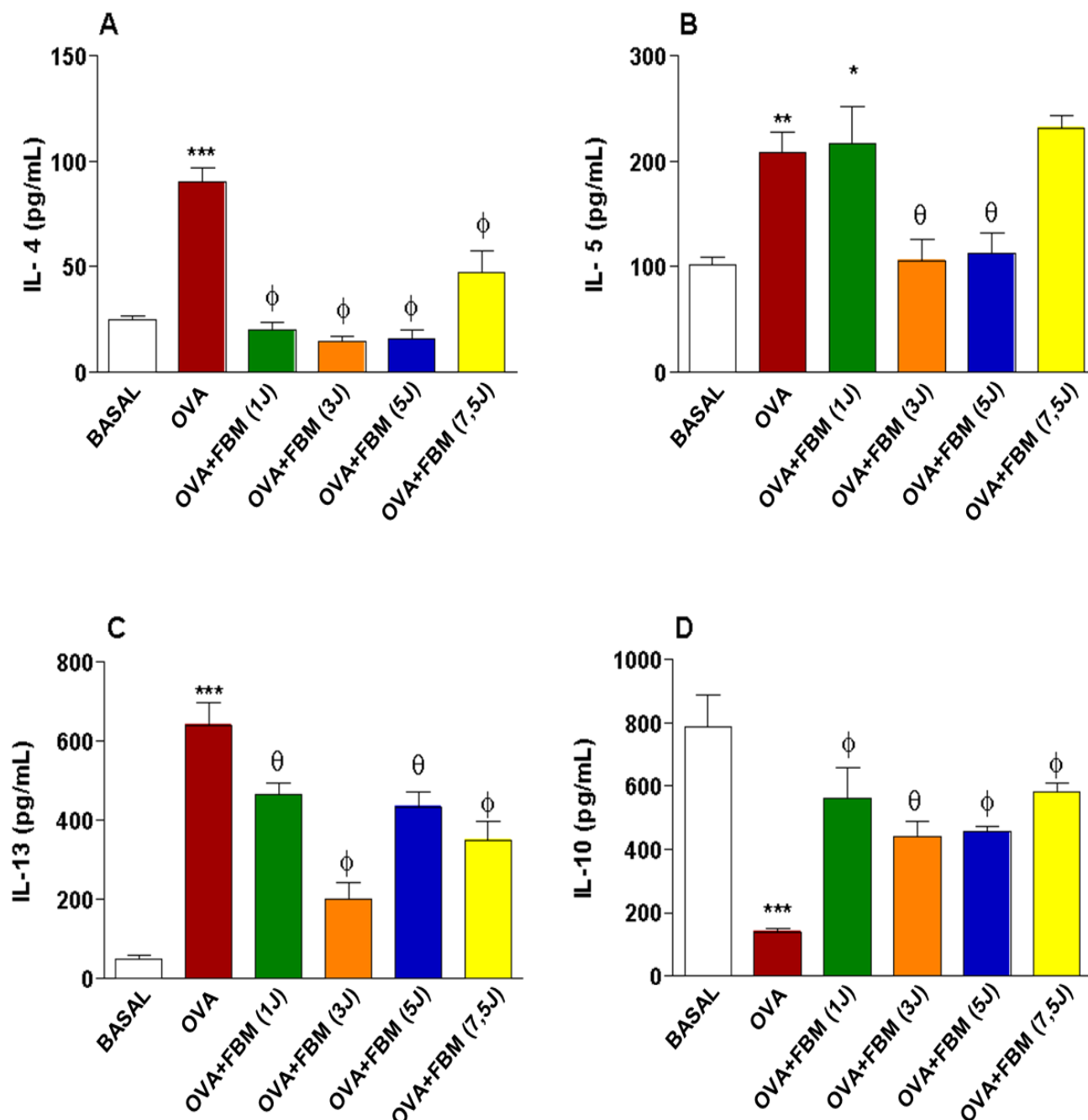




**Figura 13. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a produção de colágeno nas vias aéreas.** Os pulmões foram fixados, preparados e corados com PSR para a análise do colágeno nas vias aéreas. Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com OVA. Aumento de  $\times 200$ . Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal e  $\phi$   $p < 0,01$  quando comparado ao grupo asmático (OVA).

#### **4.4 Quantificação das citocinas no homogenato de tecido pulmonar**

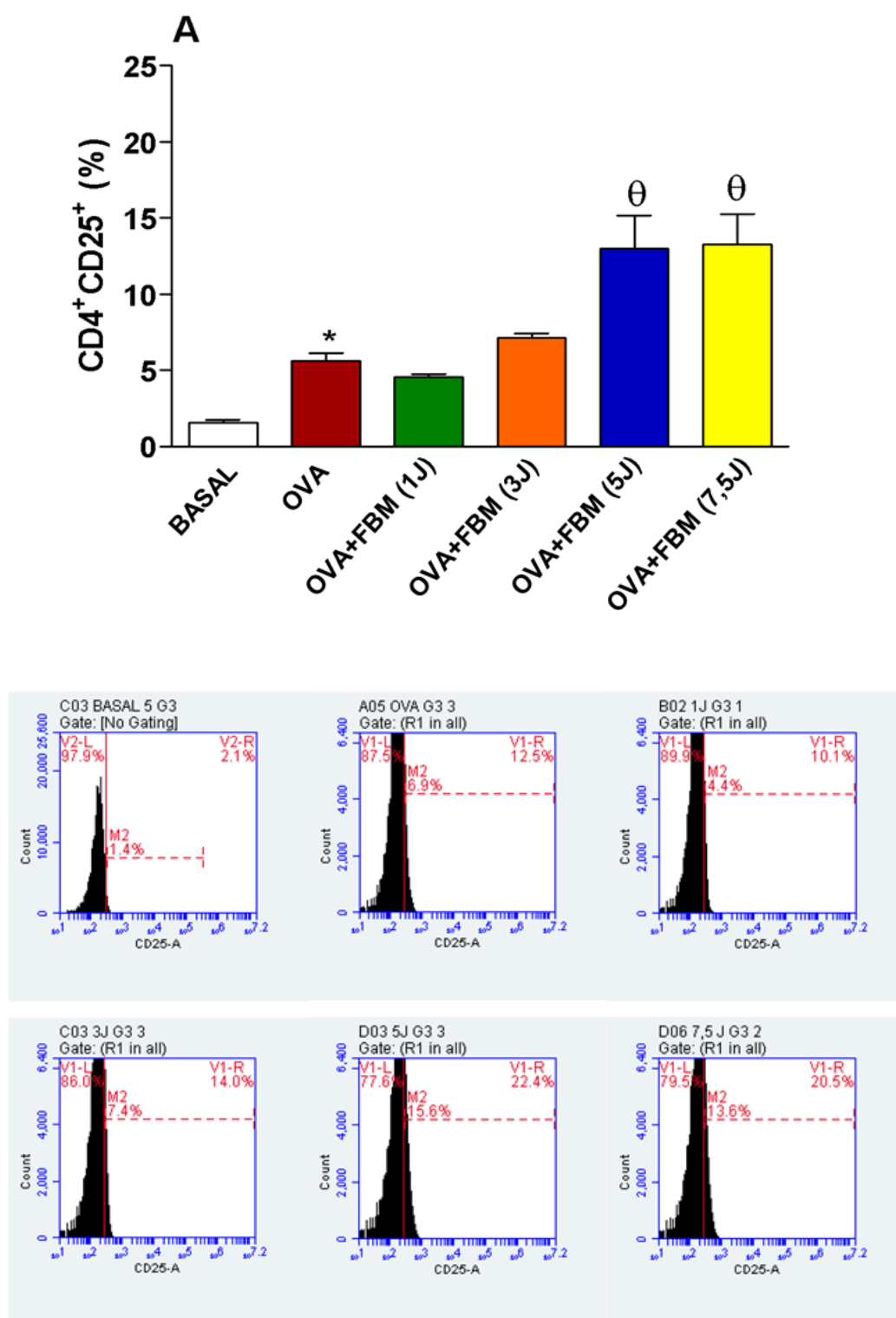
Os resultados referentes à quantificação dos níveis das citocinas no LBA: IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) estão apresentados na Figura 14 a seguir. Observamos o acréscimo significativo dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C) no grupo asmático (OVA) quando comparado ao grupo Basal. Observamos também significativa redução dos níveis das citocinas IL-4 (A) e IL-13 (C) em todos os grupos asmáticos submetidos ao tratamento com FBM, quando comparado ao grupo somente asmático. Para os níveis de IL-5 (B), observamos significativa redução somente no grupo submetido ao tratamento com fotobiomodulação de 3J e 5J. Por outro lado, houve um acréscimo de citocina anti-inflamatória IL-10 em todos os grupos submetidos ao tratamento com FBM, quando comparado ao grupo somente com OVA.



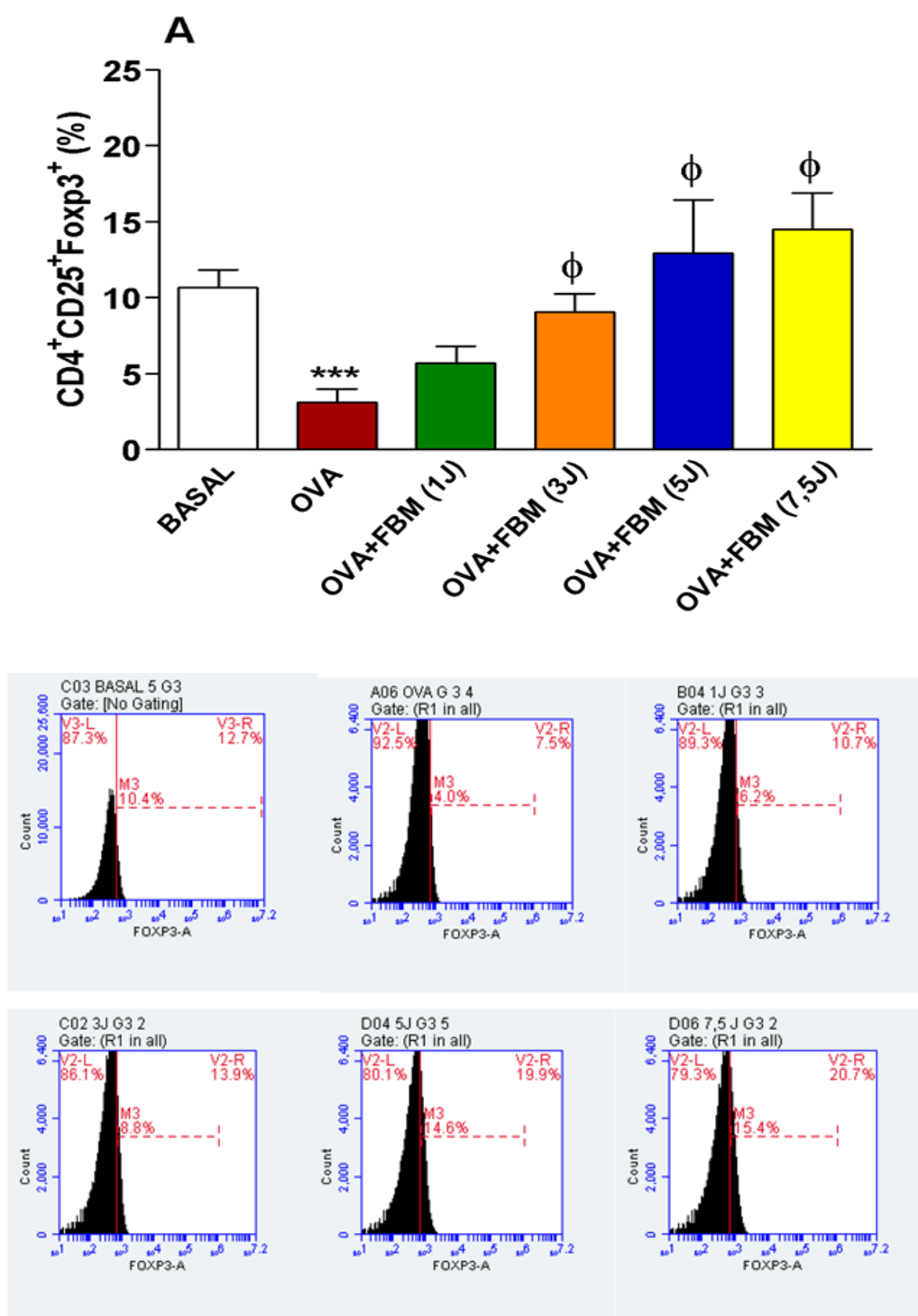
**Figura 14. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre os níveis de IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C) e IL-10 (D) no sobrenadante do LBA.** Os animais foram irradiados com laser 3x/semana, por 5 semanas, 1 hora após o desafio com OVA. Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Basal;  $\phi$   $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA.

#### **4.5 Avaliação das células T reguladoras e IL-10 no LBA**

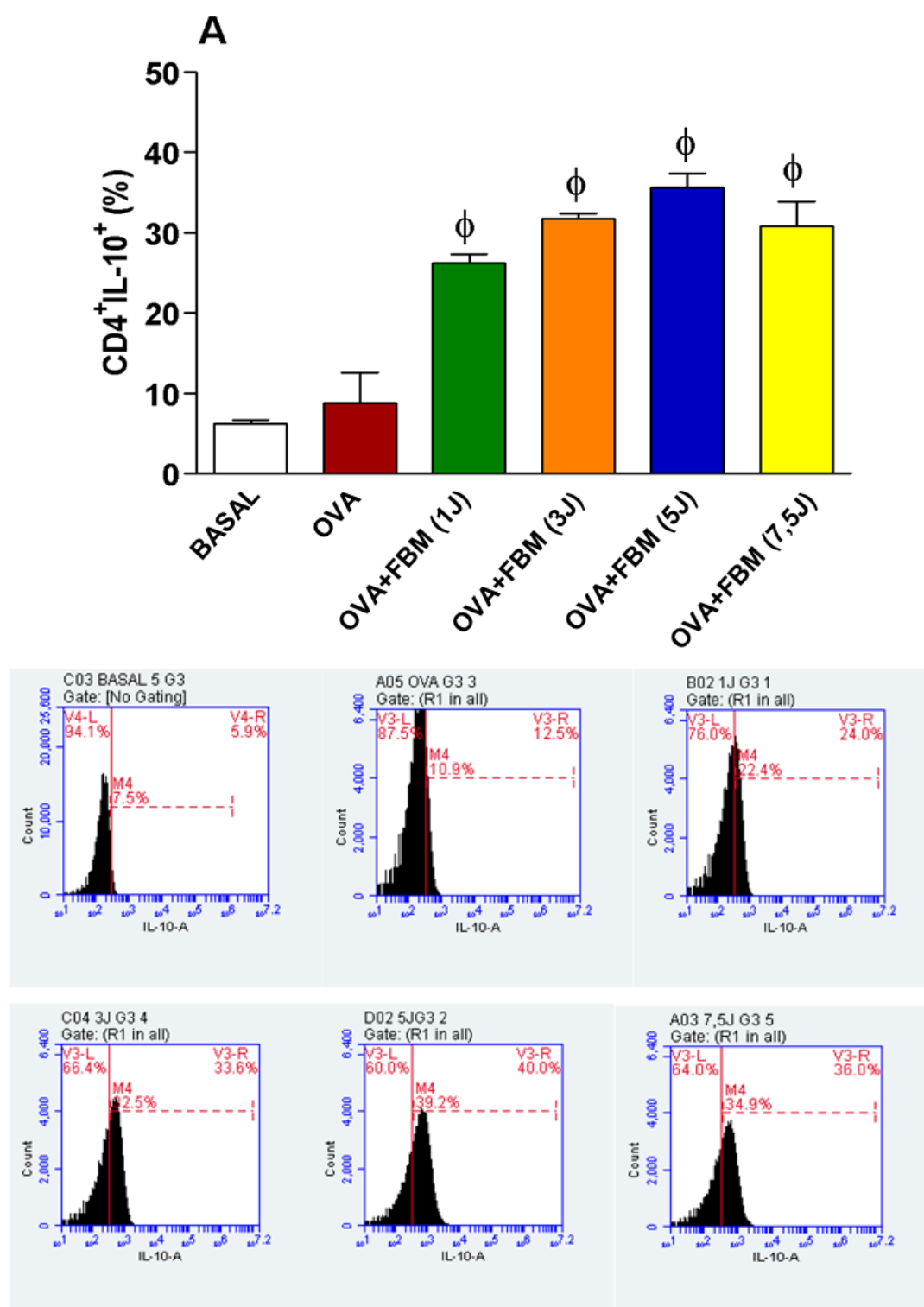
Os resultados relacionados à quantificação de células T CD4+CD25+ no LBA estão apresentados na figura 15 a seguir. Verificamos aumento significativo no número de células T reguladoras (CD4+CD25+) no grupo asmático recuperados no LBA, quando comparado ao grupo Basal. Para os grupos que receberam irradiação com 5J e 7,5J observamos aumento na porcentagem de células T Reguladoras CD4+Foxp3+ em relação ao grupo OVA. (Figura 16) Já para a contagem de linfócitos T CD4+IL-10+, observamos aumento em todos os grupos submetidos ao tratamento com fotobiomodulação (OVA+FBM 1J, 3J, 5J e 7,5J), em relação ao grupo asmático (OVA) (Figura 17).



**Figura 15. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no LBA (A) e histograma representativo (B).** Os grupos utilizados no experimento foram: Basal (animais não manipulados), asmático (OVA) (animais imunizados e desafiados com OVA) e OVA+FBM (animais sensibilizados e desafiados com OVA e posteriormente tratados com laser). Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\* p<0,001 quando comparado ao grupo Basal; φ p<0,01 quando comparados ao grupo asmático (OVA).



**Figura 16. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de Células Treguladoras CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no LBA.** Os grupos utilizados estão descritos na figura 8. Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\* p<0,001 quando comparado ao grupo Basal; φ p<0,001 quando comparados ao grupo asmático (OVA).



**Figura 17. Efeito da terapia com Fotobiomodulação sobre a porcentagem de Células T CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> no LBA.** Os grupos utilizados estão descritos na figura 8. Valores expressos como média e desvio padrão. \*\*\* p<0,001 quando comparado ao grupo Basal; φ p<0,001 quando comparados ao grupo asmático (OVA).

## 5. Discussão

A terapia de fotobiomodulação vem demonstrando ser eficaz no reparo tecidual, inflamação, redução de edema e na analgesia de inúmeros processos <sup>29</sup>. É sabido que para os pacientes asmáticos, há uma necessidade urgente de desenvolver novas terapias anti-inflamatórias com atividade imunomoduladora para fornecer estratégias alternativas para o seu tratamento. Na fisiopatologia da asma, todas as características da inflamação pulmonar e modulação fisiológica são o resultado final de eventos moleculares e celulares envolvidos na sensibilização, ativação de células Th<sub>2</sub> e nos mecanismos efetores desses mediadores.

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram a efetividade da utilização da terapia com Fotobiomodulação (FBM) na redução do perfil celular inflamatório, citocinas pró-inflamatórias, redução de muco na via aérea, bem como na deposição de colágeno. Tais achados sugerem que a FBM pode exercer um papel importante no tratamento da asma, atuando de maneira a modular e inibir o processo inflamatório e atuar também no processo de remodelamento, encontrado em uma fase mais tardia da doença.

Os resultados evidenciaram aumento no perfil celular no LBA, em particular aumento no número de eosinófilos no grupo asmático. Tal achado corrobora com dados obtidos por outros autores, sendo característico do modelo de inflamação pulmonar crônica induzida por OVA <sup>30</sup>. O infiltrado eosinofílico aumentado no pulmão do grupo asmático, está correlacionado com o seu crescimento, desenvolvimento e aumento de sobrevivência favorecido pela citocina IL-5. Os eosinófilos, uma vez ativados, irão migrar para o local da inflamação e darão início a secreção de várias substâncias inflamatórias. <sup>31</sup>

Ainda, observamos nesse modelo experimental, acréscimo de neutrófilos e linfócitos T CD4+, indo ao encontro dos dados da literatura.<sup>33</sup> Desse modo, em asmáticos, os linfócitos T são ativados mediante a estímulo alérgico, irão originar um clone de linfócitos com perfil Th<sub>2</sub> e desencadear a liberação de várias citocinas pró-inflamatória, tornando dessa maneira o quadro inflamatório e alérgico ainda mais agravado.



A citocina IL-4 apresenta múltipla e importante participação na asma, tais como: modulação no crescimento, na diferenciação e na degranulação dos mastócitos, regulação da síntese de IgE pelos linfócitos B, diferenciação e proliferação das células Th2, estimulação das células produtoras de muco, inibição do desenvolvimento Th1. Por outro lado, a IL-13 participa da estimulação e maturação de linfócitos B e a síntese de IgE e a IL-5 está diretamente envolvida no recrutamento de eosinófilos e em seu maior tempo de sobrevivência<sup>28</sup> bem como atua promovendo o recrutamento, proliferação e diferenciação das células inflamatórias presentes na inflamação alérgica. Em nossos resultados, observamos aumento nos níveis das principais citocinas pró-inflamatórias encontradas na asma crônica (IL-4, IL-5 e IL-13), coincidindo com estudos anteriores utilizando OVA para induzir a doença.<sup>34</sup>

Evidências anteriores em modelos experimentais, certificaram que a terapia com a FBM em outras doenças pulmonares já atuou principalmente de forma a diminuir o infiltrado inflamatório.<sup>19</sup> Em estudo clínico recentemente publicado, evidenciou a utilização do laser em crianças asmáticas, o qual resultou em redução nos níveis de óxido nítrico exalado e melhora nos parâmetros espirométricos.<sup>35</sup>

Dessa maneira consideramos extremamente relevante estudar a utilização do FBM em modelos experimentais com OVA, buscando a melhor dose a ser utilizada, de forma a contribuir na aplicação de uma terapia eficiente ou pelo menos auxiliar do tratamento farmacológico, como também nos gastos hospitalares despendidos com essa doença.

Com relação ao infiltrado inflamatório, os efeitos podem ser observados na redução do perfil celular avaliado no LBA através de contagem de células por citometria de fluxo (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T CD4+), bem como a deposição de muco e colágeno avaliado por histologia. Além disso, verificamos diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA no grupo tratado com laser. Por outro lado, a utilização da fotobiomodulação aumentou os níveis de IL-10 no LBA bem como de linfócitos T reguladores.

Bem como importante redução da deposição de muco na via aérea para os grupos submetidos à terapia com FBM com as energias de 3J e 5J. Esses achados

vão ao encontro com dados obtidos em estudos prévios, os quais apontam os benefícios da utilização da FBM em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar<sup>32</sup>. A redução da deposição de muco na via aérea pode contribuir de forma a justificar a diminuição do processo inflamatório pulmonar através da modulação da FBM, constatando com dados apresentados previamente na literatura.

A deposição de colágeno na via aérea evidencia uma fase mais tardia, a fase de remodelamento pulmonar. Com a intervenção terapêutica com a FBM, para todos os grupos OVA+FBM, podemos observar uma atuação positiva e que reduziu a deposição das fibras colágenas na via aérea, bem como evidenciado em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa<sup>32</sup>. Dessa maneira, a FBM foi capaz de atuar positivamente na prevenção das alterações estruturais ocasionadas a partir da inflamação crônica pulmonar.

Quanto à avaliação de eosinófilos (Siglec-F) e neutrófilos (LY6G) observamos redução nos grupos submetidos ao tratamento com fotobiomodulação de 3J e 5J. Tal achado também foi evidenciado em trabalho recentemente publicado.<sup>36</sup>

Para a avaliação de eosinófilos, observamos redução em todos os grupos submetidos à fotobiomodulação, demonstrados em dados obtidos<sup>36</sup>. Dados complementares à atenuação da migração de eosinófilos podem ser observados nas análises de citocinas. Especificamente nos níveis de IL-5, que estão diretamente ligadas a esse tipo celular, notamos melhores resultados para o grupo OVA+FBM (3J e 5J), no pulmão. Para o infiltrado eosinofílico, nos grupos submetidos à fotobiomodulação com menor dose de aplicação, notamos melhor resultado para o uso da energia de 3J e 5J, corroborando com dados obtidos por Wang et al (2014), Silva et al (2014) e Costa-Carvalho (2017). Tendo em vista esse achado, os atuais resultados sugerem que a FBM pode ter papel importante na redução da migração eosinofílica, entretanto esse mecanismo não é bem elucidado.

Os níveis de IL-4 apresentaram-se atenuados em todos os grupos submetidos à fotobiomodulação, com melhores resultados para os grupos (OVA+FBM 3J, 5J e 7,5J).

Finalizando as análises, os níveis de IL-10 no LBA apresentaram-se elevados em todos os grupos tratados com laser, da mesma maneira foi evidenciado por

Siqueira et al (2017). Para a porcentagem de CD4+CD25+Foxp3+ observamos aumento para os grupos tratados com laser (3J, 5J e 7,5J). Já para os valores de linfócitos CD4+IL-10+ os resultados revelam elevação em todos os grupos com irradiados com laser. Esses resultados mostram que a utilização da fotobiomodulação apresentou efeito benéfico com preservação da viabilidade celular, bem como na estimulação da produção de IL-10, que apresenta caráter anti-inflamatório.

Nesse cenário, o aumento encontrado está relacionado às células T reguladoras (regs), o que justifica os níveis elevados de IL-10 do LBA dos animais após a aplicação do laser, com uma ação anti-inflamatória efetiva.<sup>38</sup> Da mesma maneira, em estudo realizado por Miranda Silva em modelo experimental de asma, o laser foi capaz de aumentar os níveis de IL-10. A literatura científica 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,<sup>39</sup> além da regulação da ativação de IgE mediada por mastócitos. 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 hiper-reatividade.<sup>32</sup> Já em pacientes asmáticos os níveis de IL-10 se mostram reduzidos quando comparados a indivíduos saudáveis, corroborando com nossos resultados.<sup>37</sup>

É notável que, as concentrações de IL-10, estão elevadas nos pacientes após a aplicação do FBM como observado na literatura. Adicionando aos benefícios obtidos com o uso da terapia com FBM, notamos aumento do fator de transcrição (Foxp3) bem como da citocina IL-10, nos linfócitos T CD4+CD25+no LBA, também avaliados por citometria de fluxo. Com esses achados, podemos sugerir que ocorre um potencial anti-inflamatório do laser, provavelmente via linfócito Treg, liberando níveis aumentados de IL-10, para controlar a inflamação pulmonar.

Avanços têm sido feitos para definir os mecanismos que controlam a inflamação e induzem a tolerância imune para antígenos específicos. As células T regulatórias apresentam um efeito supressor sobre outras células CD4+, podendo apresentar um papel na regulação da função Th2 na asma. A pesquisa por mecanismos imunoregulatórios foram direcionadas para um subtipo de Treg, a CD4+CD25+. Recentemente foi demonstrado que as Tregs não funcionam

adequadamente nos pacientes com alergia. Acredita-se que esta disfunção possa explicar a ativação Th2 encontrada nos pacientes atópicos. Existe forte evidência de que a regulação destas células T na periferia tenha crucial participação no controle das alergias. Teoricamente a célula Treg pode interferir no desenvolvimento de doenças alérgicas, incluindo a asma, em diferentes estágios como: sensibilização alérgica, progressão para inflamação alérgica, remodelamento brônquico, hiperresponsividade e na persistência das manifestações clínicas da doença. Existem evidências de que as células T regulatórias CD4+CD25+ que expressam o Foxp3 estão reduzidas em indivíduos com rinite alérgica, quando comparado a indivíduos não-atópicos e isto pode ser importante, capacitando um alto número de células Th2 a desenvolver doença alérgica.<sup>6</sup>

O aumento dos níveis de IL-10 que são produzidos pela célula T reg, potencialmente suprimem a produção de IgE, enquanto simultaneamente aumentam a produção de IgG4 e IgA pelos linfócitos B. Tregs CD25+ podem suprimir uma ampla série de processos imunes de mediação celular, sugerindo um papel regulador em múltiplas doenças, inclusive a asma.<sup>6</sup>

Portanto, existem evidências de que o Foxp3 e as células Tregs CD25+ apresentam um papel de supressão em humanos, nas respostas imunes Th2, sendo que achados similares foram descritos em ratos. Recentes avanços no campo da imunologia têm ampliado nossos conhecimentos de como as respostas imunes adaptativas são reguladas, existindo mais evidências de que as células T regs CD25+ constituem um importante componente deste processo, incluindo a inflamação alérgica da asma. Por outro lado, já ficou demonstrado que o número deste tipo de linfócito aumenta durante a imunoterapia específica e também na fotobiomodulação.

Após finalizarmos todas as análises dos resultados, pudemos observar e concluir a efetividade na utilização da terapia com Fotobiomodulação em menor dose, especificamente 3J, apresentou resultados significativos e melhor efeito na redução de eosinófilos e produção de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA na doença pulmonar alérgica crônica. Dessa maneira, parece-nos razoável a utilização da fotobiomodulação atuando em menores doses para o tratamento da asma.

Ressaltamos por fim, a importância da utilização da terapia com fotobiomodulação, uma vez que acrescentamos novas evidências, estas que podem contribuir para elucidar melhor o efeito e a melhor dose anti-inflamatória a serem utilizados em modelo experimental de asma.

## **6. Conclusão**

Nossos resultados demonstram a eficácia da fotobiomodulação na regulação da inflamação pulmonar alérgica. A terapia com fotobiomodulação reduziu a migração de células para o pulmão, os níveis de citocinas e o remodelamento das vias aéreas (muco e colágeno). O possível mecanismo é o aumento de células Treg produtoras de IL-10 no pulmão, nesse sentido, essa terapia pode ser utilizada como estratégia imunoterapêutica no tratamento da asma.

## 7. Referências Bibliográficas

1. GINA Executive and Science Committees. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2018.
2. Informações de saúde (TABNET). Departamento de informática do SUS. [online] (Acessado em julho, 2018. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>.
3. ROCHLITZER S, NASSENSTEIN C, BRAUN A. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 4):594-9, 2006.
4. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma – 2012. [online] (acessado em junho, 2022. Disponível
5. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):1663-74.
6. BARNES PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 118(11):3546-56, 2008.
7. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol.* 2013 Sep 10;4:263.
8. Potter PC, Baker S, Fenimore B, Nurse B. Clinical and cytokine responses to house dust mite sublingual immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015 Apr; 114(4):327-34.
9. Grosse-Onnebrink J, Werner C, Loges NT, Hörmann K, Blum A, Schmidt R, et al., Effect of Th2 cytokines and interferon gamma on beat frequency of human respiratory cilia. *Pediatr Res.* 2016 Jan 13.
10. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2013; 380:2095-128.
11. Bax HJ, Keeble AH, Gould HJ. Cytokinergic IgE Action in Mast Cell Activation. *Front Immunol.* 2012 Aug 6;3:229.

12. DELFINO RJ. Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research. *Environ Health Perspect.* 110 Suppl 4:573-89, 2002.
13. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Sep;128(3):451-62;
14. 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>
15. BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M. I.; IVERSEN, V.; AIMBIRE, F.; MARTINS, R. A. B. L. Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24, 2:158-168, 2006.
16. AIMBIRE, F.; BJORDAL, J. M.; IVERSEN, V. V.; ALBERTINI, R.; FRIGO, L.; PACHECO, M. T. T.; FARIA NETO, H. C. C.; CHAVANTES, M. C.; LABAT, R. M.; MARTINS, R. A. B. L. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38, 8:773-778, 2006.
17. Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP, Albertini R, Corrêa JC, Ladeira de Campos CB, Lyon JP, et al. Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 $\beta$  Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. *Inflammation*. 2008 Jun;31(3):189-97.
18. ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F. S. C.; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S. A.; NUCCI, G.; FARIA NETO, H. C. C.; ZÂNGARO, R. A.; MARTINS, R. A. B. L. Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, 74, 2-3:101-107, 2004.



19. DE LIMA, F. M.; VILLAVERDE, A. B.; ALBERTINI, R.; OLIVEIRA, A. P. L.; FARIA NETO, H. C. C.; AIMBIRE, F. Low-level laser therapy associated to N-acetylcysteine lowers macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) mRNA expression and generation of intracellular reactive oxygen species in alveolar macrophages. *Photomedicine and Laser Surgery*, 28, 6:763-771, 2010.
20. KARU, T.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. Thiol reactive agents eliminate stimulation of possible involvement of cellular redox status into low power laser effects. *Laser Ther*, 11:177-187, 1999.
21. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 80, 2:366-372, 2004.
22. Sommer AP, Pinheiro AL, 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; 19:29–33. [PubMed]
23. MIKHAĬLOV, V. A.; ALEKSANDROVA, O.; GOL'DINA, E. M. The immunomodulating action of low-energy laser radiation in the treatment of bronchial asthma. *Voprosy kurortologii, Fizioterapii, i Lechebnoi Fizicheskoi Kultury*, 4:23-25, 1998.
24. da Cunha Moraes G, Vitoretti LB, de Brito AA, Alves CE, de Oliveira NCR, Dos Santos Dias A, Matos YST, Oliveira-Junior MC, Oliveira LVF, da Palma RK, Candeo LC, Lino-Dos-Santos-Franco A, Horliana ACRT, Gimenes Júnior JA, Aimbire F, Vieira RP, Ligeiro-de-Oliveira AP. Low-Level Laser Therapy Reduces Lung Inflammation in an Experimental Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Involving P2X7 Receptor. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Mar 4;2018:6798238.
25. RIGONATO-OLIVEIRA, NICOLE CRISTINE ; BRITO, AURILÉIA APARECIDA DE ; VITORETTI, LUANA BEATRIZ ; DE CUNHA MORAES, GABRIEL ; GONÇALVES, TAWANY ; HERCULANO, KARINE ZANELLA ; ALVES, CINTIA ESTEFANO ; Lino-dos-Santos-Franco, Adriana ; AIMBIRE, FLÁVIO ; VIEIRA, RODOLFO PAULA ;

- Ligeiro de Oliveira, Ana Paula . Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Pulmonary Inflammation in Asthma Induced by House Dust Mite (HDM): Dosimetry Study. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INFLAMMATION JCR*, v. 2019, p. 1-12, 2019.
26. MIZUTANI, K.; MUSYA, Y.; WAKAE, K.; KOBAYASHI, T.; TOBE, M.; TAIRA, K.; HARADA, T. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. *Photomedicine and Laser Therapy*, 22, 6:537-539, 2004.
  27. DE LIMA, F. M.; VILLAVERDE, A. B.; SALGADO, M. A.; FARIA NETO, H. C. C.; MUNIN, E.; ALBERTINI, R.; AIMBIRE, Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* in rat. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101, 3:271-278, 2010.
  28. Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, et al., Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Nov 1;176(9):871-7.
  29. Wang XY, Ma WJ, Liu CS, Li YX. Effect Of Low-level laser therapy allergic asthma in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 May;29(3):1043-50.
  30. Doras C, Petak F, Bayat S, Baudat A, Von Garnier C, Eigenmann P, Habre W. Lung responses in murine models of experimental asthma: Value of house dust mite ova ovalbumin sensitization. *Respir Physiol Neurobiol*. 2018, 247:43-51.
  31. Sivapalan N, Wattie J, Inman MD, Sehmi R. Lung-Homing of Endothelial Progenitor Cells and Airway Vascularization Is Only Partially Dependent on Eosinophils in a House Dust Mite-Exposed Mouse Model of Allergic Asthma. *PLoS ONE* 2014; 9 (10).
  32. Silva VR, Marcondes P, Silva M, Villaverde AB, Castro-Faria-Neto HC, et al. Low Level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 Inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014 Apr 1;194:37-48.

33. Debeuf, N., Haspeslagh, E., van Helden, M., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. Mouse models of asthma. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 6:169-184, 2016.
34. Jung JH, Kang IG, Kim DY, Kim DY, Hwang YJ, Kim ST. The effect of Korean red ginseng on allergic inflammation in a murine model of allergic rhinitis. *J Ginseng Res.* 2013 Apr;37(2):167-75.
35. Dabbouset OA, Soliman MM, Mohamed NH, Elseify MY, Elsheikh MS, Alsharkawy AA, Abd Al Aziz MM. Evaluation of the improvement effect of laser acupuncture biostimulation in asthmatic children by exhaled inflammatory biomarker level nitric oxide. *Lasers Med Sci.* Jan;32(1):53-59, 2017.
36. Siqueira VPC, Evangelista MIS, Dos Santos A, Marcos R, Ligeiro de Oliveira AP, Pavani C, Damazo AS, Lino dos Santos-Franco A. Light-Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. *J Biophotonics.* 2017 Dec;10(12):1683-1693.
37. Carvalho JL, Britto A, de Oliveira AP, Castro-Faria-Neto H, Albertini R, Anatriello E, Aimbire F. Beneficial effect of low-level laser therapy in acute lung injury after I/R is dependent on the secretion of IL-10 and independent of the TLR/MyD88 signaling. *Lasers Med Sci.* 2017 Feb;32(2):305-315.
38. Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, De Klerk N, Suriyaarachchi D, et al. An Immuno Epidemiological approach to asthma: Identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet.* 2005;365(9454):142–9.
39. Miranda da Silva C, Peres Leal M, Brochetti RA, Braga T, Vitoretto LB, Saraiva Câmara NO, Damazo AS, Ligeiro-de-Oliveira AP, Chavantes MC, Lino-Dos-Santos-Franco A. Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS One.* 2015 Nov 16;10(11):e0142816.
40. A Biblioteca de Conceitos Médicos da Lecturio (INTERLEUCINAS). [ONLINE] (Acessado em junho, 2023. Disponível em:

<https://www.lecturio.com/pt/concepts/interleucinas/>).

## 8. ANEXOS

### 8.1 Aprovação CEUA



#### Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN006 2013

**Título do Projeto:** *Efeito da terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) em modelos experimentais de doenças pulmonares crônicas*

**Orientador:** Ana Paula Ligeiro de Oliveira

**Aluno:** não consta

**Objetivos:** Avaliar o efeito da terapia com LBP sobre mecanismos moleculares e celulares da inflamação pulmonar em modelo de asma e DPOC.

**Método:** No presente projeto visamos estudar alguns parâmetros em animais com asma e DPOC submetidos à terapia com LBP. O protocolo utilizado para a indução da asma será administrar OVA subcutânea (dias 0 e 14) e OVA intranasal (3 vezes/semana, por 5 semanas) ou House Dust Mite intranasal (dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42). Nos dias 43 (OVA) e 50 (HDM), os animais serão sacrificados para análise funcional e morfológica do pulmão. O protocolo utilizado para a indução da DPOC será submeter camundongos C57BL/6 por 60 dias (2 vezes/dia) à inalação de fumaça de cigarro. No dia 61, os animais serão sacrificados para análise funcional e morfológica do pulmão. Em ambos os modelos, serão estudados parâmetros funcionais e estruturais, como a liberação de citocinas e quimiocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) e acúmulo de muco e colágeno. Ainda, será avaliado a participação dos fatores de transcrição STAT6, GATA3 e STAT4 e NF- $\kappa$ B (intacto e fosforilado), das MMP-9 e MMP-12, TIMP-1 e TIMP-2, bem como, a avaliação da mecânica pulmonar e hiperresponsividade das vias aéreas, em ambos modelos experimentais.

**Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):**

Camundongo	isogênico	Balb/c	8 sem	20g	560	Macho	
Camundongo	isogênico	C57BL/6	8 sem	20 g	356	Macho	
<b>TOTAL:</b>							<b>916</b>

O uso de Balb/c para a indução do modelo de asma com OVA e HDM vêm sendo amplamente utilizado. Já para o modelo experimental de DPOC, utilizaremos camundongos C57BL/6, pois trabalhos na literatura mostram que esse animal responde muito melhor para fumaça de cigarro.

#### Divisão dos animais nos grupos experimentais

##### Asma Experimental

Basal (não manipulados; n=5), 2. OVA (sensibilizados e desafiados com OVA - 4 $\mu$ g e 10 $\mu$ g; n=5), 3. OVA + Laser antes (sensibilizados e submetidos à laserterapia e posteriormente desafiados com OVA; n=5), 4. OVA + Laser depois (sensibilizados e desafiados com OVA e submetidos à laserterapia; n=5). O grupo basal e OVA não se repetirão em todos os experimentos (10 animais), os grupos OVA+laser antes e OVA+laser depois, n= 10 x 6 tempos experimentais = 60 + 10 (Basal e OVA) = 70 x 4 tipos de experimento (LBA, histologia, citometria de fluxo e mecânica pulmonar) = 280 animais



Basal (não manipulados; n=5), 2. HDM (sensibilizados e desafiados com House Dust Mite- 100 mg; n=5), 3. HDM + Laser antes (sensibilizados e submetidos à laserterapia e posteriormente desafiados com HDM; n=5), 4. HDM + Laser depois (sensibilizados e desafiados com HDM e submetidos à laserterapia; n=5). O grupo basal e HDM não se repetirão em todos os experimentos (10 animais), os grupos HDM+laser antes e HDM+laser depois, n= 10 x 6 tempos experimentais = 60 + 10 (Basal e HDM) = 70 x 4 tipos de experimento (LBA, histologia, citometria de fluxo e mecânica pulmonar) = 280 animais

#### **DPOC Experimental**

1. Basal (não manipulados; n=5), 2. DPOC (inalados por 60 dias com fumaça de cigarro; n=12), 3. DPOC+ Laser (inalados por 60 dias com fumaça de cigarro sendo que no dia 45 serão submetidos à laserterapia; n=12). O grupo basal e DPOC não se repetirão em todos os experimentos (17 animais). O grupo DPOC + Laser, n= 12 x 6 tempos experimentais = 72 + 17 (Basal e DPOC) x 4 tipos de experimento (LBA, histologia, citometria de fluxo e mecânica pulmonar) = 356 animais

Os grupos experimentais (DPOC e DPOC+laser) têm um n maior (12), pois os resultados são muito variáveis. (Robert F. Foronjy, Abdoulaye J. Dabo, Clifford C. Taggart, Sinead Weldon, and Patrick Geraghty. Respiratory Syncytial Virus Infections Enhance Cigarette Smoke Induced COPD in Mice. PLoS One.; 9(2): e90567, 2014)

One.; 9(2): e90567, 2014)

#### **Justificativa para a utilização dos animais em diferentes experimentos:**

1. Os animais que serão utilizados para a avaliação da mecânica e hiperresponsividade pulmonar não podem ser utilizados para realização do lavado broncoalveolar, pois os insultos respiratórios induzidos por diferentes volumes de ar, causam estresse nas células pulmonares, alterando de maneira muito importante os resultados de celularidade no lavado bronco-alveolar. Portanto, para a avaliação da mecânica pulmonar serão necessários 32 animais, sendo 8 animais em cada grupo experimental.
2. Os animais que serão utilizados para a avaliação do lavado bronco-alveolar não podem ser utilizados para a histologia e imunohistoquímica, uma vez que o procedimento de lavado bronco-alveolar "descola" as células dos pulmões alterando os resultados da análise histológica.
3. Os animais que serão utilizados para a avaliação da expressão dos receptores purinérgicos nos pulmões e órgãos linfoides por western blotting devem ser exclusivos para esse fim, uma vez que a tanto a realização da mecânica/hiperresponsividade pulmonar, quanto o lavado bronco-alveolar alteram a expressão dessas sensíveis proteínas (P2X7, P2Y2 e P2Y6) nos pulmões
4. Gostaria de ressaltar que esse número de animais é para 4 anos de projeto.

**Condições de alojamento e nutrição:** Os animais serão obtidos do biotério de criação da Universidade Nove de Julho e mantidos em condições controladas de umidade (50%-60%), luminosidade (12h claro/12 h escuro) e temperatura (22°C - 25°C) no biotério de experimentação da Universidade Nove de Julho

**Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:** Não há descrição

**Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir doses e vias de administração):** anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) via ip

**Eutanásia:** anestesia com ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) via ip seguida da exsanguinação pela aorta abdominal

**Pertinência e valor científico do estudo proposto:** Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos do LBP sobre células em diferentes situações metabólicas, é importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do laser de baixa potência sobre tecidos biológicos não são conclusivas, mas sim, inconsistentes e escassas. Por isso, estudos que permitam compreender qual o tipo de sinalização celular desencadeada pelo laser, se fazem pertinentes. A partir da compreensão da sinalização celular do LBP e de sua respectiva dosimetria, será possível estabelecer de fato a eficácia da terapia laser para diferentes doenças, incluindo a asma e DPOC. Vale destacar que não existem trabalhos acerca da Terapia com LBP e DPOC

**Data de Início:** 20/08/2014

**Data de Término:** 20/08/2018

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

☒ (X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

☐ ( ) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

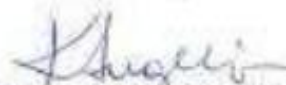
☐ ( ) Não-Aprovado

**Comentário:**

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).


- Solicitamos o envio anual de informação ao CEUA com relação ao número de animais utilizados.

São Paulo, 24 de junho de 2014





Prof. Dra. Kátia De Angelis  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
UNINOVE

## 8.2 Checklist

Tópico	Nº item	Recomendação	Pag. que consta esse item no seu projeto	
<b>Desenho do estudo</b>	<b>1</b>	<p>Para cada experimento, descrever os detalhes resumidos do desenho do estudo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não for usado, deve ser justificado.</li> <li>- A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada ou uma gaiola de animais)</li> </ul>	<b>24</b>	<p><b>O que fazer:</b> estabelecer os grupos experimentais que serão usados no estudo, número de animais por grupos e períodos de análise.</p> <p><b>Como fazer:</b> criar um fluxograma contendo o número total de animais a serem utilizados, a distribuição dos animais em grupos experimentais e número por grupo, incluir os períodos de análise.</p> <p><b>Ex:</b></p>  <pre> graph TD     A[Animais] --&gt; B[Grupo controle]     A --&gt; C[Grupo 1 tratado]     A --&gt; D[Grupo 2 tratado]   </pre>
<b>Tamanho da amostra</b>	<b>2a</b>	Especifique o número de animais alocados em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também no fluxograma o número total de animais utilizados.	<b>26</b>	<p><b>O que fazer:</b> completar o fluxograma</p> <p><b>Como fazer:</b> incluir o número total de animais a serem utilizados, a distribuição dos animais em grupos experimentais e número por grupo, incluir os períodos de análise.</p>




			26	
	2b	Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado. (sugerido incluir a escolha do número de animais com base nas análises a serem realizadas).	26	<p><b>O que fazer:</b> explicar o cálculo</p> <p><b>Como fazer:</b> incluir a fórmula sugerida pelo Prof Deana</p>
Critérios de inclusão e exclusão	3a	Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente.		<p><b>O que fazer:</b> Verificar se existem critérios de inclusão e exclusão dos animais nos grupos experimentais.</p> <p><b>Como fazer:</b> Incluir os critérios de inclusão e exclusão, se aplicável.</p>
	3b	Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não foram incluídas na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente.		
			26	
	2b	Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado. (sugerido incluir a escolha do número de animais com base nas análises a serem realizadas).	26	<p><b>O que fazer:</b> explicar o cálculo</p> <p><b>Como fazer:</b> incluir a fórmula sugerida pelo Prof Deana</p>
Critérios de inclusão e exclusão	3a	Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente.		<p><b>O que fazer:</b> Verificar se existem critérios de inclusão e exclusão dos animais nos grupos experimentais.</p> <p><b>Como fazer:</b> Incluir os critérios de inclusão e exclusão, se aplicável.</p>
	3b	Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não foram incluídas na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente.		

	3c	Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.		
Randomização	4a	Declare se foi utilizada randomização para distribuição (alocação) dos animais experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização.	26	<p>O que fazer: verificar como foi realizada a randomização dos animais</p> <p>Como fazer: descrever de forma simples como foi o processo de randomização dos animais.</p>
Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação dos animais nos grupos experimentais, na condução dos experimentos e na avaliação dos resultados	26	<p>O que fazer: verificar como foi realizado o cegamento nestas diferentes fases do experimento (alocação, condução e análise dos resultados)</p> <p>Como fazer: incluir tudo que foi "cegado" desde a alocação até a análise dos resultados.</p> <p>Ex:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4) Alocação aleatória (sem cegamento);</li> <li>5) Tratamento e coleta de dados "cega"(pesquisador não sabe o grupo experimental);</li> <li>6) Análise de resultados "cega"(pesquisador recebe os resultados sem identificação dos grupos experimentais)</li> </ol>
Desfechos	6a	Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais).	29	O que fazer: explicar detalhadamente os resultados.

	3c	Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.		
Randomização	4a	Declare se foi utilizada randomização para distribuição (alocação) dos animais experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização.	26	<p>O que fazer: verificar como foi realizada a randomização dos animais</p> <p>Como fazer: descrever de forma simples como foi o processo de randomização dos animais.</p>
Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação dos animais nos grupos experimentais, na condução dos experimentos e na avaliação dos resultados	26	<p>O que fazer: verificar como foi realizado o cegamento nestas diferentes fases do experimento (alocação, condução e análise dos resultados)</p> <p>Como fazer: incluir tudo que foi "cegado" desde a alocação até a análise dos resultados.</p> <p>Ex:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4) Alocação aleatória (sem cegamento);</li> <li>5) Tratamento e coleta de dados "cega"(pesquisador não sabe o grupo experimental);</li> <li>6) Análise de resultados "cega"(pesquisador recebe os resultados sem identificação dos grupos experimentais)</li> </ol>
Desfechos	6a	Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais).	29	O que fazer: explicar detalhadamente os resultados.

				Como fazer: Usar gráficos e tabelas para demonstrar os resultados.
	6b	Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.	29	O que fazer: caso a pesquisa seja com animais domésticos é necessário incluir o desfecho primário e cálculo amostral. Como fazer: com base no desfecho primário escolhido, fazer o cálculo amostral e descrever detalhadamente como foi realizado.
Métodos estatísticos	7	Descreva em detalhes os métodos estatísticos utilizados em cada análise, incluindo o software utilizado.	31	O que fazer: incluir como foi realizada a análise estatística de forma clara e detalhada. Como fazer: descrever o programa (software) que foi utilizado para a análise estatística, como os dados foram apresentados, qual(is) teste(s) foi(ram) utilizado(s). Ex: Programa GraphPadPrisma versão X, avaliação da distribuição dos dados.
Animais experimentais	8a	Descreva os detalhes dos animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sub-linhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento, e caso seja relevante, o peso.	24	O que fazer: incluir as informações sobre os animais utilizados. Como fazer: incluir a linhagem sexo, idade, peso e qualquer outra informação relevante sobre os animais utilizados.
	8b	Descreva as informações adicionais relevantes a procedência dos animais, estado de saúde/imunidade, modificações genéticas, genotipagem e quaisquer procedimentos prévios.	24	Ex: Ratos Wistar, machos, peso médio e DP (200±24g), Knockout para gene X.

Procedimentos experimentais	9	Para cada grupo experimental, incluindo os grupos controles, descreva os procedimentos, com detalhes suficientes, para permitir que outros repitam o procedimento realizado, incluindo	26	<p>O que fazer: incluir as informações sobre os procedimentos utilizados de forma detalhada.</p> <p>Como fazer: incluir de forma detalhada:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- O que foi feito (cirurgia, intervenção), como foi feito (procedimento, referência seguida) e o que foi utilizado (materiais e reagentes)</li> <li>- Quando e com que frequência - Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação)</li> <li>- Por quê (justifique os procedimentos);</li> <li>- Incluir timeline (momentos do experimento desde alocação em grupos, períodos de análise e tratamentos utilizados)</li> </ul>  <p>Ex: O procedimento cirúrgico para indução de de lesão medular foi baseado no estudo de Fulano et al 2000, consistiu das seguintes etapas, para tal foi usada pinça de tal modelo, o tratamento consistiu de irradiação com laser 2 vezes na semana e a análises realizadas nos momentos: inicial, após XX e XX dias.</p>
-----------------------------	---	--	----	--

Resultados	10	<p>Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estatísticas resumidas/descritivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade, quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude)</li> <li>- Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança</li> </ul>	32	<p><b>O que fazer:</b> incluir de forma detalhada a análise estatística dos resultados obtidos.</p> <p><b>Como fazer:</b> descrever adequadamente os resultados, a escolha dos testes estatísticos e de como os dados foram expressos</p> <p>Ex: dados expressos em médias e erro padrão, teste ANOVA one way e pós teste Tukey, incluir valor de P (significância)</p>
------------	----	--	----	---