

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

KARINA TEIXEIRA NAVES

**ESTUDO DA AÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (TLBP) EM
UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

São José dos Campos, SP
2008

KARINA TEIXEIRA NAVES

**ESTUDO DA AÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (TLBP) EM
UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos, SP
2008

N243i

Naves, Karina Teixeira

Estudo da Ação da Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) em um Modelo de Inflamação Pulmonar Aguda Induzida por LPS/ Karina Teixeira Naves. Orientador: Prof.Dr. Newton Soares da Silva. São José dos Campos: 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.2008.

1. Terapia a laser de baixa intensidade 2.Inflamação 3. Pulmão 4.Células endoteliais 5. Endotoxemia I. Silva, Newton Soares da, Orient. II . Título

CDU:616.24-002

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Aluna:



Data: 10/03/08

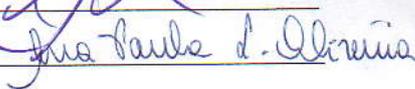
KARINA TEIXEIRA NAVES

**“ESTUDO DA AÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA
(TLBP) EM UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA
INDUZIDA POR LPS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP) _____

Prof^ª. Dra. **ANA PAULA LIGGEIRO DE OLIVEIRA** (USP) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 10 de março de 2008.

*Dedico este trabalho
aos meus pais Edison Naves e Eliana Teixeira Naves e aos meus irmãos, Pâmela Teixeira
Naves e Rafael Teixeira Naves.*

Agradecimentos

A Deus, por me sustentar durante todas as dificuldades encontradas ao longo do caminho que foi a realização deste trabalho. Sem esta força teria cedido à vontade de desistir que senti muitas vezes;

Aos meus pais e irmãos por acreditarem em mim e me encorajarem durante todo o processo;

Ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva pelo investimento e por ter disponibilizado o laboratório para que eu aprendesse um pouco mais;

Ao Prof. Dr. Flávio Aimbire Soares de Carvalho por me estender a mão quando precisei de um novo projeto e por toda a orientação que recebi;

À Prof^ª. Dr^ª. Cristina Pacheco Soares por estar sempre pronta a tirar minhas dúvidas com bom humor;

À Prof^ª. Dr^ª. Karen Cristiane Martinez de Moraes pelo encorajamento constante e por sempre me dizer que as coisas “eram assim mesmo, mas que dariam certo”;

A todos os meus companheiros de laboratório, em especial Aline, Fernanda, Maíra, Davi, Vinícius, pelas horas de descontração que todos precisamos quando estamos estudando ou quando estamos em experimento; com certeza demos boas risadas;

Também gostaria de agradecer aos professores Dr. Fábio Viera dos Santos, Dr^ª. Cláudia Barbosa Ladeira de Campos e Dr^ª. Josane Mittman. Embora o que me ensinaram não tenha sido usado diretamente neste trabalho, certamente foram informações que me ajudarão no futuro.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Apóstolo Paulo, citado na carta aos Filipenses, 4:13

ESTUDO DA AÇÃO DA TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (TLBP) EM UM MODELO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS

RESUMO

A injeção de lipopolissacarídeos (LPS) reproduz os sintomas da Lesão Pulmonar Aguda (LPA). A LPA está frequentemente associada com a endotoxemia, que é caracterizada pelo acúmulo de um grande número de neutrófilos ativados no pulmão, os quais produzem mediadores inflamatórios. Alguns autores têm relatado resultados interessantes sobre a ação da Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) em quadros de inflamação e suas conseqüências, como dor, edema e injúrias agudas. Não há informação sobre como a TLBP atua nos modelos experimentais de LPA. Por essa razão neste trabalho foi investigado se a TLBP (685nm InGaAlP) é capaz de atenuar a LPA induzida por LPS. Foi verificado que, em ratos Wistar, a TLBP reduz o acúmulo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA), os níveis de TNF- α no LBA, a atividade da mieloperoxidase. Em outra série de experimentos, foram realizados ensaios *in vitro* a fim de investigar o efeito da TLBP em células endoteliais de aorta de coelho (RAEC – do inglês “Rabbit Aortic Endothelial Cells”) após exposição ao TNF- α . Os resultados mostraram que a irradiação com laser auxilia na recuperação dos filamentos de actina do citoesqueleto das células endoteliais que foram alterados pela ação do TNF- α incubado na cultura. Juntos, esses resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório da TLBP no extravasamento microvascular pulmonar na LPA é devido, pelo menos em parte, à inibição da liberação de TNF- α por parte dos neutrófilos no tecido pulmonar.

Palavras-chave: Inflamação pulmonar aguda, LPS, laser, TNF- α , células endoteliais.

STUDY OF THE ACTIONS OF LOW LEVEL LASER THERAPY (LLLT) USING A LPS-INDUCED ACUTE LUNG INJURY MODEL

ABSTRACT

The lipopolysaccharide (LPS) injection mimics the symptoms of an acute lung injury (ALI). ALI is frequently associated with endotoxemia, which is characterized by the accumulation in the lungs of large numbers of neutrophils activated producing inflammatory mediators. Some authors have reported interesting results about Low Level Laser Therapy (LLLT) action on inflammation and its consequences, as pain, edema, and acute injuries. There is no information about how LLLT acts on ALI experimental model; thus, we investigated whether LLLT (685nm InGaAlP) can attenuate the LPS-induced ALI. We found, in Wistar rats, that LLLT reduced the accumulation of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL), TNF- α level in BAL, and the myeloperoxidase activity. In other series of experiments, an *in vitro* assay was carried out to investigate the LLLT effect on rabbit aortic endothelium cells (RAEC) after TNF- α exposure. The results demonstrated that laser irradiation helped with endothelial cell cytoskeleton actin filaments recovery which was altered by TNF- α incubation. Altogether, these results suggest that the LLLT anti-inflammatory effect on pulmonary leakage microvascular in ALI is due, at least partially, to inhibition of TNF- α releasing from neutrophils and lung tissue.

Key-words : Acute Lung Injury, LPS, Laser, TNF- α ., endothelial cells.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - O alvéolo normal (lado esquerdo) e o alvéolo danificado na fase aguda da Lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. | 4 |
| Figura 2 – Estrutura do Lipopolissacarídeo (LPS). | 8 |
| Figura 3 - Representação esquemática das principais áreas de aplicação da TLBP. | 13 |
| Figura 4 - Esquema de plaqueamento das células RAEC para análise de Microscopia de Fluorescência. | 21 |
| Figura 5A - Visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto de células RAEC – Grupo controle. | 27 |
| Figura 5B - Visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto de células RAEC – Grupo incubado com TNF-a por 1 hora. | 28 |
| Figura 5C - Visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto de células RAEC – Grupo incubado com TNF-a por 1 hora e irradiado com laser de InGaAlP. | 28 |

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Perfil celular do LBA dos animais tratados com laser e que receberam ou não LPS | 24 |
| Gráfico 2 - Atividade da Mieloperoxidase nos pulmões após injeção de LPS | 25 |
| Gráfico 3 - Atividade do TNF-a no LBA após a injeção de LPS | 26 |
| Tabela 1- Parâmetros para a irradiação <i>in vivo</i> . | 18 |
| Tabela 2 - Parâmetros para a irradiação <i>in vitro</i> | 21 |
| Tabela 3 - Comparação entre os filamentos de actina grupo controle e do grupo Laser | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

ALI – Acute Lung Injury

AP-1 – Activator Protein 1 (proteína ativadora)

ARDS – Acute Respiratory Distress Syndrome

ATF-1 – Activating Transcriptor Fator 1 (fator de ativação de transcrição)

CD18 – Cluster of Differentiation 18

Célula NK – célula “Natural Killer”

DE – Densidade de energia

EBSS - Solução Salina Balanceada de Earle

EGTA - Ethylene glycol tetraacetic acid

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

G-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos

IL – Interleucina

InGaAl – Índio Gálio Alumínio

KDO – Ácido-2-ceto-3-desoxioctônico

LBA – Lavado Broncoalveolar

LPB – Laser de Baixa Potência

LPS – Lipopolissacarídeo

MPO – Mieloperoxidase

NF- κ B – Nuclear Factor κ B

PA – Paraformaldeído

PAF – Fator de ativação plaquetária

PBS – Phosphate Saline Buffer (tampão salina fosfato)

PMN – Polimorfonuclear

RAEC – Rabbit Aortic Endothelial Cells (células endoteliais de aorta de coelho)

rpm – rotações por minuto

SARA – Síndrome da Angústia Respiratória Adulta

SFB – Soro fetal bovino

TLBP – Terapia com Laser de Baixa Potência

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

TNF- β – Fator de Necrose Tumoral β

TNF-R – Receptor do Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – grau Celsius

Ca²⁺ - cálcio

CO₂ – dióxido de carbono

cm² – centímetro quadrado

g – grama

h – hora

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

J – Joule

KCl – Cloreto de Potássio

Kg - Quilograma

KH₂PO₄ – Dihidrogenofosfato de potássio

L – Litro

M – Molar

mL – Mililitro

Mg²⁺ - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mM – Milimolar

mW – MiliWatts

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ – Hidrogenocarbonato de sódio

NaHPO₄ – Hidrogenofosfato de sódio

NaH₂PO₄ – Dihidrogenofosfato de sódio

Na_2HPO_4 – Hidrogenofosfato disódico

NH_4Cl – Cloreto de amônio

NO – Óxido nítrico

pH – Potencial de hidrogênio

O_2 – Oxigênio

U – Unidade

W – Watts

λ – Comprimento de onda

μL – Microlitro

nM – Nanomolar

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Objetivo | 2 |
| 1.2 | Objetivo Específicos | 2 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 | Lesão Pulmonar Aguda | 3 |
| 2.2 | Lipopolissacarídeos | 7 |
| 2.3 | Fator de Necrose Tumoral alfa | 9 |
| 2.4 | Laser de Baixa Potência | 10 |
| 2.4 | Laser de baixa potência e a Inflamação | 13 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 | Animais | 15 |
| 3.2 | Anestesia e Eutanásia | 15 |
| 3.3 | Administração de LPS e de TNF-a | 15 |
| 3.4 | Cultura de células | 15 |
| 3.5 | Preparo de Meio de cultura | 16 |
| 3.6 | Pancreatina | 16 |
| 3.7 | Preparo de PBS | 16 |
| 3.8 | Preparo de EBSS (Solução Salina Balanceada de Earle, sem cálcio e sem magnésio) | 16 |
| 3.9 | Preparo de Tampão Fosfato | 16 |
| 3.10 | Preparo de Tampão PHEM | 17 |
| 3.11 | Preparo de n-propil-galato (Sigma) | 17 |
| 3.12 | Preparo de Paraformaldeído (Sigma) | 17 |

| | |
|---|----|
| 3.13 Preparo da solução fixadora | 17 |
| 3.14 Rodamina-Faloidina | 17 |
| 3.19 Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) – In vivo | 17 |
| 3.20 Indução da Lesão Pulmonar Aguda | 18 |
| 3.21 Lavado Broncoalveolar (BAL) | 19 |
| 3.22 Determinação da Atividade do Fator de Necrose Tumoral (TNF-a) no LBA | 19 |
| 3.23 Atividade da Mieloperoxidase (MPO) | 20 |
| 3.24 Avaliação do dano nas células endoteliais induzido pelo LPS | 20 |
| 3.25 Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) – <i>In vitro</i> | 21 |
| 3.26 Análise dos filamentos de actina do citoesqueleto das células RAEC | 22 |
| 3.27 Análise Estatística | 22 |
| 4 RESULTADOS | 23 |
| 4.1 Efeito da TLBP nas células inflamatórias do lavado broncoalveolar (LBA) | 23 |
| 4.2 Efeito da TLBP na atividade da Mieloperoxidase | 24 |
| 4.3 Efeito da TLBP na concentração de TNF-a no LBA | 25 |
| 4.4 Efeito da TLBP no citoesqueleto de células endoteliais | 26 |
| 5 DISCUSSÃO | 30 |
| 6 CONCLUSÕES | 35 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa | 46 |

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA ou ARDS, do inglês “Acute Respiratory Distress Syndrome”) é uma doença caracterizada pela Lesão Pulmonar Aguda (LPA ou ALI, do inglês “Acute Lung Injury”), que leva a permeabilidade pulmonar, edema e falência respiratória (ASHBAUGH et al 1967; PETTY; ASHBAUGH 1971). Não há uma terapia específica e a mortalidade causada por essa doença ainda permanece alta (MATTHAY et al, 2003). Os neutrófilos circulantes desempenham um grande papel no desenvolvimento tanto de estudos clínicos quanto de modelos experimentais em animais (HOGG; DOERSCHUK, 1995; DOERSCHUK et al, 1999; SAITO et al, 2002).

A perda da integridade da barreira endotelial pulmonar juntamente com a formação de lacunas entre as células é uma marca ultraestrutural da LPA e da sua forma mais severa, a SARA (BACHOFEN; WEIBEL, 1982; WARE; MATTHAY, 2000). As mudanças conformacionais da microvasculatura pulmonar são conseqüências da ativação do endotélio pulmonar por diversos estímulos bioativos e biofísicos e resultam em alta permeabilidade pulmonar, edema e inundação alveolar (DUDEK ; GARCIA, 2001).

A administração intravenosa ou intratraqueal de LPS, um componente da parede celular bacteriana, é um modelo experimental aceito para a LPA (PETTY; ASHBAUGH 1971; MATTHAY et al, 2003). Dentre os mediadores pró-inflamatórios que participam da inflamação dos pulmões e das vias aéreas durante a endotoxemia induzida por LPS, o fator de necrose tumoral (TNF- α) desempenha um papel essencial no desenvolvimento da LPA. O TNF- α participa de ambas as respostas inflamatórias (inicial e tardia), sendo capaz de iniciar e perpetuar a inflamação (ISOWA et al, 1999; MCRITCHIE et al, 2000).

Os tratamentos tradicionais para a LPA incluem estratégias de ventilação mecânica e uma variedade de corticoesteróides farmacológicos (BERNARD et al, 1987), surfactantes exógenos (ANZUETO, 2002), inalação de óxido nítrico (GERLACH et al, 2003), metotrexato e outros agentes modificadores como a ciclosporina e imunoglobulina intravenosa, e também novos tratamentos, como o uso de bloqueadores de TNF- α (PILKINGTON; WEDDENBURG, 2005). No entanto, essas terapias convencionais ocasionam efeitos colaterais significativos que acabam por comprometer a terapia por longos períodos.

As vantagens terapêuticas da TLBP para o tratamento de patologias inflamatórias têm sido sugeridas por diversos autores (SHIMIZU et al, 1995; CAMPANA et al, 1999; SAKURAI; YANAGUCHI; ABIKO, 2000; ALBERTINI et al, 2004; BJORDAL et al, 2006). Alguns

trabalhos mostram que a terapia com laser é capaz de interferir positivamente com a finalidade de aliviar os sinais clínicos e os sintomas iniciais e tardios da inflamação pulmonar e das vias aéreas (LANDYSHEV et al, 2002; MILOJEVIC; KURUC, 2003). Entretanto, o mecanismo de sinalização celular que resulta nos efeitos anti-inflamatórios da TLBP na inflamação das vias aéreas e dos pulmões tem sido pouco explorado. No modelo experimental de lesões hemorrágicas *in vitro* induzidas por imuno-complexo em pulmões de rato, a TLBP reduziu o nível de TNF- α e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), o que leva a crer que a TLBP interfere com o TNF- α , o qual participa da LPA (AIMBIRE et al, 2007).

Considerando os efeitos da TLBP na inflamação pulmonar e das vias aéreas, foi investigado no presente estudo se a TLBP é capaz de reduzir a migração de neutrófilos e as mudanças no endotélio pulmonar através da utilização de um modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em ratos.

1.1 Objetivos

Através da utilização de um modelo animal e uma linhagem celular endotelial a proposta deste trabalho foi utilizar a endotoxina bacteriana LPS para induzir um modelo de Lesão Pulmonar Aguda com LPS com o objetivo de estudar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência (InGaAlP) sobre diferentes aspectos desta afecção. Os objetivos específicos são listados a seguir.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade do TNF- α no lavado broncoalveolar;
- Avaliar a atividade da Mieloperoxidase;
- Avaliar os efeitos causados pelo LPS no endotélio celular *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesão Pulmonar Aguda

A Síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) e a lesão pulmonar aguda (LPA) foram descritas pela primeira vez em 1967 por Ashbaugh como uma síndrome clínica e são caracterizadas por um princípio abrupto de hipoxemia clinicamente significativa com a presença de infiltrados pulmonares. Estes infiltrados aparecem nas radiografias como edema pulmonar resultado da permeabilidade vascular pulmonar aumentada (ASHBAUGH et al, 1967).

Essas doenças afetam pacientes de todas as idades e geralmente aparecem logo após um evento desencadeador que é identificado facilmente. A probabilidade de se desenvolver lesão pulmonar aguda depende da doença a que se é sensível; alguns eventos são mais prováveis de progredir para uma lesão pulmonar do que outros (WHEELER; BERNARD, 2007).

A LPA/SARA podem ocorrer associadas com diversas doenças, as quais podem ser divididas em dois grupos, um de injúrias diretas, outro de injúrias indiretas. Wheeler e Bernard (2007) trazem em seu trabalho uma lista de causas da LPA. As injúrias diretas incluem pneumonia, aspiração gástrica, afogamento, embolia de gordura e de fluido-amniótico, contusão pulmonar, hemorragia alveolar, inalação de fumaça e gases tóxicos e reperfusão (drenagem de efusão pleural, embolectomia). Já as injúrias indiretas que podem causar LPA incluem sepse severa, transfusões, choque, overdose de salicilatos ou narcóticos e pancreatite.

O desenvolvimento da LPA/SARA se dá em fases. A fase inicial da LPA/SARA é caracterizada pelo aumento da permeabilidade das barreiras endotelial e epitelial dos pulmões, com o acúmulo de fluido edematoso altamente celular e rico em proteínas no interstício e alvéolos (MATTHAY; WIENER-KRONISH, 1990). O fluido edematoso contém membranas de hialina (que é constituída de diferentes tipos de proteínas como, por exemplo, fibrina, albumina, imunoglobulinas e moléculas da matriz) e uma variedade de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos (MATTHAY; CEPKOVA, 20006) (Figura 1). As células inflamatórias, as células epiteliais pulmonares e os fibroblastos produzem citocinas que amplificam a resposta inflamatória. Vias pró-coagulantes são reguladas positivamente e a

fibrinólise é diminuída, o que leva a deposição extravascular e intravascular de fibrina (CHAPMANN; BERTOZZI; REILLY, 1988; IDELL et al, 1989).

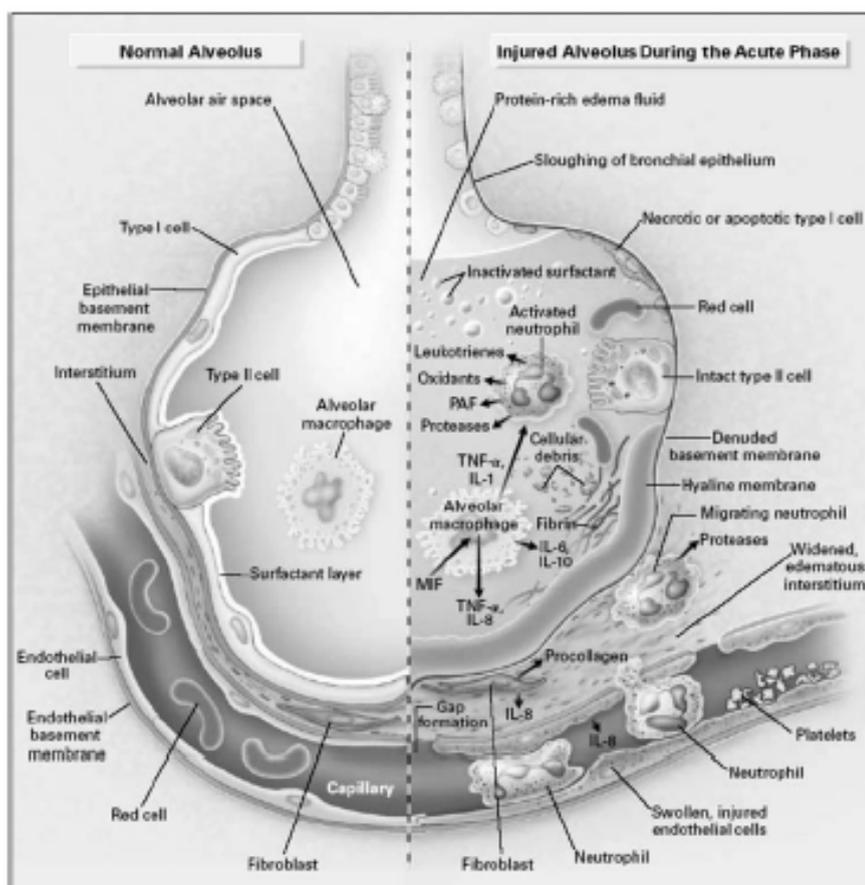


Figura 1: O alvéolo normal (lado esquerdo) e o alvéolo danificado na fase aguda da Lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. Na fase aguda da síndrome (lado direito), há degradação das células epiteliais brônquial e alveolar, com a formação de membranas de hialina ricas em proteína na membrana basal exposta. Os neutrófilos estão ilustrados aderindo ao endotélio capilar danificado a marginando através do interstício em direção ao espaço aéreo, que está cheio de fluido edematoso rico em proteínas. No espaço aéreo um macrófago alveolar está secretando citocinas, interleucinas como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 e TNF- α , o qual atua localmente para estimular a quimiotaxia e a ativação dos neutrófilos. A IL-1 também pode estimular fibroblastos a produzirem matriz extracelular. Os neutrófilos podem liberar oxidantes, proteases, leucotrienos e outras moléculas pró-inflamatórias como o fator de ativação plaquetária (PAF). (Extraído de: CEPKOVA; MATTHAY, 2006).

A deposição intracelular de fibrina e a formação de trombo levam a obstrução vascular e alterações na microvasculatura. Uma correlação patológica da fase inicial da LPA tem sido denominada *dano alveolar difuso* e consiste na associação das membranas de hialina a pelo menos uma das seguintes conseqüências: necrose de célula alveolar tipo I ou de célula endotelial, edema, fibrose intersticial ou proliferação proeminente de célula alveolar tipo II (TOMASHEFSKY, 2000; ESTEBAN et al, 2004; MATTHAY; CEPKOVA, 2006). Alguns pacientes se recuperam da LPA/SARA durante as primeiras semanas da doença, alguns morrem durante este período, mas alguns progridem para uma fase subaguda (tardia) da

LPA/SARA que se desenvolve 5-7 dias após o começo da doença. Durante essa fase subaguda, o espaço alveolar se torna cheio de células mesenquimais, e de seus produtos, além de novos vasos sanguíneos (FUKUDA et al, 1987). Finalmente, em alguns pacientes a falência respiratória persiste por mais de 14 dias e essa fase crônica é caracterizada por fibrose pulmonar excessiva com destruição da arquitetura normal dos alvéolos e desenvolvimento progressivo de regiões de enfisema no pulmão (CEPKOVA; MATTHAY, 2006).

Outros autores também descrevem as fases de desenvolvimento da LPA/SARA. Tazaka, Hasegawa e Ishizaka (2002) dividem o progresso da LPA como tendo uma primeira fase chamada de fase de risco. Esta é seguida por uma segunda, conhecida como fase aguda ou exudativa que é caracterizada pela ativação e infiltração de células inflamatórias durante as primeiras 24-48 horas. Então a doença progride para a terceira fase ou proliferativa, que ocorre entre 2 e 7 dias, quando os fibroblastos infiltram e remodelam o sítio da inflamação. Por fim, há uma quarta fase ou fibrótica, que sobrevém 7-14 dias após o início da inflamação, resultando na consolidação e fibrose do parênquima pulmonar. Essas informações também são relatadas em outros trabalhos (GATTINONI et al, 1994; MEDURI et al, 1991).

Durante a LPA e a SARA, o fluido do lavado broncoalveolar contém numerosas substâncias pró-inflamatórias e pró-coagulantes, além de proteínas e neutrófilos, o que enfatiza a importância da inflamação na patogênese do edema resultante da permeabilidade aumentada. Os mediadores inflamatórios que podem contribuir para a injúria vascular pulmonar incluem produtos de ativação do complemento, o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , fator de ativação plaquetário (PAF), endotelina, tromboxano A₂ e leucotrienos (HALES et al, 1981; CHANG et al, 1987; ICHINOSE et al, 2001). Os mediadores secundários podem ser as metaloproteínases de matriz derivadas de neutrófilos, elastase e radicais de O₂ (CHABOT et al, 1998; FINK, 2002). As citocinas intermediárias e a IL-8, potente estimulador de neutrófilos, podem desempenhar um papel importante na SARA (GROENEVELD, 1998). Entretanto, a resposta inflamatória das citocinas pode alterar diretamente o citoesqueleto do endotélio e aumentar a permeabilidade independentemente dos neutrófilos (DUDEK ; GARCIA, 201).

A LPA não tem um tratamento específico. O que se faz principalmente é prover ao paciente um cuidado de suporte para evitar complicações e tratar a causa desconhecida enquanto se mantém uma oxigenação adequada (WHEELER; BERNARD, 2007). Entretanto a literatura fornece exemplos de estudos sobre opções para o tratamento da LPA.

Uma vez que a LPA/SARA está associada com inflamação sistêmica e sepse, é possível supor que uma terapia dirigida contra os mediadores conhecidos pode reduzir a

incidência da síndrome. Devido ao fato do TNF-a ser conhecido por desempenhar um papel central na patogênese da sepse, um número de drogas contra o TNF-a foram produzidas. Os diferentes compostos neutralizadores de TNF-a usados em testes clínicos podem ser divididos em dois grupos: aqueles que utilizam anticorpos monoclonais contra TNF-a humano e aqueles que usam receptores solúveis de TNF-a com capacidades neutralizantes. Testes iniciais falharam em obter um efeito significativo estatisticamente sobre a sobrevivência de pacientes sépticos (FISHER et al, 1993; COHEN et al, 1996; ABRAHAM et al, 1998).

Um dos passos iniciais na LPA/SARA é a interação entre os neutrófilos e as células endoteliais, o que é mediado por diversas moléculas de adesão. Nesse contexto, o bloqueio das moléculas de adesão com anticorpos monoclonais ou com outros agentes que interferem na ligação entre neutrófilos e células endoteliais tem sido visto como uma modalidade terapêutica. Um alvo é uma molécula de adesão dos neutrófilos, o CD18, que medeia a adesão firme entre os neutrófilos e as células endoteliais. Diversos estudos *in vivo* têm demonstrado que o bloqueio do CD18 leva a atenuação do desenvolvimento de lesão pulmonar experimental (MILESKY et al, 1990; VEDDER et al, 1988).

Tanto os vasodilatadores não-seletivos como os semi-seletivos (óxido nítrico, prostaglandina E1, prostaciclina) têm sido testados para o tratamento da lesão pulmonar aguda. Destes compostos, o óxido nítrico (NO) tem sido o mais extensivamente estudado e os resultados são relativamente consistentes nos estudos realizados: a oxigenação e a resistência vascular pulmonar foram melhoradas, mas essas mudanças não significam melhores resultados clínicos (ADHIKARI, GRANTON, 2004; TAYLOR, ZIMMERMAN, DELLINGER, 2004).

Outra estratégia para a modulação farmacológica da LPA/SARA é a apoptose. Como os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio inflamado, eles aumentam a inflamação local por gerar espécies reativas de oxigênio e enzimas degradativas, o que leva a dano tecidual. Neste cenário, a apoptose de neutrófilos pode ser um dos mecanismos para limitar o dano tecidual no local inflamado (SAVILL, 1997; LEE, WHYTE, HASLETT, 1993). Na sepse, entretanto, é observado uma diminuição da apoptose de neutrófilos. É dito que a sobrevivência dos neutrófilos nos pulmões é prolongada em pacientes com SARA, quando a inflamação é mais severa, provavelmente por causa da presença elevada de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) no LBA (MATUTE-BELLO et al, 2000). Apesar do papel da apoptose na inflamação aguda não ser bem estabelecido, a promoção da apoptose de neutrófilos ou a prevenção da apoptose de células endoteliais poderia ser

protetora contra a propagação da destruição tecidual que o neutrófilo medeia (CENEVIVA et al, 1998).

Existem outras estratégias estudadas por diferentes pesquisadores que buscam um tratamento eficaz para a LPA/SARA. Mas os resultados não são totalmente conclusivos. Uma alternativa é a terapia com laser de baixa potência. Há diversos trabalhos com o laser de baixa potência atuando na inflamação, entretanto quase não há trabalhos que relatam o uso do laser para o tratamento da LPA.

2.2 Lipopolissacarídeos

Os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas e desempenham um importante papel (TASAKA; HASEGAWA; ISHIZAKA, 2002). O LPS é um potente ativador do sistema imune. Ele induz uma variedade de respostas imunológicas em uma infecção severa como a inflamação local, produção de anticorpos e choque séptico. Além disso, O LPS é o maior mediador das altas taxas de morbidade e mortalidade características das bactérias Gram-negativas, como por exemplo, o choque endotóxico (FENTON; GOLENBOCK, 1998; MIKUNI et al, 2000).

A arquitetura do LPS é formada por três regiões ou “blocos”: a região lipídica A; uma região interna central; e uma cadeia lateral O - específica. Essas regiões apresentam composições diferentes, o que é refletido nas suas atividades biológicas e funcionais (Figura 2). Tem sido considerado que a atividade “endotóxica” do LPS é amplamente devida à região lipídica A, embora a atividade do LPS possa ser mediada por outras regiões da molécula. Essa região lipídica pode diferir de bactéria para bactéria em termos de resíduos de açúcar; na natureza, comprimento de cadeia, número e localização dos resíduos acil; no grau de fosforilação; e na natureza das substituições nos grupos fosfato. A região central é constituída de uma porção interna e outra externa. A interna é caracterizada pela presença de açúcares incomuns, a heptose e o ácido 2-ceto-3- desoxioctônico (KDO), e tem a capacidade de exercer efeito nas atividades biológicas do lipídio A, incluindo a capacidade de induzir síntese de citocinas (HENDERSON; POOLE; WILSON, 1996). A cadeia lateral-O é o segmento mais variável do LPS, capaz de desencadear reações imunológicas na qual o organismo infectado é capaz de produzir anticorpos específicos (WESTPHAL; LUDERITZ, 1960 apud AIMBIRE 2006).

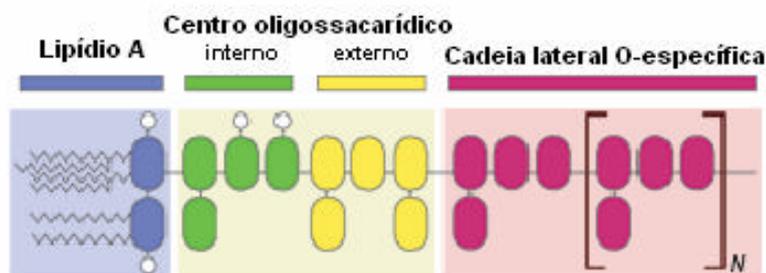


Figura 2: Estrutura do Lipopolissacarídeo (LPS). A figura ilustra as três regiões distintas do LPS, principais componentes de parede celular de bactérias Gram-negativas (Extraído e modificado de: www.uoguelph.ca/~cwhitfie/images/core1.gif).

Na resposta imune inicial ao LPS, os macrófagos, que são os principais alvos para a ação do LPS, desempenham um papel central na defesa do hospedeiro com respostas físicas e imunes contra a infecção bacteriana. (WEINSTEIN; GOLD; DeFRANCO, 1991). Acredita-se que a transdução de sinal induzida pelo LPS requer ligação a um receptor celular específico, que inclui os receptores tipo Toll (YANG et al, 2000; BEUTLER, 2002). Enquanto os produtos de bactéria estão se ligando aos receptores tipo Toll dos macrófagos, a célula é ativada e estimula uma série de sistemas de defesa, o que requer a participação de múltiplas moléculas sinalizadoras (ULEVITCH, TOBIAS, 1995; HSU; WEN, 2002). Em seguida, o sinal segue por vias e ativa diversos fatores de transcrição, que incluem o AP-1, o NF- κ B (SHAKHOV et al, 1990), e o ATF-2 (GRAY et al, 1993). Essa ação, por sua vez, desencadeia a transcrição de uma grande quantidade de genes que codificam mediadores inflamatórios e citocinas. Sabe-se que o LPS exerce múltiplos efeitos nos macrófagos, como a regulação das funções dos macrófagos (VAN LENTEN; FOGELMAN, 1992; HSU; TWU, 2002) e a indução de citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6, e o TNF (HSU; WEN, 2002).

No pulmão, tem sido demonstrado que a liberação de TNF- α favorece o seqüestro e migração de neutrófilos os quais desempenham um papel crítico na patogênese da inflamação pulmonar (ULICH et al, 1991; DENIS et al 1994).

Ao utilizar modelos de camundongos para reproduzir a inflamação local causada por partículas bacterianas presentes no ar, Moraes e colaboradores (1998) observaram que a inalação de aerossóis de LPS levou a uma produção significativa de TNF- α detectado no lavado broncoalveolar (LBA), seguido de infiltração de neutrófilos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos após a administração de LPS via aerossol ou via intratraqueal em ratos e porcos de Guiné (KIPS et al, 1993; TANG et al, 1995; HOWELL et al, 1995), que

mostravam uma infiltração de neutrófilos dentro do espaço pulmonar provavelmente devido à formação de TNF-a induzida por LPS.

2.3 Fator de Necrose Tumoral alfa

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF-a), descoberto em 1975 por Carswell e colaboradores, foi considerado como sendo uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo (CARSWELL et al, 1975).

O TNF-a é a citocina membro da superfamília TNF mais amplamente estudada. É secretado por macrófagos estimulados por LPS e causa necrose de tumores *in vivo* quando injetados em tumores de camundongos, o que lhe deu o nome de fator de necrose tumoral (CARSWELL et al, 1975). Essa citocina é produzida por muitos tipos celulares. As fontes *in vivo* de TNF-a são macrófagos, neutrófilos, células-T, linfócitos B, mastócitos, basófilos, células da musculatura lisa, eosinófilos, células NK (*natural killer*), mastócitos e células endoteliais (COTRAN et al, 2000). Condrócitos, osteoblastos e queratinócitos também liberam TNF-a quando estimulados. Os estímulos fisiológicos para a síntese de TNF-a incluem a IL-1, endotoxinas bacterianas, TNF e fator de crescimento plaquetário (PDGF) (MUKHOPADHYAY; HOIDAL; MUKHERJEE, 2006). O principal estímulo para a sua produção é a presença de lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias Gram negativas (IINO et al, 1990).

Após ser produzido e liberado, o TNF-a irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito biológico. Os receptores de TNF (principalmente o TNF-RII) podem, ainda, desencadear o gatilho para a apoptose. Entretanto, o mecanismo que determinará qual efeito será dominante ainda não está totalmente esclarecido. Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF-a é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Para isto, o TNF-a provocará uma série de efeitos no organismo (VITALE ; RIBEIRO, 2007).

Administrações *in vivo* de LPS induzem produção de níveis elevados de TNF- α em modelos animais e reproduzem muitas características comuns ao choque séptico com reações pró-inflamatórias severas (ITO et al, 2006). Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que a geração de níveis elevados de TNF- α leva à exacerbação de respostas pró-inflamatórias e pró-

oxidativas que são importantes na patogênese de muitas doenças, incluindo várias doenças pulmonares.

O TNF- α exerce profundos efeitos sobre a fisiologia celular, induzindo a produção de mediadores inflamatórios tais como o NO e eicosanóides. O TNF- α é sintetizado localmente nos pulmões e está próximo às células da musculatura lisa das vias aéreas (BROIDE et al, 1992). Alguns autores como Parson et al. (1989), Tracey et al. (1990) e Wheeler et al. (1991) observaram que o sistema respiratório mostra-se sensível aos efeitos da TNF- α reproduzindo sinais clínicos observados na SARA. Existem dados indicando que em ratos (KIPS et al, 1992), cobaias (UNO et al, 1997) e voluntários (THOMAS et al, 1995), o TNF- α participa de forma importante no desencadeamento da hiperreatividade pulmonar à acetilcolina (ACh). A exposição de camundongos ao LPS causa hiper-reatividade brônquica à metacolina, cuja modulação, diferentemente do que ocorre na asma, não é feita por eosinófilos, e sim por neutrófilos e macrófagos (VARGAFTIG et al, 1997; LEFORT et al, 1998).

A literatura relata que ambos os subtipos TNF- α como o TNF- β aparecem na circulação durante o início da lesão pulmonar induzida pela sepse, o que implica essas citocinas como potenciais mediadores inflamatórios dessa doença (LEEPER-WOODFORD et al, 1991). Com base em diversos estudos experimentais, o TNF- α juntamente com outras citocinas é considerado como um importante mediador inicial da LPA (SHERIDAN et al, 1997).

2.4 Laser de Baixa Potência

A palavra *LASER* é um acrônimo da expressão *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation* que significa amplificação da luz pela emissão estimulada da irradiação.

O fenômeno físico da emissão estimulada foi formulado por Einstein, em 1916.

Theodore H. Maimann (1960) construiu o primeiro emissor de laser de material sólido, utilizando o rubi como meio ativo. Em 1967, Endre Mester – que trabalhava na universidade de Semmelweis em Budapest, Hungria – quis testar se a radiação laser poderia causar câncer em camundongos (MESTER; SZENDE; GARTNER, 1968). Ele depilou o dorso dos animais, dividiu-os em dois grupos e tratou com laser de baixa potência que tinha o rubi como meio ativo (694 nm) um dos grupos. Esses animais irradiados não desenvolveram câncer e, para a surpresa de Mester, o pêlo do dorso do grupo irradiado cresceu mais rápido do que o grupo

não irradiado. Esta foi a primeira demonstração da “bioestimulação do laser”. Mester descreveu também que o laser pode interagir com o tecido em diferentes níveis: molecular, celular, tissular e orgânico, com efeitos sinérgicos, similarmente como ocorre nas respostas do sistema imunológico. Desde então, esta forma de energia passou a ser aplicada em inúmeros processos industriais e científicos, substituindo muitas ferramentas de trabalho, em que precisão e qualidade se fazem necessários. Atualmente, a Terapia com Laser (ou Luz) de Baixa Potência (TLBP), também conhecida como “cold laser”, “soft laser”, “bioestimulação” ou “fotobiomodulação” é praticada como parte de terapia física em muitas partes do mundo (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

As características que identificam e diferenciam a radiação laser das outras ondas luminosas, segundo Rigau (1996) são:

- Monocromaticidade: emissão de radiação com um único comprimento de onda;
- Colimação: os feixes de luz são paralelos, permitindo que uma grande quantidade de energia seja transmitida a um alvo preciso;
- Coerência: sincronização das ondas de luz no espaço e no tempo.

Nas ciências da saúde a utilização do laser está calcada a fenômenos associados (reflexão, transmissão, absorção e espalhamento) à interação da luz coerente por um sistema biológico. Esses fenômenos possuem características distintas e dependem dos componentes estruturais do meio ativo do laser e de sua interação com os tecidos biológicos.

O laser é uma fonte de luz não-ionizante, altamente concentrada, que, ao incidir sobre uma superfície qualquer, dobra-se, sendo uma parte refletida e a outra absorvida. Os tecidos biológicos são pouco homogêneos do ponto de vista óptico. Mediante a irradiação laser, introduz-se energia a um sistema biologicamente vivo que utiliza e transforma essa energia para seu consumo. A dose de irradiação, fluência ou densidade de energia (DE) é o parâmetro mais importante da terapia com laser. Se a dose for demasiadamente baixa, inferior a $0,1 \text{ J/cm}^2$, os resultados não serão obtidos, e se a dose for muito alta pode-se ter um resultado negativo, não estimulatório ou, até mesmo, inibitório (KANA et al., 1989). Devido a esses efeitos inibitórios o termo bioestimulação foi substituído por “biomodulação” (SCHINDL et al, 2000).

Os lasers são divididos em alta e baixa potência. Os primeiros produzem um efeito térmico e são destinados à remoção, ao corte e a coagulação dos tecidos, enquanto os de baixa potência (abaixo de 1 W/cm^2) são utilizados em processos de reparação tecidual, sem poder destrutivo. Em geral os aparelhos usados na terapia laser de baixa potência (TLBP) emitem luz na faixa do vermelho e do infravermelho, isto é, luz nos comprimentos de onda entre 600

e 1000nm (RIGAU, 1996). São aparelhos constituídos principalmente pelo cristal de arseneto de gálio (GaAs), emitindo comprimentos de onda (?) de 904nm, e pelo arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), emitindo ? de 780 a 870nm, constituindo os principais lasers de diodos empregados na biomodulação (RIGAU, 1996; ORTIZ et al., 2001).

A luz laser estimula a atividade energética da membrana celular, induzindo processos de biomodulação (BASFORD et al, 1995), conduzem à liberação de fatores de crescimento por macrófagos (YOUNG, 1989), proliferação de queratinócitos (HAAS et al, 1990), aumento da população e degranulação de mastócitos (EL SAYED; DYSON, 1991), mas estes processos não são obtidos com doses baixas, e no caso de doses altas de irradiação, parece que os efeitos são inibitórios (bioinibição).

A terapia de baixa potência é uma denominação genérica que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminescentes monocromáticos de intensidade relativamente baixa (< 1W) para o tratamento de afecções e lesões. Esta intensidade é considerada demasiadamente baixa para que qualquer aquecimento seja detectável nos tecidos irradiados. Assim, a terapia laser de baixa potência é uma modalidade terapêutica atérmica e seus efeitos são de fotobiomodulação por laser (KITCHEN ; BAZIN, 1998).

Karu (1989) demonstrou alguns efeitos biológicos associados à terapia com laser de baixa potência tais como: crescimento celular estimulado (tecidos conjuntivo, tendinoso e ósseo), reparação celular (aceleração nas células nervosas), efeito antiinflamatório (redução da capacidade dos linfócitos em reagir a estímulos antigênicos), redução de edema/revascularização (aceleração na regeneração de vasos linfáticos e veias), redução da formação de tecido fibroso (reduz/retarda a fibrose tissular após injúrias teciduais), maior atividade tissular (mudanças no conteúdo de prostaglandinas, maior conteúdo de enzimas específicas, aumento da formação de produtos celulares), função nervosa estimulada (aumento da amplitude dos potenciais de ação). Um aspecto importante da terapia com laser de baixa potência, é que parece ser necessário que o tecido biológico esteja de alguma forma em desequilíbrio homeostático, ou seja, alguns autores relatam que o laser de baixa potência não tem efeito sobre células ou tecidos que não apresentam algum tipo de alteração fisiopatológica (TÚNER, 1998; HODE, 1998).

Hamblin e Demidova (2006) em sua revisão sobre os mecanismos da TLBP acreditam e relatam haver evidências de que múltiplos tipos celulares mamíferos e microbianos podem responder ao laser de Baixa Potência. Ainda que muito do trabalho de Karu tenha sido realizado com *Escherichia coli* (TIPHLOVA; KARU, 1991) e células HeLa (KARU et al, 1996), os autores acreditam que para que as aplicações clínicas da TLBP sejam validadas, é

muito mais importante estudar os efeitos da TLBP em tipos celulares não malignos aptas a serem estimuladas para remediarem algumas doenças ou injúrias. Citam em seu trabalho vários tipos celulares que podem ser usados em diversos estudos com TLBP.

Para estudos sobre cicatrização, boas linhagens são, provavelmente, células endoteliais (MOORE et al, 2005), fibroblastos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005), queratinócitos (YU et al, 2003) e possivelmente algumas classes de leucócitos como os macrófagos (YOUNG et al, 1989) e os neutrófilos (FUGIMAKI et al, 2003). Para estudos sobre o alívio da dor e regeneração de nervos, boas linhagens serão de neurônios (CHEN et al, 2005; MILORO et al, 2002; BALABAN et al, 1992) e células glia (BYRNS et al, 2005). Para aplicações anti-inflamatórias e anti-edema as linhagens são de macrófagos (YUONG et al, 1989), mastócitos (EL SAYED; DYSON, 1996), neutrófilos (LOPES-MARTINS et al, 2005), linfócitos (AGAIBY, 2000) e outros.

2.4 Laser de baixa potência e a Inflamação

Há, talvez, três áreas principais da medicina e veterinária onde a TLBP tem um papel importante a desempenhar (Figura 3). Estes são (a) cicatrização de ferimentos, reparo tecidual e prevenção da morte do tecido; (b) alívio da inflamação em doenças crônicas e das dores e edema associados a injúrias; (c) alívio da dor neurogênica e de alguns problemas neurológicos. As vias propostas para explicar os mecanismos da TLBP deveriam de modo ideal ser aplicáveis a todas essas condições.

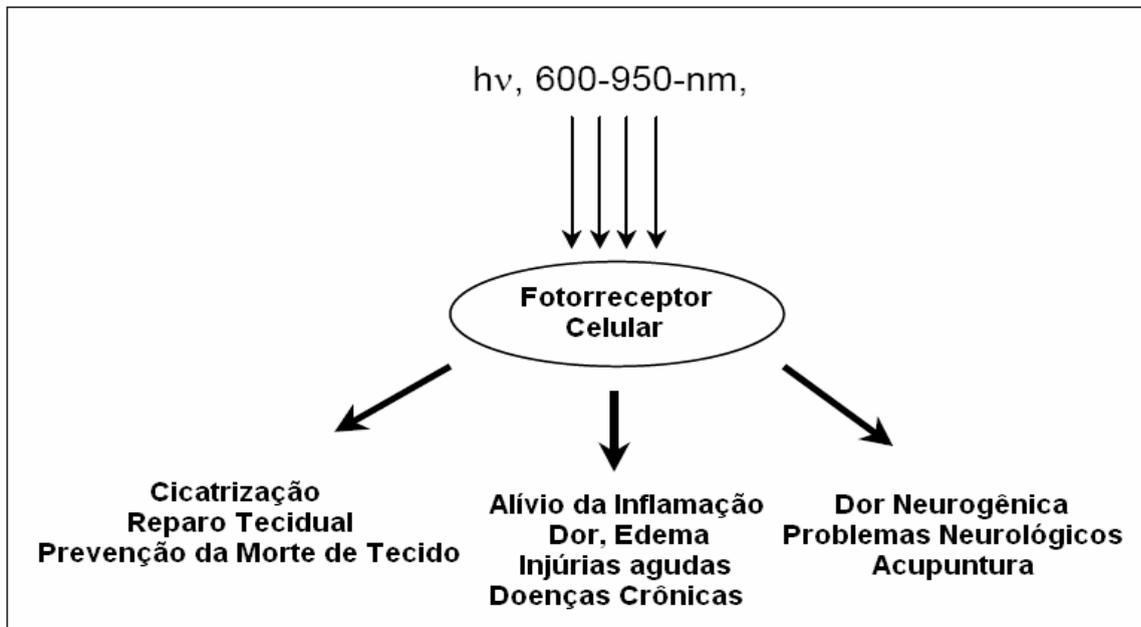


Figura 3: Representação esquemática das principais áreas de aplicação da TLBP. Extraído e adaptado de: (HAMBLIN; DEMIDOVA, 2006).

Alguns autores têm relatado resultados interessantes sobre a ação da TLBP em quadros de inflamação e suas conseqüências, como dor, edema e injúrias agudas. A terapia com laser tem sido utilizada no tratamento de patologias inflamatórias, principalmente aquelas que acometem o sistema músculo – esquelético, como a artrite reumatóide (BROSSEAU et al, 2005; GUR et al, 2003). Mas também são encontrados relatos do uso da LTBP em outros sistemas como no tratamento da inflamação da mucosa gástrica de ratos (SHAO et al, 2005), e em desordens temporal-mandibulares (CONTI et al, 1997).

Outros autores mostram o efeito do laser em patologias que acometem as vias aéreas e o pulmão. Mikhailov e colaboradores (1998) investigaram a ação da terapia com laser de baixa potência (TBP) em pacientes que apresentavam asma brônquica e observaram que a terapia com LBP irradiado duas vezes ao dia aumentou a complacência pulmonar e a eficácia de troca gasosa nesses pacientes. Nesse mesmo contexto, ao analisar pacientes acometidos por inflamação pulmonar crônica não específica, Pidaev (1997) observou que a irradiação com LBP foi capaz de reduzir a migração celular. Apesar de a terapia medicamentosa ser a mais eficaz por possuir broncodilatadores, antibióticos e corticosteróides, esses autores indicam a TLBP como tratamento nas condições de hircapnia, hipóxia e disfunção de trocas gasosas.

Em modelo experimental de pleurisia de ratos, Milojevic e Kuruc (2004) demonstraram o a eficácia do laser, visto que esta terapia reduziu o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar após a indução da inflamação. Esses dados indicam que a TLBP consegue atenuar a resposta inflamatória pulmonar de indivíduos asmáticos, mas qual o mecanismo de ação deste efeito ainda não foi descrito.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas para experimentação animal da Univap. Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 230 e 250g cada, os quais foram submetidos às condições padrões de temperatura (22-25°C), umidade relativa (40-60%) e ciclo de claro/escuro, com acesso a água e alimento *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pela Casa Central de Animais do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap. Os ratos foram mantidos em caixas comuns, divididos aleatoriamente em grupos contendo sete animais.

3.2 Anestesia e Eutanásia

Em todos os grupos experimentais os ratos foram pré-anestesiados com butorfanol (acepromazina, 0,1 mg/kg) e anestesiados com zoletil (Cloridrato de zolepram, 0,1 mg/kg + Cloridrato de Tiletamina, 0,1 mg/kg). A eutanásia foi realizada com dose excessiva de anestésico.

3.3 Administração de LPS e de TNF- α

O LPS utilizado (*Escherichia coli*) foi administrado por via intravenosa na concentração de 5mg/kg, diluído em PSB. Esse LPS foi utilizado em todos os experimentos *in vivo*.

O TNF- α foi utilizado na concentração de 10^2 U/mL para ser incubado nas células da linhagem RAEC (células endoteliais de aorta de coelho).

3.4 Cultura de células

As células utilizadas para a análise do citoesqueleto foram as da linhagem RAEC (Rabbit aortic endothelium cell). Foram adquiridas através da UNIFES, gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Helena B. Nader, estabelecidas pelo Dr. V. Buonassisi. As células foram cultivadas em garrafas (Corning) de cultura até que fossem plaqueadas para a análise dos filamentos de actina do citoesqueleto por Microscopia de Fluorescência. Foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

3.5 Preparo de Meio de cultura

O meio HAM-F12 (Gibco BRL) foi dissolvido em 1L de água ultrapura em um Becker. Sob agitação, foi adicionado 1,176 g de bicarbonato de sódio. O pH foi medido e acertado para 7,2. O meio foi filtrado e estocado em geladeira.

3.6 Pancreatina

Solução estoque pH 7,2; 5g de Viocase (Sigma) e 1,7g de NaCl (Merk) em 200mL de água ultrapura, recém destilada. A solução foi congelada em alíquotas de 1,5mL a -20°C e cada uma delas foi diluída em 8,5mL de EBSS no momento de uso.

3.7 Preparo de PBS

Para 1 litro foi misturado 100mL de tampão fosfato 0,1M em 900mL de água destilada. Sob agitação, adicionou-se 9g de NaCl.

3.8 Preparo de EBSS (Solução Salina Salanceada de Earle, sem cálcio e sem magnésio).

Preparada no laboratório, essa solução contém NaCl 116mM; KCl 5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,46mM; NaH₂PO₄ 1mM; NaHCO₃ 8mM (todos da Merk), Darmstadt, Alemanha); D-glucose 1% e vermelho de fenol 0,01% (Sigma) em um litro de água ultrapura. A solução foi acertada para pH 7,2 e conservada a 2-8°C e utilizada a 37°C.

3.9 Preparo de Tampão Fosfato

Solução A: 2,76g de NaH₂PO₄ . H₂O para 100mL de H₂O destilada

Solução B: 5,36g de Na₂HPO₄ . 7H₂O ou 7,17g NaHPO₄ . 12H₂O ou 2,84g Na₂HPO₄ para 100mL de H₂O destilada.

33ml de solução A + 67mL de solução B = pH 7,1

3.10 Preparo de Tampão PHEM

Em 500 mL de água destilada são dissolvidos 10,36 g de Pipes, (pH 6,8); 3,25g de Hepes; 1,9g de EGTA e 0,27g de $MgCl_2$.

3.11 Preparo de n-propil-galato (Sigma)

O n-propil-galato foi preparado numa concentração a 0,02M. Foram dissolvidos 4,24 g de n-propil-galato em 10 mL de PBS aquecido a 37°C. Após a dissolução foram adicionados 90 ml de glicerina.

3.12 Preparo de Paraformaldeído (Sigma)

Para a preparação do paraformaldeído (PA) foi aquecido 80mL de tampão fosfato 0,2M até 65°C. A seguir adicionou-se 10g de Paraformolaldeído (Sigma). A solução, sob constante agitação, foi clareada pela adição de hidróxido de sódio 2M. Após o resfriamento, completou-se com tampão fosfato 0,2M até 100ml obtendo-se uma solução de PA a 10%.

3.13 Preparo da solução fixadora

Foi realizada uma diluição do PA a 10% para uma concentração a 3% em tampão PHEM, que foi a utilizada para a fixação das células na técnica de Microscopia de Fluorescência. Para preparar o fixador foram utilizados 3,6mL de PA 3%, 8,4mL de PHEM e 12 μ L de Triton X-100 (0,1%).

3.14 Rodamina-Faloidina

Para a marcação dos filamentos de actina do citoesqueleto das células RAEC foi utilizado o marcador fluorescente Rodamina-Faloidina (marca) diluída em PHEM numa solução de 1:100.

3.19 Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) – In Vivo

Os animais foram irradiados no escuro com um aparelho clínico portátil de laser semiconductor com meio ativo de InGaAlP, operando com onda contínua. Os parâmetros de irradiação utilizados estão listados no quadro abaixo:

| Parâmetros | Valores |
|----------------------------|---|
| Comprimento de onda (?) | 685?m |
| Densidade de energia (DE) | 4,5 J/cm ² |
| Doses | 8,82 J (uma sessão) 17.64 J (duas sessões) |
| Densidade de Potência (DP) | 17,85 mW/cm ² |
| Potência | 35 mW |
| Área | 2 cm ² |
| Tempo | 252 segundos |
| Diâmetro do feixe | 6 cm |

Tabela 1: Parâmetros para a irradiação *in vivo*.

Nos experimentos em que o efeito do laser foi analisado 6 horas após a indução de LPS, os animais foram irradiados 1 hora após a injeção. Nos experimentos em que o efeito do laser foi analisado 24 horas após a indução com LPS, os animais foram irradiados em duas sessões de 252 segundos cada, uma sessão aplicada na 1^a hora e a outra sessão aplicada na 12^a hora após a injeção de LPS. Portanto, a dose total do laser nas duas sessões foi de 17, 64 J. Todos os animais foram irradiados sobre a pele acima do brônquio superior no local da traqueotomia (Figura 1).

3.20 Indução da Lesão Pulmonar Aguda

A fim de investigar o efeito da TLBP na LPA, o LPS foi administrado na concentração de 5 mg/kg por via intravenosa. Os ratos foram divididos em 8 grupos (n = 7 por grupo).

Grupos 1 e 2: Os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de 50µL de PBS; foram sacrificados 6 e 24 horas após a aplicação, respectivamente.

Grupo 3 e 4: Os animais receberam uma injeção i.v. de LPS e foram sacrificados 6 e 24 horas após a aplicação, respectivamente.

Grupo 5 e 6: Os animais foram irradiados, sem que tivessem recebido nenhuma droga, e foram sacrificados 6 e 24 horas após a irradiação, respectivamente.

Grupo 7: Os animais foram desafiados com LPS (i.v.) e 1 hora após a injeção foram irradiados. Seis horas após a injeção os ratos foram sacrificados.

Grupo 8: Os animais foram desafiados com LPS (i.v.). A irradiação se deu em duas aplicações, 1 hora e 12 horas após a injeção de LPS. Vinte e quatro horas após a injeção os ratos foram sacrificados.

3.21 Lavado Broncoalveolar (BAL)

Para a obtenção do lavado broncoalveolar foi realizada uma incisão longitudinal na região cérvico-ventral para expor a traquéia em um animal já previamente anestesiado de acordo com o protocolo apresentado anteriormente. A seguir, foi realizada uma incisão transversal na traquéia para que uma cânula pudesse ser inserida. Foram acopladas às entradas da cânula duas seringas, uma contendo solução salina 0,9%, a outra vazia. O PBS foi injetado para a lavagem do espaço broncoalveolar. O volume inserido foi retirado com a seringa vazia. O LBA obtido foi centrifugado, por 10 minutos a 1500 rpm. Logo após, o sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuspensão em 1 mL de PBS. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer. O LBA foi medido de acordo com o que foi descrito por Tavares de Lima et al, 1998 (26). Os dados foram expressos como LBA (células /mL).

3.22 Determinação da Atividade do Fator De Necrose Tumoral (TNF-a) no LBA

Sob anestesia os animais foram traqueotomizados com um cateter Gauge. Os pulmões foram lavados com 3 x 5 mL de solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem Ca^{2+} ou Mg^{2+} (GINCO). Os níveis de TNF-a na LBA foram determinados pela técnica de ELISA (R&D Systems, USA).

3.23 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

O acúmulo de neutrófilos dentro dos pulmões foi avaliado através da medição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), conforme descrito por Goldblum et al, (1985). A atividade da MPO nos sobrenadantes foi avaliada através da medição da mudança no A_{460} , que é resultado da decomposição de H_2O_2 na presença de o-Dianisidina (HENSON et al, 1978).

3.24 Avaliação do dano nas células endoteliais induzido pelo LPS

Para avaliar o dano causado pelo LPS nas células endoteliais foram utilizadas células endoteliais RAEC. As culturas foram cultivadas em meio de cultura HAM-F12 (Gibco-BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL) e 1% de penicilina – streptomina (Invitrogen). As células foram pancreatinizadas, centrifugadas e plaqueadas em lamínulas redondas estéreis contidas em placas de 24 poços (Nunc) na concentração de 1×10^5 células/mL. Todo experimento foi conduzido em triplicata. As células foram divididas em 4 grupos de estudo, que são descritos a seguir.

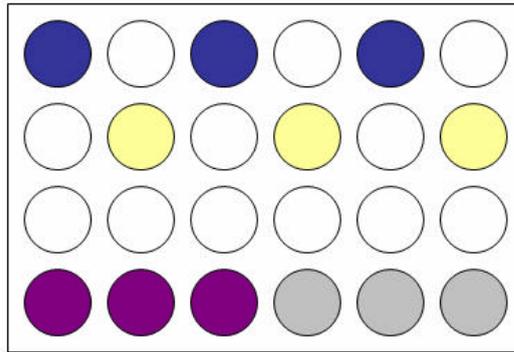
Grupo 1: As células não receberam tratamento nenhum, ou seja, foram mantidas em meio de cultura. Uma hora após horário determinado, foi realizada a marcação com rodamina para a análise de microscopia de fluorescência.

Grupo 2: As células foram incubadas com TNF- α (10^2 U/mL). Uma hora após a incubação, foi realizada a marcação com rodamina para a análise de microscopia de fluorescência.

Grupo 3: As células foram irradiadas nos parâmetros a serem descritos no próximo item. Vinte e quatro horas após a irradiação, foi realizada a marcação com rodamina para a análise de microscopia de fluorescência.

Grupo 4: As células foram incubadas com TNF- α e após 1 hora de incubação foram irradiadas. Vinte e quatro horas após a incubação foi realizada a marcação com rodamina para a análise de microscopia de fluorescência.

A figura 4 demonstra como foi realizado o plaqueamento dos grupos mencionados.



- Células + Laser
- Células + TNF- α + Laser
- Células + TNF- α
- Células sem tratamento nenhum

Figura 4: Esquema de plaqueamento das células RAEC para análise de Microscopia de Fluorescência.

3.25 Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) – In vitro

Para a realização da TLBP as células foram irradiadas nos poços seguindo os parâmetros relacionados no quadro abaixo.

| Parâmetros | Valores |
|---------------------------|-----------------------|
| Comprimento de onda (?) | 685?m |
| Densidade de energia (DE) | 4,0 J/cm ² |
| Potência | 15 mW |
| Área | 2 cm ² |
| Tempo | 8,8 minutos |

Tabela 2: Parâmetros para a irradiação *in vitro*.

3.26 Análise dos filamentos de actina do citoesqueleto das células RAEC

Para determinar os danos causados pelo TNF- α ao endotélio vascular, foram avaliados os filamentos de actina do citoesqueleto das células RAEC através da marcação específica com a rodamina-faloidina, um marcador fluorescente. Depois de terem sido submetidas ou não aos tratamentos descritos previamente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS a 37°C e fixadas por 15 minutos com paraformaldeído 4% (37°C). Em seguida as células foram lavadas 2x com PBS e tratadas com NH₄Cl a 50mM por 10 minutos (37°C). Após este período as células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% (37°C) por 15 minutos, lavadas somente e incubadas com o rodamina-faloidina por 1 hora (37°C). Depois, as células foram preparadas em lâminas contendo n-propil-galato, vedadas com esmalte incolor e observadas em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB. As fotomicrografias foram feitas com o sistema fotográfico Leica MPS 30.

3.27 Análise Estatística

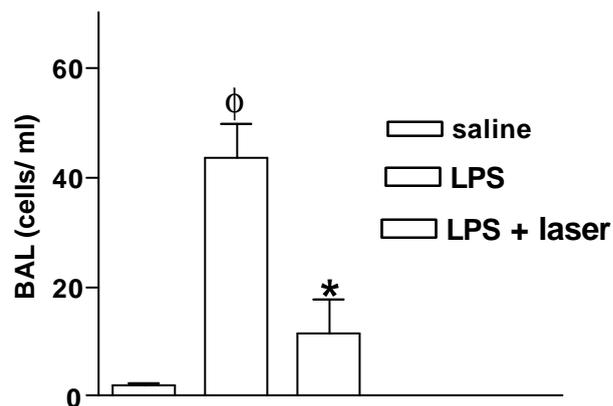
Os dados foram expressos como média \pm SEM. O programa utilizado para a análise foi o InStat (GraphPad Software). Os dados foram examinados pelo ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey a fim de determinar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0.05$. A fim de determinar a análise de variância entre os grupos foi utilizada a análise estatística de ANOVA 2-way para determinar o valor de F.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da TLBP nas células inflamatórias do lavado broncoalveolar (LBA)

O Gráfico 1 ilustra o perfil celular no LBA dos animais tratados com laser e que tinham ou não sido previamente injetados com LPS. O número de células por mililitro de fluido do LBA aumentou tanto 6 como 24 horas após a injeção de LPS (LPS 6 h: 43.5 ± 9.1 células/mL $p=0.001$; LPS 24 h: 67.8 ± 10.1 células/mL, $p=0.001$) em comparação com o grupo salina (salina 6 h: 2.1 ± 0.3 células/mL; salina 24 h: 2.8 ± 0.4 células/mL). A avaliação da presença de leucócitos polimorfonucleares mostrou que a porcentagem de neutrófilos (PMN/mL) acompanhou o aumento após a injeção com LPS. Seis horas após a injeção de LPS foram observados aproximadamente 96% de neutrófilos e 24 horas após o LPS, 98% de neutrófilos. A TLBP reduziu a contagem celular no LBA tanto no grupo de 6 horas (TLBP: 11.55 ± 9.0 células/mL, $p=0.001$; $F=86300$) como no grupo de 24 horas (TLBP: 41.6 ± 10.2 células/mL, $p=0.001$; $F=253600$). Esses resultados mostram que os neutrófilos são importantes na LPA e o efeito significativo da terapia laser neste tipo celular.

6 horas após LPS



24 horas após LPS

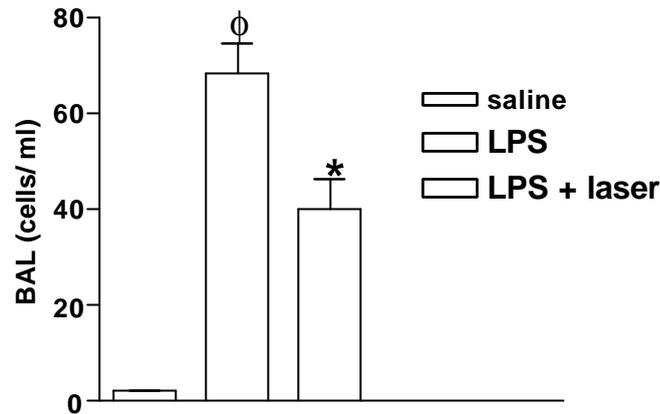
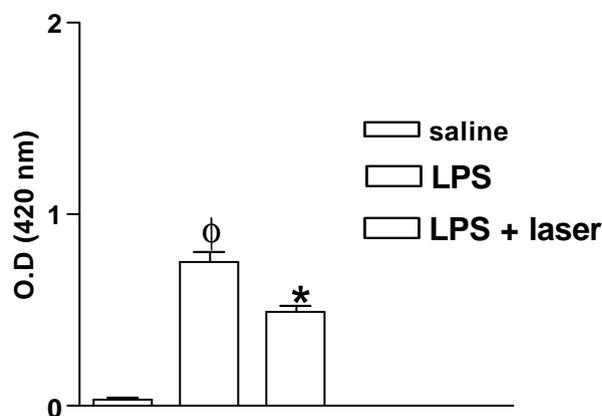


Gráfico 1: Perfil celular do LBA dos animais tratados com laser e que receberam ou não LPS. A TLBP reduziu o número de células no LBA quando a irradiação se deu 6 e 24 horas após a injeção com LPS. As diferenças significativas estatisticamente estão indicadas por uma cruz ($F = P < 0.05$) ao comparar os dados com o grupo controle ou por um asterisco ($* = P < 0.05$) ao comparar os dados com o grupo LPS.

4.2 Efeito da TLBP na atividade da Mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase foi medida nos períodos de 6 e 24 horas após a injeção de LPS a fim de avaliar o total de neutrófilos acumulados nos pulmões. No grupo de animais que teve a atividade da MPO medida 6 horas após a injeção de LPS foi verificado um aumento significativo em relação ao grupo tratado apenas com salina. Além disso, 24 horas após a injeção de LPS a atividade da MPO também estava mais alta do que a do grupo controle. No entanto, a TLBP atenuou significativamente o aumento da atividade da MPO (TLBP 6 h: 37.5%, $p = 0.00023$; $F = 5483$; TLBP 24 h: 52.3%, $p = 0.00021$; $F = 30160$). Os resultados podem ser visualizados o Gráfico 2.

6 horas após LPS



24 horas após LPS

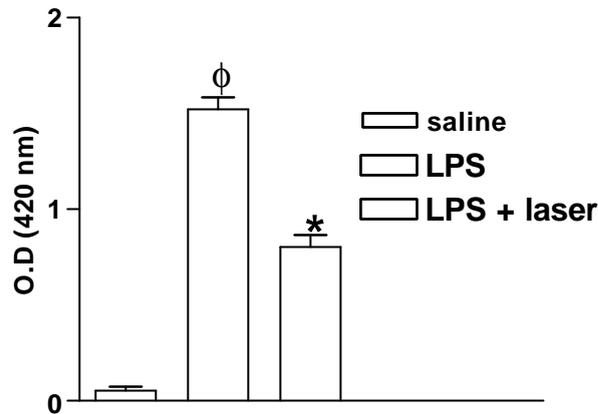


Gráfico 2: Atividade da Mieloperoxidase nos pulmões após injeção de LPS. A atividade da MPO nos animais incubados com LPS estava significativamente elevada após 6 e 24 horas. A TLBP se mostrou eficiente em atenuar significativamente o aumento que o LPS havia causado na atividade desta enzima nos pulmões. As diferenças significativas estatisticamente estão indicadas por uma cruz ($F = P < 0.05$) quando comparadas com o grupo controle e por um asterisco ($* = P < 0.05$) quando comparado com os dados do grupo LPS.

4.3 Efeito da TLBP na concentração de TNF-a no LBA

Os níveis de TNF-a no LBA dos animais após a injeção com LPS são demonstrados no Gráfico 3. Foi possível verificar um aumento significativo e acentuado na concentração de TNF-a 6 horas após a injeção de LPS (LPS 6 h: 60.8 ± 0.8 pg/mL, $p = 0.0001$) em relação ao grupo controle (salina 6 h: 0.02 ± 0.01 pg/mL). A atividade de TNF-a também aumentou 24 horas após a indução com LPS (LPS 24 h: 77.5 ± 0.83 pg/mL, $p = 0.0001$) quando comparado com o grupo controle (salina 24 h: 0.06 ± 0.01 pg/mL). Já o tratamento com LBP reduziu significativamente a concentração de TNF-a nos fluidos do LBA em ambos os períodos avaliados após a indução com LPS (TLBP 6 h: 18.83 ± 0.7 pg/mL, $p = 0.001$; $F = 1091000$; TLBP 24 h: 17.74 ± 0.81 pg/mL, $p = 0.001$; $F = 961000$) em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que o efeito antiinflamatório do laser de InGaAl pode ser mediado pela atividade do TNF-a.

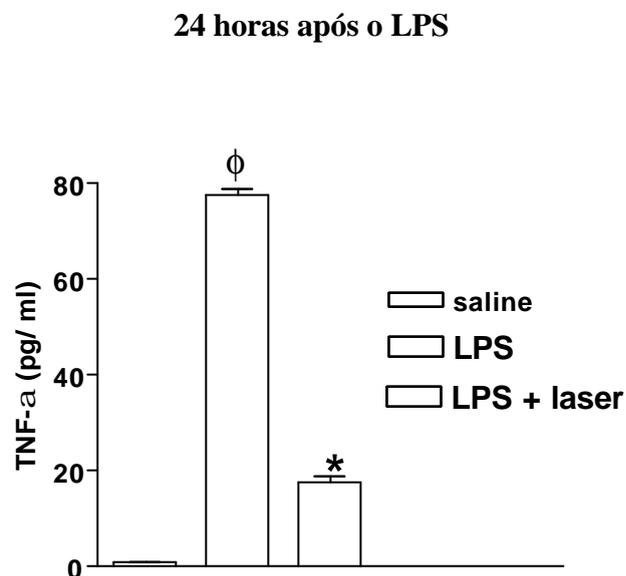
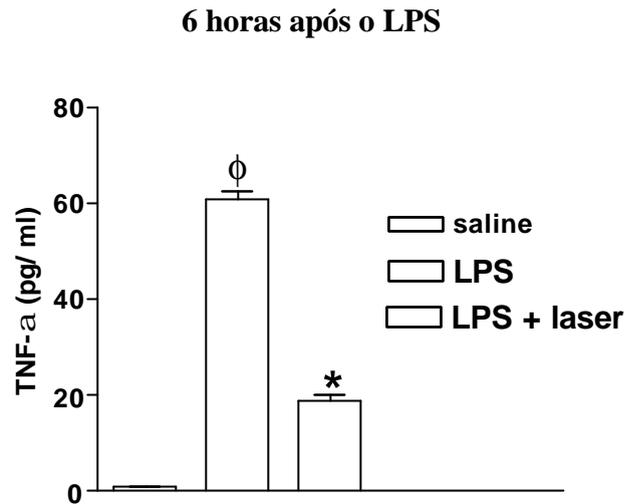


Gráfico 3: Atividade do TNF-a no LBA após a injeção de LPS. Foi verificado um aumento significativo na concentração de TNF-a 6 e 24 horas após a injeção com LPS. A terapia com laser reduziu significativamente a concentração de TNF-a no LBA em ambos os períodos avaliados. As diferenças significativas estatisticamente estão indicadas por uma cruz ($F = P < 0.05$) ao comparar os dados com o grupo controle e por um asterisco ($* = P < 0.05$) ao comparar os dados com o grupo LPS.

4.4 Efeito da TLBP no citoesqueleto de células endoteliais

As células RAEC (células endoteliais de aorta de coelho) foram marcadas com a sonda fluorescente Rodamina-Faloidina para que os filamentos de actina do citoesqueleto pudessem ser avaliados. As células controle mostraram perfeita distribuição das fibras no citoplasma celular e bandas periféricas características. As células também apresentaram morfologia poligonal, alongada normal. (Figura 5A). Entretanto as células tratadas com TNF-a (10^2 U/mL) mostraram uma mudança significativa neste padrão. A incubação com TNF-a resultou

no desenvolvimento de fibras de stress orientadas ao acaso e aparente redução de bandas periféricas. Ao comparar as células controle com as incubadas com TNF-a fica clara a diferença entre a distribuição dos filamentos de actina. Nas células incubadas esses filamentos estão muito reduzidos. Também é possível notar mudança na morfologia celular. As células que antes eram alongadas e poligonais passaram a ser arredondadas, o que pode indicar retração celular. As células também apresentavam mais projeções de espículas do citoesqueleto (Figura 5B). As células que foram incubadas com TNF-a, porém tratadas com laser demonstraram que a terapia reduziu as mudanças morfológicas anteriormente observadas. Houve restabelecimento das fibras de actina (Figura 5C).

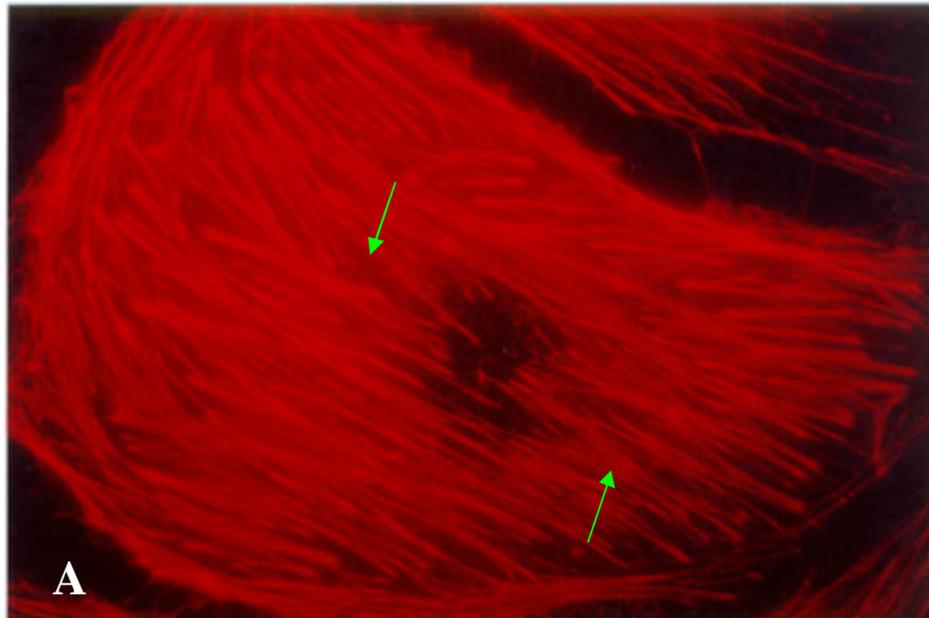


Figura 5A: Visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto de células RAEC. Fotomicrografia do grupo controle. Esta célula apresenta perfeita orientação das fibras de stress (setas) e bandas periféricas características. A célula apresenta morfologia poligonal e alongada, o que é normal para este tipo celular. (x 2500).

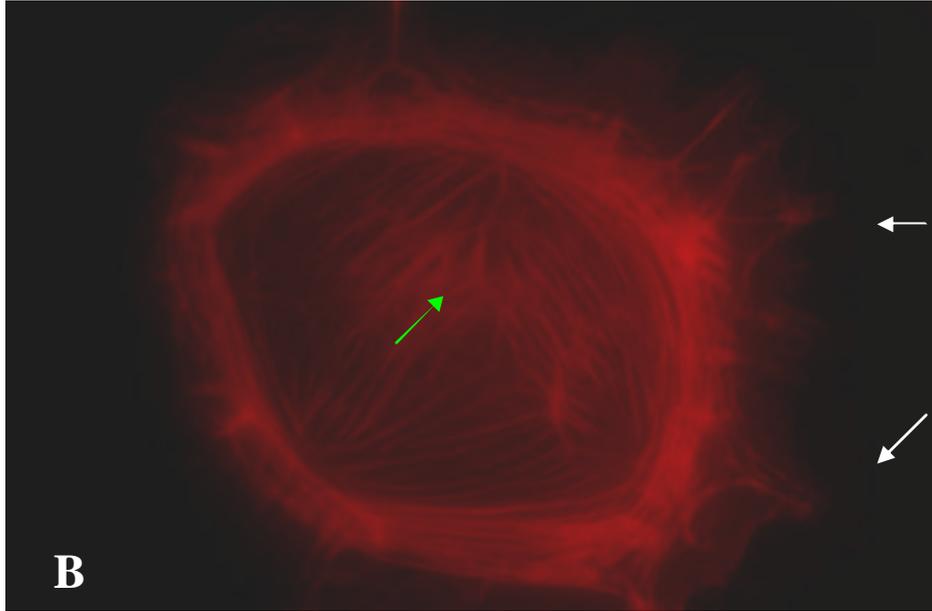


Figura 5B: Visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto de células RAEC. Fotomicrografia do grupo incubado com TNF-a por 1 hora. A incubação com TNF-a resultou no desenvolvimento de fibras de stress orientadas ao acaso (seta verde) e desaparecimento das bandas periféricas. A célula perdeu seu formato poligonal, assumindo uma morfologia mais esférica, o que pode indicar retração celular. As setas brancas indicam espículas projetadas pelo citoesqueleto. (x 2500).

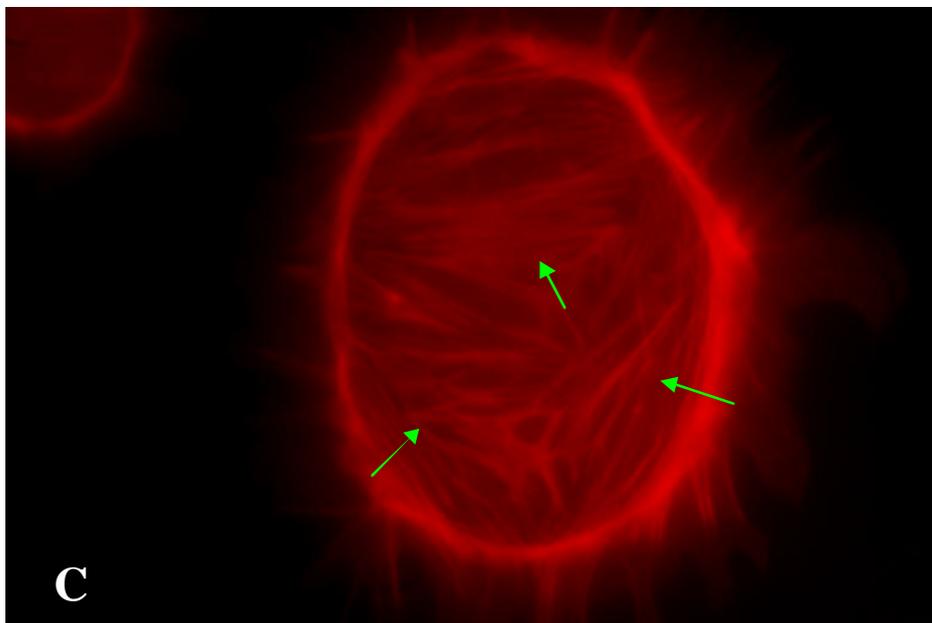


Figura 5C: Visualização dos filamentos de actina do citoesqueleto de células RAEC. Fotomicrografia do grupo incubado com TNF-a por 1 hora e irradiado com laser de InGaAlP. Vinte e quatro horas depois da irradiação a TLBP reduziu as mudanças morfológicas anteriormente observadas. As setas indica a reorganização das fibras de stress. (x 2500).

A tabela 3 mostra os valores obtidos após a irradiação das células RAEC expostas ao TNF-a. A TLBP reduziu significativamente a desorganização do citoesqueleto das células

expostas ao TNF-a em comparação com o grupo controle (TNF-a + laser: 10 ± 3.2 (10%); TNF-a: 105 ± 1.73 (95%). Esses resultados sugerem que a TLBP pode agir diretamente no citoesqueleto das células RAEC atenuando os efeitos causados pela exposição ao TNF-a.

Comparação entre os filamentos de actina grupo controle e do grupo TNF-a + Laser

| | Estrutura normal dos filamentos | | Rompimento | |
|----------------------|--|------|-------------------|-----|
| Controle | 115 ± 10.8 | 96% | 5 ± 2.0 | 4% |
| Laser | 113 ± 8.9 | 95% | 6.2 ± 1.2 | 5% |
| TNF-a | $\dagger 10 \pm 1.15$ | 9.5% | 105 ± 1.73 | 95% |
| TNF-a + Laser | $* 79.5 \pm 2.0$ | 90% | 10 ± 3.2 | 10% |

Tabela 3: Na tabela estão demonstradas a contagem total e a porcentagem das células RAEC 24 horas depois da incubação e irradiação com laser AsGaAIP ($\dagger p < 0.001$ comparados com o grupo controle; $* p < 0.001$ comparados com o grupo TNF-a).

5 DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos da Terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) no tratamento da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) induzida por LPS. Foi demonstrado aqui que a TLBP atenuou o acúmulo de neutrófilos no lavado broncoalveolar (LBA), o que foi avaliado pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O efeito antiinflamatório da irradiação com laser de baixa potência também interferiu na concentração de TNF- α no LBA dos animais incubados com LPS. Além disso, as mudanças morfológicas observadas nas células endoteliais após serem expostas ao TNF- α foram reduzidas após o tratamento com o laser. É importante deixar claro que os resultados apresentados no presente estudo com respeito às ações da TLBP são baseados em experimentos *in vivo*. Portanto, esses resultados sugerem uma possível contribuição da TLBP para o tratamento da patogênese da LPA induzida por LPS.

Hoje se sabe que o aumento do extravasamento vascular e a diapedese dos leucócitos, característica essencial da resposta inflamatória, contribui significativamente para a disfunção multisistêmica dos órgãos que envolve a LPA (PENG et al, 2004). Com essas observações *in vitro*, o presente estudo se propôs a estudar a propriedade antiinflamatória em potencial da TLBP *in vivo* utilizando um modelo animal de lesão pulmonar aguda induzida por LPS e verificada pela análise da atividade da MPO, por parâmetros do LBA e também *in vitro*, através da utilização de cultura de células endoteliais para analisar o citoesqueleto após a indução com TNF- α .

Apesar da intensa pesquisa e de diversos experimentos terapêuticos (ANZUETO, 2002; GERLACH et al, 2003; PILKINGTON; WEDDENBURG, 2005), terapias específicas efetivas para prevenir ou reverter a inflamação pulmonar severa e a permeabilidade pulmonar aumentada ainda não são conclusivas. Ao usar um modelo confiável da LPA, foi demonstrado um efeito significativo da TLBP sobre a inflamação pulmonar. Uma única irradiação com o laser, uma hora após a injeção de LPS no animal, reduziu significativamente a concentração de células e de TNF- α no LBA; a atividade da MPO, o que indica uma diminuição da presença de neutrófilos; e recuperou o citoesqueleto das células endoteliais observadas. Foi possível sugerir que a terapia com laser tem o potencial antiinflamatório para controlar importantes acontecimentos que ocorreram não só 6 horas após a exposição ao LPS como também 24 horas depois.

Como citado anteriormente, a LPA e a SARA são caracterizadas principalmente por aumento da permeabilidade vascular pulmonar que leva a edema e fôlencia respiratória. A permeabilidade endotelial é resultado da liberação de citocinas, da interação neutrófilos-endotélio e das mudanças no citoesqueleto (ESSLER et al, 2000; DUDEK; GARCIA, 2001), que causam “poros”, lacunas e distanciamento entre as células do endotélio que facilitam a passagem de neutrófilos, proteínas plasmáticas e água (GROENEVELD, 2003). De fato, não somente o LPS como também outros mediadores pró-inflamatórios liberados pelo estímulo com LPS são capazes de modificar a integridade da barreira vascular (ISOWA et al, 1999; ROSSOL; GÄRTNER; HAUSCHILDT, 2001).

Através das fotomicrografias apresentadas neste trabalho foi possível visualizar o que o TNF- α causou na estrutura dos filamentos de actina do citoesqueleto. Houve desorganização das fibras de stress, diminuição de filamentos e possivelmente retração celular (Figura 5B). Tasaka e colaboradores (2005) mostraram que a monocamada de células endoteliais de artéria pulmonar humana (HPAEC) incubadas com TNF- α (10^3 U/mL) e marcadas com rodamina-faloidina apresentou mudanças significativas na organização dos filamentos de actina em comparação com o grupo controle. Assim como o trabalho apresentado aqui, eles também observaram desenvolvimento de fibras de stress orientadas ao acaso, desaparecimento das bandas periféricas e ainda retração celular e formação de lacunas entre as células, que estavam perdendo contato entre si. Eles trataram as células HPAEC com um inibidor de proteína ROCK, o Y-27632, e obtiveram bons resultados, pois houve restauração do citoesqueleto. No presente trabalho o agente restaurador foi a TLBP. As modificações causadas pela incubação com TNF- α foram atenuadas.

Como nosso trabalho é um de poucos que tentam explicar o efeito da TLBP sobre a lesão pulmonar aguda, não se sabe exatamente como esta resposta benéfica do laser sobre o endotélio ocorre. A literatura nos trás dados sobre o efeito biomodulatório do laser de baixa potência sobre as células endoteliais. O que se observa é que o laser acelera a mitose aumentando a microcirculação e também ativando fatores de crescimento (TRELLES; MAYAYO, 1984), o que pode servir para explicar a recuperação do endotélio. Não se sabe exatamente como o laser atua sobre o endotélio nem mesmo se ele atua diretamente sobre o citoesqueleto ou sobre o TNF- α .

Os efeitos da exposição ao TNF- α e ao laser foram confirmados com a contagem do número de células RAEC. O número de células RAEC funcionais foi significativamente menor na presença de TNF- α em comparação às células que não haviam sido expostas ao TNF- α . Entretanto, serão necessários mais estudos para investigar se a TLBP pode reduzir a

reorganização do citoesqueleto durante a exposição ao TNF- α . A diminuição dos danos no endotélio pulmonar, causados pelo TNF- α , através da utilização da terapia com laser sugere uma ação moduladora da TLBP na lesão pulmonar aguda induzida por LPS, por meio de uma via de sinalização nas células endoteliais da microvaculatura pulmonar que envolve o TNF- α .

O efeito protetor as TLBP sobre as células endoteliais pode ser responsável pela atenuação do dano pulmonar. A proporção entre os neutrófilos do espaço aéreo alveolar e os neutrófilos do septo nos ratos com endotoxemia é um indicador da habilidade dos neutrófilos de extravasar. Durante a inflamação com LPS o volume ocupado pelos neutrófilos aumentou. A TLBP atenuou o número de neutrófilos no septo alveolar e no espaço aéreo alveolar, o que sugere que esta terapia medeia os efeitos da injeção de LPS nas células endoteliais.

Após induzir um quadro de lesão pulmonar aguda nos animais com injeção de LPS, foi observado que 6 horas após a injeção o LBA dos animais desafiados com LPS apresentava um conteúdo de células polimorfonucleares muito superior ao grupo de animais que recebeu somente salina. Esse número aumentou ainda mais no período de 24 horas. Isso indica que houve migração das células para o interior do pulmão. Como a lesão pulmonar induzida por LPS é conhecida por ser dependente de neutrófilos (HOGG; DOERSCHUK, 1995; DOERSCHUK, 1999), é razoável inferir que o volume aumentado de células no LBA pós LPS era constituído, em sua maioria, por neutrófilos que migraram para o interior dos alvéolos além dos macrófagos alveolares que são residentes. Isso pôde ser de certa forma confirmado pela avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no LBA. A ativação de leucócitos polimorfonucleares (PMN) por estímulos endógenos (fragmentos do complemento, citocinas, etc.) ou por microrganismos patogênicos é seguida por uma ativação da NADPH oxidase. A atividade dessa enzima associada à membrana leva a um aumento do consumo de oxigênio e é responsável pela produção de ânion superóxido, o radical livre precursor de uma série de formas ativadas de oxigênio (KLEBANOFF, 1992). A estimulação de PMN também leva a degranulação e o conteúdo degranulado é liberado no meio. Esses produtos incluem a MPO, que é liberada dos grânulos primários e exerce função de peroxidase utilizando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MATHY-HARTERT et al, 1998). A MPO está presente em abundância principalmente nos neutrófilos, por isso a migração de neutrófilos ativos e macrófagos diretamente do sangue para o tecido pulmonar é comumente avaliado pela medida da atividade dessa enzima (TAVARES DE LIMA, et al, 1998). O que foi observado é que após a injeção de LPS nos animais estudados a atividade da MPO aumentou significativamente como mostraram os gráficos apresentados nos resultados (Gráfico 2). Isso foi observado em ambos os períodos avaliados (6 e 24 horas após a injeção de LPS).

No entanto, a TLBP se mostrou eficaz em diminuir a atividade aumentada que havia sido observada. Como diminuição da atividade da MPO indica diminuição na quantidade de neutrófilos, pode ser que a ação que a TLBP exerceu sobre o endotélio tenha diminuído a permeabilidade vascular e conseqüentemente o seqüestro e extravasamento das células inflamatórias como os neutrófilos.

Se o laser tem algum efeito direto ou indireto sobre o TNF-a, isso pode explicar a diminuição da concentração dessa citocina no LBA. Foi observado que após 6 horas da injeção com LPS a quantidade de TNF-a estava muito aumentada. Mas esse quadro foi revertido significativamente pela irradiação com LBP (Gráfico 3). O mesmo foi visto no período de 24 horas. Neste período a diminuição da concentração de TNF-a no LBP após a irradiação foi muito mais evidente. O TNF-a, é uma citocina pró-inflamatória de resposta precoce, que é produzida por diversos tipos celulares em resposta a estimulação por LPS (BEMELMANS; VAN TITS; BUURMAN, 1996). Células como os macrófagos alveolares são as maiores fontes de TNF-a nos pulmões (VASSALI, 1992). Apesar de haver uma participação importante dos macrófagos na resposta inflamatória induzida pelo LPS, essas células sofrem menos efeitos anti-apoptóticos na presença de citocinas em comparação com os neutrófilos (KUPFNER et al, 2001). Níveis elevados de citocinas estimulam uma resposta de sinalização celular a qual prejudica o acontecimento da apoptose em neutrófilos, o que pode contribuir para a perpetuação da resposta inflamatória (NIWA et al, 2000). Como houve um aumento significativo no número de neutrófilos no LBA e essas células também produzem TNF-a quando ativadas, é possível inferir que o aumento da concentração de TNF-a no lavado se deu principalmente por causa da maior quantidade de neutrófilos presentes. Visto que houve diminuição da atividade da MPO, o que indica menos neutrófilos, é possível que a diminuição da concentração de TNF-a tenha acontecido por causa da diminuição do número de neutrófilos no LBA.

O efeito antinflamatório da TLBP na infiltração dos neutrófilos no LBA e nos pulmões sugere uma ação local da irradiação com laser, uma vez que essa terapia não mostrou eficácia em reduzir o nível de TNF-a no soro (dados não mostrados). Considerando-se que a TLBP reduziu a concentração de TNF-a no LBA, é provável que apesar de a produção de TNF-a ter sido causada por um estímulo sistêmico, os neutrófilos que migraram para os pulmões foram capazes de manter a inflamação, já que essas células também são produtoras de TNF-a. Portanto, é cabível sugerir que a TLBP pode atenuar a inflamação pulmonar por reduzir o TNF-a produzido; que a redução de TNF-a é devida, pelo menos em parte, a diminuição do número de neutrófilos infiltrados.

Infelizmente, o presente estudo não oferece informação sobre quais mecanismos celulares exatos podem estar envolvidos no processo onde a TLBP reduz o extravasamento microvascular pulmonar e a migração de neutrófilos para os pulmões. No entanto, os resultados deste trabalho sugerem que a TLBP pode modular a lesão pulmonar aguda através da redução do nível de TNF- α pulmonar nos períodos de 6 e 24 horas após a injeção de LPS.

Com toda a certeza, mais estudo e experimentos devem ser conduzidos a fim de elucidar o exato mecanismo de ação da Terapia com Laser de Baixa Potência para o tratamento da Lesão pulmonar aguda.

6 CONCLUSÕES

Após avaliar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência pós LPS no modelo animal de Lesão Pulmonar Aguda e na cultura de células endoteliais da linhagem RAEC foi possível concluir que:

- Após a injeção de LPS, a TLBP reduziu a contagem celular no LBA tanto no grupo de 6 horas como no grupo de 24 horas;
- A terapia com laser atenuou significativamente o aumento da atividade da MPO;
- A TLBP reduziu significativamente a concentração de TNF-a nos fluidos do LBA em ambos os períodos avaliados após a indução com LPS em relação ao grupo controle;
- A TLBP reduziu significativamente a desorganização do citoesqueleto das células expostas ao TNF-a em comparação com o grupo controle o que sugere que a TLBP pode agir diretamente no citoesqueleto das células RAEC atenuando os efeitos causados pela exposição ao TNF-a.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E., et al. Double-blind randomized controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factoring treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. **Lancet**, v.351, p.929-933, 1998.
- ADHIKARI, N.; GRANTON, J. T. Inhaled nitric oxide for acute lung injury. **J. Amer.Med. Assoc.** v.291, p.1629-1631, 2004.
- AGAIBY, A.D.; GHALI, L.R. WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers Surg. Med.**, v.26, p.357-363, 2000.
- AIMBIRE, F. **Estudo do mecanismo de ação do laser de baixa potência em modelos experimentais de inflamação pulmonar em ratos.** 2006. 107f. Tese (Doutorado em Engenharia Bio médica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.
- AIMBIRE, F., et al. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. **Photomed Laser Surg.**, v.25, n.2, p.112-117, 2007.
- ALBERTINI, R., et al. Effects of different protocols doses of low power laser gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced paw oedema. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.72, p.101-107, 2004.
- ANZUETO, A. Exogenous surfactant in acute respiratory distress syndrome: more is better. **Eur. Respir. J.**, v.19, n.5, p. 787-789, 2002.
- ASHBAUGH, D. G.; BIGELOW, D. B.; PETTY, T. L.; LEVINE, B. E. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v.2, p.319-323, 1967.
- BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory syndrome. **Clin. Chest Med.**, v.3, p.35-56, 1982.
- BALABAN, P., et al. He-Ne laser irradiation of single identified neurons, **Lasers Surg. Med.** v.12, p.329-337, 1992.
- BEMELMANS, M. H. A.; VAN TITS, L. J. H.; BUURMAN, W. A. Tumor necrosis factor: function, release, and clearance. **Crit. Rev.Immunol.**, v.16, p.1-11, 1996.
- BERNARD, G. R., et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.317, n.25, p.1565-1570, 1987.
- BEUTLER, B. Toll-like receptors: how they work and what they do. **Curr. Opin. Hematol.**, v.9, p.2-10, 2002.
- BJORDAL, J. M., et al. Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.2, p.158-168, 2006.

BROIDE, D. H., et al. Cytokines in symptomatic asthma airways. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.89, n.5, p.958-967, 1992.

BROSSEAU, L.; WELLS, G.; MARCHAND, S. Randomized controlled trial on low level laser therapy (LLL) in the treatment of osteoarthritis (OA) of the hand. **Laser Surg. Med.**, v.36, p.210-219, 2005.

BYRNES, K.R., et al. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers Surg. Med.**, v.36, p.171-185, 2005.

CAMPANA, V., et al. The relative effects of HeNe laser and meloxicam on experimentally induced inflammation. **Laser Ther.**, v.11, n.1, p.36-41, 1999.

CARSWELL, E. A., et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **PNAS (USA)**, v.72, p.3666-3670, 1975.

CENEVIVA, G. D., et al. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v.185, p.601-607, 1998.

COHEN, J.; CARLET, J. INTERSEPT: an international, multicenter, placebo-controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor- α in patients with sepsis. **Crit. Care Med.**, v.24, p.1431-1440, 1996.

CHABOT, F.; MITCHELL, J. A.; GUTTERIDGE, J. M. C.; EVANS, T. W. Reactive Oxygen Species in acute lung injury. **Eur. Respir. J.**, v.11, p.745-757, 1998.

CHAPMANN, H. A. JR; BERTOZZI, P.; REILLY, J. J. JR. Role of enzymes mediating thrombosis and thrombolysis in lung disease. **Chest**, v.93, p. 1256-1263, 1988.

CHANG, S. W.; FEDDERSEN, C. O.; HENSON, P. M.; VOELKEL, N. F. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.1498-1509, 1987.

CHEN, Y.S., et al. Effect of low-power pulsed laser on peripheral nerve regeneration in rats. **Microsurgery**, v.25, p.83-89, 2005.

CONTI, P. C. LLLT in the treatment of temporomandibular disorders (TMD): a double-blind pilot study. **Cranio**, v.15, n.2, p.144-149, 1997.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.2-14, 83-100.

DENIS, M., GOUJIAN, L., WIDMER, M., CANIN, A. A mouse model of lung injury induced by microbial products: implication of tumor necrosis factor. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 10, p.658-664, 1994.

DOERSCHUK, C. M., et al. Adhesion molecules and cellular biomechanical changes in acute lung injury. **Chest**, v.116, p.37S-43S, 1999.

- DUDEK, S. M.; GARCIA, J. G. N. Cytoskeleton regulation of pulmonary vascular permeability. **J. Appl. Physiol.**, v.91, p.1487-1500, 2001.
- EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg. Med.**, v.19, p.433-437, 1996.
- ESSLER, M.; STADDON, J. M.; WEBER, P. C.; AEPFELBACHER, M. Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling. **J. Immunol.**, v.164, p.6543-6549, 2001.
- ESTEBAN, A. et al. Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. **Ann. Intern. Med.**, v.141, p.440-45, 2004.
- FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **J. Leukocyte Biol.**, v.64, p.25-32, 1998
- FILK, M. P. Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. **Curr. Opin. Crit. Care**, v.8, p.6-11, 2002.
- FISHER, C. J. JR, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. **Crit. Care Med.**, v.21, p.318-327, 1993.
- FUJIMAKI, Y., et al. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.21, p.165-170, 2003.
- FUKUDA, Y. et al. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. **Am. J. Pathol.**, v.126, p.171-182, 1987.
- GATTINONI, L., et al. Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. **JAMA**, v.271, p.11772-11779, 1994.
- GERLACH, H., et al. Dose-response characteristics during long-term inhalation of nitric oxide in patients with severe acute respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, controlled study. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 167, n. 7, p. 1008-1015, 2003.
- GOLDBLUM, S. E.; WU, K. M.; JAY, M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. **J. Appl. Physiol.**, v.59, p.1978-1985, 1985.
- GUR, A.; COSUT, A.; SARAC, A. J. Efficacy of different therapy regimes of low-level laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. **Laser Surg. Med.**, v.33, p.330-338, 2003.
- GRAY, J. G., et al. A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. **Mol. Cell. Biol.** v.13, p.6678-6689, 1993.
- GROENEVELD, A. B. J. A central role of interleukine-8 in the pathogenesis of ARDS. In: VINCENT, J. L. (Ed.), **Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine**. Springer, Berlin, 1998. p.65-75.

GROENEVELD, A. B. J. Vascular pharmacology of acute injury and acute respiratory distress syndrome. **Vasc. Pharmacol.**, v.39, p.247-256, 2003.

HALES, C. A., et al. Role of thromboxane and prostacyclin in pulmonary vasomotor changes after endotoxin in dogs. **J. Clin. Invest.**, v.68, p.497-505, 1981.

HAMBLIN, M.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of Low Level Light Therapy. **Proc. of SPIE**, v.6140, p.614001-614012, 2006.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, p.251-259, 2005.

HENDERSON, B.; POOLE, S.; WILSON, M. Bacterial Modulins: a Novel Class of Virulence Factors Which Cause Host Tissue Pathology By Inducing Cytokine Synthesis. **Microbiol. Rev.**, v.60, n.2, p.316-341, 1996.

HENSON, P.; ZANOLARY, B.; SCHAWARTZMAN, N. A.; HONG, S. Intracellular control of human neutrophil secretion. **J. Immunol.**, v.121, p.851-855, 1978.

HOGG, J. C.; DOERSCHUK, C. M. Leukocyte traffic in the lung. **Annu. Rev. Physiol.**, v.57, p.97-114, 1995.

HSU, H. Y.; TWU, Y. C. Tumor Necrosis Factor- α -mediated Protein Kinases in Regulation of Scavenger Receptor and Foam Cell Formation on Macrophage. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.41035-41048, 2000.

HSU, H. Y.; WEN, M. H. Lipopolysaccharide-mediated Reactive Oxygen Species and Signal Transduction in the Regulation of Interleukin-1 Gene Expression. **J. Biol. Chem.**, v.277, n.25, p.22131-22139, 2002.

ICHINOSE, F., et al. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction by endotoxemia requires 5-lipoxygenase in mice. **Circ. Res.**, v.88, p.832-838, 2001.

IDELL, S. et al. Local abnormalities of coagulation and fibrinolytic pathways that promotes alveolar fibrin deposition in the lungs of baboons with diffuse alveolar damage. **J. Clin. Invest.**, v.84, p.181-193, 1989.

IINO, K.; TORYAMA, M.; OGAWA, H.; KAWAKAMI, M. Cholesteatoma debris as an activator of human monocytes. **Acta Otolaryngol.**, v.110, p.410-415, 1990

ITO, H., et al. Lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide sensitization as a new experiment model of septic shock. **Lab. Invest.**, v.86, p.254-261, 2006.

ISOWA, N., et al. LPS-induced depolymerization of cytoskeleton and its role in TNF- α production by rat pneumocytes. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol.**, v.277, n.3, p.606-615, 1999.

- KANA, J.E.; HUTSCHENREITER, G.; HAM, D.; WAIDELICH, W. Effects of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch Surg**, v.116, p.293-296, 1981.
- KARU, T. I. Laser biomodulation: a photobiological phenomenon. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.3, n.4, p.638-640, 1989.
- KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S.; ESENALIEV, R.O. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v.18, p.171-177, 1996.
- KIPS, J. C.; CUVELLIER, C. A.; PAUWELLS, R. A. Effect of acute and chronic antigen inhalation on air way morphology and responsiveness in actively sensitized rats. **A. Rev. Respir. Dis.**, v.146, n.6, p.1306-1310, 1993.
- KITCHEN, S.; BAZIN, S. Reparo dos Tecidos. In: _____ . **Eletroterapia de Clayton**. 10 ed., São Paulo: Manole, 1998. Cap.3.
- KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolites from phagocytes. In: GALLIN, J. I; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, M. D. eds. **Inflammation: Basic principles and clinical correlates**. New York: Raven Press Ltd, 1992. p.391-444.
- KUPFNER, J. G., et al. Role of NF-kappaB in endotoxemia-induced alterations of lung neutrophil apoptosis. **J. Immunol.**, v.167, n.12, p.7044-7051, 2001.
- LANDYSHEV, IU. S., et al. Efficacy of low intensity laser irradiation and sodium nedocromil in the complex treatment of patients with bronchial asthma. **Ter Arkh.**, v.74, n.3, p.25-28, 2002.
- LEE, A.; WHYTE, M. K.; HASLETT, C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. **J. Leukoc. Biol.**, v.54, p.283-288, 1993.
- LEEPER-WOODFORD, S. K., et al. Tumor necrosis factor. Alpha and beta subtypes appear in circulation during onset of sepsis-induced lung injury. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.143, p.1976-1982, 1991.
- LEFORT, J., et al. Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyper-reactivity dissociated from TNF-a formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. **J. Immunol.**, v.161, n.1, p.474-480, 1998.
- LOPES-MARTINS, R.A., et al. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by Carrageenan. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, n.?, p.377-381, 2005.
- MATHY-HARTERT et al. Purification of Myeloperoxidase from Equine Polymorphonuclear Leucocytes. **Can. J. Vet. Res.**, v.62, p.127-132, 1998.
- MAIMANN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v.187, p.493-494, 1960.

MATTHAY, M. A., et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.167, p.1027-1035, 2003.

MATTHAY, M. A.; CEPKOVA, M. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. **J. Intensive Care Med.**, v.21, p.119-143, 2006.

MATTHAY, M. A.; WIENER-KRONISH, J. P. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.142, p.1250-1257, 1990.

MATUTE-BELLO, G., et al. Modulation of neutrophil apoptosis by colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. **Crit. Care Med.**, v.28, p.1-7, 2000.

MCRITCHIE, D. I., et al. Production of tumor necrosis factor alpha by primary cultured rat alveolar epithelial cells. **Cytokine**, v.12, n.6, p.644-654, 2000.

MEDURI, G. U., et al. Fibroproliferative phase of ARDS. Clinical findings and effects of corticosteroids. **Chest**, v.100, p.943-952, 1991.

MESTER, E.; SZENDE, B.; GARTNER, P. The effect of laser on the growth of hair in mice. **Radiobiol. Radiother.** (Berl), v.9, p. 621-626, 1968.

MIKHAILOV, V. A.; ALEKSANDROVA, O.; GOL'DINA, E. M. The immunomodulating action of low-energy laser radiation in the treatment of bronchial asthma. **Vopr. Kuortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult.**, v.4, p.23-25, 1998.

MIKUNI, Y., et al. Expression of Toll-Like Receptor 2 on T Cells Bearing Invariant Vg6/Vd1 Induced by *Escherichia coli* Infection in Mice. **J. Immunol.**, v.165, p.931-940, 2000.

MILESKI, W. J., et al. Inhibition of CD18-dependent neutrophil adherence reduces organ injury after hemorrhagic shock in primates. **Surgery**, v.108, p.206-212, 1990.

MILOJEVIC, M.; KURUC, V. Low power laser biostimulation in the treatment of bronchial asthma. **Med. Pregl.**, v.56, p.413-418, 2003.

MILORO, M., et al. Low-level laser effect on neural regeneration in Gore-Tex tubes. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v.93, p.27-34, 2002.

MOORE, P., et al. Effect of wavelength on low intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers Surg. Med.** v.36, n.?, p.8-12, 2005.

MORAES, V.L.G., SINGER, M., VARGAFTIG, B.B., CHIGNARD, M. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. **Br J Pharmacol**, v.123, p 631-636, 1998.

MUKHOPADHYAY, S.; HOIDAL, J. R.; MUKHERJEE, T. K. Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology. **Respir. Res.**, v.7, p.125-133, 2006.

NIWA, M., et al. Nuclear factor-kappaB activates dual inhibition sites in the regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v.407, n.3, p.211-219, 2000.

ORTIZ, M.C.S., et al. Laser de baixa intensidade: efeitos sobre os sistemas biológicos – parte 1. **Fisioter. Brasil**, v.2, n.4, p.222-240, 2001.

PARSONS, P. C., et al. The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. **AM. Rev. Respir. Dis.**, v.140, p.294-301, 1989.

PENG, X., et al. Protective effects of sphingosine 1- phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.169, p.1245-1251, 2004.

PETTY, T. L.; ASHBAUGH, D. G. The adult respiratory distress syndrome: clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. **Chest**, v.60, p.233-239, 1971.

PIDAEV, A. V. A mathematical assessment on the efficacy of the methods for treating patients with chronic nonspecific lung diseases at a health resort. **Lik. Spreva**, v.6, p.168-172, 1997.

PILKINGTON, C. A.; WEDDENBURG, L. R. Pediatric idiopathic inflammatory muscle disease: recognition and management. **Drugs.**, v.65, n.10, p.1355-1365, 2005.

RIGAU, I.; MAS, J. **Acción de la luz laser a baja intensidad en la modulación de la function celular.** Virgo: Universitat Rovira e virgili, 1996. 211p.

ROSSOL, M.; GÄRTNER, D.; HAUSCHILDT, S. Diverse regulation of microfilament assembly, production of TNF-alpha, and reactive oxygen intermediates by actin modulating substances and inhibitors of ADP-ribosylation in human monocytes stimulated with LPS. **Cell Motil. Cytoskeleton.** v.48, n.2, p.96-108, 2001.

SAITO, H.; LAI, J.; ROGERS, R.; DOERSCHUK, C. M. Mechanical properties of rat bone marrow and circulating neutrophils and their responses to inflammatory mediators. **Blood**, v.15, p.2207-2213, 2002.

SAKURAI, Y.; YANAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **Eur. J. Oral Sci.**, v.108, n.1, p.29-34, 2000.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v.61, p.375-380, 1997.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PEMERSTORFER-SCHÖN, H.; SCHINDL, L. Low-Intensity Laser Therapy: a review. **J Inv Med**, v.48, n.5, p.312-326, 2000.

SHAKHOV, A. N., et al. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. **J. Exp. Med.**, v.171, p.35-47, 1990.

SHAO, X. H., et al. Effect of He-Ne laser irradiation on chronic atrophic gastritis in rat. **World J. Gastroenterol.**, v.11, n.25 p.3958-3961, 2005.

SHERIDAN, B. C.; McINTYRE, R. C.; MELDRUM, D. R.; FULLERTON, D.A. Pentoxifyline treatment attenuates pulmonary vasomotor dysfunction in acute lung injury. **J. Surg. Res.**, v.71, p.150-154, 1997.

SHIMIZU, N., et al. Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin-1 β production by low power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. **J. Dental Res.**, v.74, p. 1382-1388, 1995.

TASAKA, S.; HASEGAWA, N.; ISHIKASA, A. Pharmacology of Acute Injury. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v.15, p. 83-95, 2002.

TAYLOR, R. W.; ZIMMERMAN, J. L.; DELLINGER, R. P. et al. Low dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. **JAMA**, v.291, p.1603-1609, 2004.

TAVARES DE LIMA, W., et al. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v.358, n.1, p.69-75, 1998.

THOMAS, P. S.; YATES, D. H.; BARNES, P. J. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and spectrum neutrophilia in normal human subjects. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.152, n.1 p.76-80, 1995.

TIPHLOVA, O.; KARU, T. Action of low-intensity laser radiation on Escherichia coli. **Crit. Rev. Biomed. Eng.**, v.18, p.387-412, 1991.

TOMASHEFSKY, J. F. JR. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clin. Chest Med.**, v.21, p.435-466, 2000.

TRACEY, K. J.; BEUTLER, B.; LOWRY, S. F. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science**, v.234, p.470-474, 1986.

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. H. Laser HeNe 632nm come attivatore della cicatrizzazione. **Bolletino Italia AIVPA**. v.23, n.2, 1984.

TUNÉR, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of well-known negative studies on Low-Level Laser Therapy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.16, n.5, p.245-48, 1998.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Receptor-Dependent Mechanisms of Cell Stimulation by Bacterial Endotoxin. **Annu. Rev. Immunol.**, v.13, p.437-457, 1995.

ULICH, T.R., WATSON, L.R., YIN, S. GUO, K., DEL CASTILLO, J. The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I: characterization of LPS-induced TNF and IL-1 mRNA expression and the LPS-, TNF- and IL-1-induced inflammatory infiltrate. **Am J Pathol**, v.138, p.1485-1496, 1991.

- UNO, T.; TANAKA, H.; NAKAI, N.; NAGAI, H. Participation of leukotriene D4 and tumor necrosis factor on lipopolysaccharide-induced airway hyper-responsiveness in guinea pigs. **Biol. Pharm. Bull.**, v.20, n.4, p.332-337, 1997.
- VAN LENTEN, B. J.; FOGELMAN, A. M. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor- α . **J. Immunol.** v.148, p.112-116, 1992.
- VARGAFTIG, B. B. Modification of experimental bronchopulmonary hyper-responsiveness. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.156, p.97-102, 1997.
- VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.10, p.411-452, 1992.
- VEDDER, N., et al. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. **J. Clin. Invest.**, v.81, p.939-944, 1988.
- VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Ver. Brás. Otorrinolaringol.**, v.73, n.1, p.123-127, 2007.
- WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.1334-1349, 2000.
- WEINSTEIN, S. L.; GOLD, M. R.; DeFRANCO, A. L. Bacterial Lipopolysaccharide Stimulates Protein Tyrosine Phosphorylation in Macrophages **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.88, p. 4148-4152, 1991.
- WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**, v.369, p.1553-1565, 2007.
- WHEELER, A. W., et al, Reactivity of mast-cell-bound IgE idiotypes with anti-idiotypic antibody: mediator release or inhibition of antigen-induced mediator release? **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.91, n.2, p.192-197, 1990.
- YANG, H.; YOUNG, D. W.; GUSOVSKY, F.; CHOW, J. C. Cellular Events Mediated by Lipopolysaccharide-stimulated Toll-like Receptor 4. MD-2 IS REQUIRED FOR ACTIVATION OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES AND Elk-1. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.20861-20866, 2002.
- YOUNG, S., et al. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg. Med.**, v.9, p.497-505, 1989.
- YU, H.S., et al. Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. **J. Invest. Dermatol.**, v.120, p.56-64, 2003.

ANEXO A

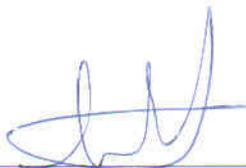
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A008/2006/CEP, intitulado "*Estudo do efeito antiinflamatório da terapia laser de baixa potência sobre as vias aéreas de ratos submetidos ao modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS)*", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maricília Silva Costa, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecação de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 02 de maio de 2006.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP