

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAELLA ROCHA FIGUEIREDO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO
PULMONAR EM RATOS**

ALFENAS/MG

2024

RAFAELLA ROCHA FIGUEIREDO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO
PULMONAR EM RATOS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências aplicadas à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Josie Resende Torres da Silva

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Figueiredo, Rafaella Rocha .

Efeitos da fotobiomodulação em um modelo de lesão pulmonar em ratos
/ Rafaella Rocha Figueiredo. - Alfenas, MG, 2024.

73 f. : il. -

Orientador(a): Marcelo Lourenço da Silva.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Lesão pulmonar. 2. Terapia com luz de baixa intensidade. 3.
Inflamação experimental dos pulmões. 4. Lung injury. 5. Experimental
inflammation of the lungs. I. Silva, Marcelo Lourenço da, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

RAFAELLA ROCHA FIGUEIREDO

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR EM RATOS

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutorem Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: 19 de janeiro de 2024.

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso
UFMT

Profa. Dra. Ravena Carolina de Carvalho
Instituição: Marinha do Brasil

Profa. Dra. Carolina Kosour
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Lourenço da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 07:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1172645** e o código CRC **6AEFE6BD**.

AGRADECIMENTOS

Quando olho para toda luta e esforço despenhados para chegar até esse momento meu coração se enche de alegria e gratidão. Agradeço primeiramente à Deus, sem Ele nada seria possível, pois “TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE”. Agradecer aos meus familiares pelo apoio durante essa jornada, em especial ao meu esposo Samuel Henrique Tavares Mendes por todo amparo, amor e incentivo, aos meus pais Marcos José de Souza Figueiredo e Mona Lyza Rocha Figueiredo por serem sempre minha base e por acreditarem em mim, aos meus irmãos Marcos José de Souza Figueiredo Júnior e Izabella Rocha Figueiredo que estiveram ao meu lado, por fim gostaria de agradecer pela minha filha Isis, que está a caminho e já vai fazer parte desse momento tão importante da minha vida.

Ao meu orientador Marcelo Lourenço da Silva e minha coorientadora Josie Rezende Torres da Silva por todo aprendizado, vocês foram meus mestres e minhas referências como profissionais e principalmente como seres humanos, obrigada por acreditarem em mim e no meu potencial, por me guiarem e por nunca me deixarem desistir. Aos meus colegas/amigos do laboratório LANNED, vocês fazem parte dessa conquista, sem o auxílio e companheirismo de todos vocês eu não teria chegado até aqui.

Gostaria de entender meus agradecimentos também a Universidade Federal de Alfenas, que me acolheu quando tinha apenas 18 anos no ano de 2009, e quantas histórias eu vivi dentro dessa universidade, graduação, mestrado e agora o tão sonhado doutorado, se hoje sou a profissional que sou devo muito a essa instituição, minha eterna gratidão.

Agradeço também às instituições parceiras que financiaram a pesquisa PIB-Pós e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – número do financiamento 001 - CAPES.

RESUMO

Introdução: A fotobiomodulação tem capacidade de modular a resposta inflamatória, reduzindo o infiltrado de células do sistema imune. Sua potencial ação de redução do processo inflamatório poderia ser usada como adjuvante no tratamento da síndrome do desconforto respiratório agudo, umas das principais causas de internações hospitalares. **Objetivo:** Analisar como a fotobiomodulação atua no recrutamento de neutrófilos, citocinas, mecânica ventilatória, atividade da Mieloperoxidase e histologia do tecido pulmonar em um modelo de inflamação pulmonar aguda em ratos. **Métodos** 288 ratos Wistar machos tiveram a lesão pulmonar induzida por Lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* através da instilação traqueal e posteriormente foram submetidos a radiação LED 430 nm, Laser 660 nm e Laser 880 nm. Após 24 horas os animais foram ventilados mecanicamente para análise da resistência, viscância, elastância e histesividade e o pulmão retirado para análise. **Resultados:** Dentre as fototerapias utilizadas, o laser vermelho 660 nm foi a única capaz de reduzir todas as variáveis da mecânica ventilatória, bem como a atividade da mieloperoxidase, marcadores inflamatórios na análise do RT-QPCR com repercussão visível na análise da histologia pulmonar, sendo capaz de atenuar o processo patológico da Lesão Pulmonar. O mesmo não ocorreu com a aplicação do LED que alterou somente marcadores inflamatórios e com o Laser infravermelho (808 nm) que foi capaz de reduzir somente o fator de necrose tumoral e interleucina seis, com repercussão no corte histológico. **Conclusão:** O Laser vermelho 660 nm foi capaz de modular o processo inflamatório reduzindo a tempestade de citocinas em animais com lesão pulmonar induzida por Lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* com repercussão na mecânica ventilatório e visível na análise da histologia pulmonar.

Palavras-chave: lesão pulmonar; terapia com luz de baixa intensidade; inflamação experimental dos pulmões.

ABSTRACT

Introduction: Photobiomodulation has the capacity to modulate the inflammatory response, reducing the infiltration of immune system cells. Its potential action to reduce the inflammatory process could be used as an adjuvant in the treatment of acute respiratory distress syndrome, one of the main causes of hospital admissions.

Objective: To analyze how photobiomodulation acts on the recruitment of neutrophils, cytokines, ventilatory mechanics, Myeloperoxidase activity and lung tissue histology in a model of acute lung inflammation in rats. **Methods:** 288 male Wistar rats had lung injury induced by Escherichia Coli Lipopolysaccharide through tracheal instillation and were subsequently subjected to 430 nm LED, 660 nm Laser and 880 nm Laser radiation. After 24 hours, the animals were mechanically ventilated to analyze resistance, viscosity, elastance and hysteresivity and the lung was removed for analysis.

Results: Among the phototherapies used, the 660 nm red laser was the only one capable of reducing all variables of ventilatory mechanics, as well as the activity of myeloperoxidase, inflammatory markers in the RT-QPCR analysis with visible repercussions in the analysis of lung histology, being capable of attenuating the pathological process of Lung Injury. The same did not occur with the application of LED, which only changed inflammatory markers, and with the infrared laser (808 nm), which could reduce only tumor necrosis factor and interleukin six, with repercussions on the histological section. **Conclusion:** The 660 nm red laser was able to modulate the inflammatory process by reducing the cytokine storm in animals with lung injury induced by Escherichia Coli Lipopolysaccharide, with repercussions on ventilatory mechanics and visible in the analysis of lung histology.

Keywords: lung injury; low intensity light therapy; experimental inflammation of the lungs.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Resultados dos valores de resistência pulmonar obtidos por meio avaliação da ventilação mecânica, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).....	27
Gráfico 2-	Resultados dos valores de viscância pulmonar obtidos por meio avaliação da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).....	28
Gráfico 3-	Resultados dos valores de elastância pulmonar obtidos por meio avaliação da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).....	29
Gráfico 4-	Resultados dos valores de histeresividade pulmonar obtidos por meio avaliação da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$)	30
Gráfico 5-	Resultados dos valores da atividade MPO obtidos por meio análise sanguínea dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).....	30
Gráfico 6-	Resultados dos valores de RT-QPCR para os marcadores inflamatórios TNF- alfa, IL-6, IL-10 e IL- 1beta. *significância ($p < 0,05$)	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cirurgia do modelo de lesão pulmonar.....	23
Figura 2- Laser utilizado para aplicação da radiação de 660 nm e 808 nm potência útil no emissor de 100 mW e aplicação da radiação.....	24
Figura 3- Fotomicrografia das lesões pulmonares induzidas por LPS e os efeitos do de led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm, dexametasona (10 mg/kg, ip) nas alterações histopatológicas induzidas por LPS nos tecidos pulmonares de ratos. Grupo controle (Salina), grupo instilação LPS, grupo LPS + Dexametasona (DEX, 10 mg/kg, ip) e grupo LPS + fotobiomodulação (led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm)	32

LISTA DE TABELAS

Tabela1- Relação dos animais distribuídos em seus respectivos grupos.....	19
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia Coli</i>
PEEP	Pressão expiratória final
SARS	Síndrome respiratória grave
COVID	Corona vírus disease
OMS	Organização Mundial da Saúde
IL6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL1- β	Interleucina 1 beta
IL	Interleucina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alfa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LILT	<i>Low Intensity Laser Therapy</i>
NO	Óxido nítrico
PBM	Fotobiomodulação
RT-QPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
MPO	Atividade da mieloperoxidase
VEI	Veículo salina
PBS	Tampão fosfato-salino
DEXA	Dexametazona
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 MÉTODOS	19
2.1 TAMANHO DA AMOSTRA.....	19
2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	21
2.3 RANDOMIZAÇÃO	21
2.4 CEGAMENTO	21
2.5 MEDIDA DE RESULTADOS	22
2.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS	22
2.7 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	22
2.8 MODELO DE LESÃO PULMONAR.....	23
2.9 PROTOCOLOS DE LILT E LED.....	23
2.10 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR	24
2.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE	25
2.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR)	266
2.13 HISTOLOGIA DO TECIDO PULMONAR	26
3 RESULTADOS.....	27
3.1 RESISTÊNCIA DAS VIAS AÉREAS	27
3.2 VISCÂNCIA TECIDUAL	28
3.3 ELASTÂNCIA TECIDUAL	28
3.4 HISTERESIVIDADE	29
3.5 ATIVIDADE MPO	30
3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR)	31
3.7 HISTOLOGIA DO TECIDO PULMONAR	32
4 DISCUSSÃO	333
4.1 ARTIGO	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A - COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO DA TESE EM REVISTA, CONFORME REGULAMENTO DO PROGRAMA.....	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) são condições clínicas que comprometem a função dos pulmões, elas tem um espectro de gravidade crescente de lesão do tecido pulmonar definida por critérios fisiológicos, radiológicos e clínicos que acontecem devido ao dano generalizado das células e das estruturas da membrana alvéolo-capilar (MATTHAY; ZIMMERMAN; ESMON; BHATTACHARYA *et al.*, 2003; SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

Embora o termo lesão pulmonar esteja caindo em desuso em humanos em modelos animais pré-clínicos permanece aplicável, uma vez que nenhum modelo replica todos os recursos da SDRA (D'ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018).

Diferentes modelos de lesão pulmonar em animais têm sido utilizados para investigação dos mecanismos envolvidos na LPA/SDRA, os que levam a lesão direta podem ser causados por administração via intraqueal, intraoral ou intranasal. Os agentes de lesão mais comuns incluem lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* (LPS), ácidos, bactérias (vivas ou mortas pelo calor) e vírus. A hiperóxia também pode causar lesão pulmonar direta. Em comparação, a lesão pulmonar indireta pode ser induzida por injeção intravenosa de LPS, ligadura e punção cecal, choque hemorrágico e isquemia e reperfusão mesentérica (D'ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018).

Após a instilação de LPS assim como em humanos a resposta inflamatória tem início rápido após o insulto, com lesão do parênquima pulmonar e comprometimento das trocas gasosas, embora exista uma baixa probabilidade de encontrar todas as alterações em um modelo animal de LPA, a escolha do modelo deve ser guiada pelo objetivo principal da pesquisa (MATUTE-BELLO; DOWNEY; MOORE; GROSHONG *et al.*, 2011), quando administrado via intratraqueal a endotoxina de bactéria gram-negativa LPS simula uma pneumonia, sendo capaz de reproduzir a lesão da membrana alvéolo capilar (BECK-SCHIMMER; SCHWENDENER; PASCH; REYES *et al.*, 2005).

As principais características desse modelo são lesão tecidual acentuada evidenciada nas primeiras horas, caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos no interstício e no espaço alveolar seguida de espessamento e edema da parede alveolar (FONSECA, 2015).

Estudos sugerem que a LPA/SDRA é responsável por cerca de 10% das admissões em unidades de terapia intensiva sendo que 23% desses pacientes necessitam de suporte ventilatório com uma mortalidade de até 45% nos casos da síndrome grave (GRASSELLI; CALFEE; CAMPOROTA; POOLE *et al.*, 2023), sendo considerada uma das principais causas de insuficiência respiratória aguda com alto índice de mortalidade e morbidade em pacientes críticos (MATTHAY; ZIMMERMAN; ESMON; BHATTACHARYA *et al.*, 2003; MOKRA, 2020). As sequelas deixadas aos pacientes que sobrevivem à LPA/SDRA são importantes, como redução da qualidade de vida, fraqueza muscular, maior ocorrência de polineuropatia, miopatias e estenose traqueal, além de contraturas musculares dentre outras (MATTHAY; ZIMMERMAN; ESMON; BHATTACHARYA *et al.*, 2003; SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

A chamada Classificação de Berlim em 2012 definiu a SDRA em 3 categorias, tendo como base a hipoxemia e o nível de PEEP, sendo a Lesão Pulmonar considerada a SDRA leve e as demais em SDRA moderado e grave (GRASSELLI; CALFEE; CAMPOROTA; POOLE *et al.*, 2023; MOKRA, 2020). Desde tal definição, os conhecimentos da medicina permitiram avanços com relação ao desenvolvimento da SDRA, como métodos não invasivos para avaliar critérios de oxigenação, uso de oxigênio nasal de alto fluxo para tratamento da Insuficiência Respiratória hipoxêmica grave onde esses pacientes não atendem à definição de Berlim, diante de algumas limitações foram propostas mudanças em uma conferência de consenso global em junho de 2021. A nova definição global de SDRA traz como base as evidências atuais da prática clínica, onde pacientes tratados com cateter nasal de alto fluxo a 30 L/min devem ser incluídos na SDRA, saturação de oxigênio poder ser verificada por oximetria de pulso podendo ser usada em vez da gasometria arterial para diagnóstico, o ultrassom poderá ser utilizado para obtenção de imagens quando a radiografia de tórax ou a tomografia computadorizada não estiver disponível (MATTHAY; ARABI; ARROLIGA; BERNARD *et al.*, 2024).

A LPA/SDRA é definida pela exposição a um insulto conhecido de forma direta (pulmonar) ou indireta (extrapulmonar). Na lesão pulmonar direta o estímulo atinge as estruturas pulmonares desencadeando uma resposta imune inata pela ligação de produtos bacterianos ou moléculas endógenas associadas a lesões celulares a receptores padrão no epitélio pulmonar e macrófagos alveolares, iniciando assim a resposta inflamatória aguda (MOKRA, 2020).

São várias as doenças que podem desencadear tal síndrome incluindo pneumonias virais (vírus influenza A ou rinovírus), bacterianas (*Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*), aquelas decorrentes da ventilação mecânica, produtos químicos (cloro, fosgênio e aerossóis industriais), cigarros eletrônicos, já as lesões consideradas indiretas podem ocorrer por lesão cerebral aguda, sepse, pancreatite aguda dentre outras (MOKRA, 2020; SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

A cascata inflamatória em resposta ao insulto é o ponto principal da patogênese da LPA/SDRA, após o evento agressor a inflamação faz com que ocorra um aumento da permeabilidade dos vasos capilares pulmonares e conseqüentemente dano alveolar difuso (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022), os macrófagos entram em contato com o patógeno dando início a resposta imune pulmonar (PARDO; SELMAN; BIOLOGY, 2021), representando cerca de 95% dos leucócitos presentes do espaço aéreo (FAN; FAN, 2018).

Posteriormente a lesão, os macrófagos passam por uma transição para fenótipos M1 pró-inflamatórios secretando assim citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-6, IL-1) e quimiocinas (IL-8, CCL7, CCL2), que por sua vez aumentam a quimiotaxia fazendo com que os espaços alveolares fiquem enriquecidos por monócitos e neutrófilos (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

Os neutrófilos por sua vez liberam inúmeros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio e proteinases que destroem o surfactante, as membranas basais e a barreira epitélio-endotelial (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022). Embora a ativação de neutrófilos seja essencial para a defesa do hospedeiro, sua ativação excessiva acarreta danos nos tecidos por liberação de agentes ativadores de células citotóxicas e imunes, que passam a secretar elastases que digerem o tecido e ativam algumas metaloproteinases teciduais (MATTHAY; ZEMANS; ZIMMERMAN; ARABI *et al.*, 2019; SATHE; MOSTAGHIM; BARNES; O'CONNOR *et al.*, 2023).

O dano ao epitélio alveolar é um dos fatores determinantes da LPA/SDRA, contribuindo para interrupção das funções da barreira epitélio alveolar, favorecendo a permeação de várias proteínas no espaço alveolar o que contribui para o edema pulmonar (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022). Os eventos envolvidos na fisiopatologia da síndrome podem ser divididos em fases, sendo a exsudativa que

apresenta uma duração de 1 a 3 dias caracterizada por extravasamento de líquidos e proteínas (edema do interstício e do alvéolo), fase proliferativa após 48 horas do início do insulto indo até o 6º dia caracterizado por migração de neutrófilos, fibroblastos e produção de mais mediadores químicos e a fase fibrótica que acontece após 7º dia, nessa fase é onde acontece a fibrose pulmonar com hipoxemia severa (GRASSELLI; CALFEE; CAMPOROTA; POOLE *et al.*, 2023).

Mesmo com os avanços da medicina no entendimento da LPA/SDRA ainda carecemos de farmacoterapia eficaz que aumente a sobrevida desses pacientes, sendo necessários mais estudos com esse objetivo (FAN; FAN, 2018; MOKRA, 2020).

Os tratamentos recentes estão focados nos anti-inflamatórios, reduzindo a “tempestade de citocinas”, controle dos sintomas como correção de hipoxemia com administração de oxigênio suplementar e suporte ventilatório. Por tanto são necessários mais estudos que busquem intervenções mais ativas, seguras e eficazes no controle da inflamação pulmonar de pacientes com LPA/SDRA. (LIU; XIAO; XIE, 2022).

Os avanços na tecnologia da luz e a evolução da fotobiomodulação (PBM) através de pesquisas e novas tecnologias, permitiram a ciência descobrir os efeitos benéficos da vários espectros de luz - em particular luz violeta/azul, emitidas por diodo emissor de luz (*Light Emitting Diode*, LED) e luz vermelha e infravermelha, emitidas por laserterapia de baixa intensidade (*Low Intensity Laser Therapy*, LILT) (ENWEMEKA; BUMAH; MASSON-MEYERS; BIOLOGY, 2020).

Até o presente momento, sabemos que a luz azul (espectro de 400-470 nm) possui ação antimicrobiana contra numerosas bactérias, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, e tem o potencial para abrandar infecções bacterianas oportunistas como as associadas à COVID-19 e outras infecções por coronavírus. A luz vermelha e a infravermelha (espectro de 600 a 700 nm e 700–1000 nm, respectivamente) têm o potencial de reduzir a inflamação pulmonar, fibrose e, portanto, a SDRA (YE; LIU; PATHOLOGY, 2020).

A inativação dos microrganismos por luz visível acontece baseada nas reações de oxidação fotossensibilizadoras, que requerem normalmente três componentes, o cromóforo (denominado fotossensibilizador), luz e oxigênio. Após a absorção da luz, a energia luminosa é convertida em potencial de oxigenação que pode danificar as

biomoléculas dos microrganismos (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022).

É possível que a oxidação fotossensibilizada possa neutralizar os agentes causadores da SDRA e de outras causas de lesão pulmonar, desempenhando papel no controle de tais doenças, no entanto não há dados disponíveis sobre a relação fotodinâmica na inativação ou controle das mesmas e quais comprimento de ondas são mais indicados (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022).

A PBM vem sendo cada vez mais estudada devido seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, dados recentes sugerem que os fótons emitidos podem interagir com fotorreceptores existentes nos tecidos resultando no transporte de elétrons de forma mais efetiva na cadeia respiratória mitocondrial resultando em aumento da produção de trifosfato de adenosina (KLEBANOV; KREININA; POLTANOV; KHRISTOFOROVA *et al.*, 2001). Os canais iônicos sensíveis a luz absorvem os fótons, fazendo com que a concentração dos íons cálcio intracelular aumente, esse processo ativa as vias de sinalização por espécie reativas de oxigênio, adenosina monofosfato cíclico, óxido nítrico e cálcio, influenciando o processo celular e conseqüentemente a inflamação com liberação de histamina e produção de prostaglandina (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021).

Dados demonstram que a PBM possui a capacidade também de regeneração tecidual, além de reduzir marcadores inflamatórios como neutrófilos de forma eficaz ao mesmo tempo que promove proliferação de colágeno na área afetada. No entanto tais efeitos são dependentes das especificidades dos parâmetros e dos comprimentos de onda escolhidos (DE OLIVEIRA MARTINS; MARTINEZ DOS SANTOS; EVANY DE OLIVEIRA; DE BRITTO *et al.*, 2013; PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022), muitos estudos utilizam diferentes comprimentos de onda, descrevendo os resultados com relação a penetração de lasers ao tecido sendo possível identificar algumas particularidades como laser infravermelho ser mais eficaz para analgesia e o vermelho ter melhor penetração no tecido pulmonar (ASH; DUBEC; DONNE; BASHFORD, 2017; NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021).

Diante de tais efeitos a PBM poderia ser usada como terapia adjuvante, ou mesmo terapia alternativa operando nesses mecanismos, podendo reduzir o processo inflamatório decorrente da LPA/SDRA e conseqüentemente melhorar o prognóstico

da síndrome.

Esse trabalho se justifica pois os resultados encontrados com experimentação animal poderão incentivar estudos futuro clínicos onde os benefícios oriundos da PBM poderiam reduzir a gravidade da SDRA, repercutindo diretamente não somente na sobrevida dos pacientes, mas também na redução do tempo de internação e necessidade de suporte ventilatório.

Por fim o objetivos do estudo é investigar como a PBM poderia modular o processo inflamatório em um modelo agudo de lesão pulmonar induzida por LPS, e qual seria o comportamento do recrutamento de células inflamatórias bem como influência sobre a mecânica ventilatória, atividade MPO e histologia do tecido pulmonar em animais.

2 MÉTODOS

O presente estudo seguiu as recomendações do ARRIVE (Guidelines for Reporting Animal Research) para experimentação animal) (PERCIE DU SERT; HURST; AHLUWALIA; ALAM *et al.*, 2020).

2.1 TAMANHO DA AMOSTRA

Os animais foram distribuídos em grupos de forma aleatória, a relação do número de animais e os grupos experimentais foram dispostos na forma de tabela.

Tabela 1 - Relação dos animais distribuídos em seus respectivos grupos.

(Continua)

Grupos	Animais
Mecânica ventilatória e histologia	VEÍCULO/SHAM 8
	VEÍCULO/LED 430 8
	VEÍCULO/LASER 660 NM 8
	VEÍCULO/LASER 808 NM 8
	VEÍCULO/VEÍCULO 8
	VEÍCULO/DEXA 8
	LPS/SHAM 8
	LPS/LED 430 8
	LPS/LASER 660 8
	LPA/LASER 808 NM 8
	LPS/VEÍCULO 8
	LPS/DEXA 8
Atividade MPO	VEÍCULO/SHAM 8
	VEÍCULO/LED 430 8

Tabela 1- Relação dos animais distribuídos em seus respectivos grupos.

(Continuação)

Grupos	Animais
	VEÍCULO/LASER 808 NM 8
	VEÍCULO/VEÍCULO 8
	VEÍCULO/DEXA 8
	LPS/SHAM 8
	LPS/LED 430 8
	LPS/LASER 660 8
	LPA/LASER 808 NM 8
	LPS/VEÍCULO 8
	LPS/DEXA 8
RT-QPCR	VEÍCULO/SHAM 8
	VEÍCULO/LED 430 8
	VEÍCULO/LASER 660 NM 8
	VEÍCULO/LASER 808 NM 8
	VEÍCULO/VEÍCULO 8
	VEÍCULO/DEXA 8
	LPS/SHAM 8
	LPS/LED 430 8
	LPS/LASER 660 8
	LPA/LASER 808 NM 8
	LPS/VEÍCULO 8
	LPS/DEXA 8

Tabela 1- Relação dos animais distribuídos em seus respectivos grupos.

(Conclusão)

Total 288

Perdas

Grupos		Animais
Mecânica ventilatória e histologia	LPS/LED 430	3
	LPS/LASER 660	2
	LPA/LASER 808 NM	3
	LPS/SHAM	1
Total		9

Fonte: Autor, 2024.

2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo ratos da espécie Wistar, machos de 7 a 8 semanas de vida, com peso entre 250 a 300g, em condições fisiológicas normais sem anormalidades físicas. Os animais foram excluídos se não apresentassem peso corporal e idade dentro do descrito, bem como se eles apresentassem alguma alteração fisiológica.

2.3 RANDOMIZAÇÃO

Neste estudo, os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: veículo/SHAM, veículo/LED, veículo/laser 660nm; veículo/laser 808 nm, veículo/veículo, veículo/DEXA, LPS/sham, LPS/LED 430 nm, LPS/laser 660 nm, LPS/laser 808 nm, LPS/Veículo e LPS/DEXA.

2.4 CEGAMENTO

O cegamento dos pesquisadores aconteceu no momento das análises dos marcadores inflamatórios, ventilação mecânica e histologia pulmonar, por esse motivo

o mesmo não tinha conhecimento de qual grupo o animal pertencia, não sofrendo influência de tal fato.

2.5 MEDIDA DE RESULTADOS

Após a instilação com LPS os animais foram avaliados com relação mecânica ventilatória após a instilação de PBS ou do LPS. Para isso os animais foram ventilados com volume corrente (V_t) de 6 ml.kg^{-1} , frequência respiratória de 120 min^{-1} e pressão expiratória final positiva (PEEP) de $3,0 \text{ cmH}_2\text{O}$, a atividade da mieloperoxidase foi realizada por meio da análise dos pulmões bem como a histologia pulmonar e a reação em cadeia da polimerase em tempo real que foram realizadas usando SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen, Life Technologies) no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com primers específicos sintetizados pela Síntese Biotecnologia (SAHU; MISHRA; LAL, 2020).

2.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi assegurada por métodos paramétricos utilizando análise de variância de duas vias (two-way) seguida de pós-teste de Bonferroni. Para cada análise, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism version 6.0).

2.7 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados, 288 ratos machos, de linhagem Wistar, mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os animais foram mantidos sob condições normais (gaiolas de acrílico, com a temperatura entre $18\text{-}21^\circ \text{C}$, $55\text{-}60\%$ de umidade relativa, e ciclos de 12 horas claro/escuro). Com ração padrão e água disponível até o dia do experimento, seguindo as normas éticas preestabelecidas.

Os aspectos éticos bem como as normas que regulamentam a utilização de animais em laboratório elaborados pela Comissão de Ética Experimentação em

Animal da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL foram adotadas e seguidas rigorosamente, o presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL com o registro nº 21/2020.

2.8 MODELO DE LESÃO PULMONAR

Os animais foram anestesiados através da administração por via intraperitoneal, utilizando-se uma solução de cetamina 10 mg/kg (Ketamina®) e 100mg/kg xilasina (Dopaser®). A região da traqueia foi tricotomizada e limpa e, após uma incisão na pele, a musculatura foi afastada para exposição da traqueia (D'ALESSIO, 2018; LI; DONG; ZHANG; GAO *et al.*, 2019) (Figura 1).

A lesão pulmonar foi induzida por instilação de LPS de *Escherichia coli* (Sigma, 2 mg/kg) ou veículo (PBS) na traqueia entre os anéis de cartilagem, utilizando um scalp calibre 27 G. Após instilação, a incisão cervical foi fechada com fio de sutura de seda 4.0, durante o retorno da anestesia foi ofertado calor para evitar a hipotermia dos animais. Para o tratamento controle positivo, foi proposto o tratamento com glicocorticóide nos animais, onde foi administrados dexametasona (1 mg/kg, por via oral, p.o.) ou tratamento Sham com PBS (0,5% de metilcelulose / 0,2% de Tween 80 p.o.) 1 hora antes da instilação de LPS (D'ALESSIO, 2018; RABELO, 2017).

Figura 1 – Cirurgia do modelo de lesão pulmonar.



Fonte: Autor, 2024

2.9 PROTOCOLOS DE LILT E LED

Após 1 hora da instilação de LPS, um grupo LPS e outro PBS foram submetidos à radiação laser ($\lambda = 660 \text{ nm}$, modelo Therapy EC, marca DMC, Brasil), outro grupo LPS e outro PBS submetidos a radiação radiação laser ($\lambda = 808 \text{ nm}$, modelo Therapy EC, marca DMC, Brasil) ambos com a potência útil no emissor de 100 mW, na fluência de 9 J/cm^2 , por 90 segundos, com o tamanho do ponto de $0,06 \text{ cm}^2$.

Também após 1 hora da instilação, outro grupo LPS e PBS foram submetidos à radiação LED ($\lambda = 430 \text{ nm}$, modelo D-2000, marca DMC), com potência útil no emissor de 900 mW, em modo contínuo, por 30 segundos, com o tamanho do ponto de $1,00 \text{ cm}^2$.

Todos os animais foram irradiados na pele sobre a porção lateral do esterno próximo a região anatômica do lobo superior direito (DE LIMA; NAVES; MACHADO; ALBERTINI *et al.*, 2009).

Figura 2 - Laser utilizado para aplicação da radiação de 660 nm e 808 nm potência útil no emissor de 100 mW e aplicação da radiação.



Fonte: Autor, 2024.

2.10 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR

Para a medida da mecânica respiratória em 24 horas após a instilação de LPS e PBS, os animais foram pré-anestesiados com xilazina $8 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.p.}$ (Anasedan, Ceva, Brasil) anestesiados com pentobarbital $40 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.p.}$ (Nembutal, OAK, EUA) e receberam analgésico Cloridrato de tramadol $30 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.p.}$ (Tramal, Grumenthal, Brasil).

Foi realizada a traqueostomia para a inserção de uma cânula de metal (14G), fixada na traqueia do animal por meio de fios de algodão, a qual foi conectada ao ventilador (Ventstar – RWD) (AOKI, 2013).

Os animais foram ventilados com volume corrente (V_t) de 6 ml.kg^{-1} , frequência respiratória de 120 min^{-1} e pressão expiratória final positiva (PEEP) de $3,0 \text{ cmH}_2\text{O}$.

Após iniciada a ventilação, os animais foram paralisados com brometo de pancurônio ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, i.p.) e depois de 5 minutos, foi obtido os valores de resistência das vias aéreas (R_{aw}) que representa a dificuldade da passagem do ar pelas vias aéreas, viscosidade tecidual (G_{tis}) que está relacionada à resistência do tecido e reflete a dissipação da energia e elastância, elastância tecidual (H_{tis}) que representa a dificuldade em expandir os compartimentos alveolares e histeresividade (η) que é obtido a partir do cálculo entre resistência e elastância (BATES, 2009).

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados para remoção dos pulmões e processamento de demais análises.

2.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Fragmentos dos pulmões pesando 300-350 mg de cada amostra armazenada a -80°C foram triturados, um a um, com lâmina de bisturi em placa de Petri sobre gelo com a adição de solução tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 6,0).

A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 30 min a 4°C . O sedimento foi ressuspenso com tampão fosfato de potássio contendo 5 % de brometo de hexadeciltrimetil amônio (Sigma, St Louis, EUA). A suspensão sofreu 3 ciclos de congelamento (congelado em gelo seco e descongelado em temperatura ambiente). No último descongelamento, a suspensão foi sonificada (amplitude de 20-30%) por 40 s em gelo.

As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4°C , e os sobrenadantes utilizados para o ensaio de MPO, em duplicatas. Foi utilizado um kit de ensaios (Rat MMP-17, ELISA, Kit) para determinar a atividade de MPO dos homogenatos, conforme instruções do fabricante. A absorbância de cada amostra foi medida utilizando um leitor de microplaca equipado para excitação de 560 nm. Os resultados foram expressos em mUg^{-1} .

2.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

As amostras de pulmão foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen, Life Technologies), conforme as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® 2000, Thermo Scientific). Foram utilizadas somente as amostras que apresentarem uma relação de absorção (260/280 nm) entre 1,8 e 2.

As amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen, Life Technologies) para evitar contaminação com DNA genômico. Todas as soluções foram preparadas em água tratada com DEPC (0,01%). O nível de transcrição dos genes de interesse (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) foi determinado mediante RT-qPCR. Para a síntese do cDNA foi usado o kit SuperScript® IV First-Strand Synthesis.

O teste inicial dos primers foi feito por PCR convencional usando Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix. O teste de eficiência dos primers e as reações de qPCR foram realizadas usando SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen, Life Technologies) no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com primers específicos (SAHU; MISHRA; LAL, 2020) sintetizados pela Síntese Biotecnologia (<https://sintesebiotecnologia.com.br/idt.html>).

As reações foram feitas em 8 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas e os resultados foram normalizados pelos níveis de transcrição do gene referência GAPDH. Os níveis de transcrição foram determinados pelo método $2(-\Delta\Delta Ct)$ (Applied Biosystems, User bulletin#2 e Livak & Schmittgen) (YE; LIU; PATHOLOGY, 2020).

2.13 HISTOLOGIA DO TECIDO PULMONAR

O tecido pulmonar foi removido para análise da histopatologia, sendo colocado em formaldeído a 4% e, em seguida, embutido em parafina. Colorações de hematoxilina e eosina (H&E) foram realizadas utilizando um procedimento padrão e fotografadas com um microscópio de luz. Foram avaliados o grupo controle no qual sofreu a instilação de PBS na traqueia, grupo lesão pulmonar após o insulto com LPS, grupo LPS + Dexametasona (DEX, 10 mg/kg, ip) e grupo LPS + fotobiomodulação (led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm).

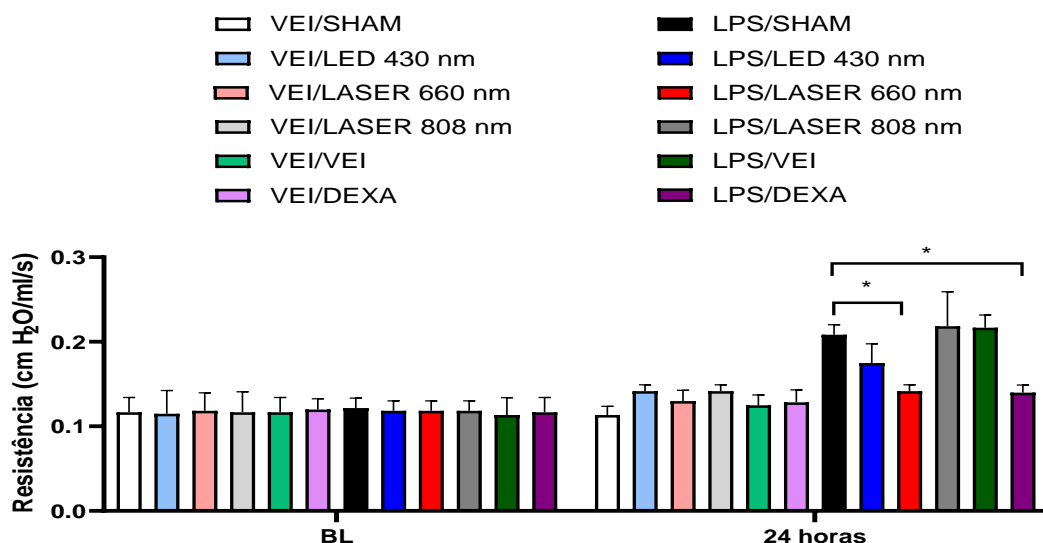
3 RESULTADOS

Os resultados encontrados foram dispostos em forma de gráficos. Todos os grupos intervenção possui um grupo controle, sendo administrado veículo de salina (PBS) ao invés de lipopolissacarídeo na traqueia, as análises foram feitas antes de 24 horas (basal) e após 24 horas da indução do LPS ou VEI.

3.1 RESISTÊNCIA DAS VIAS AÉREAS

É possível verificar que houve uma redução na resistência de forma pronunciada no grupo LPS/Laser 660 nm com diferença estatística significativa entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre os grupos LPS/SHAM e LPS/DEXA. Em contrapartida quando partimos para análise dos resultados dos grupos LPS/ Laser 808 nm e LPS/ LED 430 nm foi possível verificar que o mesmo não ocorreu. As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 224,4$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 12,09$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 17,40$, $P < 0,0001$.

Gráfico 1 - Resultados dos valores de resistência das vias aéreas obtidos por meio da análise da ventilação mecânica, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).



Fonte: Autor, 2024.

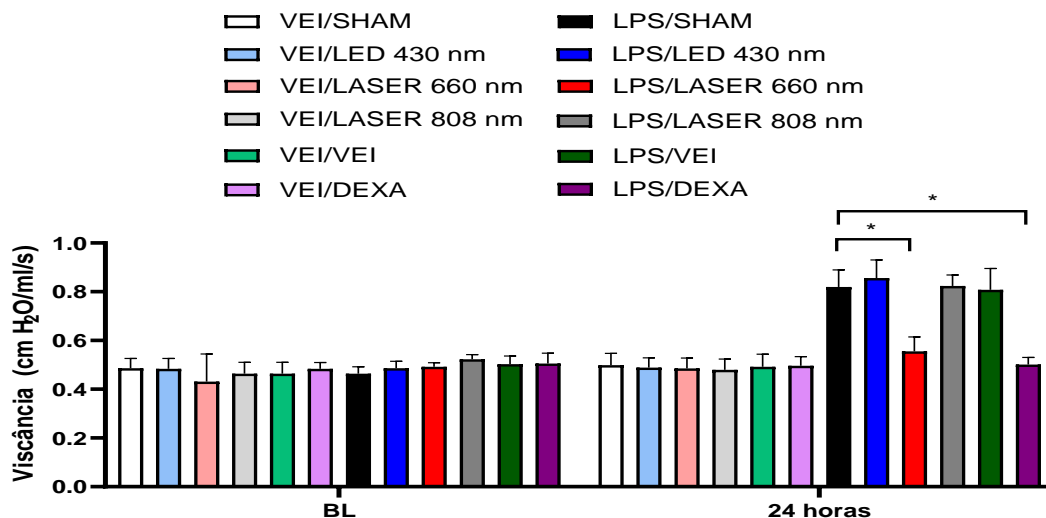
3.2 VISCÂNCIA TECIDUAL

Ao analisarmos o gráfico 2 é possível verificar que para os animais pertencentes ao grupo LPS/Laser 660nm os resultados foram promissores, visto que os valores de tal grupo (0,55 cmH₂O/ml/s) foram próximos aos do grupo LPS/DEXA (0,50 cmH₂O/ml/s) apresentando redução dos valores de viscosidade tecidual, o mesmo que ocorreu quando analisamos a resistência pulmonar.

Com $p < 0,05$ entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre os grupos LPS/SHAM e LPS/DEXA.

Em contrapartida o mesmo não foi verificado nos demais experimentos. As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 26,71$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 35,68$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 26,71$, $P < 0,0001$.

Gráfico 2 - Resultados dos valores de viscosidade tecidual obtidos por meio da análise da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).



Fonte: Autor, 2024.

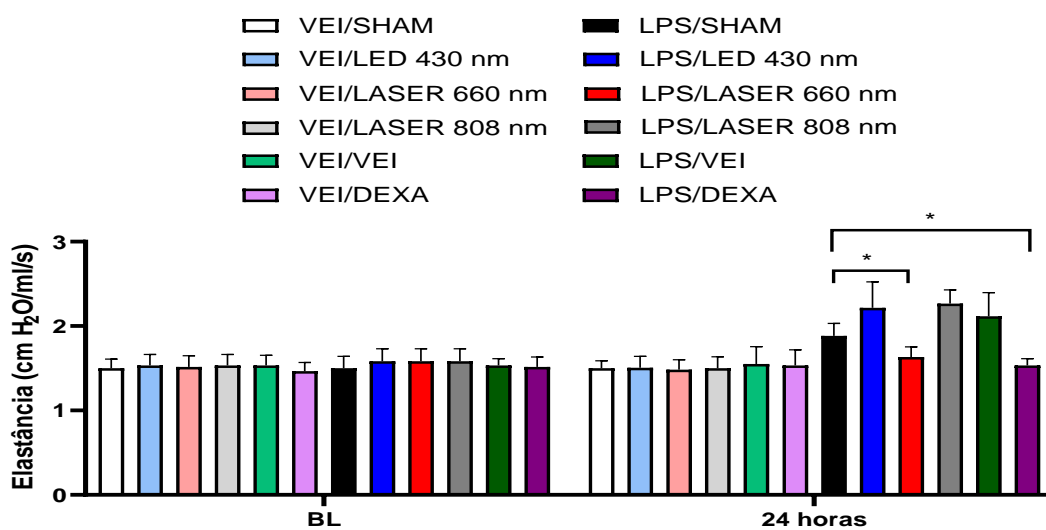
3.3 ELASTÂNCIA TECIDUAL

Com relação a elastância do tecido pulmonar no grupo LPS/Laser 660 nm os animais apresentaram valores mais baixos (1,66 cmH₂O/ml/s) e mais uma vez próximos aos valores do grupo LPS/DEXA (1,53 cmH₂O/ml/s).

Com diferença estatística significativa entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre o grupo LPS/SHAM e LPS/DEXA, fato que se repetiu nas outras variáveis da mecânica ventilatória.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 77,02$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 10,83$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 13,95$, $P < 0,0001$.

Gráfico 3 - Resultados dos valores de elastância tecidual obtidos por meio da análise da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).



Fonte: Autor, 2024.

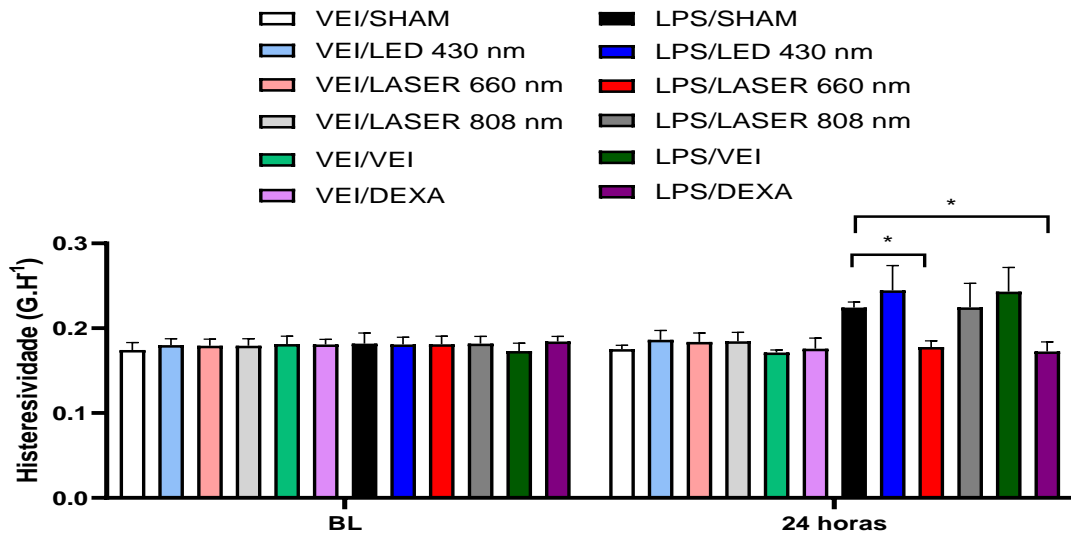
3.4 HISTERESIVIDADE

Os resultados encontrados no gráfico da histeresividade pulmonar mostra que os grupos LPS/LED e LPS/Laser 808 nm apresentaram efeitos capazes de reduzir tal parâmetro.

Todavia o Laser 660 nm exibiu um comportamento diferente, visto que ao analisarmos os animais pertencentes a esse grupo observamos valores de histeresividade menor 0,178 G.H-1. Apresentando significância estatística entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre o grupo LPS/SHAM e LPS/DEXA.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 68,73$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 12,59$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 16,61$, $P < 0,0001$.

Gráfico 4 - Resultados dos valores de histeresividade pulmonar obtidos por meio avaliação da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).

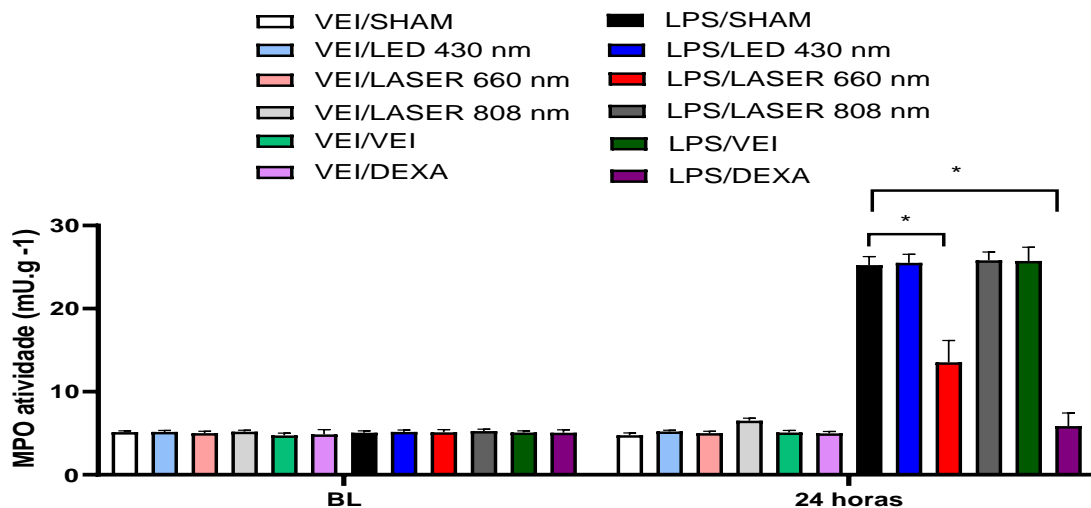


Fonte: Autor, 2024.

3.5 ATIVIDADE MPO

Para a atividade MPO verificamos que o grupo Laser 660 nm apresentou valores de MPO diminuídos com diferença estatística com $p < 0,05$ entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre o grupo LPS/SHAM e LPS/DEXA. As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 32,62$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 398,6$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 430,1$, $P < 0,0001$.

Gráfico 5 - Resultados dos valores da atividade MPO obtidos por meio análise sanguínea dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).



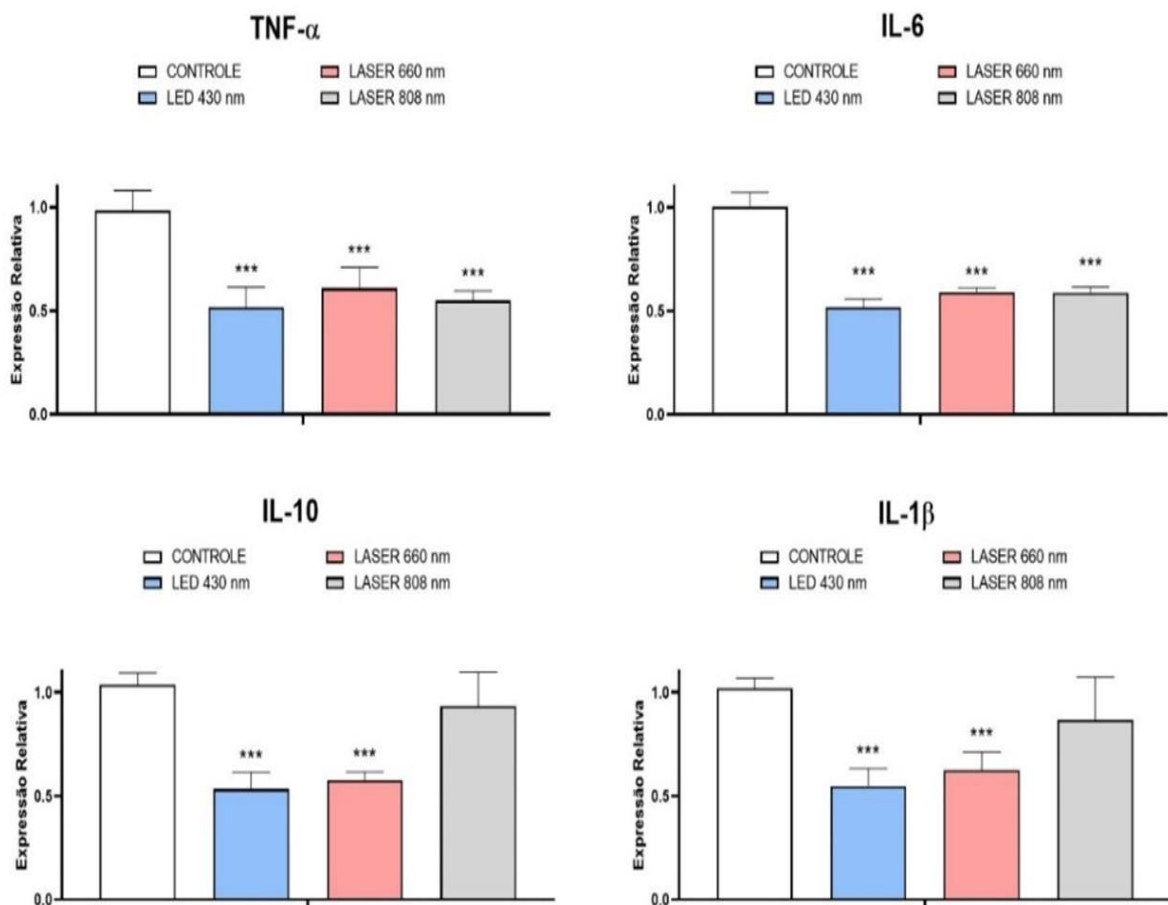
Fonte: Autor, 2024.

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

Ao analisarmos a RT- QPCR foi possível verificar que para o TNF- α a aplicação do LED, laser 660 nm e do laser 808 nm reduziu os níveis desse marcador com diferença estatística, o mesmo fato também aconteceu com a IL-6.

No entanto ao partimos para a IL-10 e IL-1 β verificamos que somente a aplicação do LED e Laser 660 nm reduziu os níveis desses marcadores com $p < 0,05$, o que não ocorreu com o laser 880 nm. As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 52,12$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 32,12$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 43,96$, $P < 0,0001$.

Gráfico 6 – Resultados dos valores de RT-QPCR para os marcadores inflamatórios TNF- alfa, IL-6, IL-10 e IL- 1beta. *significância ($p < 0,05$).



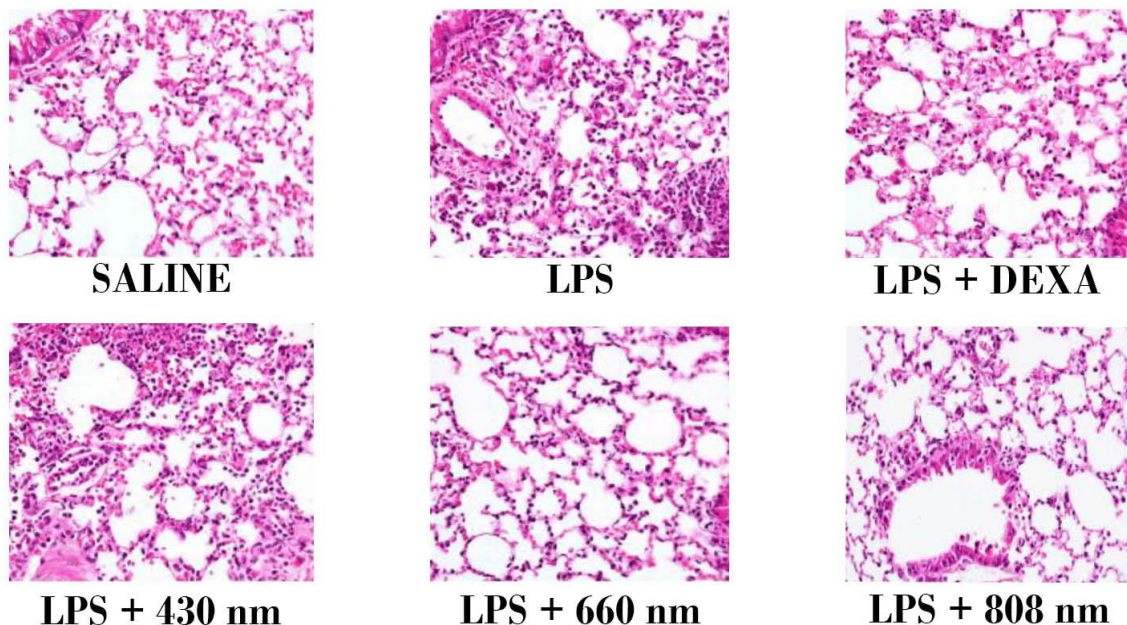
Fonte: Autor, 2024.

3.7 HISTOLOGIA DO TECIDO PULMONAR

Na análise histológica foram examinadas as alterações morfológicas dos pulmões após a indução da inflamação pulmonar com LPS. Os resultados mostraram uma arquitetura pulmonar normal no grupo de controle (PBS), enquanto no grupo LPS foram observadas alterações, como infiltração de neutrófilos em vasos pulmonares, edema no espaço intersticial da parede alveolar, indicando danos às células epiteliais alveolares.

Tais alterações foram atenuadas pelo laser 660 nm, 808 nm e pela dexametasona, indicando que o tanto o laser vermelho quanto o infravermelho amenizaram os efeitos patológicos no modelo de lesão pulmonar por LPS. A aplicação do led 430 nm não apresentou modificações na infiltração de neutrófilos e edema intersticial.

Figura 3 – Fotomicrografia das lesões pulmonares induzidas por LPS e os efeitos do de led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm, dexametasona (10 mg/kg, ip) nas alterações histopatológicas induzidas por LPS nos tecidos pulmonares de ratos. Grupo controle (Salina), grupo instilação LPS, grupo LPS + Dexametasona (DEX, 10 mg/kg, ip) e grupo LPS + fotobiomodulação (led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm).



Fonte: Autor, 2024.

4 DISCUSSÃO

O modelo de instilação com lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* (LPS), está descrito na literatura como sendo um dos mais reprodutíveis que promovem neutrofilia robusta, aveolite e ruptura da membrana alvéolo-capilar (D’ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018), tais fatos foram essenciais para escolha desse modelo de lesão pulmonar, indo ao encontro com nossos achados, visto que no grupo LPS/SHAM observamos aumento de citocinas inflamatórias e alterações da estrutura pulmonar no corte histológico após a instilação ficando mais evidente as alterações descritas acima e sua capacidade lesiva, sendo possível segundo autores avaliar as fases iniciais da LPA (D’ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018).

A fotobiomodulação (PBM) é uma possível alternativa no manejo do processo inflamatório, utilizada por promover regeneração tecidual, reduzir a inflamação e dor (CARVALHO; BRITTO; DE OLIVEIRA; CASTRO-FARIA-NETO *et al.*, 2017; PEREIRA; DE LIMA; FERNANDES; ZÂNGARO *et al.*, 2023; SIGMAN; MOKMELI; VETRICI, 2020; SOHEILIFAR; FATHI; NAGHDI, 2021), estudos descrevem que na dose certa e no comprimento de onda apropriado, a luz interage com as células e tecidos podendo induzir funções promovendo efeitos anti-inflamatórios (DE BRITO; DA SILVEIRA; RIGONATO-OLIVEIRA; SOARES *et al.*, 2020; PEREIRA; DE LIMA; FERNANDES; ZÂNGARO *et al.*, 2023) tais fatos vão ao encontro com os resultados do presente estudo visto que em um comprimento de onda específico foi possível verificar alteração da mecânica ventilatória, atividade MPO, marcadores inflamatórios que se apresentação reduzidos após a intervenção sendo possível identificar até mesmo um remodelamento do tecido pulmonar no corte histológico.

Em concordância, alguns trabalhos descrevem que a PBM quando aplicada na região dos pulmões pode reduzir não somente a inflamação local mas também a sistêmica (PEREIRA; DE LIMA; FERNANDES; ZÂNGARO *et al.*, 2023; SABINO; BALL; BAPTISTA; DAI *et al.*, 2020; YU; CHI; NAIM; LANZAFAME *et al.*, 1997) contribuindo para a melhora da mecânica ventilatória, sendo mais eficaz em células que estão sofrendo hipóxia, tal fato sugere que a terapia poderia ser mais promissora nas doenças pulmonares que comprometem as trocas gasosas como na LPA/SDRA (CAPUTO; STRAYER; LEVITAN, 2020).

Resultados semelhantes foram descritos por Méndez e colaboradores em 2019, onde a PBM demonstrou suprimir o processo inflamatório, tal fato foi comprovado a partir dos efeitos anti-inflamatórios e regenerativos encontrados nos tratamentos das doenças pulmonares (MÉNDEZ; RIZZATO; LAMARQUE; DIONISIO *et al.*, 2019; PORTO, 2021), concordando com De Lima *et al.*, que descrevem a redução da inflamação pulmonar aguda, corroborando com os achados positivos da terapia Laser 660 nm encontrados no estudo aqui exposto, bem como Oliveira e colaboradores os quais avaliaram o efeito do PBM na SDRA em um modelos com camundongos, onde foi possível observar uma correlação entre redução do processo inflamatório e aplicação da luz, sendo capaz de abrandar a gravidade da doença (OLIVEIRA JR; GREIFFO; RIGONATO-OLIVEIRA; CUSTÓDIO *et al.*, 2014).

Vários trabalhos (DA CUNHA MORAES; VITORETTI; DE BRITO; ALVES *et al.*, 2018; DE LIMA, F. M.; MOREIRA, L. M.; VILLAVERDE, A. B.; ALBERTINI, R. *et al.*, 2011) assim como o presente estudo investigaram a relação do PBM com a redução da inflamação pulmonar relatando efeitos positivos tanto na redução da inflamação pulmonar aguda e quanto crônica.

Os efeitos anti-inflamatórios segundo Nejatifard e colaboradores alcançados pela PBM na LPA/SDRA são redução do edema pulmonar, das citocinas no líquido de lavagem broncoalveolar, do influxo de neutrófilos e da atividade MPO, tais eventos foram observados neste estudo, visto que os animais pertencentes ao grupo Laser 660 nm apresentaram redução da atividade MPO e marcadores inflamatórios no PCR além de alterações visíveis ao corte histológico (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021), onde o processo patológico parece ter sido atenuados pelo laser 660 nm, 808 nm e pela dexametaxona.

A inflamação pulmonar aguda está relacionada ao aumento do número de neutrófilos polimorfonucleares presentes no espaço intersticial associado a liberação de outras células pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α . O aumento do nível, por exemplo de IL-1 β está diretamente proporcional a piora do prognóstico do paciente com SDRA, sendo responsável por aumentar a sobrevivência dos neutrófilos e prolongar o processo inflamatório. Já o TNF- α é responsável pela adesão, ativação de neutrófilos, pela coagulação sanguínea e edema (SOHEILIFAR; FATHI; NAGHDI, 2021) indo ao encontro com os resultados deste trabalho, visto que após a análise do RT-QPCR foi possível observar que depois da instilação do LPS houve um aumento

dos níveis de tais marcadores e que com a aplicação da PBM tivemos uma redução significativa, onde o LED 430 e Laser 660 nm foram capazes de reduzir todos os marcadores inflamatórios, enquanto o 808 nm apenas o TNF- α e IL-6.

Segundo autores essa capacidade anti-inflamatória acontece a nível molecular, celular e tecidual, sendo eficaz contra a tempestade de citocinas promovendo a cura e regeneração dos tecidos com repercussão sistêmica (OLIVEIRA; GREIFFO; RIGONATO-OLIVEIRA; CUSTÓDIO *et al.*, 2014).

Corroborando com os nossos achados, de Lima e colaboradores comprovam que a PBM afeta efetivamente o TNF- α , diminuindo macrófagos alveolares reduzindo conseqüentemente incidência de SDRA em camundongos, eles observaram que o TNF- α tem um papel importante no sequestro e migração de neutrófilos, desempenhando papel principal na patogênese da SDRA (DE LIMA, F. M.; MOREIRA, L. M.; VILLAVERDE, A.; ALBERTINI, R. *et al.*, 2011), achados similares foram relatados por Oliveira *et al.*, em um modelo com ratos onde a PBM diminuiu significativamente a migração de neutrófilos para o tecido pulmonar reduzindo a gravidade da doença (OLIVEIRA JR; GREIFFO; RIGONATO-OLIVEIRA; CUSTÓDIO *et al.*, 2014).

Alguns autores descrevem que a luz visível que exibe comprimento de onda na faixa de 405-470 nm apresentam efeitos microbicidas (PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022), sendo contrário ao que encontramos, visto que os animais que tiveram a aplicação do LED 430 nm, não apresentaram mudanças na mecânica ventilatória, atividade MPO nem na análise histológica do tecido pulmonar, apresentando somente redução dos marcadores inflamatórios no PCR. Deveras isso poderia ser justificado pois segundo Kingsley *et al.*, para se conseguir tal efeito é necessário uma radiação maior e por um período prolongado (KINGSLEY; KUIS; PEREZ; BASALDUA *et al.*, 2018) o que de fato não ocorreu, dado que a aplicação de LED aconteceu em uma única vez por 30 s.

Já outros trabalhos relatam que os lasers com luz vermelha são mais recomendados devido a sua melhor penetração no tecido pulmonar (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021) sendo utilizados para reduzir dor e inflamação, em concordância com estudo aqui exposto, dado que encontramos resultados significativos em todas as variáveis analisadas somente com o comprimento de onda do Laser vermelho 660 nm.

Em concordância com tais fatos, estudos descrevem que pacientes expostos a tratamento com luz vermelha apresentam melhoria do processo inflamatório (ACKROYD; KELTY; BROWN; REED *et al.*, 2001; DA-PALMA-CRUZ; DA SILVA; MONTEIRO; REHIM *et al.*, 2019; FINSEN, 1901; SIGMAN; MOKMELI; VETRICI, 2020), a PBM vem sendo utilizada como tratamento alternativo para lesão pulmonar aguda em modelos de SDRA, pela característica principal de redução da inflamação sistêmica e proteção da função pulmonar (DA-PALMA-CRUZ; DA SILVA; MONTEIRO; REHIM *et al.*, 2019; DA SILVA SERGIO; CORTES THOME; DA SILVA NETO TRAJANO; MENCALHA *et al.*, 2018; NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; SOHEILIFAR; FATHI; NAGHDI, 2021), reafirmando os achados do presente estudo onde foi possível verificar uma melhora na mecânica ventilatória, redução da atividade MPO e dos marcadores inflamatórios nos animais pertencentes ao grupo LPS/Laser 660 nm, demonstrando efeito na redução do processo inflamatório e consequentemente melhoria da função pulmonar evidenciada também pela melhoria da arquitetura pulmonar presente no corte histológico dos animais pertencentes a tal grupo.

Diante dos benefícios oriundos da PBM vários trabalhos vem relacionando tal terapia ao tratamento de doenças que levam ao processo de inflamação como LPA/SDRA, a maioria deles usando o laser vermelho (650 e 660 nm) (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; SIGMAN; MOKMELI; VETRICI, 2020), outros utilizaram lasers infravermelho com 808 nm e 830 nm ambos com efeitos anti-inflamatórios indo ao encontro com Kingsley *et al.*, que em seu estudo verificou que o laser promovia inativação de 99% dos vírus em todos os comprimentos de onda (KINGSLEY; KUIS; PEREZ; BASALDUA *et al.*, 2018), discordando dos nossos achados, visto que encontramos evidências de redução do processo inflamatório com impacto na mecânica ventilatória, atividade MPO e redução dos marcadores inflamatórios somente com Laser vermelho 660 nm, no entanto com o infravermelho não encontramos tais evidências.

Sabino e colaboradores em sua revisão sistemática descreveram que existiam 90 artigos publicados relacionando PBM e lesão pulmonar, inflamação pulmonar ou SDRA, vários deles utilizavam modelos animais para demonstrar os efeitos da luz diante dessa patologia, sendo possível argumentar a relação da penetração da luz em animais, que acontecem mais facilmente do que em humanos, isso poderia justificar

o fato de não encontrarmos efeitos positivos no grupo Laser 808 nm, pois tal comprimento de onda poderia ter penetrado, ultrapassando o local da lesão e não ter gerado modificação no tecido dos animais (SABINO; BALL; BAPTISTA; DAI *et al.*, 2020).

Em concordância, autores compararam os efeitos dos lasers infravermelho e vermelho (KINGSLEY; KUIS; PEREZ; BASALDUA *et al.*, 2018) demonstrando que o infravermelho atinge camadas mais profundas em concordância com esses achados, nossos resultados demonstraram que o laser infravermelho (808 nm) não apresentou efeito anti-inflamatório capaz de melhorar a mecânica ventilatória, reduzir a atividade MPO e marcadores inflamatórios exatamente pela característica da penetração em animais ser mais facilitada e pela profundidade do laser infravermelho.

Entretanto o estudo feito por Pereira *et al.*, demonstrou que o uso do colete infravermelho (940 nm) reduz tempo de internação e necessidade de ventilação mecânica, sugerindo que o tratamento promoveu melhorias na função pulmonar, os resultados discrepantes com o presente estudo podem ser justificados pois um foi clínico quanto que o este pré-clínico e como já mencionado o comprimento de onda parece influenciar nos desfechos positivos da PBM, assim como no estudo de Sigma e colaboradores onde a melhora da função pulmonar também foi evidenciada após a aplicação do laser infravermelho em humanos (SIGMAN; MOKMELI; MONICI; VETRICI, 2020).

No presente trabalho foi possível observar efeitos positivos com a aplicação do Laser 660 nm, nossos achados auxiliam no entendimento de que a PBM foi capaz de ter efeitos anti-inflamatórios imediatos evidenciado pela redução dos marcadores inflamatórios no PCR, sendo capaz de melhorar variáveis da mecânica ventilatória, além de reduzir a atividade MPO com repercussão na análise histológica pulmonar resultados semelhantes foram encontrados em um estudo clínico, realizado com 52 pacientes irradiados com luz vermelha de 620- 635 nm onde foi possível verificar uma redução dos níveis de IL-6 e IL-8 e TNF-alfa após 6 horas de início de tratamento, demonstrando o seu potencial anti-inflamatório (MARASHIAN; HASHEMIAN; POURABDOLLAH; NASSERI *et al.*, 2022).

Por fim nossos resultados sugerem que para animais onde a lesão pulmonar fora induzida por LPS, a aplicação da PBM por laser vermelho apresentou efeitos anti-inflamatórios evidenciados pela redução de células pró-inflamatórias sendo capaz de

gerar repercussões na mecânica ventilatória, na atividade MPO, promovendo remodelação da arquitetura do tecido pulmonar, contudo, só encontramos todos esses efeitos com o laser 660 nm, demonstrando que para animais o comprimento de onda parece ter um papel muito importante no desfecho final.

4.1 ARTIGO

Código de fluxo 643

ORIGINAL ARTICLE

EFFECTS OF PHOTOBIMODULATION IN A LUNG INJURY MODEL IN RATS

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR EM RATOS

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: sim

DESTAQUES

- Estudo sobre uma doença que está em crescimento no Brasil e no mundo, sendo responsável por um aumento no número de internações em unidade de terapia intensiva.
- Relevância clínica pois os achados em animais poderão beneficiar tratamento clínicos no futuro.
- A Fotobiomodulação pode ser usada como terapia adjuvante no tratamento de lesão pulmonar aguda.

INTRODUÇÃO

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) são condições clínicas que comprometem a função dos pulmões, elas tem um espectro de gravidade crescente de lesão do tecido pulmonar definida por critérios fisiológicos, radiológicos e clínicos que acontecem devido ao dano generalizado das células e das estruturas da membrana alvéolo-capilar (MATTHAY; ZIMMERMAN; ESMON; BHATTACHARYA *et al.*, 2003; SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

Embora o termo lesão pulmonar esteja caindo em desuso em humanos em modelos animais pré-clínicos permanece aplicável, uma vez que nenhum modelo replica todos os recursos da SDRA (D'ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018).

Diferentes modelos de lesão pulmonar em animais têm sido utilizados para investigação dos mecanismos envolvidos na LPA/SDRA, os que levam a lesão direta podem ser causados por administração via intratraqueal, intraoral ou intranasal. Os agentes de lesão mais comuns incluem lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* (LPS), ácidos, bactérias (vivas ou mortas pelo calor) e vírus. A hiperóxia também pode causar lesão pulmonar direta. Em comparação, a lesão pulmonar indireta pode ser induzida por injeção intravenosa de LPS, ligadura e punção cecal, choque hemorrágico e isquemia e reperfusão mesentérica (D'ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018).

Após a instilação de LPS assim como em humanos a resposta inflamatória tem início rápido após o insulto, com lesão do parênquima pulmonar e comprometimento das trocas gasosas, embora exista uma baixa probabilidade de encontrar todas as alterações em um modelo animal de LPA, a escolha do modelo deve ser guiada pelo objetivo principal da pesquisa (MATUTE-BELLO; DOWNEY; MOORE; GROSHONG *et al.*, 2011), quando administrado via intratraqueal a endotoxina de bactéria gram-negativa LPS simula uma pneumonia, sendo capaz de reproduzir a lesão da membrana alvéolo capilar (BECK-SCHIMMER; SCHWENDENER; PASCH; REYES *et al.*, 2005).

As principais características desse modelo são lesão tecidual acentuada evidenciada nas primeiras horas, caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos no interstício e no espaço alveolar seguida de espessamento e edema da parede alveolar (FONSECA, 2015).

Estudos sugerem que a LPA/SDRA é responsável por cerca de 10% das admissões em unidades de terapia intensiva sendo que 23% desses pacientes necessitam de suporte ventilatório com uma mortalidade de até 45% nos casos da síndrome grave (GRASSELLI; CALFEE; CAMPOROTA; POOLE *et al.*, 2023), sendo considerada umas das principais causas de insuficiência respiratória aguda com alto índice de mortalidade e morbidade em pacientes críticos (MATTHAY; ZIMMERMAN; ESMON; BHATTACHARYA *et al.*, 2003; MOKRA, 2020). As sequelas deixadas aos pacientes que sobrevivem à LPA/SDRA são importantes, como redução da qualidade de vida, fraqueza muscular, maior ocorrência de polineuropatia, miopatias e estenose

traqueal, além de contraturas musculares dentre outras (MATTHAY; ZIMMERMAN; ESMON; BHATTACHARYA *et al.*, 2003; SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

A chamada Classificação de Berlim em 2012 definiu a SDRA em 3 categorias, tendo como base a hipoxemia e o nível de PEEP, sendo a Lesão Pulmonar considerada a SDRA leve e as demais em SDRA moderado e grave (GRASSELLI; CALFEE; CAMPOROTA; POOLE *et al.*, 2023; MOKRA, 2020). Desde tal definição, os conhecimentos da medicina permitiram avanços com relação ao desenvolvimento da SDRA, como métodos não invasivos para avaliar critérios de oxigenação, uso de oxigênio nasal de alto fluxo para tratamento da Insuficiência Respiratória hipoxêmica grave onde esses pacientes não atendem à definição de Berlim, diante de algumas limitações foram propostas mudanças em uma conferência de consenso global em junho de 2021.

A nova definição global de SDRA traz como base as evidências atuais da prática clínica, onde pacientes tratados com cateter nasal de alto fluxo a 30 L/min devem ser incluídos na SDRA, saturação de oxigênio poder ser verificada por oximetria de pulso podendo ser usada em vez da gasometria arterial para diagnóstico, o ultrassom poderá ser utilizado para obtenção de imagens quando a radiografia de tórax ou a tomografia computadorizada não estiver disponível (MATTHAY; ARABI; ARROLIGA; BERNARD *et al.*, 2024).

A LPA/SDRA é definida pela exposição a um insulto conhecido de forma direta (pulmonar) ou indireta (extrapulmonar). Na lesão pulmonar direta o estímulo atinge as estruturas pulmonares desencadeando uma resposta imune inata pela ligação de produtos bacterianos ou moléculas endógenas associadas a lesões celulares a receptores padrão no epitélio pulmonar e macrófagos alveolares, iniciando assim a resposta inflamatória aguda (MOKRA, 2020).

São várias as doenças que podem desencadear tal síndrome incluindo pneumonias virais (vírus influenza A ou rinovírus), bacterianas (*Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*), aquelas decorrentes da ventilação mecânica, produtos químicos (cloro, fosgênio e aerossóis industriais), cigarros eletrônicos, já as lesões consideradas indiretas podem ocorrer por lesão cerebral aguda, sepse, pancreatite aguda dentre outras (MOKRA, 2020; SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

A cascata inflamatória em resposta ao insulto é o ponto principal da patogênese da LPA/SDRA, após o evento agressor a inflamação faz com que ocorra um aumento da permeabilidade dos vasos capilares pulmonares e conseqüentemente dano alveolar difuso (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022), os macrófagos entram em contato com o patógeno dando início a resposta imune pulmonar (PARDO; SELMAN; BIOLOGY, 2021), representando cerca de 95% dos leucócitos presentes do espaço aéreo (FAN; FAN, 2018).

Posteriormente a lesão, os macrófagos passam por uma transição para fenótipos M1 pró-inflamatórios secretando assim citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, Il-6, Il-1) e quimiocinas (IL-8, CCL7, CCL2), que por sua vez aumentam a quimiotaxia fazendo com que os espaços alveolares fiquem enriquecidos por monócitos e neutrófilos (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022).

Os neutrófilos por sua vez liberam inúmeros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio e proteinases que destroem o surfactante, as membranas basais e a barreira epitélio-endotelial (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022). Embora a ativação de neutrófilos seja essencial para a defesa do hospedeiro, sua ativação excessiva acarreta danos nos tecidos por liberação de agentes ativadores de células citotóxicas e imunes, que passam a secretar elastases que digerem o tecido e ativam algumas metaloproteinases teciduais (MATTHAY; ZEMANS; ZIMMERMAN; ARABI *et al.*, 2019; SATHE; MOSTAGHIM; BARNES; O'CONNOR *et al.*, 2023).

O dano ao epitélio alveolar é um dos fatores determinantes da LPA/SDRA, contribuindo para interrupção das funções da barreira epitélio alveolar, favorecendo a permeação de várias proteínas no espaço alveolar o que contribui para o edema pulmonar (SAVIN; ZENKOVA; SEN'KOVA, 2022). Os eventos envolvidos na fisiopatologia da síndrome podem ser divididos em fases, sendo a exsudativa que apresenta uma duração de 1 a 3 dias caracterizada por extravasamento de líquidos e proteínas (edema do interstício e do alvéolo), fase proliferativa após 48 horas do início do insulto indo até o 6° dia caracterizado por migração de neutrófilos, fibroblastos e produção de mais mediadores químicos e a fase fibrótica que acontece após 7° dia, nessa fase é onde acontece a fibrose pulmonar com hipoxemia severa (GRASSELLI; CALFEE; CAMPOROTA; POOLE *et al.*, 2023).

Mesmo com os avanços da medicina no entendimento da LPA/SDRA ainda

carecemos de farmacoterapia eficaz que aumente a sobrevida desses pacientes, sendo necessários mais estudos com esse objetivo (FAN; FAN, 2018; MOKRA, 2020).

Os tratamentos recentes estão focados nos anti-inflamatórios, reduzindo a “tempestade de citocinas”, controle dos sintomas como correção de hipoxemia com administração de oxigênio suplementar e suporte ventilatório. Por tanto são necessários mais estudos que busquem intervenções mais ativas, seguras e eficazes no controle da inflamação pulmonar de pacientes com LPA/SDRA. (LIU; XIAO; XIE, 2022).

Os avanços na tecnologia da luz e a evolução da fotobiomodulação (PBM) através de pesquisas e novas tecnologias, permitiram a ciência descobrir os efeitos benéficos da vários espectros de luz - em particular luz violeta/azul, emitidas por diodo emissor de luz (*Light Emitting Diode*, LED) e luz vermelha e infravermelha, emitidas por laserterapia de baixa intensidade (*Low Intensity Laser Therapy*, LILT) (ENWEMEKA; BUMAH; MASSON-MEYERS; BIOLOGY, 2020).

Até o presente momento, sabemos que a luz azul (espectro de 400-470 nm) possui ação antimicrobiana contra numerosas bactérias, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*, e tem o potencial para abrandar infecções bacterianas oportunistas como as associadas à COVID-19 e outras infecções por coronavírus. A luz vermelha e a infravermelha (espectro de 600 a 700 nm e 700–1000 nm, respectivamente) têm o potencial de reduzir a inflamação pulmonar, fibrose e, portanto, a SDRA (YE; LIU; PATHOLOGY, 2020).

A inativação dos microrganismos por luz visível acontece baseada nas reações de oxidação fotossensibilizadoras, que requerem normalmente três componentes, o cromóforo (denominado fotossensibilizador), luz e oxigênio. Após a absorção da luz, a energia luminosa é convertida em potencial de oxigenação que pode danificar as biomoléculas dos microrganismos (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022).

É possível que a oxidação fotossensibilizada possa neutralizar os agentes causadores da SDRA e de outras causas de lesão pulmonar, desempenhando papel no controle de tais doenças, no entanto não há dados disponíveis sobre a relação fotodinâmica na inativação ou controle das mesmas e quais comprimento de ondas são mais indicados (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022).

A PBM vem sendo cada vez mais estudada devido seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, dados recentes sugerem que os fótons emitidos podem interagir com fotorreceptores existentes nos tecidos resultando no transporte de elétrons de forma mais efetiva na cadeia respiratória mitocondrial resultando em aumento da produção de trifosfato de adenosina (KLEBANOV; KREININA; POLTANOV; KHRISTOFOROVA *et al.*, 2001). Os canais iônicos sensíveis a luz absorvem os fótons, fazendo com que a concentração dos íons cálcio intracelular aumente, esse processo ativa as vias de sinalização por espécie reativas de oxigênio, adenosina monofosfato cíclico, óxido nítrico e cálcio, influenciando o processo celular e consequentemente a inflamação com liberação de histamina e produção de prostaglandina (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021).

Dados demonstram que a PBM possui a capacidade também de regeneração tecidual, além de reduzir marcadores inflamatórios como neutrófilos de forma eficaz ao mesmo tempo que promove proliferação de colágeno na área afetada. No entanto tais efeitos são dependentes das especificidades dos parâmetros e dos comprimentos de onda escolhidos (DE OLIVEIRA MARTINS; MARTINEZ DOS SANTOS; EVANY DE OLIVEIRA; DE BRITTO *et al.*, 2013; PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022), muitos estudos utilizam diferentes comprimentos de onda, descrevendo os resultados com relação a penetração de lasers ao tecido sendo possível identificar algumas particularidades como laser infravermelho ser mais eficaz para analgesia e o vermelho ter melhor penetração no tecido pulmonar (ASH; DUBEC; DONNE; BASHFORD, 2017; NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021).

Diante de tais efeitos a PBM poderia ser usada como terapia adjuvante, ou mesmo terapia alternativa operando nesses mecanismos, podendo reduzir o processo inflamatório decorrente da LPA/SDRA e consequentemente melhorar o prognóstico da síndrome.

Esse trabalho se justifica pois os resultados encontrados com experimentação animal poderão incentivar estudos futuro clínicos onde os benefícios oriundos da PBM poderiam reduzir a gravidade da SDRA, repercutindo diretamente não somente na sobrevivência dos pacientes, mas também na redução do tempo de internação e necessidade de suporte ventilatório.

Por fim o objetivos do estudo é investigar como a PBM poderia modular o processo inflamatório em um modelo agudo de lesão pulmonar induzida por LPS, e

qual seria o comportamento do recrutamento de células inflamatórias bem como influência sobre a mecânica ventilatória, atividade MPO e histologia do tecido pulmonar em animais.

MÉTODOS

O presente estudo seguiu as recomendações do ARRIVE (Guidelines for Reporting Animal Research) para experimentação animal) (PERCIE DU SERT; HURST; AHLUWALIA; ALAM *et al.*, 2020).

TAMANHO DA AMOSTRA

Os animais foram distribuídos em grupos de forma aleatória, a relação do número de animais e os grupos experimentais foram dispostos na forma de tabela (Tabela 1).

GRUPOS	ANIMAIS	
MECÂNICA VENTILATÓRIA E HISTOLOGIA	VEÍCULO/SHAM	8
	VEÍCULO/LED 430	8
	VEÍCULO/LASER 660 NM	8
	VEÍCULO/LASER 808 NM	8
	VEÍCULO/VEÍCULO	8
	VEÍCULO/DEXA	8
	LPS/SHAM	8
	LPS/LED 430	8
	LPS/LASER 660	8
	LPA/LASER 808 NM	8
LPS/VEÍCULO	8	

	LPS/DEXA	8
ATIVIDADE MPO	VEÍCULO/SHAM	8
	VEÍCULO/LED 430	8
	VEÍCULO/LASER 660 NM	8
	VEÍCULO/LASER 808 NM	8
	VEÍCULO/VEÍCULO	8
	VEÍCULO/DEXA	8
	LPS/SHAM	8
	LPS/LED 430	8
	LPS/LASER 660	8
	LPA/LASER 808 NM	8
	LPS/VEÍCULO	8
	LPS/DEXA	8
RT-QPCR	VEÍCULO/SHAM	8
	VEÍCULO/LED 430	8
	VEÍCULO/LASER 660 NM	8
	VEÍCULO/LASER 808 NM	8
	VEÍCULO/VEÍCULO	8
	VEÍCULO/DEXA	8
	LPS/SHAM	8
	LPS/LED 430	8
	LPS/LASER 660	8
	LPA/LASER 808 NM	8
	LPS/VEÍCULO	8

	LPS/DEXA	8
TOTAL		288
PERDAS		
MECÂNICA VENTILATÓRIA E HISTOLOGIA	LPS/LED 430	3
	LPS/LASER 660	2
	LPA/LASER 808 NM	3
	LPS/SHAM	1
TOTAL		9

Tabela 1: Relação dos animais distribuídos em seus respectivos grupos.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo ratos da espécie Wistar, machos de 7 a 8 semanas de vida, com peso entre 250 a 300g, em condições fisiológicas normais sem anormalidades físicas. Os animais foram excluídos se não apresentassem peso corporal e idade dentro do descrito, bem como se eles apresentassem alguma alteração fisiológica.

RANDOMIZAÇÃO

Neste estudo, os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: veículo/SHAM, veículo/LED, veículo/laser 660nm; veículo/laser 808 nm, veículo/veículo, veículo/DEXA, LPS/sham, LPS/LED 430 nm, LPS/laser 660 nm, LPS/laser 808 nm, LPS/Veículo e LPS/DEXA.

CEGAMENTO

O cegamento dos pesquisadores aconteceu no momento das análises dos marcadores inflamatórios, ventilação mecânica e histologia pulmonar, por esse motivo o mesmo não tinha conhecimento de qual grupo o animal pertencia, não sofrendo influência de tal fato.

MEDIDA DE RESULTADOS

Após a instilação com LPS os animais foram avaliados com relação mecânica ventilatória após a instilação de PBS ou do LPS. Para isso os animais foram ventilados com volume corrente (V_t) de 6 ml.kg^{-1} , frequência respiratória de 120 min^{-1} e pressão expiratória final positiva (PEEP) de $3,0 \text{ cmH}_2\text{O}$, a atividade da mieloperoxidase foi realizada por meio da análise dos pulmões bem como a histologia pulmonar e a reação em cadeia da polimerase em tempo real que foram realizadas usando SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen, Life Technologies) no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com primers específicos sintetizados pela Síntese Biotecnologia (SAHU; MISHRA; LAL, 2020).

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi assegurada por métodos paramétricos utilizando análise de variância de duas vias (two-way) seguida de teste Tukey (Two-Way ANOVA). Para cada análise, $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism version 6.0).

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados, 288 ratos machos, de linhagem Wistar, mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os animais foram mantidos sob condições normais (gaiolas de acrílico, com a temperatura entre $18\text{-}21^\circ \text{C}$, $55\text{-}60\%$ de umidade relativa, e ciclos de 12 horas claro/escuro). Com ração padrão e água disponível até o dia do experimento, seguindo as normas éticas preestabelecidas.

Os aspectos éticos bem como as normas que regulamentam a utilização de animais em laboratório elaborados pela Comissão de Ética Experimentação em Animal da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL foram adotadas e seguidas rigorosamente, o presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL com o registro nº 21/2020.

MODELO DE LESÃO PULMONAR

Os animais foram anestesiados através da administração por via intraperitoneal, utilizando-se uma solução de cetamina 10 mg/kg (Ketamina®) e 100mg/kg xilasina (Dopaser®). A região da traqueia foi tricotomizada e limpa e, após uma incisão na pele, a musculatura foi afastada para exposição da traqueia (D'ALESSIO, 2018; LI; DONG; ZHANG; GAO *et al.*, 2019) (Figura 1).

A lesão pulmonar foi induzida por instilação de LPS de *Escherichia coli* (Sigma, 2 mg/kg) ou veículo (PBS) na traqueia entre os anéis de cartilagem, utilizando um scalp calibre 27 G. Após instilação, a incisão cervical foi fechada com fio de sutura de seda 4.0, durante o retorno da anestesia foi ofertado calor para evitar a hipotermia dos animais. Para o tratamento controle positivo, foi proposto o tratamento com glicocorticóide nos animais, onde foi administrados dexametasona (1 mg/kg, por via oral, p.o.) ou tratamento Sham com PBS (0,5% de metilcelulose / 0,2% de Tween 80 p.o.) 1 hora antes da instilação de LPS (D'ALESSIO, 2018; RABELO, 2017).

PROTÓCOLOS DE LILT E LED

Após 1 hora da instilação de LPS, um grupo LPS e outro PBS foram submetidos à radiação laser ($\lambda = 660$ nm, modelo Therapy EC, marca DMC, Brasil), outro grupo LPS e outro PBS submetidos a radiação radiação laser ($\lambda = 808$ nm, modelo Therapy EC, marca DMC, Brasil) ambos com a potência útil no emissor de 100 mW, na fluência de 9 J/cm², por 90 segundos, com o tamanho do ponto de 0,06 cm².

Também após 1 hora da instilação, outro grupo LPS e PBS foram submetidos à radiação LED ($\lambda = 430$ nm, modelo D-2000, marca DMC), com potência útil no emissor de 900 mW, em modo contínuo, por 30 segundos, com o tamanho do ponto de 1,00 cm². Todos os animais foram irradiados na pele sobre a porção lateral do

esterno próximo a região anatômica do lobo superior direito (DE LIMA; NAVES; MACHADO; ALBERTINI *et al.*, 2009).

AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR

Para a medida da mecânica respiratória em 24 horas após a instilação de LPS e PBS, os animais foram pré-anestesiados com xilazina 8 mg.kg⁻¹ i.p. (Anasedan, Ceva, Brasil) anestesiados com pentobarbital 40 mg.kg⁻¹ i.p. (Nembutal, OAK, EUA) e receberam analgésico Cloridrato de tramadol 30 mg.kg⁻¹ i.p. (Tramal, Grumenthal, Brasil). Foi realizada a traqueostomia para a inserção de uma cânula de metal (14G), fixada na traqueia do animal por meio de fios de algodão, a qual foi conectada ao ventilador (Ventstar – RWD) (AOKI, 2013).

Os animais foram ventilados com volume corrente (Vt) de 6 ml.kg⁻¹, frequência respiratória de 120 min⁻¹ e pressão expiratória final positiva (PEEP) de 3,0 cmH₂O. Após iniciada a ventilação, os animais foram paralisados com brometo de pancurônio (1,0 mg.kg⁻¹, i.p.).

Após de 5 minutos, foi obtido os valores de resistência das vias aéreas (Raw) que representa a dificuldade da passagem do ar pelas vias aéreas, viscosidade tecidual (Gtis) que está relacionada à resistência do tecido e reflete a dissipação da energia e elastância, elastância tecidual (Htis) que representa a dificuldade em expandir os compartimentos alveolares e histeresividade (η) que é obtido a partir do cálculo entre resistência e elastância (BATES, 2009).

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados para remoção dos pulmões e processamento de demais análises.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Fragments dos pulmões pesando 300-350 mg de cada amostra armazenada a -80° C foram triturados, um a um, com lâmina de bisturi em placa de Petri sobre gelo com a adição de solução tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 6,0).

A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 30 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso com tampão fosfato de potássio contendo 5 % de brometo de hexadeciltrimetil amônio (Sigma, St Louis, EUA). A suspensão sofreu 3 ciclos de

congelamento (congelado em gelo seco e descongelado em temperatura ambiente). No último descongelamento, a suspensão foi sonificada (amplitude de 20-30%) por 40 s em gelo.

As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4°C, e os sobrenadantes utilizados para o ensaio de MPO, em duplicatas. Foi utilizado um kit de ensaios (Rat MMP-17, ELISA, Kit) para determinar a atividade de MPO dos homogenatos, conforme instruções do fabricante.

A absorbância de cada amostra foi medida utilizando um leitor de microplaca equipado para excitação de 560 nm. Os resultados foram expressos em mUg-1.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

As amostras de pulmão foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen, Life Technologies), conforme as instruções do fabricante.

O RNA total foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® 2000, Thermo Scientific). Foram utilizadas somente as amostras que apresentarem uma relação de absorção (260/280 nm) entre 1,8 e 2.

As amostras foram tratadas com DNase (Invitrogen, Life Technologies) para evitar contaminação com DNA genômico. Todas as soluções foram preparadas em água tratada com DEPC (0,01%). O nível de transcrição dos genes de interesse (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) foi determinado mediante RT-qPCR. Para a síntese do cDNA foi usado o kit SuperScript® IV First-Strand Synthesis.

O teste inicial dos primers foi feito por PCR convencional usando Platinum™ SuperFi™ Green PCR Master Mix.

O teste de eficiência dos primers e as reações de qPCR foram realizadas usando SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen, Life Technologies) no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com primers específicos (SAHU; MISHRA; LAL, 2020) sintetizados pela Síntese Biotecnologia (<https://sintesebiotecnologia.com.br/idt.html>).

As reações foram feitas em 8 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas e os resultados foram normalizados pelos níveis de transcrição do gene referência

GAPDH. Os níveis de transcrição foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems, User bulletin#2 e Livak & Schmittgen) (YE; LIU; PATHOLOGY, 2020).

HISTOLOGIA DO TECIDO PULMONAR

O tecido pulmonar foi removido para análise da histopatologia, sendo colocado em formaldeído a 4% e, em seguida, embutido em parafina.

Colorações de hematoxilina e eosina (H&E) foram realizadas utilizando um procedimento padrão e fotografadas com um microscópio de luz.

Foram avaliados o grupo controle no qual sofreu a instilação de PBS na traqueia, grupo lesão pulmonar após o insulto com LPS, grupo LPS + Dexametasona (DEX, 10 mg/kg, ip) e grupo LPS + fotobiomodulação (led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm).

RESULTADOS

Os resultados encontrados foram dispostos em forma de gráficos.

Todos os grupos intervenção possui um grupo controle, sendo administrado veículo de salina (PBS) ao invés de lipopolissacarídeo na traqueia, as análises foram feitas antes de 24 horas (basal) e após 24 horas da indução do LPS ou VEI.

RESISTÊNCIA DAS VIAS AÉREAS

É possível verificar que houve uma redução na resistência de forma pronunciada no grupo LPS/Laser 660 nm com diferença estatística significativa entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre os grupos LPS/SHAM e LPS/DEXA.

Em contrapartida quando partimos para análise dos resultados dos grupos LPS/Laser 808 nm e LPS/ LED 430 nm foi possível verificar que o mesmo não ocorreu.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 224,4$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 12,09$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 17,40$, $P < 0,0001$.

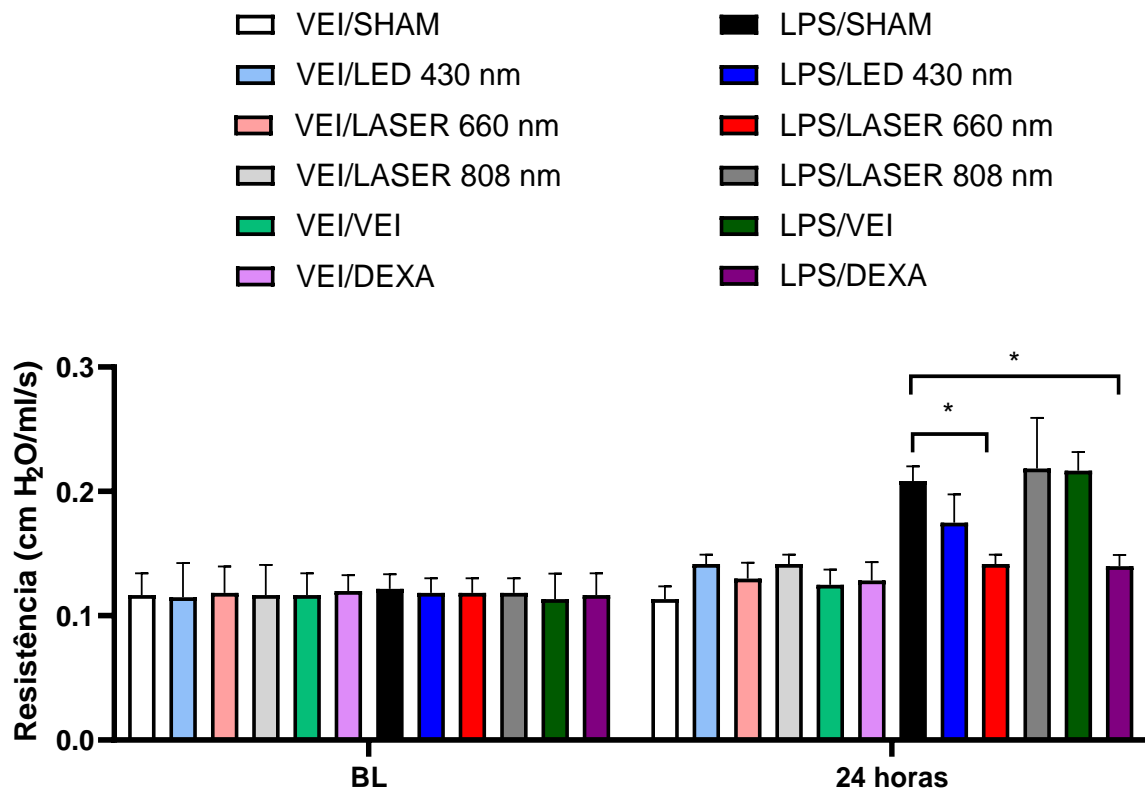


Gráfico 1: Resultados dos valores de resistência das vias aéreas obtidos por meio da análise da ventilação mecânica, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).

VISCÂNCIA TECIDUAL

Ao analisarmos o gráfico 2 é possível verificar que para os animais pertencentes ao grupo LPS/Laser 660nm os resultados foram promissores, visto que os valores de tal grupo (0,55 cmH₂O/ml/s) foram próximos aos do grupo LPS/DEXA (0,50 cmH₂O/ml/s) apresentando redução dos valores de viscosidade tecidual, o mesmo que ocorreu quando analisamos a resistência pulmonar.

Com $p < 0,05$ entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre os grupos LPS/SHAM e LPS/DEXA. Em contrapartida o mesmo não foi verificado nos demais experimentos.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 26,71$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 35,68$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 26,71$, $P < 0,0001$.

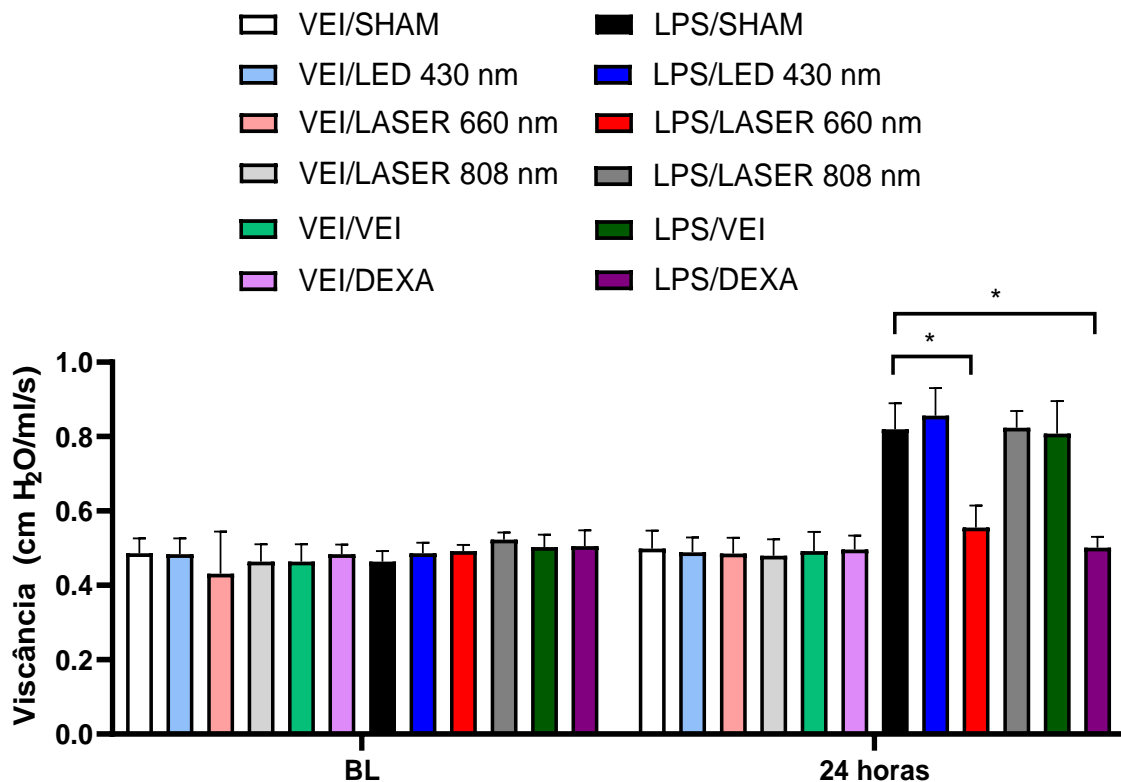


Gráfico 2: Resultados dos valores de viscosidade tecidual obtidos por meio da análise da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).

ELASTÂNCIA TECIDUAL

Com relação a elastância do tecido pulmonar no grupo LPS/Laser 660 nm os animais apresentaram valores mais baixos (1,66 cmH₂O/ml/s) e mais uma vez próximos aos valores do grupo LPS/DEXA (1,53 cmH₂O/ml/s).

Com diferença estatística significativa entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre o grupo LPS/SHAM e LPS/DEXA, fato que se repetiu nas outras variáveis da mecânica ventilatória.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 77,02$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 10,83$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 13,95$, $P < 0,0001$.

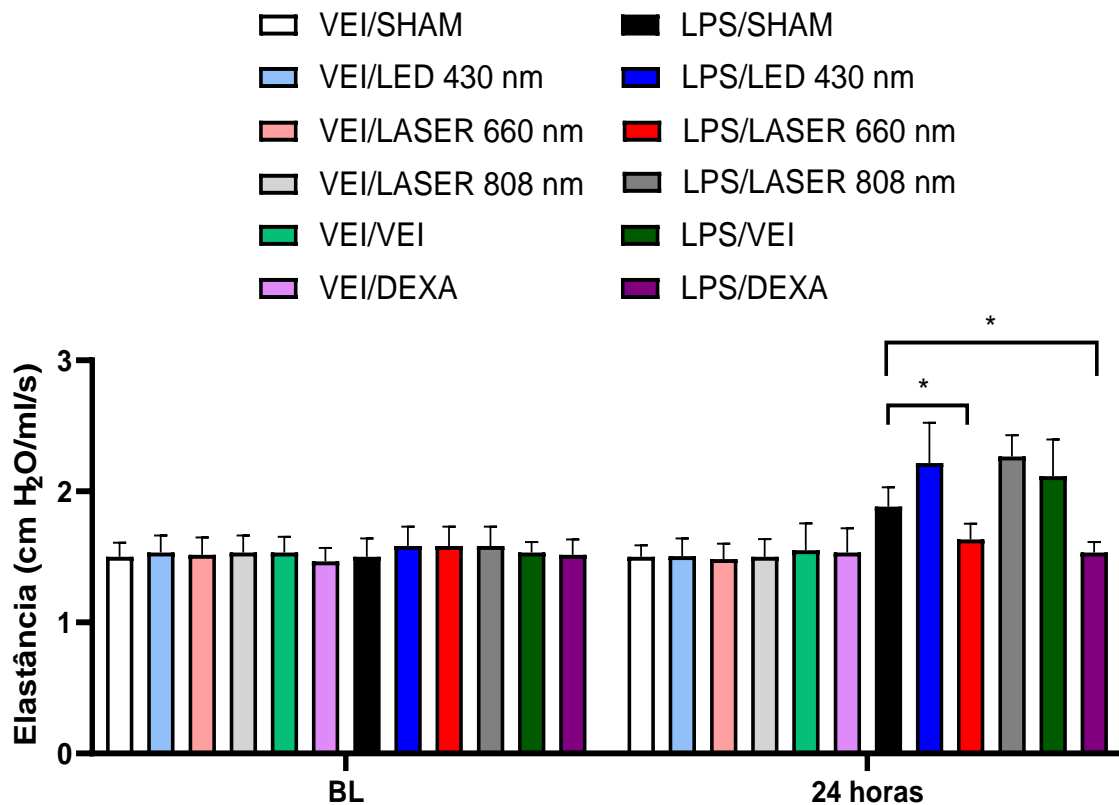


Gráfico 3: Resultados dos valores de elastância tecidual obtidos por meio da análise da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).

HISTERESIVIDADE

Os resultados encontrados no gráfico da histeresividade pulmonar mostra que os grupos LPS/LED e LPS/Laser 808 nm apresentaram efeitos capazes de reduzir tal parâmetro.

Todavia o Laser 660 nm exibiu um comportamento diferente, visto que ao analisarmos os animais pertencentes a esse grupo observamos valores de histeresividade menor 0,178 G.H-1.

Apresentando significância estatística entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre o grupo LPS/SHAM e LPS/DEXA.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 68,73$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 12,59$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 16,61$, $P < 0,0001$.

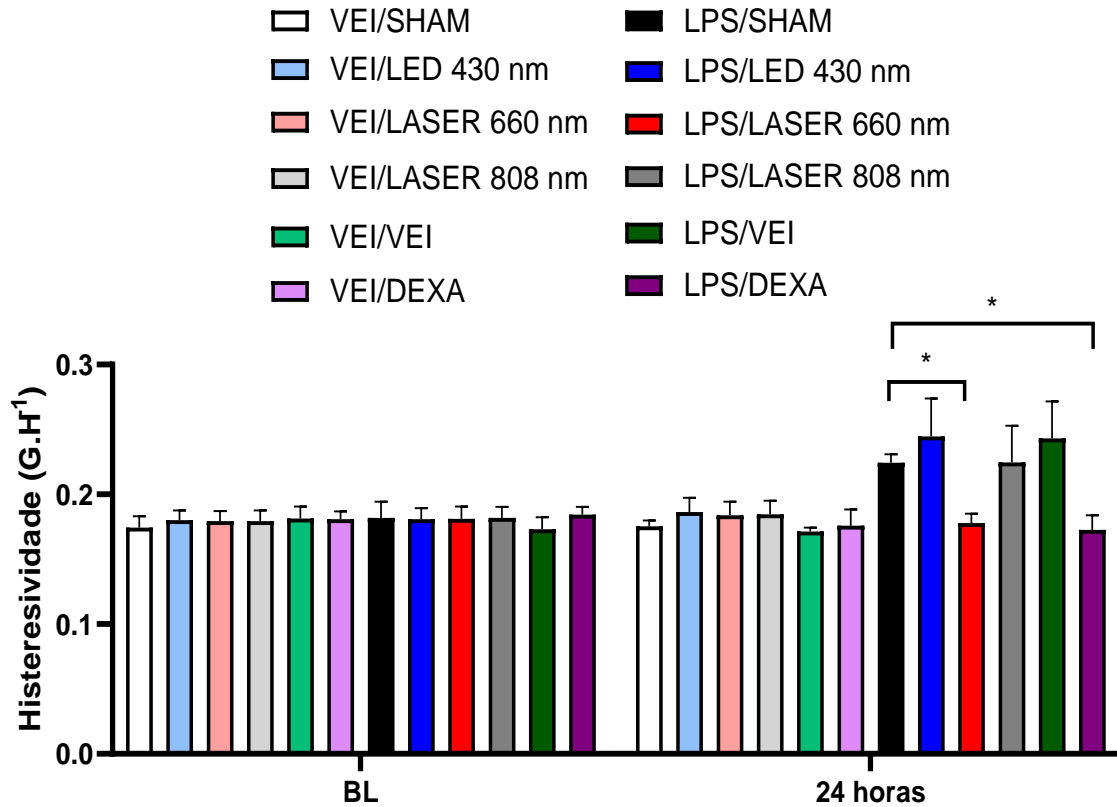


Gráfico 4: Resultados dos valores de histeresividade pulmonar obtidos por meio avaliação da ventilação mecânica dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).

ATIVIDADE MPO

Para a atividade MPO verificamos que o grupo Laser 660 nm apresentou valores de MPO diminuídos com diferença estatística com $p < 0,05$ entre os grupos LPS/SHAM e LPS/LASER 660 nm e entre o grupo LPS/SHAM e LPS/DEXA.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 32,62$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 398,6$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 430,1$, $P < 0,0001$.

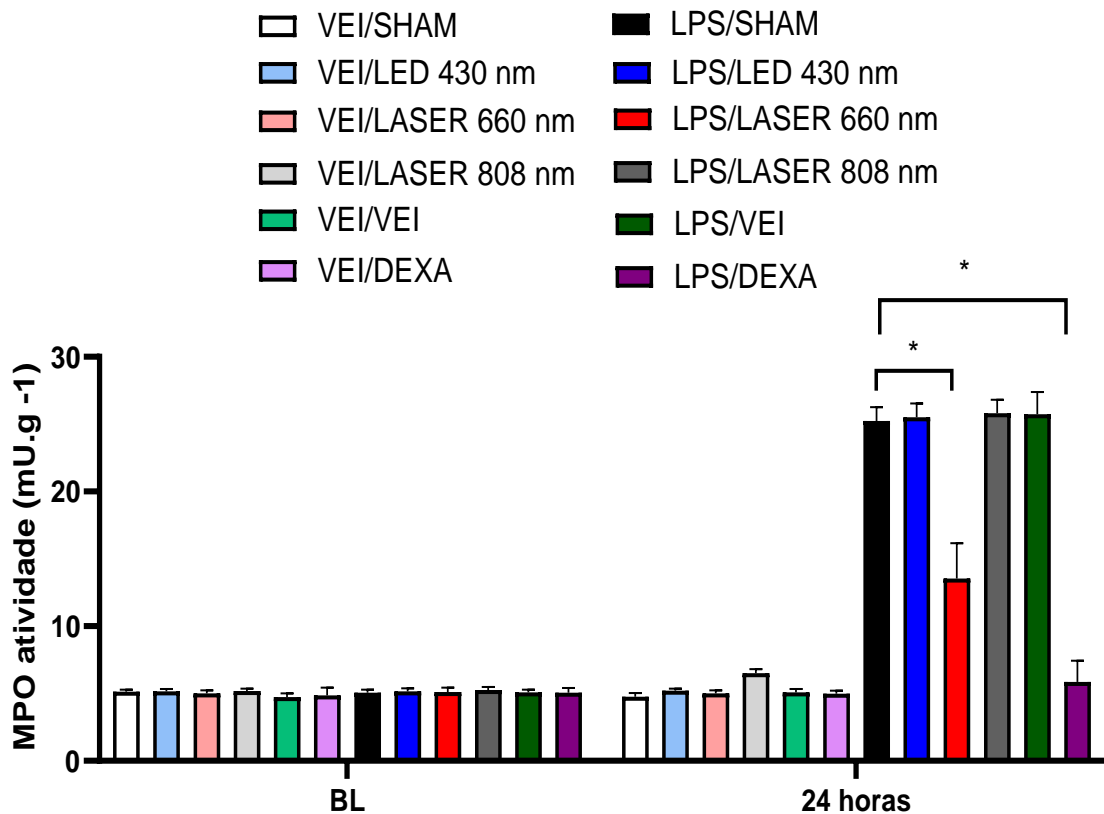


Gráfico 5: Resultados dos valores da atividade MPO obtidos por meio análise sanguínea dos animais, nos momentos BL (basal) e 24 horas após a instilação de LPS. *significância ($p < 0,05$).

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

Ao analisarmos a RT- QPCR foi possível verificar que para o TNF- α a aplicação do LED, laser 660 nm e do laser 808 nm reduziu os níveis desse marcador com diferença estatística, o mesmo fato também aconteceu com a IL-6.

No entanto ao partimos para a IL-10 e IL-1 β verificamos que somente a aplicação do LED e Laser 660 nm reduziu os níveis desses marcadores com $p < 0,05$, o que não ocorreu com o laser 880 nm.

As médias foram diferentes em relação ao Tempo $F_{(1, 60)} = 52,12$, $P < 0,0001$; Tratamento $F_{(11, 60)} = 32,12$, $P < 0,0001$ e interação Tratamento x Tempo $F_{(11, 60)} = 43,96$, $P < 0,0001$.

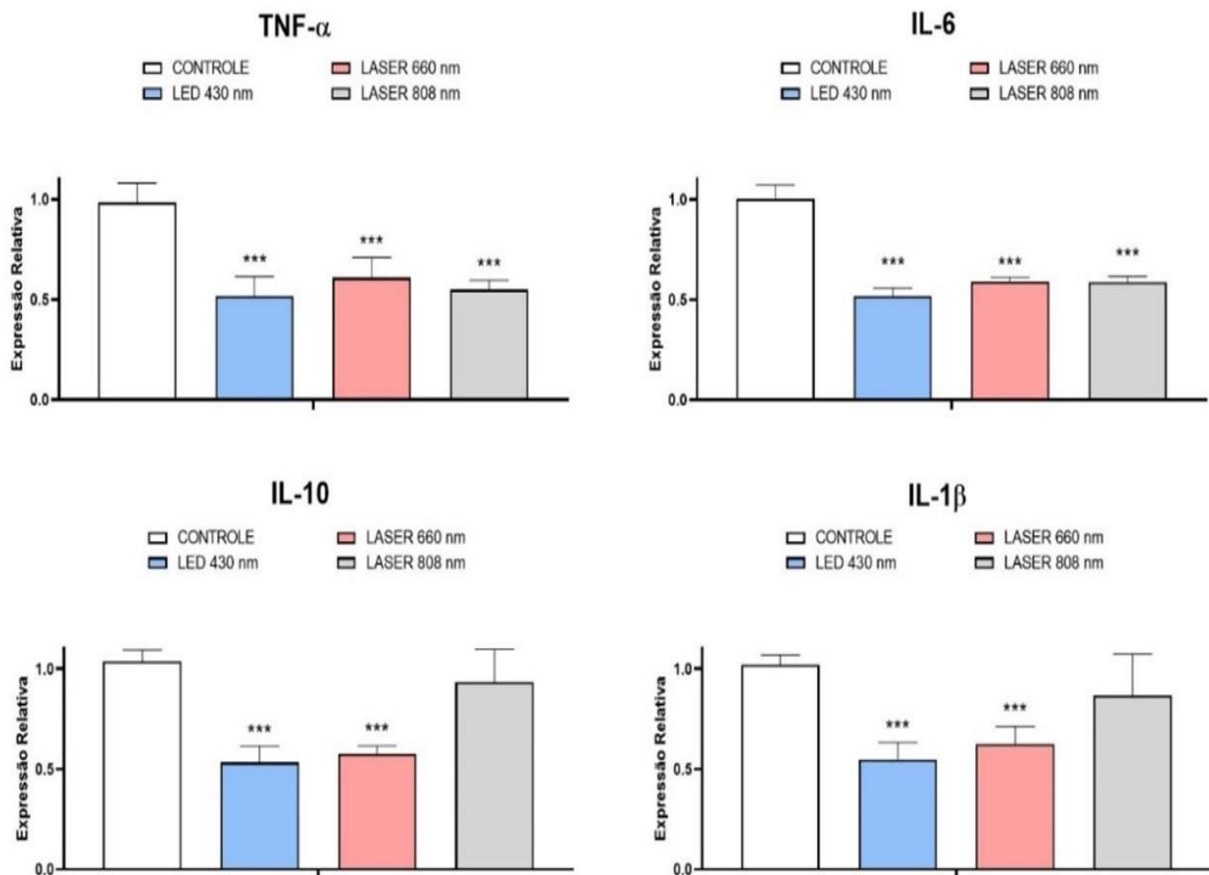


Gráfico 6 – Resultados dos valores de RT-QPCR para os marcadores inflamatórios TNF- alfa, IL-6, IL-10 e IL- 1beta. *significância ($p < 0,05$)

HISTOLOGIA DO TECIDO PULMONAR

Na análise histológica foram examinadas as alterações morfológicas dos pulmões após a indução da inflamação pulmonar com LPS.

Os resultados mostraram uma arquitetura pulmonar normal no grupo de controle (PBS), enquanto no grupo LPS foram observadas alterações, como infiltração de neutrófilos em vasos pulmonares, edema no espaço intersticial da parede alveolar, indicando danos às células epiteliais alveolares.

Tais alterações foram atenuadas pelo laser 660 nm, 808 nm e pela dexametasona, indicando que o tanto o laser vermelho quanto o infravermelho amenizaram os efeitos patológicos no modelo de lesão pulmonar por LPS. A aplicação

do led 430 nm não apresentou modificações na infiltração de neutrófilos e edema intersticial.

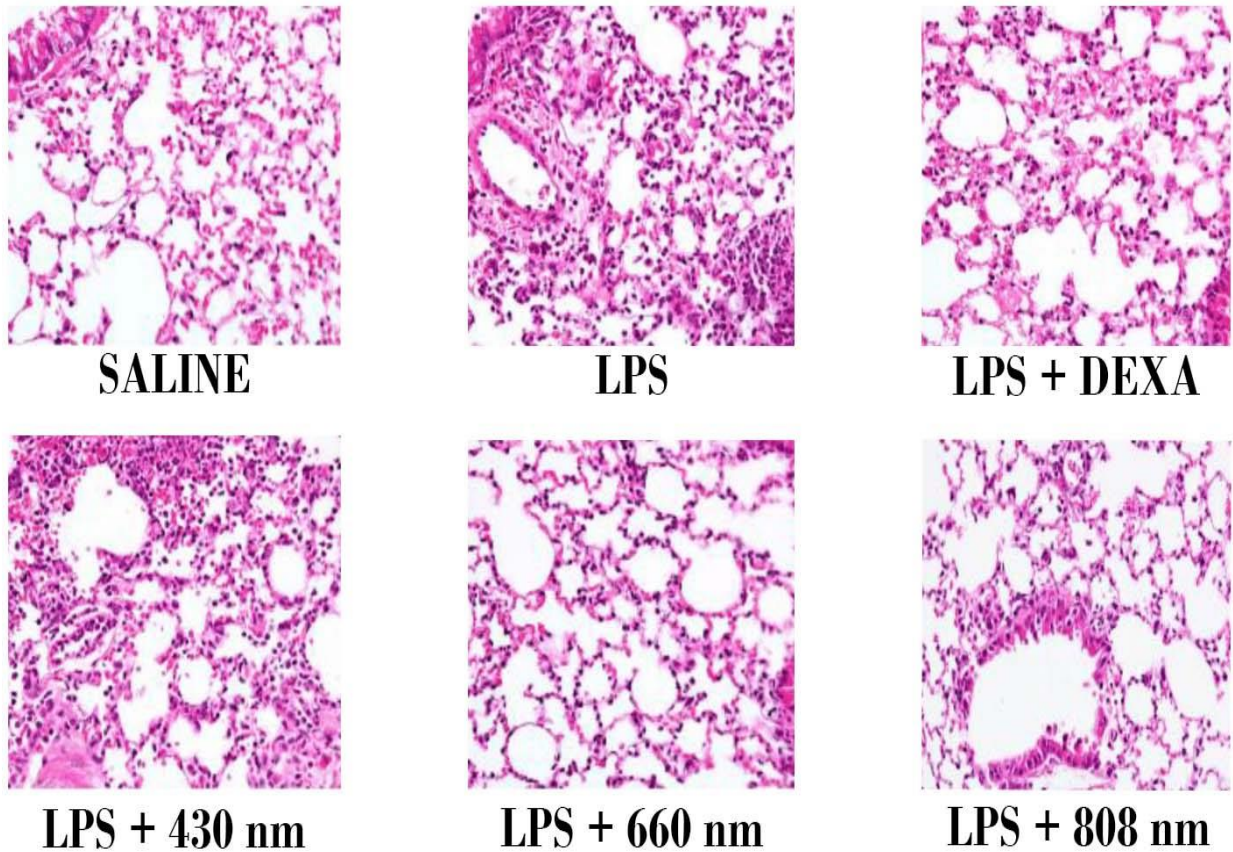


Figura 3 – Fotomicrografia das lesões pulmonares induzidas por LPS e os efeitos do de led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm, dexametasona (10 mg/kg, ip) nas alterações histopatológicas induzidas por LPS nos tecidos pulmonares de ratos. Grupo controle (Salina), grupo instilação LPS, grupo LPS + Dexametasona (DEX, 10 mg/kg, ip) e grupo LPS + fotobiomodulação (led 430 nm, laser 660 nm e laser 808 nm) (Fonte: Autor).

DISCUSSÃO

O modelo de instilação com lipopolissacarídeo de *Escherichia Coli* (LPS), está descrito na literatura como sendo um dos mais reprodutíveis que promovem neutrofilia robusta, aveolite e ruptura da membrana alvéolo-capilar (D’ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018)

Tais fatos foram essenciais para escolha desse modelo de lesão pulmonar, indo ao encontro com nossos achados, visto que no grupo LPS/SHAM observamos

aumento de citocinas inflamatórias e alterações da estrutura pulmonar no corte histológico após a instilação ficando mais evidente as alterações descritas acima e sua capacidade lesiva, sendo possível segundo autores avaliar as fases iniciais da LPA (D'ALESSIO; METHODS; PROTOCOLS, 2018).

A fotobiomodulação (PBM) é uma possível alternativa no manejo do processo inflamatório, utilizada por promover regeneração tecidual, reduzir a inflamação e dor (CARVALHO; BRITTO; DE OLIVEIRA; CASTRO-FARIA-NETO *et al.*, 2017; PEREIRA; DE LIMA; FERNANDES; ZÂNGARO *et al.*, 2023; SIGMAN; MOKMELI; VETRICI, 2020; SOHEILIFAR; FATHI; NAGHDI, 2021), estudos descrevem que na dose certa e no comprimento de onda apropriado, a luz interage com as células e tecidos podendo induzir funções promovendo efeitos anti-inflamatórios (DE BRITO; DA SILVEIRA; RIGONATO-OLIVEIRA; SOARES *et al.*, 2020; PEREIRA; DE LIMA; FERNANDES; ZÂNGARO *et al.*, 2023)

Tais fatos vão ao encontro com os resultados do presente estudo visto que em um comprimento de onda específico foi possível verificar alteração da mecânica ventilatória, atividade MPO, marcadores inflamatórios que se apresentam reduzidos após a intervenção sendo possível identificar até mesmo um remodelamento do tecido pulmonar no corte histológico.

Em concordância, alguns trabalhos descrevem que a PBM quando aplicada na região dos pulmões pode reduzir não somente a inflamação local mas também a sistêmica (PEREIRA; DE LIMA; FERNANDES; ZÂNGARO *et al.*, 2023; SABINO; BALL; BAPTISTA; DAI *et al.*, 2020; YU; CHI; NAIM; LANZAFAME *et al.*, 1997) contribuindo para a melhora da mecânica ventilatória, sendo mais eficaz em células que estão sofrendo hipóxia, tal fato sugere que a terapia poderia ser mais promissora nas doenças pulmonares que comprometem as trocas gasosas como na LPA/SDRA (CAPUTO; STRAYER; LEVITAN, 2020).

Resultados semelhantes foram descritos por Méndez e colaboradores em 2019, onde a PBM demonstrou suprimir o processo inflamatório, tal fato foi comprovado a partir dos efeitos anti-inflamatórios e regenerativos encontrados nos tratamentos das doenças pulmonares (MÉNDEZ; RIZZATO; LAMARQUE; DIONISIO *et al.*, 2019; PORTO, 2021)

Concordando com De Lima *et al.*, que descrevem a redução da inflamação pulmonar aguda, corroborando com os achados positivos da terapia Laser 660 nm

encontrados no estudo aqui exposto, bem como Oliveira e colaboradores os quais avaliaram o efeito do PBM na SDRA em um modelo com camundongos, onde foi possível observar uma correlação entre redução do processo inflamatório e aplicação da luz, sendo capaz de abrandar a gravidade da doença (OLIVEIRA JR; GREIFFO; RIGONATO-OLIVEIRA; CUSTÓDIO *et al.*, 2014).

Vários trabalhos (DA CUNHA MORAES; VITORETTI; DE BRITO; ALVES *et al.*, 2018; DE LIMA, F. M.; MOREIRA, L. M.; VILLAVERDE, A. B.; ALBERTINI, R. *et al.*, 2011) assim como o presente estudo investigaram a relação do PBM com a redução da inflamação pulmonar relatando efeitos positivos tanto na redução da inflamação pulmonar aguda e quanto crônica.

Os efeitos anti-inflamatórios segundo Nejatifard e colaboradores alcançados pela PBM na LPA/SDRA são redução do edema pulmonar, das citocinas no líquido de lavagem broncoalveolar, do influxo de neutrófilos e da atividade MPO, tais eventos foram observados neste estudo, visto que os animais pertencentes ao grupo Laser 660 nm apresentaram redução da atividade MPO e marcadores inflamatórios no PCR além de alterações visíveis ao corte histológico (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021), onde o processo patológico parece ter sido atenuado pelo laser 660 nm, 808 nm e pela dexametaxona.

A inflamação pulmonar aguda está relacionada ao aumento do número de neutrófilos polimorfonucleares presentes no espaço intersticial associado a liberação de outras células pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α . O aumento do nível, por exemplo de IL-1 β está diretamente proporcional a piora do prognóstico do paciente com SDRA, sendo responsável por aumentar a sobrevivência dos neutrófilos e prolongar o processo inflamatório. Já o TNF- α é responsável pela adesão, ativação de neutrófilos, pela coagulação sanguínea e edema (SOHEILIFAR; FATHI; NAGHDI, 2021)

Indo ao encontro com os resultados deste trabalho, visto que após a análise do RT-QPCR foi possível observar que depois da instilação do LPS houve um aumento dos níveis de tais marcadores e que com a aplicação da PBM tivemos uma redução significativa, onde o LED 430 e Laser 660 nm foram capazes de reduzir todos os marcadores inflamatórios, enquanto o 808 nm apenas o TNF- α e IL-6.

Segundo autores essa capacidade anti-inflamatória acontece a nível molecular, celular e tecidual, sendo eficaz contra a tempestade de citocinas promovendo a cura

e regeneração dos tecidos com repercussão sistêmica (OLIVEIRA; GREIFFO; RIGONATO-OLIVEIRA; CUSTÓDIO *et al.*, 2014).

Corroborando com os nossos achados, de Lima e colaboradores comprovam que a PBM afeta efetivamente o TNF-alfa, diminuindo macrófagos alveolares reduzindo conseqüentemente incidência de SDRA em camundongos, eles observaram que o TNF- α tem um papel importante no sequestro e migração de neutrófilos, desempenhando papel principal na patogênese da SDRA (DE LIMA, F. M.; MOREIRA, L. M.; VILLAVARDE, A.; ALBERTINI, R. *et al.*, 2011), achados similares foram relatados por Oliveira *et al.*, em um modelo com ratos onde a PBM diminuiu significativamente a migração de neutrófilos para o tecido pulmonar reduzindo a gravidade da doença (OLIVEIRA JR; GREIFFO; RIGONATO-OLIVEIRA; CUSTÓDIO *et al.*, 2014).

Alguns autores descrevem que a luz visível que exibe comprimento de onda na faixa de 405-470 nm apresentam efeitos microbicidas (PAGE; KELL; PRETORIUS, 2022), sendo contrário ao que encontramos, visto que os animais que tiveram a aplicação do LED 430 nm, não apresentaram mudanças na mecânica ventilatória, atividade MPO nem na análise histológica do tecido pulmonar, apresentando somente redução dos marcadores inflamatórios no PCR.

Deveras isso poderia ser justificado pois segundo Kingsley *et al.*, para se conseguir tal efeito é necessário uma radiação maior e por um período prolongado (KINGSLEY; KUIS; PEREZ; BASALDUA *et al.*, 2018) o que de fato não ocorreu, dado que a aplicação de LED aconteceu em uma única vez por 30 s.

Já outros trabalhos relatam que os lasers com luz vermelha são mais recomendados devido a sua melhor penetração no tecido pulmonar (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021) sendo utilizados para reduzir dor e inflamação, em concordância com estudo aqui exposto, dado que encontramos resultados significativos em todas as variáveis analisadas somente com o comprimento de onda do Laser vermelho 660 nm.

Em concordância com tais fatos, estudos descrevem que pacientes expostos a tratamento com luz vermelha apresentam melhoria do processo inflamatório (ACKROYD; KELTY; BROWN; REED *et al.*, 2001; DA-PALMA-CRUZ; DA SILVA; MONTEIRO; REHIM *et al.*, 2019; FINSEN, 1901; SIGMAN; MOKMELI; VETRICI, 2020), a PBM vem sendo utilizada como tratamento alternativo para lesão pulmonar

aguda em modelos de SDRA, pela característica principal de redução da inflamação sistêmica e proteção da função pulmonar (DA-PALMA-CRUZ; DA SILVA; MONTEIRO; REHIM *et al.*, 2019; DA SILVA SERGIO; CORTES THOME; DA SILVA NETO TRAJANO; MENCALHA *et al.*, 2018; NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; SOHEILIFAR; FATHI; NAGHDI, 2021), reafirmando os achados do presente estudo onde foi possível verificar uma melhora na mecânica ventilatória, redução da atividade MPO e dos marcadores inflamatórios nos animais pertencentes ao grupo LPS/Laser 660 nm, demonstrando efeito na redução do processo inflamatório e consequentemente melhora da função pulmonar evidenciada também pela melhora da arquitetura pulmonar presente no corte histológico dos animais pertencentes a tal grupo.

Diante dos benefícios oriundos da PBM vários trabalhos vem relacionando tal terapia ao tratamento de doenças que levam ao processo de inflamação como LPA/SDRA, a maioria deles usando o laser vermelho (650 e 660 nm) (NEJATIFARD; ASEFI; JAMALI; HAMBLIN *et al.*, 2021; SIGMAN; MOKMELI; VETRICI, 2020), outros utilizaram lasers infravermelho com 808 nm e 830 nm ambos com efeitos anti-inflamatórios indo ao encontro com Kingsley *et al.*, que em seu estudo verificou que o laser promovia inativação de 99% dos vírus em todos os comprimentos de onda (KINGSLEY; KUIS; PEREZ; BASALDUA *et al.*, 2018)

Discordando dos nossos achados, visto que encontramos evidências de redução do processo inflamatório com impacto na mecânica ventilatória, atividade MPO e redução dos marcadores inflamatórios somente com Laser vermelho 660 nm, no entanto com o infravermelho não encontramos tais evidências.

Sabino e colaboradores em sua revisão sistemática descreveram que existiam 90 artigos publicados relacionando PBM e lesão pulmonar, inflamação pulmonar ou SDRA, vários deles utilizavam modelos animais para demonstrar os efeitos da luz diante dessa patologia, sendo possível argumentar a relação da penetração da luz em animais, que acontecem mais facilmente do que em humanos, isso poderia justificar o fato de não encontrarmos efeitos positivos no grupo Laser 808 nm, pois tal comprimento de onda poderia ter penetrado, ultrapassando o local da lesão e não ter gerado modificação no tecido dos animais (SABINO; BALL; BAPTISTA; DAI *et al.*, 2020).

Em concordância, autores compararam os efeitos dos lasers infravermelho e vermelho (KINGSLEY; KUIS; PEREZ; BASALDUA *et al.*, 2018) demonstrando que o infravermelho atinge camadas mais profundas em concordância com esses achados, nossos resultados demonstraram que o laser infravermelho (808 nm) não apresentou efeito anti-inflamatório capaz de melhorar a mecânica ventilatória, reduzir a atividade MPO e marcadores inflamatórios exatamente pela característica da penetração em animais ser mais facilitada e pela profundidade do laser infravermelho.

Entretanto o estudo feito por Pereira *et al.*, demonstrou que o uso do colete infravermelho (940 nm) reduz tempo de internação e necessidade de ventilação mecânica, sugerindo que o tratamento promoveu melhorias na função pulmonar, os resultados discrepantes com o presente estudo podem ser justificados pois um foi clínico quanto que o este pré-clínico e como já mencionado o comprimento de onda parece influenciar nos desfechos positivos da PBM, assim como no estudo de Sigma e colaboradores onde a melhora da função pulmonar também foi evidenciada após a aplicação do laser infravermelho em humanos (SIGMAN; MOKMELI; MONICI; VETRICI, 2020).

No presente trabalho foi possível observar efeitos positivos com a aplicação do Laser 660 nm, nossos achados auxiliam no entendimento de que a PBM foi capaz de ter efeitos anti-inflamatórios imediatos evidenciado pela redução dos marcadores inflamatórios no PCR, sendo capaz de melhorar variáveis da mecânica ventilatória, além de reduzir a atividade MPO com repercussão na análise histológica pulmonar resultados semelhantes foram encontrados em um estudo clínico, realizado com 52 pacientes irradiados com luz vermelha de 620- 635 nm onde foi possível verificar uma redução dos níveis de IL-6 e IL-8 e TNF-alfa após 6 horas de início de tratamento, demonstrando o seu potencial anti-inflamatório (MARASHIAN; HASHEMIAN; POURABDOLLAH; NASSERI *et al.*, 2022).

Por fim nossos resultados sugerem que para animais onde a lesão pulmonar fora induzida por LPS, a aplicação da PBM por laser vermelho apresentou efeitos anti-inflamatórios evidenciados pela redução de células pró-inflamatórias sendo capaz de gerar repercussões na mecânica ventilatória, na atividade MPO, promovendo remodelação da arquitetura do tecido pulmonar, contudo, só encontramos todos esses efeitos com o laser 660 nm, demonstrando que para animais o comprimento de onda parece ter um papel muito importante no desfecho final.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados sugerem que a fotobiomodulação é uma alternativa promissora para ser usada como tratamento adjuvante nos quadros de LPA/SDRA em modelo animal, podendo modular o processo inflamatório, pois ao aplicarmos laser com comprimento de onda de 660 nm, após 1 hora do insulto, verificamos uma melhora da ventilação mecânica, logo a fototerapia foi capaz de gerar um efeito reduzindo também a atividade MPO, redução de citocinas pró-inflamatórias com repercussão visível na análise histológica pulmonar, sendo capaz de atenuar o processo patológico da LPA.

No entanto nossos resultados também sugerem que tais efeitos são dependentes do comprimento de onda.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu subvenção específica de agências de fomento nos setores público, sendo fornecida pela agência FAPEMIG a financiadora.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Rafaella Rocha Figueiredo

Análise estatística, Coleta de Dados, Conceitualização, Gerenciamento do Projeto, Investigação, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Validação, Visualização.

Marcelo Lourenço Da-Silva

Análise estatística, Software, Supervisão, Validação.

Josie Resende Silva

Gerenciamento do Projeto, Supervisão.

Laura Pereira Generoso

Coleta de Dados, Metodologia.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados sugerem que a fotobiomodulação é uma alternativa promissora para ser usada como tratamento adjuvante nos quadros de LPA/SDRA em modelo animal, podendo modular o processo inflamatório, pois ao aplicarmos laser vermelho no comprimento de onda de 660 nm, após 1 hora do insulto, verificamos uma melhora da ventilação mecânica, logo a fototerapia foi capaz de gerar um efeito anti-inflamatório reduzindo também a atividade MPO, as citocinas pró-inflamatórias com repercussão visível na análise histológica pulmonar, sendo capaz de atenuar o processo patológico da LPA. No entanto tais efeitos são dependentes do comprimento de onda.

Mesmo com algumas limitações durante a realização dos experimentos, como número de intervenções e cirurgias, desafios da ventilação mecânica, esse estudo projeta a análise mais efetiva da PBM como terapia adjuvante, visando investigar o comportamento do Laser 660 nm associada a outras terapias anti-inflamatórias como a dexametasona.

REFERÊNCIAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. J. P. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol. New York.* v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

AOKI, Fabio Gava. **Modelos matemáticos aplicados na avaliação da mecânica respiratória em camundongos com desafios de agonista da musculatura lisa.** 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2013.

ASH, C.; DUBEC, M.; DONNE, K.; BASHFORD, T. J. L. i. m. s. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. **Lasers Med Sci.** Reino Unido. 32, p. 1909-1918, 2017.

BATES, J. H. **Lung mechanics: an inverse modeling approach.** Cambridge: University Press, 2009.

BECK-SCHIMMER, B.; SCHWENDENER, R.; PASCH, T.; REYES, L. *et al.* Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. **Respir Res.** Switzerland. v. 6, p. 1-14, 2005.

CAPUTO, N. D.; STRAYER, R. J.; LEVITAN, R. J. A. E. M. Early self-proning in awake, non-intubated patients in the emergency department: a single ED's experience during the COVID-19 pandemic. **Acad Emerg Med.** New York. v. 27, n. 5, p. 375-378, 2020.

CARVALHO, J.; BRITTO, A.; DE OLIVEIRA, A.; CASTRO-FARIA-NETO, H. *et al.* Beneficial effect of low-level laser therapy in acute lung injury after il/R is dependent on the secretion of IL-10 and independent of the TLR/MyD88 signaling. **Lasers Med Sci.** Brazil. v. 32, n. 2, p. 305-315, 2017.

D'ALESSIO, F. R. Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS. **Methods Mol Biol,** USA. v. 1809, p. 341-350, 2018.

D'ALESSIO, F. R. J. L. I. I.; METHODS, I.; PROTOCOLS. Mouse models of acute lung injury and ARDS. p. 341-350, 2018.

DA-PALMA-CRUZ, M.; DA SILVA, R. F.; MONTEIRO, D.; REHIM, H. M. M. A. *et al.* Photobiomodulation modulates the resolution of inflammation during acute lung injury induced by sepsis. 34, p. 191-199, 2019.

DA CUNHA MORAES, G.; VITORETTI, L. B.; DE BRITO, A. A.; ALVES, C. E. *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, p. 6798238, 2018.

DA SILVA SERGIO, L. P.; CORTES THOME, A. M.; DA SILVA NETO TRAJANO, L. A.; MENCALHA, A. L. *et al.* Photobiomodulation prevents DNA fragmentation of alveolar epithelial cells and alters the mRNA levels of caspase 3 and Bcl-2 genes in acute lung injury. 17, p. 975-983, 2018.

DE BRITO, A. A.; DA SILVEIRA, E. C.; RIGONATO-OLIVEIRA, N. C.; SOARES, S. S. *et al.* Low-level laser therapy attenuates lung inflammation and airway remodeling in a murine model of idiopathic pulmonary fibrosis: relevance to cytokines secretion from lung structural cells. 203, p. 111731, 2020.

DE LIMA, F. M.; MOREIRA, L. M.; VILLAVERDE, A.; ALBERTINI, R. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome. 26, p. 389-400, 2011.

DE LIMA, F. M.; MOREIRA, L. M.; VILLAVERDE, A. B.; ALBERTINI, R. *et al.* Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome. **Lasers Med Sci**, 26, n. 3, p. 389-400, May 2011.

DE LIMA, F. M.; NAVES, K.; MACHADO, A.; ALBERTINI, R. *et al.* Lung inflammation and endothelial cell damage are decreased after treatment with phototherapy (PhT) in a model of acute lung injury induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in the rat. 33, n. 12, p. 1212-1221, 2009.

DE OLIVEIRA MARTINS, D.; MARTINEZ DOS SANTOS, F.; EVANY DE OLIVEIRA, M.; DE BRITTO, L. R. *et al.* Laser therapy and pain-related behavior after injury of the inferior alveolar nerve: possible involvement of neurotrophins. 30, n. 6, p. 480-486, 2013.

ENWEMEKA, C. S.; BUMAH, V. V.; MASSON-MEYERS, D. S. J. J. o. P.; BIOLOGY, P. B. Light as a potential treatment for pandemic coronavirus infections: A perspective. 207, p. 111891, 2020.

FAN, E. K.; FAN, J. J. R. r. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation. 19, n. 1, p. 1-13, 2018.

FINSEN, N. R. **Phototherapy: 1. The Chemical Rays of Light and Smallpox, 2. Light as a Stimulant, 3. The Treatment of Lupus Vulgaris by Concentrated Chemical Rays.** Arnold, 1901.

FONSECA, L. M. C. d. Lesão pulmonar aguda induzida por injeção intraperitoneal de lipopolissacáride em ratos wistar com ou sem enfisema induzido por elastase. 2015.

GRASSELLI, G.; CALFEE, C. S.; CAMPOROTA, L.; POOLE, D. *et al.* ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies. **Intensive Care Med**, 49, n. 7, p. 727-759, Jul 2023.

KINGSLEY, D.; KUIS, R.; PEREZ, R.; BASALDUA, I. *et al.* Oxygen-dependent laser inactivation of murine norovirus using visible light lasers. 15, p. 1-8, 2018.

KLEBANOV, G.; KREININA, M.; POLTANOV, E.; KHRISTOFOROVA, T. *et al.* Mechanism of therapeutic effect of low-intensity infrared laser radiation. 131, p. 239-241, 2001.

LI, L.; DONG, L.; ZHANG, J.; GAO, F. *et al.* Mesenchymal stem cells with downregulated Hippo signaling attenuate lung injury in mice with lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. **Int J Mol Med**, 43, n. 3, p. 1241-1252, Mar 2019.

LIU, C.; XIAO, K.; XIE, L. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS. **Front Immunol**, 13, p. 971189, 2022.

MARASHIAN, S. M.; HASHEMIAN, M.; POURABDOLLAH, M.; NASSERI, M. *et al.* Photobiomodulation Improves Serum Cytokine Response in Mild to Moderate COVID-19: The First Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Pilot Study. **Front Immunol**, 13, p. 929837, 2022.

MATTHAY, M. A.; ARABI, Y.; ARROLIGA, A. C.; BERNARD, G. *et al.* A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, 209, n. 1, p. 37-47, Jan 1 2024.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L.; ZIMMERMAN, G. A.; ARABI, Y. M. *et al.* Acute respiratory distress syndrome. **Nat Rev Dis Primers**, 5, n. 1, p. 18, Mar 14 2019.

MATTHAY, M. A.; ZIMMERMAN, G. A.; ESMON, C.; BHATTACHARYA, J. *et al.* Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. 167, n. 7, p. 1027-1035, 2003.

MATUTE-BELLO, G.; DOWNEY, G.; MOORE, B. B.; GROSHONG, S. D. *et al.* An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.

MÉNDEZ, D. A. C.; RIZZATO, V. L.; LAMARQUE, G. C. C.; DIONISIO, E. J. *et al.* Could a chelant improve the effect of curcumin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy against dental intact biofilms? 34, n. 6, p. 1185-1192, 2019.

MOKRA, D. J. P. R. Acute lung injury—from pathophysiology to treatment. 69, n. Suppl 3, p. S353, 2020.

NEJATIFARD, M.; ASEFI, S.; JAMALI, R.; HAMBLIN, M. R. *et al.* Probable positive effects of the photobiomodulation as an adjunctive treatment in COVID-19: A systematic review. 137, p. 155312, 2021.

OLIVEIRA JR, M. C.; GREIFFO, F. R.; RIGONATO-OLIVEIRA, N. C.; CUSTÓDIO, R. W. A. *et al.* Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. 134, p. 57-63, 2014.

OLIVEIRA, M. C., Jr.; GREIFFO, F. R.; RIGONATO-OLIVEIRA, N. C.; CUSTÓDIO, R. W. *et al.* Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. **J Photochem Photobiol B**, 134, p. 57-63, May 5 2014.

PAGE, M. J.; KELL, D. B.; PRETORIUS, E. J. C. S. The role of lipopolysaccharide-induced cell signalling in chronic inflammation. 6, p. 24705470221076390, 2022.

PARDO, A.; SELMAN, M. J. A. J. o. R. C.; BIOLOGY, M. The interplay of the genetic architecture, aging, and environmental factors in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. 64, n. 2, p. 163-172, 2021.

PERCIE DU SERT, N.; HURST, V.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. 40, n. 9, p. 1769-1777, 2020.

PEREIRA, P. C.; DE LIMA, C. J.; FERNANDES, A. B.; ZÂNGARO, R. A. *et al.* Cardiopulmonary and hematological effects of infrared LED photobiomodulation in the treatment of SARS-COV2. **J Photochem Photobiol B**, 238, p. 112619, Jan 2023.

PORTO, S. S. Líquen plano oral e doenças sistêmicas: associação casual ou causal? 2021.

RABELO, M. A. E. Desenvolvimento de lesão pulmonar aguda induzida por instilação intratraqueal de lipopolissacáride em um modelo animal de enfisema pulmonar por administração de elastase. 2017.

SABINO, C. P.; BALL, A. R.; BAPTISTA, M. S.; DAI, T. *et al.* Light-based technologies for management of COVID-19 pandemic crisis. **J Photochem Photobiol B**, 212, p. 111999, Nov 2020.

SAHU, K. K.; MISHRA, A. K.; LAL, A. J. Q. A. I. J. o. M. Coronavirus disease-2019: An update on third coronavirus outbreak of 21st century. 113, n. 5, p. 384-386, 2020.

SATHE, N. A.; MOSTAGHIM, A.; BARNES, E.; O'CONNOR, N. G. *et al.* Biomarker Signatures of Severe Acute Kidney Injury in a Critically Ill Cohort of COVID-19 and Non-COVID-19 Acute Respiratory Illness. **Crit Care Explor**, 5, n. 7, p. e0945, Jul 2023.

SAVIN, I. A.; ZENKOVA, M. A.; SEN'KOVA, A. V. J. I. J. o. M. S. Pulmonary Fibrosis as a Result of Acute Lung Inflammation: Molecular Mechanisms, Relevant In Vivo Models, Prognostic and Therapeutic Approaches. 23, n. 23, p. 14959, 2022.

SIGMAN, S. A.; MOKMELI, S.; MONICI, M.; VETRICI, M. A. J. T. A. J. o. C. R. A 57-year-old African American man with severe COVID-19 pneumonia who responded to supportive photobiomodulation therapy (PBMT): first use of PBMT in COVID-19. 21, p. e926779-926771, 2020.

SIGMAN, S. A.; MOKMELI, S.; VETRICI, M. A. Adjunct low level laser therapy (LLLT) in a morbidly obese patient with severe COVID-19 pneumonia: A case report. **Can J Respir Ther**, 56, p. 52-56, 2020.

SOHEILIFAR, S.; FATHI, H.; NAGHDI, N. Photobiomodulation therapy as a high potential treatment modality for COVID-19. **Lasers Med Sci**, 36, n. 5, p. 935-938, Jul 2021.

YE, R.; LIU, Z. J. E.; PATHOLOGY, m. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway. 113, p. 104350, 2020.

YU, W.; CHI, L. H.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. J. L. i. S. *et al.* Improvement of host response to sepsis by photobiomodulation. 21, n. 3, p. 262-268, 1997.

ANEXO A - Comprovação da submissão da tese em revista, conforme regulamento do programa.



BrJP - GNPapers <gnpapers@gnpapers.com.br>
para mim ▾

30 de dez. de 2023, 16:36 (há 13 dias) ☆ ↶ ⋮



Ilmo(a). Sr(a).
Rafaella Rocha Figueiredo

Número do artigo: 643
Seção: Artigo Original

Saudações de todo o time que compõe o BrJP.

Informamos que recebemos o manuscrito "EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR EM RATOS", o qual será enviado para apreciação pelos revisores com vistas à consideração para publicação no(a) Brazilian Journal of Pain. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito, cite o número do artigo apresentado acima.

O(s) autor(es) declara(m) que o presente trabalho é inédito e o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em qualquer outro periódico, impresso ou eletrônico.

Agradecemos por escolher o BrJP para submeter seu manuscrito.

Atenciosamente,

Juliana Barcellos de Souza
Editora-chefe