



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

**DURABILIDADE DO EFEITO DA TERAPIA COM FOTOBIOMODULAÇÃO EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA**

Silmara Brasileiro Quaresma

**São Paulo
2024**



Silmara Brasileiro Quaresma

**DURABILIDADE DO EFEITO DA TERAPIA COM FOTOBIOMODULAÇÃO EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho para obtenção de título de Mestre em Medicina-Biofotônica.

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira

**São Paulo
2024**

Quaresma, Silmara Brasileiro.

Durabilidade do efeito da terapia com fotobiomodulação em modelo experimental de asma. / Silmara Brasileiro Quaresma. 2024.

56 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2024.

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

1. Asma. 2. Inflamação pulmonar. 3. Laser em baixa intensidade. 4. Terapia com fotobiomodulação.

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

CDU 615.831

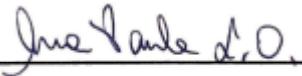
São Paulo, 18 de dezembro de 2024.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Silmara Brasileiro Quaresma

Título da Dissertação: "Durabilidade do efeito da terapia com fotobiomodulação em modelo experimental de asma".

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



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



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



Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, Pai, Filho e Espírito Santo, por todas as bênçãos concedidas durante minha jornada, não posso esquecer também de agradecer a intercessão da Virgem Maria.

Minha eterna gratidão à minha mãe, Maria Soelyth Brasileiro, que mesmo ausente, continua sendo a minha maior inspiração. Sua força, humildade e honestidade me guiam até hoje. Agradeço também à minha irmã Bruna, meu irmão Artur, aos meus filhos Wellington e Giovana, por todo o amor e apoio incondicional.

Sou imensamente grata à minha orientadora, Ana Paula de Oliveira Ligeiro, por sua dedicação, conhecimento e paciência. Seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento profissional. Agradeço também aos meus colegas, em especial à Cíntia, Tawany, Kelly, Keila e Aline, por toda a ajuda e companheirismo durante essa jornada.

Agradeço à Universidade Nove de Julho por proporcionar um ambiente propício ao aprendizado e por ter feito parte da minha história desde a graduação. Em especial, agradeço à coordenadora do programa Biofotônica-Medicina Cristiane Porta, por seus conselhos e apoio em momentos tão importantes.

A todos vocês, meu mais sincero agradecimento. Cada um contribuiu de forma especial para a realização deste trabalho.

RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas com alta prevalência nos dias atuais. A Terapia com fotobiomodulação (TFBM) tem se mostrado uma alternativa promissora no tratamento da asma, oferecendo benefícios significativos em comparação com os glicocorticóides, que são frequentemente utilizados para controlar essa condição, porém sem efeitos colaterais. Assim, o objetivo do estudo será avaliar a durabilidade do efeito da TFMB sobre a inflamação pulmonar em modelo experimental de asma. O estudo será composto por 7 grupos: Basal, OVA 72h, OVA 1s, OVA 2s, OVA+L 72h e OVA+L 1s e OVA+L 2s. Os animais serão sensibilizados com OVA (s.c.) nos dias 0 e 14. A Partir do dia 21 os animais receberam OVA por via orotraqueal 1 vez (Grupo OVA 72h), 3 vezes (Grupo OVA 1 s) e 6 vezes (Grupo OVA 2s). Os animais serão irradiados apenas 1 vez com laser diodo, com os seguintes parâmetros: 660 nm, 100 mW, 3J de energia, Largura espectral \pm 20, Modo de operação contínuo, Exposição radiante (J/cm^2) 66, Área do feixe no alvo (cm^2) 0,0045, Tempo de exposição 30 s, Frequência Única, 3 Pontos de aplicação e técnica de aplicação de 1 cm de distância. 1 hora após o primeiro desafio em cada grupo correspondente. Decorrido 24 horas do último desafio os animais serão eutanasiados e o lavado broncoalveolar e o pulmão coletados para a quantificação celular e dos mediadores inflamatórios, bem como avaliação do muco e colágeno nas vias aéreas.

Palavras-chave: asma, inflamação pulmonar, laser em baixa intensidade, Terapia com fotobiomodulação.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Fisiopatologia da asma brônquica.....	XX
Figura 2. Ilustração do esquema de interação do laser com a célula.....	XX
Figura 3. Fluxograma com os grupos experimentais.....	XX
Figura 4. Demonstração de sensibilização e administração orotraqueal (o.t.) de OVA.....	XX
Figura 5. Laser de diodo utilizado no protocolo experimental.....	XX
Figura 6. Pontos de aplicação do laser em baixa intensidade.	XX
Figura 7. Desenho experimental.....	XX

Lista de Tabelas

Tabela 1.Tabela 1 – Interleucinas e seus efeitos nas células-alvo na asma (perfil TH2)

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA – Análise de Variância

ATP – Adenosina Trifosfato

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

FBM – Fotobiomodulação

HDM – Dermatophagoides pteronyssinus (ácaro da poeira)

i.m. – Intramuscular

i.p. – Intraperitoneal

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

IL-13 – Interleucina 13

IFN- γ – Interferon Gama

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação)

LBA – Lavado Broncoalveolar

OVA – Ovalbumina

PBS – Tampão Fosfato Salino (Phosphate-Buffered Saline)

PAS – Ácido Periódico de Schiff

RhoA – Proteína G RhoA

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

TFBM – Terapia com Fotobiomodulação

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador beta

UV – Ultravioleta

J – Joule

mW – Milliwatt

nm – Nanômetro

RPM – Revoluções por Minuto (Rotations per Minute)

°C – Grau Celsius

cm² – Centímetro quadrado

L – Litro

μ L – Microlitro

μ m – Micrômetro

mg – Miligrama

g – Grama

s – Segundo

h – Hora

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Asma

A asma é um sério problema de saúde global que afeta todas as faixas etárias. Sua prevalência está aumentando em muitos países, especialmente entre crianças.¹ A asma é considerada uma doença inflamatória nas vias aéreas, levando à hiperresponsividade das vias aéreas, obstrução, hiperprodução de muco e remodelação da parede das vias aéreas.²⁻³ A resposta inflamatória causa lesão dos tecidos, edema e produção de muco, o que pode resultar em obstrução do fluxo de ar. Além disso, a hiperresponsividade das vias aéreas provoca uma contração exagerada do músculo liso da traqueia e dos brônquios, levando a uma obstrução temporária das vias respiratórias.³ São indicativos de asma: um ou mais dos sintomas, dispneia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã⁴.

Atualmente, a asma afeta uma parcela significativa da população, sendo considerada um problema de saúde global. Estima-se que entre 1% e 18% da população mundial seja afetada, totalizando cerca de 339 milhões de pessoas. Essa condição tem um impacto significativo na vida dos pacientes, de seus familiares e dos sistemas de saúde.⁵ A asma é a terceira ou quarta causa de hospitalizações pelo SUS (2,3% do total), conforme o grupo etário considerado.⁶ Se as tendências atuais continuarem, estima-se que poderá haver mais 100 milhões de asmáticos até 2025⁷. Estima-se que os custos econômicos associados à asma sejam classificados como um dos mais altos entre as doenças crônicas devido à utilização significativa de cuidados de saúde associados a essa condição.⁸

Os custos da asma são em grande parte devido à doença descontrolada e provavelmente aumentarão à medida que sua prevalência e gravidade aumentam.⁹ Em todos os países, as decisões sobre o uso de novas terapias são baseadas não apenas em avaliações de segurança e tolerabilidade, mas também, cada vez mais, em evidências de custo-benefício.¹⁰

Embora a causa exata da asma não seja completamente conhecida, ela envolve uma combinação de fatores genéticos e ambientais que afetam o sistema imunológico e respiratório. Como resultado da interação entre fatores genéticos, componentes celulares com comportamento diverso do normal e modulação ambiental, mecanismos imunes anormais, modulados por numerosas citocinas, resultam nas alterações e disfunções observadas na asma.¹¹ Ácaros da poeira doméstica (HDM), *Dermatophagoides spp.*, estão associados à resposta alérgica em até 85% dos pacientes com asma em todo o mundo.¹²

Os modelos de animais utilizados para investigação das doenças respiratórias alérgicas induzidas por Ovalbumina (OVA) e aeroalérgenos têm sido amplamente utilizados para elucidar mecanismos imunológicos e não imunológicos envolvidos na patogênese da asma e da rinite.¹³ O protocolo utilizado foi baseado no estudo de Rigonato-Oliveira et al., 2019¹⁴, que demonstrou a eficácia desse modelo na indução de inflamação pulmonar alérgica crônica. O procedimento consiste em sensibilizar os animais com injeções de OVA, seguido de exposições repetidas ao antígeno via orotraqueal. Isso resulta em uma resposta inflamatória similar à observada em humanos, com recrutamento de eosinófilos, produção de citocinas inflamatórias e remodelamento do tecido pulmonar

As células do tipo Th2 dominam sobre as células do tipo Th1, promovendo fibrose subepitelial e hiperplasia das células musculares lisas das vias aéreas⁽¹⁵⁾. As citocinas geradas desta inflamação Th2, incluindo interleucinas IL-4,IL-5,IL-13, são reconhecidas como intimamente associadas aos mecanismos patogenéticos da asma¹⁶⁻¹⁷.

Para que os linfócitos sejam ativados, é necessário que o antígeno seja identificado pelas células dendríticas, que atuam como apresentadoras de抗ígenos. Na superfície dessas células, estão presentes as moléculas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade), que se ligam aos receptores de抗ígenos nos linfócitos. Os linfócitos T CD4 reconhecem as moléculas MHC da classe II (figura 1), sendo divididos em dois subgrupos, Th1 e Th2, de acordo com as citocinas que produzem. Entre as citocinas mencionadas, a IL-4, juntamente com a IL-13, estimula a produção de IgE pelas

células B⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Além disso, essas citocinas, em conjunto com outras, aumentam a secreção de muco, promovem a superexpressão de células caliciformes e contribuem para a hiperresponsividade das vias aéreas (Figura 1).

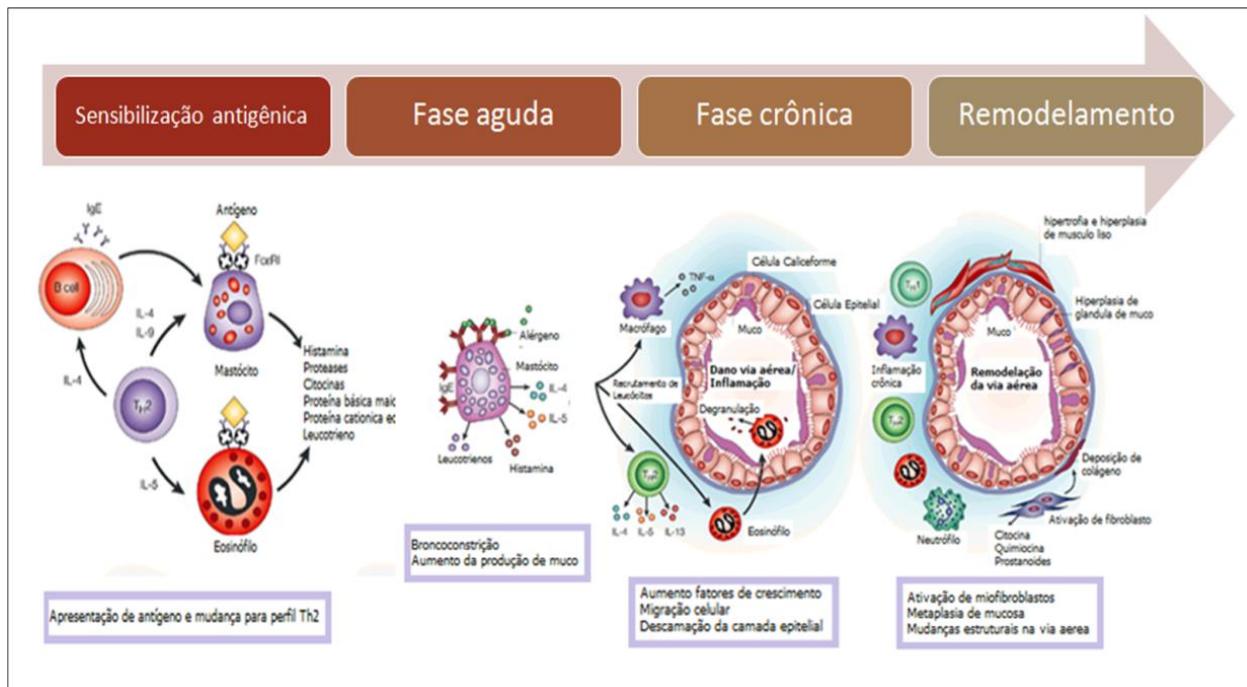


Figura 1. Fisiopatologia da asma. Fases e sintomas apresentados na asma. Fonte: Adaptado de **Nature Reviews Immunology** [Internet]. Nature Reviews Immunology; [cited 2024 Aug 27]. Available from: <https://www.nature.com/nri/journal>

Essa tabela destaca o papel das interleucinas no contexto da asma, enfatizando os efeitos específicos nas células-alvo associadas ao perfil TH2.

Tabela 1 – Interleucinas e seus efeitos nas células-alvo na asma (perfil TH2)

NOME	FONTE	CÉLULAS-ALVO	EFEITOS NAS CÉLULAS-ALVO
IL-4	Células Th2	Mastócitos, Células T, Células B, Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciação de células T em células Th2 - Fator de crescimento de células B - Produção de IgG1 e IgE
IL-5	Células Th2	Eosinófilos, Células B	<ul style="list-style-type: none"> - Crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos - Produção de IgA
IL-9	Células T	Mastócitos, Células NK	<ul style="list-style-type: none"> - Sobrevida e secreção de citocinas pelas células T - Crescimento e ativação de mastócitos
IL-13	Células Th2	Células B, Monócitos, Fibroblastos, Células epiteliais	<ul style="list-style-type: none"> - Produção de IgE - Aumento da produção de muco - Síntese de colágeno - Inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias
IL-10	Células Th2	Macrófagos, Células B, Células Th1, Células dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> - Inibe a produção de citocinas de Th1 (IFN-γ, TNF-β, IL-2) - Inibe a produção de IL-12 por macrófagos - Diminui a expressão de MHC classe II em células dendríticas

As células Th2 também podem estimular a produção de IgE por meio da interação com as células B. Em seguida, a IgE se liga a receptores de alta afinidade para IgE (Fc ϵ R1) presentes nos mastócitos, e a ligação cruzada da IgE na superfície dos mastócitos por alérgenos específicos leva à ativação dos mastócitos e à liberação de mediadores, como histamina, fator ativador de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos. O aumento da IL-4 e a IL-13 induzem metaplasia de células caliciformes e produção de MUC5AC, favorecendo a produção de muco nas vias aéreas asmáticas.⁽¹⁹⁾.

Compreende-se que a estimulação de alérgenos das vias aéreas em pacientes com asma leva a um aumento dos linfócitos Th, com predominância de Th2. No entanto, a asma resulta de um desequilíbrio entre Th1 e Th2⁽²⁰⁾.

Estudos indicam que os sistemas reguladores evitam a expressão excessiva das respostas Th1 e Th2, com a IL-10 desempenhando um papel importante nesse processo. Apesar de ser inicialmente classificada como uma citocina Th2, sabe-se, hoje, que a IL-10 é produzida por uma ampla gama de tipos celulares: células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T (CD4+, CD8+ e NK; linfócitos T regulatórios CD4+ CD25+), neutrófilos e células epiteliais²¹⁻²².

A IL-5, secretada pelos linfócitos Th2, desempenha um papel essencial nos eosinófilos, influenciando sua ativação, maturação e sobrevivência⁽²³⁾. A secreção de citocinas Th2 nas vias aéreas pode promover um padrão inflamatório eosinofílico e mastocitário, bem como mudanças estruturais típicas do fenótipo asmático⁽²⁴⁾. No processo asmático, também há uma resposta do sistema imunológico inato, onde o alérgeno se liga diretamente à IgE presente na membrana dos mastócitos localizados na mucosa e submucosa dos brônquios, o que resulta na liberação de mediadores inflamatórios.

Durante a inflamação crônica, há proliferação das células epiteliais e miofibroblastos, além de um acúmulo de colágeno e proteoglicanos na membrana basal, o que leva ao espessamento dos brônquios. O acúmulo de eosinófilos ativados nas vias aéreas gera quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína básica principal, que provocam ruptura da integridade do epitélio causando diretamente a hiper-reatividade das vias aéreas⁽²⁵⁾.

A patogênese da asma envolve uma elevação na expressão de diversas proteínas relacionadas à inflamação, como citocinas, quimiocinas, enzimas responsáveis pela síntese de mediadores inflamatórios, além de receptores e moléculas de adesão celular. Os principais objetivos do manejo da asma são alcançar um bom controle dos sintomas e reduzir o risco de futuras complicações relacionadas à doença¹. O tratamento da asma deve incluir o controle dos fatores de risco modificáveis, além do uso de medicamentos que variam de acordo com a frequência e gravidade dos sintomas e a função pulmonar. Os broncodilatadores b2-agonistas de curta ação são as medicações de escolha para o alívio dos sintomas da asma, enquanto os b2-agonistas de longa ação são fármacos que, associados à terapia de manutenção com corticosteróides inalatórios, atuam para o melhor controle dos sintomas⁽²⁶⁾.

Os glicocorticóides são amplamente utilizados no tratamento de doenças respiratórias, especialmente na asma e na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), devido à sua potente ação anti-inflamatória. A maioria desses medicamentos se enquadra nas três categorias principais a seguir: 1) medicamentos de controle de longo prazo; 2) medicamentos de alívio rápido; e 3) agentes biológicos. Medicamentos de controle de longo prazo reduzem a inflamação das vias aéreas que leva a sintomas crônicos e incluem terapias como ICSs, LABAs, LAMAs, modificadores de leucotrienos, teofilina e cromolina²⁷. Além disso, os glicocorticóides ajudam a melhorar a função pulmonar e a reduzir a frequência e gravidade dos sintomas respiratórios.

Os glicocorticóides podem provocar osteoporose transitória, aumentando o risco de fraturas ósseas devido à inibição da formação óssea e ao aumento da reabsorção óssea²⁸. Outro efeito adverso comum é a supressão do sistema imunológico, tornando os pacientes mais suscetíveis a infecções⁹. Portanto, é essencial monitorar atentamente os pacientes em tratamento com glicocorticóides para minimizar esses riscos e ajustar a terapia conforme necessário.

Nesse sentido, a Terapia com fotobiomodulação (TFBM) tem se mostrado uma alternativa promissora no tratamento da asma, oferecendo benefícios significativos em comparação com os glicocorticóides, que são frequentemente utilizados para controlar essa

condição. A TFBM utiliza luz de baixa intensidade para estimular as células, promovendo a redução da inflamação e a modulação da resposta imunológica sem os efeitos colaterais associados aos glicocorticóides.

1.2. Terapia com Fotobiomodulação (TFBM)

Em 1967, a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) era utilizada pelo pesquisador húngaro Endre Mester, que observou melhora na cicatrização de feridas e aumento no crescimento de pelos em experimentos com ratos²⁹. Além do laser monocromático coerente, descobriu-se que o diodo emissor de luz (LED) também poderia ser utilizado com parâmetros comparáveis para obter os mesmos efeitos biológicos.

A TFBM é baseada na aplicação de luz de baixa intensidade nos tecidos. Essa luz é absorvida por cromóforos celulares específicos, especialmente a citocromo C oxidase, localizada na mitocôndria que gera aumento de ATP pela ação dos cromóforos na cadeia de transporte de elétrons³⁰.

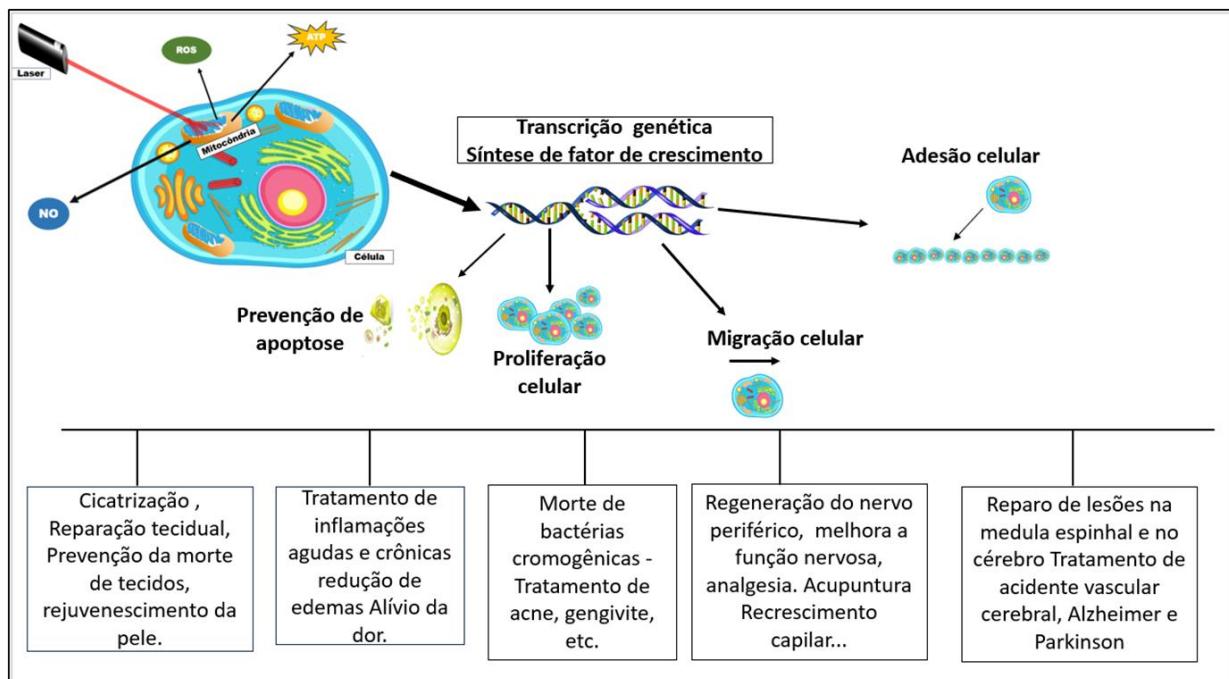


Figura 2. Ilustração do esquema de interação do laser com a célula. Fonte: Adaptado de Tuchin VV. Tissue Optics and Photonics: Light-Tissue Interaction II. J Biomed Photonics Eng. 2016;2(3):030201.

Alguns estudos têm utilizado a LLLT na área clínica e como resultado têm observado melhora nos parâmetros espirométricos, redução da concentração de óxido nítrico exalado, melhor controle da exacerbão da asma e consequente redução no uso de medicamentos^{31,32,33}. Ainda não se conhecem com exatidão os efeitos sistêmicos da terapia com LED, mas acredita-se que possa haver um impacto na inflamação e nas células imunológicas de tecidos não adjacentes ao local tratado. Acredita-se que produz um efeito analgésico ao diminuir os níveis de mediadores da dor, como prostaglandinas, betendorfinas, interleucina 1-beta e fator de necrose tumoral-alfa, bem como ao melhorar a microcirculação local^{33,34}.

Os mecanismos pelos quais a TFBM induz efeitos sistêmicos ainda não são totalmente elucidados. No entanto, há evidências de que a TFBM possa modular a resposta inflamatória sistêmica e influenciar células imunes em tecidos distantes do local de

irradiação. Propostas mecanísticas incluem o aumento da produção de ATP mitocondrial, a liberação de óxido nítrico e a modulação de espécies reativas de oxigênio³⁶.

"A versatilidade terapêutica da terapia com fotobiomodulação pode ser atribuída à presença da citocromo C oxidase, uma enzima intrínseca à cadeia respiratória mitocondrial e sensível à luz, em todas as células eucarióticas. Essa enzima atua como um fotoaceptor endógeno, desencadeando uma cascata de eventos bioquímicos que mediam os efeitos benéficos da terapia com luz³⁷.

A durabilidade dos efeitos do laser no tratamento da inflamação é influenciada por vários fatores, incluindo a intensidade da luz, a dose aplicada, e a frequência das sessões. Pesquisas já conduzidas revelam que a TFBM promove a redução da inflamação por meio da melhora na função mitocondrial e a diminuição da produção de mediadores inflamatórios³⁸.

Um número crescente de estudos em modelos experimentais de doenças inflamatórias pulmonares tem mostrado que a terapia com laser de baixa intensidade pode ser uma opção terapêutica complementar, com baixo custo e sem efeitos colaterais. No entanto, ainda não há um protocolo bem definido em relação à dosagem ideal para essa terapia.

Fotobiomodulação e doenças pulmonares

Estudos indicam que a TFBM pode reduzir a inflamação brônquica e melhorar a função pulmonar ao atuar nas mitocôndrias, aumentando a produção de ATP e promovendo a recuperação celular³⁸. Além disso, a TFBM tem mostrado potencial para diminuir a hiperreatividade das vias aéreas e a produção de mediadores inflamatórios, contribuindo para um alívio sintomático e mais duradouro³⁹.

A terapia com Fotobiomodulação (TFBM) tem demonstrado potencial na modulação de processos inflamatórios, conforme evidenciado em diversos estudos. Em modelos experimentais de asma, a TFBM reduziu significativamente a infiltração de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T) e a produção de citocinas pró-

inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-13) no Lavado broncoalveolar (LBA), concomitante ao aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, a FBM atenuou alguns parâmetros da asma, incluindo hiperreatividade brônquica e remodelamento das vias aéreas³³.

Em modelos experimentais de doenças pulmonares inflamatórias, TFBM tem mostrado capacidade de regular a resposta inflamatória. No modelo de asma induzida por HDM, a TFBM (660 nm, 100 mW, 1J e 3J) reduziu o número de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T no pulmão, além de diminuir os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, e aumentar a IL-10 no LBA. A terapia também diminuiu a infiltração de eosinófilos peribrônquicos, a deposição de colágeno, a broncoconstricção e o espessamento das vias aéreas¹⁴.

A TFBM (660 nm, 30 mW, 5,4J) atenuou a hiperresponsividade brônquica em modelo de asma, associada à redução da expressão de RhoA e da inflamação pulmonar. Observou-se diminuição de eosinófilos, eotaxina, ICAM-1, citocinas Th2 e STAT6. Esses resultados sugerem que a TFBM modula a via RhoA/STAT, reduzindo a inflamação pulmonar⁴⁰.

Em modelo de DPOC induzido por fumaça de cigarro, a terapia com fotobiomodulação (660 nm, 30 mW, 3J/cm²) reduziu a inflamação pulmonar, caracterizada pela diminuição de células inflamatórias e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-17, TNF-α) no LBA. Adicionalmente, a TFBM atenuou o remodelamento pulmonar, com redução da produção de muco, depósito de colágeno e do alargamento alveolar. Esses efeitos foram acompanhados por diminuição da expressão do receptor P2X7 e aumento da produção de IL-10⁴¹.

Em modelo experimental de DPOC induzido por fumaça de cigarro, a TFBM (660 nm, 30 mW, 180s) reduziu significativamente a inflamação pulmonar, caracterizada pela diminuição de células inflamatórias e de diversas citocinas e quimiocina (IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-γ, MCP-1, GM-CSF, KC/CXCL1, LTB4) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, a TFBM atenuou o remodelamento pulmonar, com redução do depósito de colágeno e muco, e modulou a resposta imune, caracterizada por redução de células T CD4+ e CD8+ efetoras e aumento de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+IL-10+)⁴².

Diversos trabalhos indicam que o laser desempenha um papel importante na ação anti-inflamatória sobre as células. Em modelos experimentais de doenças inflamatórias pulmonares, a TFBM. Estudos sugerem um aumento de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) produtoras de IL-10 dentro do pulmão que essas células agem suprimindo células T efetoras (CD4+STAT-4+), conhecidas por produzir IFN- γ ³⁵. Além disso, observou-se uma diminuição na produção de muco, eosinófilos peribrônquicos, deposição de colágeno, índice de broncoconstricção, e no espessamento das vias aéreas e da musculatura brônquica ^{36,37}.

Um estudo in vitro demonstrou que a TFBM modula a resposta inflamatória em um modelo de sobreposição asma e DPOC (ACO), reduzindo significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a produção da citocina anti-inflamatória (IL-10). Esses achados sugerem que a TFBM pode exercer um efeito anti-inflamatório e imunomodulador, oferecendo uma nova perspectiva para o tratamento da ACO ⁴³.

Considerando que os efeitos da TFBM sobre o processo inflamatório têm se mostrado promissores em estudos relacionados à asma, é fundamental que novas pesquisas experimentais sejam conduzidas para avaliar a durabilidade desse efeito em doenças pulmonares. Nesse contexto, essa terapia pode representar uma opção terapêutica adicional, com custos acessíveis e sem efeitos colaterais, para pacientes com asma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a durabilidade do efeito da terapia com fotobiomodulação em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar, nos tempos de avaliação com 72 horas, 7 dias e 14 dias, após o tratamento com laser.

2.2. Objetivos Secundários

- Avaliar a inflamação pulmonar através da contagem de células totais e diferenciais no LBA;
- Quantificar a liberação de citocinas (IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) no sobrenadante do LBA;
- Avaliar a produção de muco e deposição de colágeno nas vias aéreas.

3. 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, fêmeas (maior quantidade disponível no biotério), 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 (12h claro/12h 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 Basal, OVA 72h, OVA 1s, OVA 2 s, OVA+L 72h, OVA+L 1s e OVA+L 2s, escolhidos de forma aleatória.

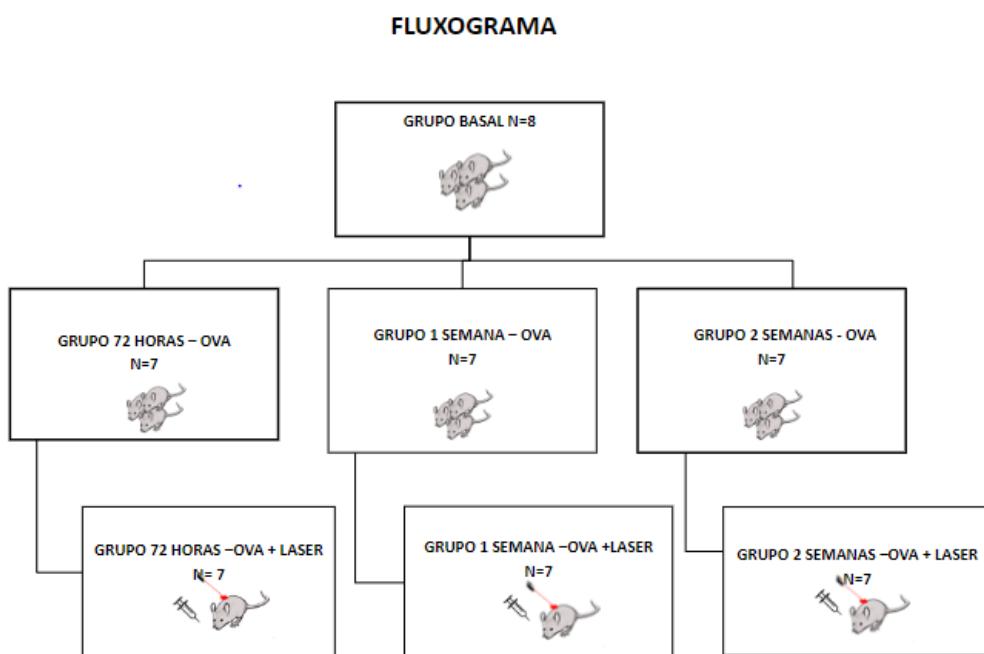


Figura 3. Fluxograma com os grupos experimentais. Fonte: própria

3.3 Tamanho da amostra

Foram utilizados 50 camundongos (Balb/C) fêmeas para o projeto, com o tamanho amostral calculado com base nos estudos de Silva et al. (2014) e de Brito et al. (2022)^{40,42}. A amostra foi dividida em dois conjuntos experimentais, de forma a permitir a realização do protocolo experimental em momentos distintos. Na primeira parte do estudo, os animais foram distribuídos em 7 grupos experimentais: o grupo basal foi composto por 8 animais, e

os outros grupos contaram com 7 animais cada.

3.4 Randomização

Neste estudo foi utilizado 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 Ovoalbumina (OVA), foi baseado no estudo de RIGONATO-OLIVEIRA et al 2019¹⁴, e constituiu as 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 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 (Grupo 2s), 4 semanas (Grupo 1s) e 3 semanas (Grupo 72h). Para esse procedimento os animais serão 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 será realizada a instilação de OVA (Figura 4).

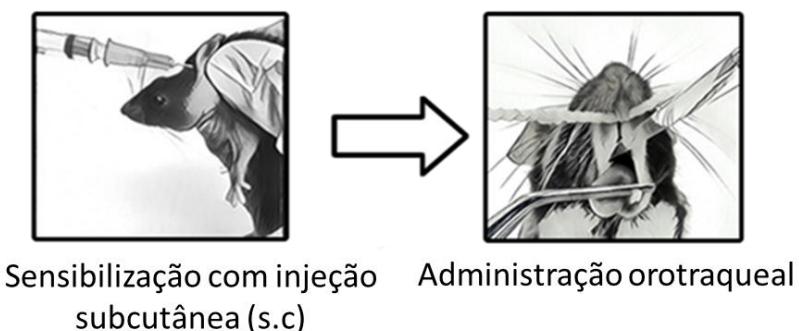


Figura 4. Demonstração de sensibilização e administração orotraqueal (o.t.) de OVA.

3.6.2 Terapia com FBM

A TFBM foi baseada no estudo de RIGONATO-OLIVEIRA et al 2019¹⁴, então os animais foram irradiados com um laser de diodo CW *Continuous Wave* (Onda Contínua) (Figura 5), com potência de 100 mW e comprimento de onda de 660nm irradiando uma área de 0,045 J/cm² com 3J de energia. Uma hora após o primeiro desafio (Grupo OVA+L), 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). Após a primeira irradiação com laser os animais continuaram a receber o desafio antigênico com OVA até o dia da eutanásia (72h, 1 ou 2 semanas).

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos do laser em baixa intensidade.

Energia Radiante (J)	3J
Comprimento de onda (nm)	660
Largura espectral	± 20
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média (mW)	100 mW
Exposição radiante (J/cm²)	66
Área do feixe no alvo (cm²)	0,045
Tempo de exposição (s)	30 s
Frequência	Única
Pontos de aplicação	3 Pontos
Técnica de Aplicação	1cm 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

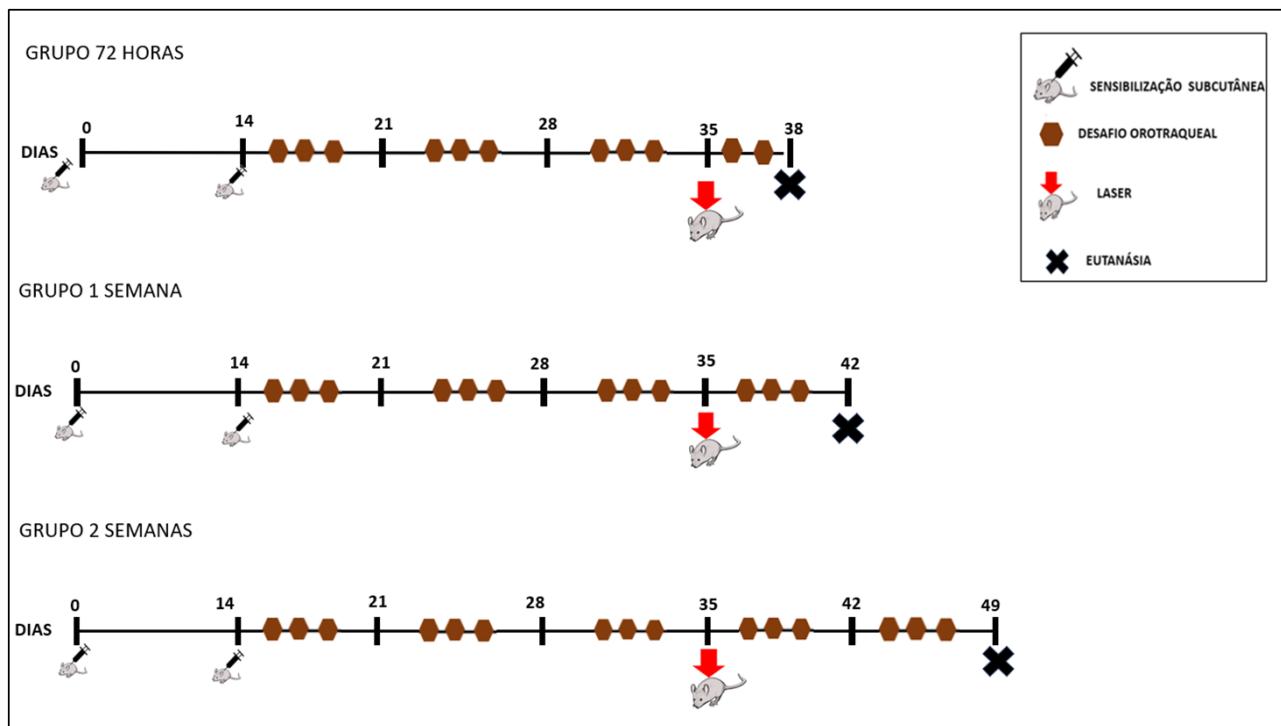


Figura 7. Desenho experimental.

3.7 Eutanásia

Cada grupo foi submetido à aplicação da anestesia com injeção intraperitoneal (i.p.) 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 os pulmões lavados com 3 x 0,5 ml de tampão fosfato salino (PBS).

O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1600 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante será armazenado a -70°C para análise das citocinas por meio de ELISA. O botão celular foi ressuspensiondo em 1 ml de tampão fosfato salino (PBS) e utilizado para a determinação do número de células totais no LBA realizado por meio de contagem na Câmara de Neubauer. (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2010)^{44,45,46} O restante do material ressuspensiondo foi utilizado para preparação de lâminas de cytospin. Foram utilizados 200µl de amostra de cada animal para contagem diferencial das células, centrifugadas por 10 minutos, 450 rpm no equipamento de modelo Cytospin-2, Shandon Instruments Sewickley, PA. As lâminas foram coradas através da técnica de coloração Instant Prov: 1) colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov I, deixar por 10 segundos, retirar e deixar escorrer por 5 segundos. (2) Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov II, deixar por 10 segundos, retirar e deixar escorrer por 5 segundos. (3) Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov III, deixar por 20 segundos, retirar, deixar escorrer por 5 segundos e lavar as lâminas em água corrente. Após a coloração 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial.

3.8.2 Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA

Os níveis de IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ no sobrenadante do 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). A quantificação das citocinas foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.8.3 Avaliação do remodelamento das vias aéreas através da histomorfometria

Os pulmões foram fixados em formaldeído 10% sob pressão constante de 20 cmH₂O por 24h. O material foi colocado em parafina para confecção das lâminas histológicas para posterior marcação específica pela técnica de histoquímica (Theodoro et al., 2017).

Com o intuito de avaliar os efeitos da terapia sobre a proporção de fibras colágenas na parede das vias aéreas e produção de muco, os pulmões esquerdos foram coletados, fixados em formalina 10% e embebidos em parafina, cortes de 4 μ m de espessura serão realizados e as lâminas coradas com Picrossírius para detecção das fibras de colágeno, ácido periódico de schiff (PAS) para detecção de muco. Foram analisadas 15 vias aéreas de cada animal. A análise quantitativa foi realizada através da técnica morfométrica e os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software Image Pró Plus (versão 4.5, NIH, Maryland, EUA).

3.9 Análise estatística

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).

4. Desfecho

No painel A observamos que os grupos OVA em todos os tempos analisados (72h, 1s e 2s), apresentam um aumento significativo no total de células recuperadas do LBA em relação ao grupo Basal. Por outro lado, verificamos que os grupos OVA+PBM (72h, 1s e 2s), apresenta uma redução significativa no total de células recuperadas do LBA comparados aos respectivos grupos OVA (Figura 8A).

Já no painel B, notamos aumento significativo do número de eosinófilos recuperados do LBA nos grupos OVA (72h, 1s e 2s) quando comparados ao grupo Basal. Por outro lado, os grupos OVA+PBM (72h, 1s e 2s), demonstraram uma redução significativa na contagem de eosinófilos recuperados do LBA em relação aos respectivos grupos OVA (Figura 8B).

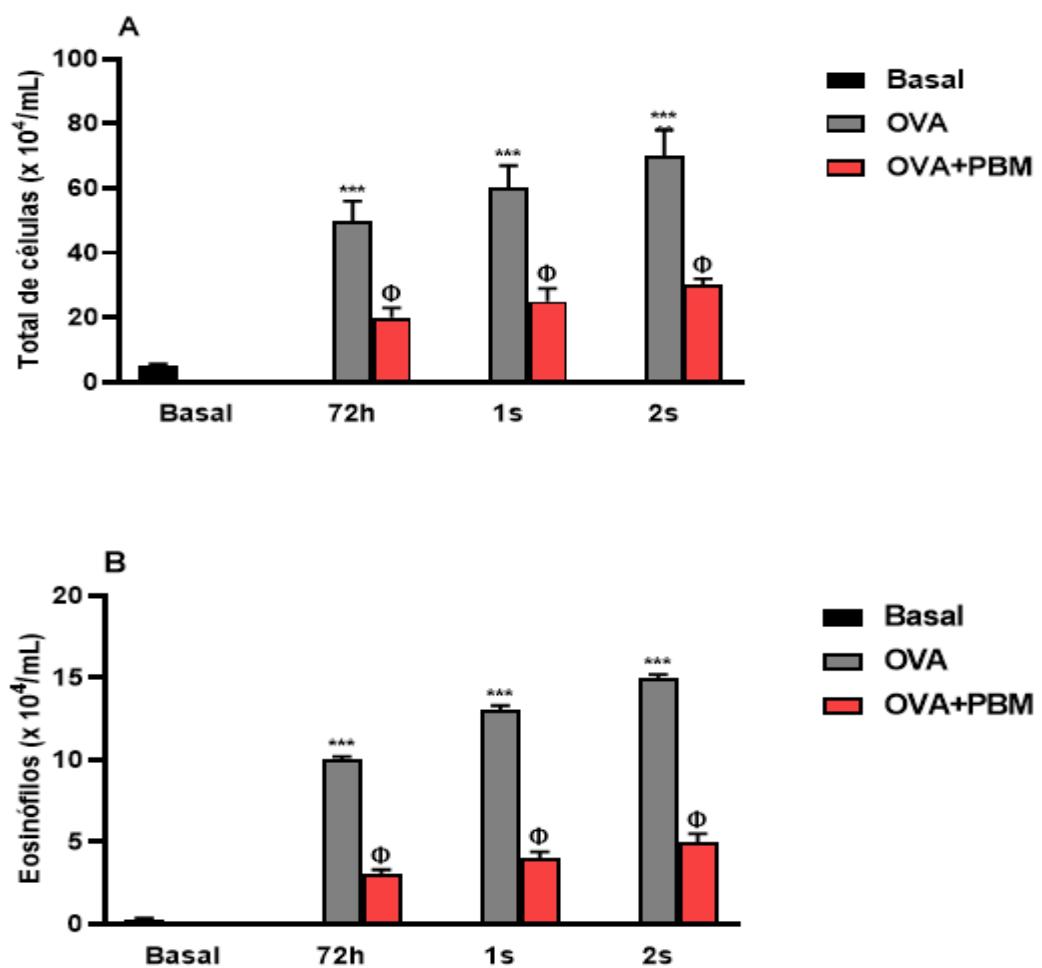


Figura 8. Durabilidade do efeito da TFBM sobre o número de células totais (A) e eosinófilos (B) recuperadas do LBA. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA 72h, OVA 1s e OVA 2s (animais desafiados com OVA e sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio), OVA 72h+FBM, OVA 1s+FBM e OVA 2s+FBM (animais desafiados com OVA, irradiados com laser, sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio). Os resultados foram expressos em média \pm SEM de 5-8 animais por grupo. *** p<0,001 em relação ao grupo Basal; f p<0,001 em relação ao respectivo grupo OVA.

Na figura 9 (Painel A), observamos aumento significativo nos grupos OVA em todos os tempos estudados (72h, 1s e 2s) na contagem de macrófagos recuperados do LBA em relação ao grupo Basal. Com relação aos grupos OVA+FBM (72h, 1s e 2s), não verificamos diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados.

No painel B, verificamos aumento significativo nos grupos OVA (72h, 1s e 2s), no número de linfócitos recuperados do LBA em comparação ao grupo Basal. Por outro lado, observamos uma redução significativa na contagem de linfócitos recuperados do LBA nos grupos OVA+FBM em todos os tempos estudados (72h, 1s e 2s) quando comparados aos respectivos grupos OVA (Figura 9B).

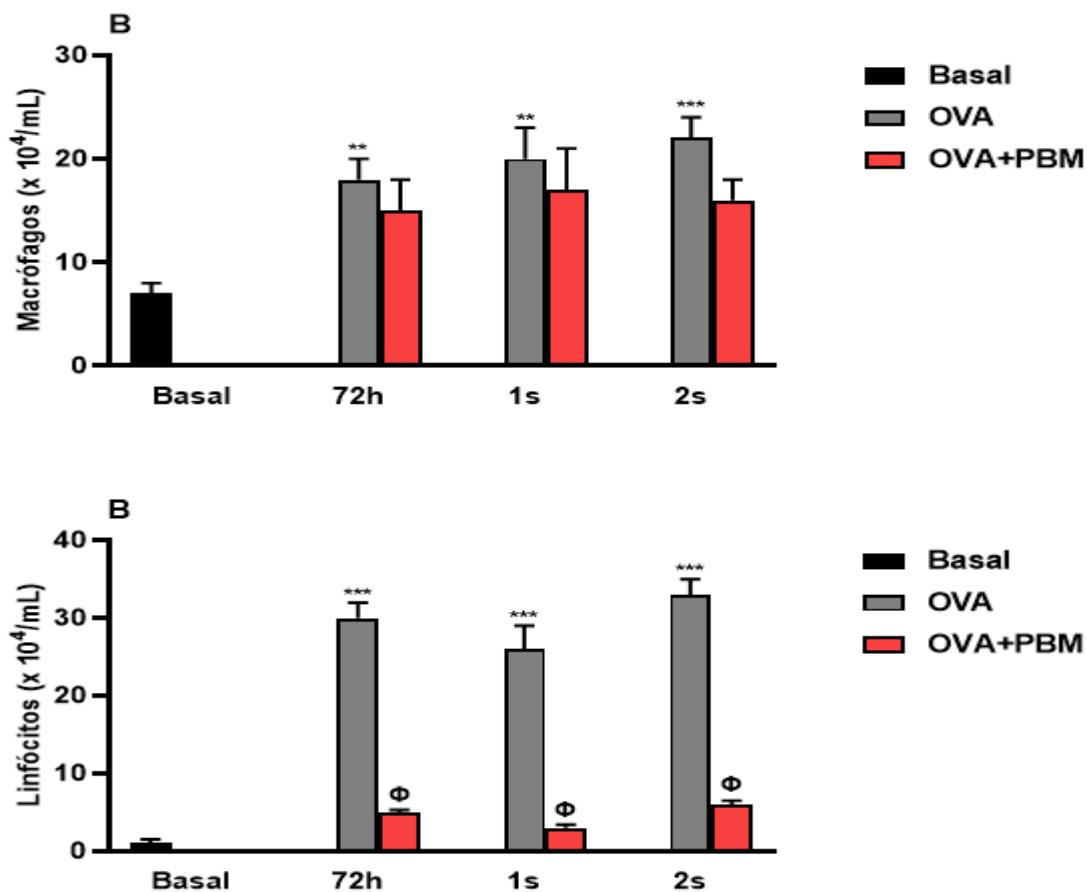


Figura 9. Durabilidade do efeito da TFBM sobre o número macrófagos (A) e linfócitos (B) recuperadas do LBA. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA 72h, OVA 1s e OVA 2s (animais desafiados com OVA e sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio), OVA 72h+FBM, OVA 1s+FBM e OVA 2s+FBM (animais desafiados com OVA, irradiados com laser, sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio). Os resultados foram expressos em média ± SEM de 5-8 animais por grupo. ** p<0,01; *** p<0,001 em relação ao grupo Basal; f p<0,001 em relação ao respectivo grupo OVA.

A figura 10 (Painel A), verificamos aumento dos níveis de IL-4 no sobrenadante do LBA dos grupos OVA (72h, 1s e 2s) em todos os tempos analisados em relação ao grupo Basal. Por outro lado, verificamos redução dos níveis dessa citocina no sobrenadante do LBA nos grupos OVA+PBM (72h, 1s e 2s) quando comparados aos respectivos grupos OVA.

No painel B, observamos aumento dos níveis de IL-5 no sobrenadante do LBA nos grupos OVA em todos os tempos analisados (72h, 1s e 2s) em comparação ao grupo Basal. Por outro lado, os grupos OVA+PBM (72h, 1s e 2s) apresentam redução significativa dos níveis de IL-5 em relação aos respectivos grupos OVA (Figura 10B).

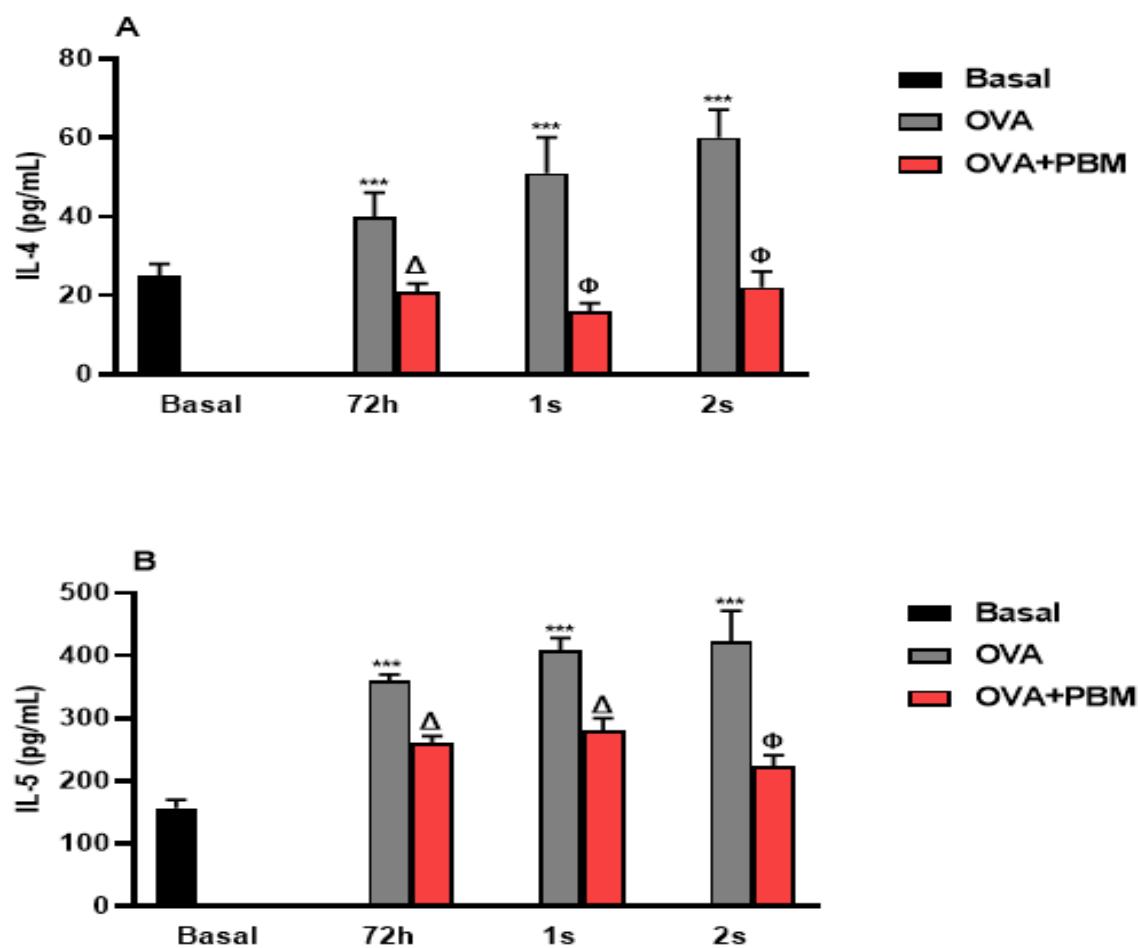


Figura 10. Durabilidade do efeito da TFBM sobre os níveis de IL-4 (A) e IL-5 (B) no sobrenadante do LBA. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA 72h, OVA 1s e OVA 2s (animais desafiados com OVA e sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio), OVA 72h+FBM, OVA 1s+FBM e OVA 2s+FBM (animais desafiados com OVA, irradiados com laser, sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio). Os resultados foram expressos em média ± SEM de 5-8 animais por grupo. *** p<0,001 em relação ao grupo Basal; D p<0,05; f p<0,001 em relação ao respectivo grupo OVA.

Na figura 11, observamos aumento nos níveis de IL-1 β (Painel A), TNF- α (Painel B) e IL-17 (Painel C) no sobrenadante do LBA nos grupos OVA em todos os tempos analisados (72h, 1s e 2s) em relação ao grupo Basal. Por outro lado, verificamos redução significativa nos níveis de IL-1 β (Painel A) e IL-17 (Painel C) no sobrenadante do LBA nos grupos OVA+PBM (72h, 1s e 2s) quando comparados aos respectivos grupos OVA. No entanto, não verificamos nenhuma diferença significativa nos níveis de TNF- α nos grupos OVA+FBM em nenhum dos tempos avaliados (Figura 11B).

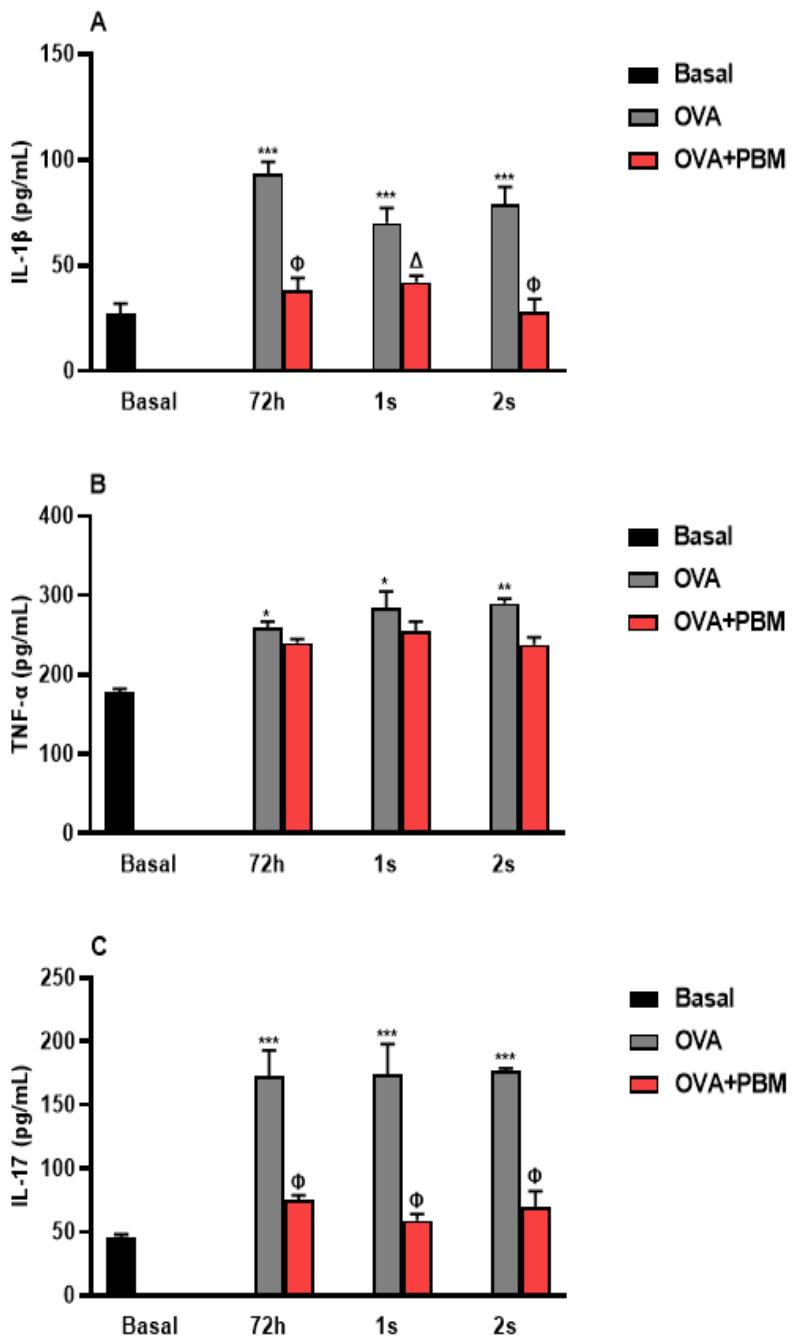


Figura 11. Durabilidade do efeito da TFBM sobre os níveis de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-17 (C) no sobrenadante do LBA. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA 72h, OVA 1s e OVA 2s (animais desafiados com OVA e sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio), OVA 72h+FBM, OVA 1s+FBM e OVA 2s+FBM (animais desafiados com OVA, irradiados com

laser, sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio). Os resultados foram expressos em média \pm SEM de 5-8 animais por grupo. *** p<0,001 em relação ao grupo Basal; D p<0,05; f p<0,001 em relação ao respectivo grupo OVA.

Não verificamos nenhuma diferença estatística nos grupos OVA em nenhum período avaliado com relação aos níveis de IL-10 no sobrenadante do LBA (Figura 12A). No entanto, observamos aumento significativo de IL-10 no sobrenadante do LBA nos grupos OVA+FBM em todos os tempos analisados (72h, 1s e 2s) em relação aos respectivos grupos OVA.

Já na figura 12 (Painel B) verificamos aumento significativo nos níveis de IFN- γ no sobrenadante do LBA nos grupos OVA em todos os tempos analisados (72h, 1s e 2s) em comparação ao grupo Basal. Por outro lado, os grupos OVA+PBM (72h, 1s e 2s) apresentam níveis reduzidos de IFN- γ no sobrenadante do LBA em relação aos respectivos grupos OVA.

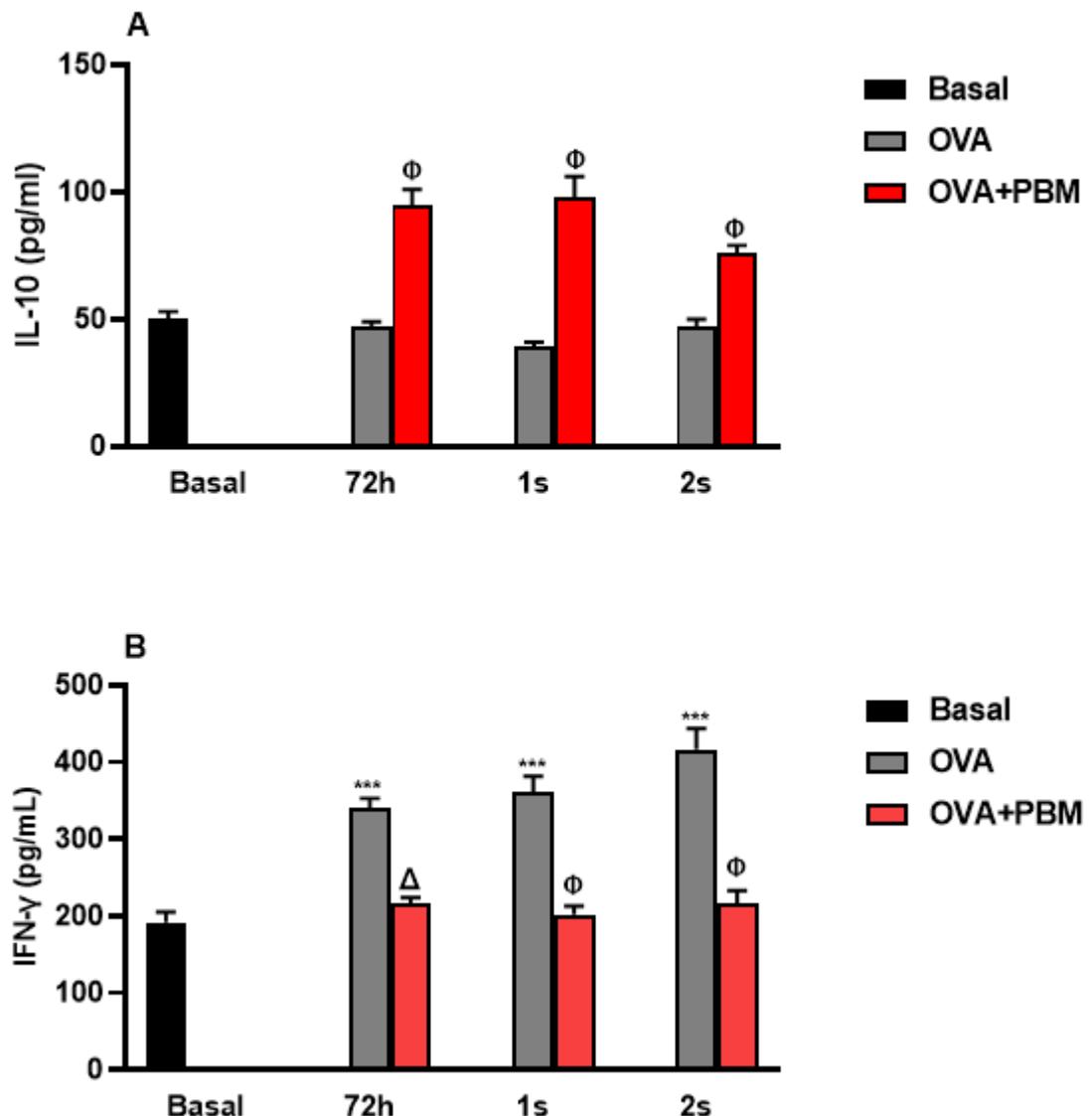


Figura 12. Durabilidade do efeito da TFBM sobre os níveis de IL-10 (A) e IFN- γ (B) no sobrenadante do LBA. Os grupos usados no estudo foram Basal (não manipulados), OVA 72h, OVA 1s e OVA 2s (animais desafiados com OVA e sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio), OVA 72h+FBM, OVA 1s+FBM e OVA 2s+FBM (animais desafiados com OVA, irradiados com laser, sacrificados após 72h, 1 semana e 2 semanas do último desafio). Os resultados foram expressos em média \pm SEM de 5-8 animais por grupo. *** p<0,001 em relação ao grupo Basal; D p<0,05; f p<0,001 em relação ao respectivo grupo OVA.

5.BIBLIOGRAFIA

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2024 update [Internet]. 2024 May 24 [cited 2024 Sep 8]. Available from: https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2024/05/GINA-2024-Strategy-Report-24_05_22_WMS.pdf
2. Silva EC de F. Asma Brônquica. Rev Hosp Univ Pedro Ernesto, UERJ. 2008;7(Jul-Dez).
3. Kudo M, Ishigatubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. Front Microbiol. 2013 Sep 10;4:263. doi: 10.3389/fmicb.2013.00263. PMID: 24032029; PMCID: PMC3768124.
4. Seeley, RR.; Stephens, TD.; Tate P. Patologia do Aparelho Respiratório: Asma. In: Anatomia e Fisiologia. 6 ed. 2003. p. 864–865.
5. Organização Mundial da Saúde (OMS). Asma. Genebra: OMS; 2023 [citado em 22 set 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/asthma>.
6. Wills TA, Soneji SS, Choi K, et al. E-cigarette use and respiratory disorders: an integrative review of converging evidence from epidemiological and laboratory studies. Eur Respir J 2021; 57: 1901815.
7. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Programa da Iniciativa Global para a Asma (GINA) A carga global da asma: resumo executivo do relatório do Comitê de Disseminação da GINA. Alergia. 2004; 59 :469–78.
8. DE BRITO, A. A. et al. Custo da asma grave no Brasil e impacto econômico para as famílias. Jornal Brasileiro de Pneumologia, [S. l.], v. 47, n. 6, 2021 Disponível em: <https://cdn.publisher.gn1.link/jornaldepneumologia.com.br/pdf/jbp2021-0273PT637713659788378351.pdf>.
9. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. J Bras Pneumol. 2006 Nov;32(Suppl 7) doi: 10.1590/S1806-37132006001100002.
10. Barnes, Peter & Jonsson, B & Klim, J.B.. (1996). The cost of asthma. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 9. 636-42. 10.1183/09031936.96.09040636.

11. Campos, HS. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide Asthma. Rev Bras Pneumol Sanit. 2007;15(1):47–60.
12. Gregory LG e Lloyd CM (2011). Orquestrando alergia associada a ácaros da poeira doméstica no pulmão . Trends Immunol. 32 , 402-411. 10.1016/j.it.2011.06.006.
13. Piuvezam, M. R, et al. Implantação do modelo experimental da síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas no laboratório de imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018, <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/17654>.
14. Rigonato-Oliveira NC, de Brito AA, Vitoretti LB, de Cunha Moraes G, Gonçalves T, Herculano KZ, Alves CE, Lino-Dos-Santos-Franco A, Aimbre F, Vieira RP, Ligeiro de Oliveira AP. Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Pulmonary Inflammation in Asthma Induced by House Dust Mite (HDM): Dosimetry Study. Int J Inflam. 2019 Mar 21;2019:3945496. doi: 10.1155/2019/3945496. PMID: 31015955; PMCID: PMC6448342.
15. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. Clin Exp Allergy. 2009 Sep;39(9):1314-23. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03301.x. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19538496.
16. Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. Lancet. 2015;386(9998):1086-96.
17. Reis AP, Machado JAN. Biomarcadores e imunobiológicos na asma. Arq Asma Alerg Imunol. 2018;2(4):405-415.
18. Arruda LK, Md , Phd , Brom L, Md , Mendonça TN, et al. Terapia anti IL-4/IL-13: revolução no tratamento da asma, dermatite atópica e rinossinusite crônica com polipose nasossinusal?. Braz J Allergy Immunol. 2015;3(3):71-76.
19. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest. 1999;103(6):779–788. doi: 10.1172/JCI5909.
20. E. Anatriello, M. Cunha, J. Nogueira, J.L. Carvalho, A.K. Sá, M. Miranda, H. Castro-Faria-Neto, A.C. Keller, F. Aimbre. Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45.10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2

cytokines and STAT6/T-bet, *Cellular Immunology*, volume 341, 2019, ISSN 0008-8749, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103928>.

21. Koulis A, Robinson DS. The anti-inflammatory effects of interleukin- 10 in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2000;30:747-50.
22. Campos Hisbello S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróideAsthma: its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid. *Rev. Bras. Pneumol. Sanit. [Internet]*. 2007 Dez [citado 2024 Set 28] ; 15(1): 47-60. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-32582007000100007&lng=pt.
23. Mesquita Júnior D. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Med*. 2010 Nov 12;67(5):52-64. doi: 10.1590/S0482-50042010000500008.
24. Campos HS. Asthma: its origins, inflammatory mechanisms and the role of the corticosteroid. *Rev Bras Pneumol Sanit*. 2007;15(1):9-16,<http://scielo.iec.gov.br/pdf/rbps/v15n1/v15n1a07.pdf>.
25. Boulet LP. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Opin Pulm Med*. 2018 Jan;24(1):56-62. doi: 10.1097/MCP.0000000000000441. PMID: 29076828.
26. Capítulo III - tratamento. *J Pneumol*. 2002 Jun;28 (Suppl 1) doi: 10.1590/S0102-35862002000700006.
27. Wendell SG, Fan H, Zhang C. G Protein-Coupled Receptors in Asthma Therapy: Pharmacology and Drug Action. *Pharmacol Rev*. 2020 Jan;72(1):1-49. doi: 10.1124/pr.118.016899. PMID: 31767622; PMCID: PMC6878000.
28. Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). The anti-inflammatory effects of glucocorticoids: basic mechanisms and clinical relevance. *Endocrine Reviews*, 26(5), 309-332
29. Mester A, Mester A. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903-1984). *Photomed Laser Surg*. 2017 Aug;35(8):393-394. doi: 10.1089/pho.2017.4332. PMID: 28783466.

30. Barbosa LS, et al. The photobiomodulation (658, 830 and 904nm) on wound healing in histomorphometric analysis. *Fisioter Mov.* 2020;33 doi: 10.1590/1980-5918.033.AO18.
31. Elseify MY, Mohammed NH, Alsharkawy AA, Elseoudy ME Acupuntura a laser no tratamento da asma brônquica infantil. *Journal of complementary and integrative medicine* . 2013; 10
32. Dabbous OA, Soliman MM, Mohamed NH, et al. Avaliação do efeito de melhora da bioestimulação da acupuntura a laser em crianças asmáticas pelo nível de biomarcador inflamatório exalado de óxido nítrico. *Lasers in Medical Science* . 2017; 32 (1):53–59. doi: 10.1007/s10103-016-2082-9.
33. Rigonato-Oliveira NC, de Brito AA, Vitoretti LB, de Cunha Moraes G, Gonçalves T, Herculano KZ, Alves CE, Lino-Dos-Santos-Franco A, Aimbre F, Vieira RP, Ligeiro de Oliveira AP. Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Pulmonary Inflammation in Asthma Induced by House Dust Mite (HDM): Dosimetry Study. *Int J Inflam.* 2019 Mar 21;2019:3945496. doi: 10.1155/2019/3945496. PMID: 31015955; PMCID: PMC6448342.
34. David AC, Zamuner SR. Semina cienc. biol. saude. 2021;42(2):236-42. Disponível em: LILACS, ID: biblio-1293205. Biblioteca responsável: BR512.1. Localização: BR512.1.DOI: 10.5433/1679-0367.2021v42n2p235
35. De Brito AA, Herculano KZ, de Alvarenga-Nascimento CR, Estefano-Alves C, Duran CCG, Marcos RL, Silva Junior JA, Chavantes MC, Zamuner SR, Aimbre F, Lladó-Pelfort L, Gubern A, Fàbrega A, da Palma RK, Ligeiro de Oliveira AP. Effect of photobiomodulation in the balance between effector and regulatory T cells in an experimental model of COPD. *Front Med (Lausanne)*. 2024 Jun 5;11:1347517. doi: 10.3389/fmed.2024..
36. NEGRI LB, SANTOS L, MARTINS A, et al. Photobiomodulation combined with photodynamic therapy using ruthenium phthalocyanine complexes in A375 melanoma cells: Effects of nitric oxide generation and ATP production. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019 Sep;198:8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.01.007. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134419300399>.
37. KARU TI. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2014 Mar-Apr;20(2):6. doi: 10.1109/JSTQE.2013.2287795. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/6558290>.

38. De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3):7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
39. Moshage H. Photobiomodulation in regenerative medicine. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019;191:52-60.
40. 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
41. MORAES GD, SILVA F, COSTA M, et al. Low-level laser therapy reduces lung inflammation in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease involving P2X7 receptor. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8. doi:10.1155/2018/1234567
42. DE BRITO AA, SILVA JF, LIMA C, 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;12:11. doi:10.3389/fimmu.2021.768123.
43. GUERRA MB. Efeito da fotobiomodulação em modelo experimental in vitro da síndrome de sobreposição de asma e DPOC [dissertação]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho; 2022.
44. Yoshizaki K, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, et al. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol.* 2010;22(7):610-617.
45. APL de Oliveira, HV Domingos, G Cavriani, AS Damazo, et al. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung
46. Ligeiro de Oliveira AP, Oliveira-Filho RM, da Silva ZL, Borelli P, Tavares de Lima W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. *Neuroimmunomodulation.* 2003;11(1):20-27

ANEXOS

- CEUA
- CHECKLIST

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- α , IL-1 β , 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- κ B (intacto e fosforilado), das MMP-9 e MMP-12, TIMP-1 e TIMP-2, bem como, a avaliação da mecânica pulmonar e hipersensibilidade 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	
TOTAL:							916

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 μ g e 10 μ 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)

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 imuno-histoquímica, 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/12h 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 dose 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

CHECKLIST

Tópico	Nº item	Recomendação	Pag. que consta esse item no seu projeto	
Desenho do estudo	1	<p>Para cada experimento, descrever os detalhes resumidos do desenho do estudo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não for usado, deve ser justificado. - A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada ou uma gaiola de animais) 	25	<p>O que fazer: estabelecer os grupos experimentais que serão usados no estudo, número de animais por grupos e períodos de análise.</p> <p>Como fazer: 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>Ex:</p> <pre> graph TD A[Animais] --> B[Grupo controle] A --> C[Grupo 1 tratado] A --> D[Grupo 2 tratado] </pre>
Tamanho da amostra	2a	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.	25	<p>O que fazer: completar o fluxograma</p> <p>Como fazer: 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>
	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.	25	<p>O que fazer: explicar o cálculo</p> <p>Como fazer: 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>O que fazer: Verificar se existem critérios de inclusão e exclusão dos animais nos grupos experimentais.</p> <p>Como fazer: Incluir os critérios de inclusão e exclusão, se aplicável.</p>
	3b	Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dadas não foram incluídas na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente.		

Tópico	Nº item	Recomendação	Pag. que consta esse item no seu projeto	
Desenho do estudo	1	<p>Para cada experimento, descrever os detalhes resumidos do desenho do estudo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não for usado, deve ser justificado. - A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada ou uma gaiola de animais) 	25	<p>O que fazer: estabelecer os grupos experimentais que serão usados no estudo, número de animais por grupos e períodos de análise.</p> <p>Como fazer: 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>Ex:</p> <pre> graph TD A[Animais] --> B[Grupo controle] A --> C[Grupo 1 tratado] A --> D[Grupo 2 tratado] </pre>
Tamanho da amostra	2a	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.	25	<p>O que fazer: completar o fluxograma</p> <p>Como fazer: 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>

			25	<pre> graph TD A[Animais (n total)] --> B[Grupo controle (n=X)] A --> C[Grupo 1 tratado (n=x)] A --> D[Grupo 2 tratado (n=X)] </pre>
	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.	25	<p>O que fazer: explicar o cálculo</p> <p>Como fazer: 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>O que fazer: Verificar se existem critérios de inclusão e exclusão dos animais nos grupos experimentais.</p> <p>Como fazer: Incluir os critérios de inclusão e exclusão, se aplicável.</p>
	3b	Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dadas não foram incluídas na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente.		

Procedimentos experimentais	9	<p>Para cada grupo experimental, incluindo os grupos controles, descreva os procedimentos, com detalhes suficientes, para permitir que outros repitam o procedimento realizado, incluindo</p>	30	<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"> - O que foi feito (cirurgia, intervenção), como foi feito (procedimento, referência seguida) e o que foi utilizado (materiais e reagentes) - Quando e com que frequência - Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimatação) - Por que (justifique os procedimentos); - Incluir timeline (momentos do experimento desde alocação em grupos, períodos de análise e tratamentos utilizados)  <p>Ex: O procedimento cirúrgico para indução 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"> - Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade, quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude) - Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança 	32	<p>O que fazer: incluir de forma detalhada a análise estatística dos resultados obtidos.</p> <p>Como fazer: 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>