

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento**

FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO

**ESTUDO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
RATOS**

**São José dos Campos, SP
2006**

FLÁVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO

**ESTUDO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
RATOS**

**Tese de Doutorado apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Engenharia Biomédica da Universidade do
Vale do Paraíba como complementação
dos créditos necessários para obtenção do
título de Doutor em Engenharia Biomédica.**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Co-Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto

São José dos Campos, SP

2006

C323e

Carvalho, Flávio Aimbire Soares de
Estudo do mecanismo de ação do laser de baixa potência em modelos
experimentais de inflamação pulmonar em ratos/ Flávio Aimbire Soares
de Carvalho. São José dos Campos: UNIVAP, 2006
1 Disco laser.

Tese de Doutorado apresentada ao programa Pós-graduação em
Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da
Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1 Pulmão 2. Diafragma 3. Inflamação 5. Terapia a Laser
de Baixa Potência I. Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Orient. II. Faria-
Neto, Hugo Caire Castro, Co-Orient. III. Título

CDU:616.24

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos a reprodução parcial ou total
desta tese, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Flávio Aimbire Soares de Carvalho

Data:

08/11/2006

“ESTUDO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MODELOS EXPERIMENTAIS
DE INFLAMAÇÃO PULMONAR EM RATOS”


Flávio Aimbire Soares de Carvalho

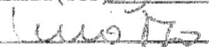
Banca Examinadora:

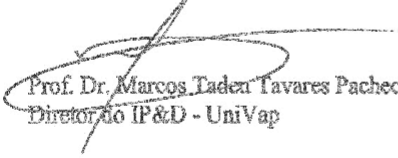
Prof. Dr. ANTONIO G. J. BALBIN VILLAVERDE (UNIVAP) 

Prof. Dr. MARCOS TADEU TAVARES PACHECO (UNIVAP) 

Prof. Dr. WELLINGTON RIBEIRO (UNIVAP) 

Prof. Dra. ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA (USP) 

Prof. Dr. LÚCIO FRIGO (UNICSUL) 


Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Direção IP&D - UniVap

DEDICATÓRIA

A Regiane Albertini, pela coragem e paciência incondicional de seguir ao meu lado, pelas críticas especiais, e por proporcionar a base sólida para que tudo isso fosse realizado. Regiane é a brisa da calma e o farol que ilumina o meu caminho nas horas de tormenta. É a minha maior alegria.

Aos meus avós maternos pela ajuda incondicional durante a minha formação intelectual, religiosa e moral.

A minha mãe, que com amor, sensibilidade, alegria de viver, trabalho sério e foco me fez trilhar o caminho que hoje permite que eu faça aquilo que realmente gosto. Isso pra mim é tudo.

A minha irmã, que é na família a maior alegria que eu tenho. É a certeza de que eu não estou sozinho. Amo Lud.

A Moysés Valderis Albertini, Maria Regina Cizoto Albertini, Tereza Poletto Cizoto, Elisabeth Cizoto (*in memorium*) pelo imenso carinho, pela generosidade, pelo apoio incondicional e principalmente pelo exemplo de amor em família.

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Magnífico Reitor da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap), Prof. Dr. Baptista Gargione, pela oportunidade de fazer parte da família UniVap e pela generosidade durante a minha formação acadêmica.

Ao Diretor do Instituto e Pesquisa e Desenvolvimento da UniVap, Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, por fazer existir o Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da UniVap, pela orientação simples e eficiente nas horas mais difíceis e pela confiança depositada durante a proposta desse estudo.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da UniVap, Prof. Dr. Antonio Balbin Villaverde, pela disponibilidade incondicional em ajudar os alunos frente a coordenação e na correção dos manuscritos em língua inglesa

Ao Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde, Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro, por quem eu tenho grande estima, pela confiança depositada, pela generosidade na discussão científica, pelos ensinamentos de persistência e pelo exemplo de profissional.

Ao Coordenador do Laboratório de Imunofarmacologia da FioCruz, Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, por quem tenho grande admiração, agradeço pela amizade, pela orientação, pelos ensinamentos e pela generosidade em disponibilizar inteiramente o seu laboratório durante a realização desse estudo. Foi o responsável pelo despertar de toda a minha iniciação científica, quando me levou para o Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da FioCruz.

Especiais aos Professores Doutores Eduardo Vera Tibiriçá, Rodrigo Lopes-Martins, Sócrates Penna, Wellington Ribeiro, Jaime Aboin Sèrtie e Wothan Tavares

de Lima, que me deram à oportunidade de fazer parte de seus respectivos grupos de pesquisa durante a minha formação acadêmica. A eles agradeço por me ensinar a importância da formação crítica do pensamento, a metodologia científica, a ler e escrever um manuscrito, e a pensar como pesquisador.

A Prof. Dra. Maricília Costa pela amizade incondicional, pela efervescência de idéias na construção do protocolo experimental, por discordar de forma pontual, e pela generosidade durante os momentos de tormenta produtiva.

A Prof. Dra. Cristina Pacheco, pelas críticas construtivas durante a minha segunda qualificação, durante a redação do projeto inicial desta tese, e por atualmente disponibilizar o seu laboratório dando início a possíveis resultados futuros.

Ao Prof. Dr. Alfeu Saraiva, responsável pelo Laboratório de Biomateriais do IP&D da UniVap, pela amizade, pelo incentivo constante e pelo reconhecimento do meu trabalho. O Prof. Dr. Alfeu tem me mostrado o caminho de continuidade na vida acadêmica como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio de Oliveira, inicialmente pela ajuda no meu exame de proficiência, um pouco mais tarde pelas críticas durante a minha segunda qualificação, e por me mostrar a conduta de um pesquisador sério.

Ao Prof. Dr. Jan Magnus Bjordal, meu co-orientador na Noruega, por me mostrar a relevância clínica e a possibilidade de ampla utilização da terapia com laser de baixa potência.

Ao Dr. Vegard Vereid Iversen, por disponibilizar o seu laboratório e pelos ensinamentos da técnica de microdiálise.

A Rosângela Taranger, pela estética do texto final e pela generosidade. Rosângela Taranger é o máximo.

Estudo do efeito do laser de baixa potência em modelos experimentais de inflamação pulmonar em ratos

Resumo

O presente estudo mostra o efeito da terapia com Laser de Baixa Potência (TLBP) sobre modelos experimentais de hiperreatividade (HR) das vias aéreas, inflamação pulmonar e disfunção contrátil do músculo diafragma em ratos Wistar. Além disso, avaliamos efeito antiinflamatório da TLBP sobre a hipersensibilidade de músculo liso de brônquio ao íon cálcio. Estudamos ainda, a eficácia da TLBP sobre a hiporresponsividade de segmentos de traquéia ao estímulo β -adrenérgico. Inicialmente mostramos o perfil temporal do efeito da injeção intravenosa de lipopolissacarídeo de bactéria Gram-negativa (LPS) sobre a resposta contrátil da musculatura lisa das vias aéreas e sobre a migração de células inflamatórias para o pulmão após a instilação intratraqueal de LPS. A TLBP foi capaz de reduzir a HR de traquéia e a migração de células inflamatórias para o pulmão, atenuando assim, a resposta inflamatória induzida pelo LPS. Esses resultados mostraram que a eficácia da TLBP se deveu a redução da concentração de prostaglandina (PGE₂) e tromboxana (TXA₂) do exsudato inflamatório pulmonar de ratos estimulados com LPS. O efeito da TLBP sobre a migração de células inflamatórias para o pulmão e o índice de lesão hemorrágica pulmonar de ratos foi avaliado. O tratamento farmacológico com dexametasona ou celecoxib reduziu as lesões hemorrágicas. A TLBP também reduziu a concentração de TNF no exsudato inflamatório pulmonar, atenuando a lesão hemorrágica. Apesar do tipo de afecção pulmonar, o TNF é um mediador inflamatório que apresenta um papel importante no desencadeamento e perpetuação da HR das vias aéreas e da inflamação pulmonar. Dessa forma, avaliamos a HR de traquéia e a capacidade de relaxamento dessa musculatura lisa frente ao efeito direto do TNF. Os resultados mostram que segmentos de traquéia incubados com TNF apresentam HR frente ao estímulo colinérgico e menor capacidade de relaxamento frente ao estímulo β -adrenérgico. Após a TLBP, a HR foi

atenuada e a capacidade de relaxamento da musculatura lisa e a atividade da adenilato ciclase foi restaurada. A TLBP foi investigada em modelo de disfunção contrátil do diafragma de ratos induzida por LPS. Para tanto, avaliamos o efeito do LPS sobre a capacidade contrátil do diafragma após estimulação elétrica. Os resultados mostraram que o LPS (i.v) e o TNF são capazes de reduzir força contrátil do diafragma de ratos após estimulação elétrica, visto que o tratamento farmacológico reduziu os níveis de TNF tecidual e restabeleceu a resposta contrátil. A TLBP reduziu os níveis de TNF tecidual e restaurou a resposta contrátil do diafragma após o LPS. O presente trabalho demonstra que a TLBP interfere em importantes efeitos causados pela estimulação com LPS e TNF, tanto aqueles ligados a musculatura lisa das vias aéreas e a migração de células inflamatórias quanto aos que se referem à musculatura diafragmática. Apesar do mecanismo de ação desta terapia, este tipo de tratamento, ainda pouco explorado nas afecções de vias aéreas e por isso pobremente elucidado, sugere uma alternativa de tratamento co-adjuvante que é eficaz, de baixo custo e de amplo espectro para as afecções pulmonares.

Palavras-chave: Vias aéreas; Pulmão; Diafragma; Inflamação; Laser de Baixa Potência.

Study of effect of Low Level Laser Therapy on experimental models of lung inflammation in rats

Abstract

The present study demonstrated the effect of Low Level Laser Therapy (LLLT) on experimental model of airway hyper-reactivity (AH) and lung inflammation and hypo-responsiveness of trachea rings to β -adrenoreceptor in Wistar rat. We also evaluated the anti-inflammatory effect of LLLT on the increasing of sensitivity of bronchi smooth muscle to calcium and contractile dysfunction of diaphragm. Initially, we showed the temporal profile of LPS intravenous injection on contractile response of airway smooth muscle and the influx of inflammatory cells into the lung after intra-tracheal instillation of LPS. The LLLT was able to reduce the AH and migration of inflammatory cells to the lung, attenuating the LPS- induced inflammatory response. These results demonstrated that the LLLT efficacy was due to the reduction of thromboxana A₂ (TXA₂) and prostaglandin E₂ (PGE₂) levels of inflammatory exudates of rats stimulated with LPS. The effect of LLLT on inflammatory cells influx and levels of TNF in bronco-alveolar lavage (BAL) and pulmonary hemorrhagic lesions was also analyzed. The pharmacological treatment with dexametasone or celecoxib decreased the pulmonary hemorrhagic lesions. The LLLT reduced the same parameters of pharmacological treatment, and in additionally reduced the TNF levels in BAL. Despite of lung disease pattern, the TNF- α is an inflammatory mediator that presents an important role in development and perpetuating of AH and inflammation lung. Therefore, we studied the dysfunction of relaxation response of trachea segments against the TNF effect. The results showed that the trachea segments incubated with TNF- α presented AH to cholinergic agonist and relaxation dysfunction to β -adrenoceptor. After LLLT, the AH and relaxation dysfunction was attenuated. The adenylyl cyclase activity of TNF-treated rat trachea segments was also increased after LLLT. In addition, the LLLT reduced significantly the sensibility of bronchi segments to calcium after TNF incubation. It is suggested that LLLT can be attenuating AH through the reduction of contractile response mediated by calcium. The LLLT action was investigated in an inflammation model induced by LPS characterized to reduce the contractile force of rat diaphragm muscle. Thus, in rats

treated or not with LPS, we measured the diaphragm contraction after electrical stimulation. The results showed that both LPS and TNF- α reduce the contractile force of diaphragm. The pharmacological therapy with chlorpromazine reduced the tissue TNF levels and reestablished the contractile force after LPS. The present study showed that the LLLT is able to interfere on important effects of airway and lung caused by stimulation with LPS or TNF, such those linked to airway smooth muscle and inflammatory cells influx as those referents to diaphragm muscle. Despite of the action mechanism of LLLT, this therapy still poorly understood in pulmonary diseases, suggest the LLLT as alternative of co-adjuvant treatment that is efficient, low cost and wide spectrum for pulmonary diseases.

Keywords: Airway; Lung; Diaphragm muscle; Inflammation; Low Level Laser Therapy.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1. Lipopolissacarídeo (LPS)	01
1.2. Eicosanóides	05
1.3. Fator de Necrose Tumoral (TNF)	09
1.4. Hiperreatividade das vias aéreas	13
1.5. Hiporresponsividade das vias aéreas ao estímulo β -Adrenérgico	17
1.6. Reação por imuno-complexo.....	22
1.7. Hiper-sensibilidade brônquica ao cálcio após estimulação com TNF.	27
1.8. Disfunção contrátil do músculo diafragma	32
1.9. Laser de Baixa Potência (LBP).	37
1.9.1. Laser de baixa potência (LBP) e inflamação	44
1.9.2. Laser de baixa potência (LBP) e inflamação das vias aéreas.	49
2. Objetivos	57
3. Resultados – Trabalhos publicados	58
4. Discussão	64
5. Conclusão	96
Referências Bibliográficas	97

1. Introdução

1.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

No início do século XIX, Pfeiffer detectou um componente tóxico termoestável em bactérias Gram-negativas (PFEIFFER, 1892). Este autor observou que animais de laboratório submetidos à administração de *Vibrio cholerae* inativado, apresentavam sinais de choque seguido de morte. A esse componente tóxico, naquela época ainda não caracterizado, ele denominou endotoxina. Esta terminologia foi utilizada por presumir que a substância encontrava-se no interior da bactéria. Isto também serviu para distingui-la das toxinas secretadas (exotoxinas) por culturas de bactérias Gram-positivas. Estudos posteriores mostraram que esta denominação era inadequada porque as endotoxinas se encontravam na parede celular das bactérias e não no seu interior. Atualmente é conhecido que outras endotoxinas, como a isolada por Centanni na mesma época das experiências de Pfeiffer, na verdade se tratam da mesma endotoxina. Além disso, a presença deste tipo de toxina caracteriza o grupo de bactérias Gram-negativas (RIETSCHER; CAVAILLON, 2003).

Por volta de 1930 até o início da década de 40, André Boivin do Instituto Pasteur e Walter Morgan do Instituto Lister de Londres mostraram que toxinas de bactérias Gram-negativas contêm lipídeos, polissacarídeos e proteínas. Subseqüentemente, esses mesmos autores observaram na bactéria *Serratia marcescens*, capaz de provocar infecções nosocomiais, que a substância tóxica presente nesta bactéria era composta de lipídeos e polissacarídeos. A partir desta observação denominou-a de lipopolissacarídeo (LPS). Diferentemente de Boivin e Morgan que utilizaram extratos de bactérias Gram-negativas relativamente impuros, e um pouco mais tarde conseguiram grandes quantidades de extratos bacterianos puros. Estes

pesquisadores demonstraram que somente bactérias Gram-negativas sintetizavam endotoxinas (RIETSCHEL; BRADE, 1992; RIETSCHEL; CAVALLON, 2003). A presença de LPS, de forma geral, distingue a bactéria Gram-negativa da bactéria Gram-positiva (HITCHCOCK, 1986).

Estruturalmente, o LPS apresenta três regiões principais: a cadeia polissacarídica-O (específica para cada tipo de bactéria), a polissacarídica central (comum a todas as bactérias) e a região lipídica-A (HITCHCOCK et al., 1986; MORRISON, 1983; NOWOTNY, 1987).

A cadeia polissacarídica-O é o segmento mais variável da endotoxina, capaz de desencadear reações imunológicas na qual o organismo infectado é capaz de produzir anticorpos específicos, além disso, o LPS difere entre as espécies bacterianas, assim cada cepa tem uma cadeia polissacarídica-O específica. A cadeia polissacarídica central, chamada de “core”, apresenta-se dividida em uma camada central interna, ligada à região lipídica, e uma camada externa ligada à região polissacarídica-O. A região lipídica-A varia pouco estruturalmente, e acredita-se ser esta responsável pelos efeitos biológicos causados pela infecção bacteriana.

Os efeitos biológicos da exposição ao LPS resultam da sua ligação a receptores presentes na membrana de diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, entre outras (ULEVITCH; TOBIAS., 1995). Os receptores de LPS diferem-se quanto a sua função. Desta forma, a molécula CD18 está envolvida na depuração e degradação de endotoxinas, para isso o LPS se liga à molécula CD18, que a partir daí é ativada e capaz de fagocitar o LPS (KIELIAN et al, 1995). Ainda com a mesma função da molécula CD18, um outro receptor denominado “scavenger receptor”, reconhece dispersões do LPS e está envolvido na via pinolítica

de remoção das endotoxinas da circulação (RAETZ et al, 1991). Apesar de várias proteínas plasmáticas identificadas, a CD14 é a única proteína considerada um receptor para o LPS presente no sangue durante o processo infeccioso. A CD14 é uma glicoproteína que se apresenta ligada à membrana plasmática de células mielóides (mCD14), ou na forma de proteína solúvel (sCD14). As duas formas de CD14 ativam as células em resposta ao LPS e no mecanismo de transdução pela via sCD14, o LPS liga-se a uma glicoproteína sintetizada no fígado e lançada à circulação, denominada proteína ligante de LPS ("lipopolysaccharide binding protein", LBP). O LPS atinge na circulação concentrações plasmáticas fisiológicas de 500 µg/ml e sua concentração pode atingir 50 ng/ml.

Por fim, o complexo LPS-LBP liga-se a receptores CD14. Embora a ligação à LBP seja importante para ativação de várias células e conseqüentemente seus efeitos biológicos, alguns dados na literatura indicam a existência de moléculas na membrana de macrófagos desprovidas de CD14 que são capazes de se ligarem diretamente ao LPS, principalmente à região lipídica (SHIBA et al., 1984). Além do mencionado, o aumento da concentração circulante de LPS induz as células a sintetizar/liberar substâncias químicas conhecidas como mediadores químicos, independentemente da formação do complexo LPS-LBP-CD14 (SHIBA et al., 1984).

A partir da ativação celular ocorre a síntese e/ou liberação de diversos mediadores químicos, os quais apresentam potente efeito inflamatório. Entre eles destacam-se os mediadores lipídicos (eicosanóides e fator ativador de plaquetas), aminas vasoativas (histamina e serotonina), diversas interleucinas (ILs), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF) (CLANCY; AMIN; ABRAMSON, 1998; LOUIE; HALLIWELL; CROSS, 1997). Tais mediadores pró-inflamatórios estão intimamente relacionados com os mecanismos desencadeadores dos efeitos do LPS, como por

exemplo, aumento da permeabilidade vascular pulmonar (MIOTLA; FEFERY; HELLEWELL, 1998), aumento da expressão de moléculas de adesão, coagulação intravascular disseminada e hipotensão severa (MIOTLA; FEFERY; HELLEWELL, 1998).

O modelo de choque séptico pode ser induzido experimentalmente pela administração de LPS em animais de experimentação (CAVAILLON et al., 1992). Frequentemente, esta condição patológica é acompanhada de falência respiratória, podendo advir a SARA (Síndrome da Angústia Respiratória Aguda). Por causa disso, a exposição prévia de animais de experimentação ao LPS se constitui em modelo de estudo da SARA (PARSONS et al., 1989).

O choque séptico é uma condição na qual se observa um estado de profunda depressão de alguns órgãos e se caracteriza por hipotensão arterial refratária, alteração da reatividade vascular pulmonar, hiperreatividade das vias aéreas, inflamação pulmonar, perfusão tecidual inadequada, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla de órgãos (BIGAUD et al., 1992; MCKENNA et al., 1990; MARTIN; SILVERMAN, 1992). Baseado no exposto, o choque séptico pode representar uma condição potencialmente fatal.

Vale lembrar que, apesar das investigações e do conhecimento adquirido sobre esta afecção, o número de mortes decorrentes das manifestações do choque séptico ainda é elevado, e apesar de identificados diversos mediadores inflamatórios, os mecanismos desencadeadores dessas afecções ainda não estão totalmente elucidados (WOLFE; DASTA, 1995).

1.2 Eicosanóides

Os eicosanóides estão implicados no controle de numerosos processos fisiológicos e estão entre os mais importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória. Os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos; são produzidos a partir da via metabólica de novo a partir de fosfolipídios. O interesse pelos eicosanóides surgiu na década de 1930, após relatos de que o sêmen continha uma substância que provocava contração do músculo liso uterino. Acreditou-se que a substância tivesse sua origem na próstata e, assim, recebeu a designação errônea de prostaglandina. Posteriormente, ficou claro que a prostaglandina não era apenas uma substância, mas uma família de compostos, que eram produzidos em muitos, se não na maioria, dos tecidos e que derivavam do ácido araquidônico (AA). A principal fonte de eicosanóides é o AA, um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro duplas ligações (daí o termo “eicosa” para referir-se aos 20 átomos de carbono e “tetraenóico” para designar as quatro duplas ligações).

O AA é um ácido graxo liberado do fosfolipídio da membrana tanto através da ação da seqüência da fosfolipase C e da lipase do diacilglicerol como pela ação direta da fosfolipase A_2 sobre o fosfolipídio de membrana. Uma vez liberado o ácido araquidônico é reesterificado ou metabolizado pela via da lipoxigenase ou pela via da cicloxigenase (COX).

A COX é a enzima responsável pelo metabolismo do ácido araquidônico (AA) livre à prostaglandina- H_2 . Esta enzima tem como resultado do seu metabolismo a formação de prostanóides, a partir da ação de diversas enzimas específicas chamadas de sintases (SMITH; MARNETT, 1991). Dentre os prostanóides formados

incluem-se a prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaciclina (PGI_2) e tromboxana A_2 (TXA_2).

Existem pelo menos duas isoformas da COX identificadas e denominadas de COX-1 e COX-2, as quais catalisam reações idênticas (SMITH; MARNETT, 1991). A COX-1 é responsável pela produção de prostanóides que têm importante efeito sobre a homeostasia celular e algumas funções fisiológicas, por isso é expressa constitutivamente na maioria das células e tecidos (SMITH et al, 1993). Entretanto, alguns autores admitem que a COX-1 pode ser induzida em algumas células sobre certas condições (SMITH et al, 1993).

A segunda isoforma da COX, denominada COX-2 foi considerada existir a partir de observações *in vivo* e *in vitro* que mostraram um aumento da atividade da COX a estímulos inflamatórios, como citocinas e LPS, que é regulado pelo glicocorticóide (dexametasona) (MAIER; HLA; MACIAG, 1990; MASFERRER et al., 1992; VANE et al., 1994). Experimentos de Biologia Molecular confirmaram esta hipótese, tornando razoável admitir a idéia de que inibidores da COX-2 poderiam ser antiinflamatórios, no entanto preservando os efeitos fisiológicos da COX-1. Esta hipótese foi corroborada pela descoberta e síntese de antiinflamatórios que seletivamente inibem a COX-2, mas não interferem com os efeitos fisiológicos da COX-1.

Alguns autores mostraram que a COX-2 apresenta-se de forma constitutiva em diversos órgãos (SEKI, 1995). No mesmo sentido, no que diz respeito à arquitetura pulmonar, Ermert et al. (1998), recentemente demonstraram que a COX-2 pode ser expressa constitutivamente em vários tipos celulares das vias aéreas, incluindo células epiteliais brônquicas, células da musculatura lisa da traquéia e do brônquio, macrófagos alveolares e algumas células da musculatura lisa vascular do pulmão que alteram a resistência vascular. Além disso, Ermert et al. (2000), também demonstraram

a presença de tromboxana sintase nas células da musculatura lisa de vasos de pulmão não inflamado. Esses mesmos autores demonstraram que a resposta vasoconstritora ao AA em pulmão não inflamado é devido à síntese de TXA₂ derivada da atividade da COX-2 e não da COX-1.

Através dos vários estudos mencionados, é possível notar que as divergências a respeito do papel da COX na fisiologia celular e nos processos inflamatórios ainda são inúmeras. Isto chama atenção para a complexidade dos efeitos decorridos da atividade destas enzimas.

O aumento da síntese de prostanóides está envolvido em anormalidades vasculares decorrentes da endotoxemia ou sepse, e as vias aéreas são alvo de tais eventos, principalmente no que diz respeito a SARA (STEUDEL et al. ,1997). Ainda nesse sentido, Steudel et al. (1997) observaram que o LPS é capaz de estimular a síntese de grandes quantidades de TXA₂, que têm importante efeito nos distúrbios vasculares das vias aéreas e nas alterações do tônus broncomotor.

Dados da literatura relatam que a reatividade das vias aéreas a estímulos constritores pode ser alterada em condições de inflamação induzidas pelo LPS ou citocina, e que o LPS é capaz de induzir “priming” para a COX-2 em pulmão perfundido de ratos, com conseqüente aumento da síntese de prostanóides (ERMERT et al., 2000). Ainda neste contexto, Ermert et al. (2000) observaram que o “priming” induzido pelo LPS sobre a COX-2, aumenta a produção de prostanóides que geram uma resposta exacerbada da musculatura lisa da traquéia de ratos a estímulos constritores.

Além disso, Belvisi et al. (1997) demonstraram que em cultura de células da musculatura lisa das vias aéreas de humanos, citocinas como TNF podem estimular a COX-2 a sintetizar grandes quantidades de prostanóides, que agravam o quadro de

hiperreatividade. De fato, Pang e Knox (1997) mostraram que cultura de células da musculatura lisa das vias aéreas de humanos libera prostanóides em resposta a IL-1 β , e que a resposta é mediada preferencialmente pela indução da COX-2, indicando que a musculatura lisa das vias aéreas pode ser uma importante fonte de prostaglandina, e que a COX-2 pode desempenhar um efeito importante no quadro de hiper-reatividade das vias aéreas induzida por LPS. Existem dados indicando que a perfusão de pulmão isolado de ratos com LPS causa liberação de prostaglandina e TXA₂, resultando em constrição dos bronquíolos terminais (PANG; KNOX, (1997).

De forma geral, a musculatura lisa brônquica e da traquéia de várias espécies mostram-se particularmente sensíveis a TXA₂, PGF_{-2 α} , PGE₂, LTC₄ e LTD₄. Apesar da PGE₂ e da prostaciclina causarem relaxamento do músculo liso das vias aéreas, o efeito resultante de suas ações sobre seus receptores nesse tipo de musculatura culmina em potente contração. (ARM; SPUR; LEE, 1991; DRAZEN et al., 1980; HAMBERG et al., 1976; PIPER, 1983; ZAPOL; LEMAIRE, 1991).

Ainda neste sentido, é possível que os prostanóides (destaque para a TXA₂) localizados em diferentes microambientes, já que podem ser produzidos no sítio inflamatório ou sistemicamente, contribuam para o início e para a rápida amplificação das alterações das vias aéreas associadas à inflamação pulmonar. Por fim, embora os prostanóides sejam sintetizados pelas células da musculatura lisa das vias aéreas (ZAPOL; LEMAIRE, 1991), o efeito de sua produção e interação com outros mediadores inflamatórios sobre condições fisiopatológicas, e a regulação das diferentes isoformas da COX nessas células ainda não foi totalmente elucidado.

1.3 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina produzida por diversos tipos celulares. A primeira descrição desta substância ocorreu na década de 70, quando Carswell et al. (1975) mostraram que a administração de endotoxina (LPS) em coelhos sensibilizados com Bacilo Calmette-Guerrin (BCG) causa o aparecimento de um fator plasmático com atividade necrotizante hemorrágica em tumores experimentais *in vivo*, além disso, o TNF é um fator protéico presente em plasma de camundongos submetidos à administração de LPS. Esses mesmos autores descreveram ainda nesta época a presença de uma proteína plasmática responsável pela perda de peso de coelhos infectados com *T. brucei*. Esta proteína foi chamada de caquexina e foi reconhecida como a própria molécula do TNF (BEUTLER; CERAMI, 1989). A principal célula produtora de TNF é o macrófago, embora outras células sintetizem TNF, entre elas, linfócitos, mastócitos (as únicas a armazenar TNF), neutrófilos, célula muscular lisa, entre outras (SIMPSON; CASEY, 1989). Apesar de esta citocina receber o nome de TNF, parece claro que seu papel na citólise direta de tumores naturais não é relevante, e possivelmente, não é responsável pela caquexia observada em humanos neoplásicos (SIMPSON; CASEY, 1989). O TNF é mediador de alguns eventos da resposta inflamatória. Embora a endotoxina tenha efeitos tóxicos diretos sobre algumas células, os efeitos deletérios da exposição ao LPS sobre o organismo não podem ser explicados exclusivamente pelas ações da endotoxina. Alguns autores sugerem que o TNF é o principal mediador dos efeitos tóxicos da endotoxina (SIMPSON; CASEY, 1989), visto que o tratamento com anticorpo anti-TNF é capaz de reverter às alterações fisiológicas induzidas pela endotoxina (LACHMAN; PITSOE;

GAFFIN, 1984; VILCEK; LEE, 1991). De fato, quando injetado em animais de experimentação, o TNF é capaz de reproduzir o quadro de choque séptico (SIMPSON; CASEY, 1989). Os efeitos variam de alterações metabólicas até injúria do endotélio pulmonar, com conseqüente formação de edema, redução da complacência pulmonar, e hipoxemia arterial e hiper-reatividade das vias aéreas (VILCEK; LEE, 1991). Os efeitos biológicos observados após a estimulação *in vitro* ou *in vivo* com o TNF, são conseqüência de sua ligação a receptores específicos localizados na membrana celular. Pelo menos dois tipos de receptores para o TNF já foram descritos (LEWIS et al, 1991).

O TNF exerce profundos efeitos sobre a fisiologia celular, induzindo a produção de mediadores inflamatórios tais como NO e eicosanóides. O TNF é sintetizado localmente nos pulmões, e está próximo às células da musculatura lisa das vias aéreas (BROIDE et al, 1992). Alguns autores como Parsons et al. (1989), observaram que o sistema respiratório mostra-se sensível aos efeitos do TNF reproduzindo os sinais clínicos observados na SARA. Existem dados indicando que em ratos (KIPS; TAVERNIER; PAUWELS, 1992), cobaias (UNO et al, 1997), e voluntários (THOMAS; YATES; BARNES, 1995), o TNF participa de forma importante no desencadeamento da hiper-reatividade 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 (LEFORT et al, 1998; VARGAFTIG, 1997).

Haddad e Rousell (1998) observaram que o TNF causa aumento da reatividade da musculatura lisa brônquica de humanos, e que isso ocorre em nível pré-juncional nas terminações nervosas parassimpáticas. A partir dessa observação é razoável sugerir que o TNF- α atue no receptor colinérgico M₂. De fato, o TNF pode alterar a regulação

endógena das vias aéreas através da disfunção do auto-receptor (dessensibilização e down-regulation) levando a exacerbação da broncoconstrição e secreção de muco, contribuindo para o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas (HADDAD; ROUSELL, 1998). Além disso, sabe-se que o mecanismo de transdução de sinal do autoreceptor muscarínico M_2 é capaz de inibir a adenilato ciclase, inibindo assim a sinalização do AMP cíclico para o relaxamento das vias aéreas (ROUX et al, 1998). Amrani, Martinet e Bronner, (1995) observaram que o TNF, além de exacerbar a resposta contrátil das células da musculatura lisa das vias aéreas durante a inflamação pulmonar, interfere com a função dos receptores β -adrenérgicos. Desta forma, o relaxamento das vias aéreas de cães mediado pelo isoproterenol é comprometido. Embora, o suposto aumento de liberação de ACh durante o processo inflamatório explique a hipo-reatividade a agonistas β -adrenérgicos, isto não é suficiente para explicar a hiper-reatividade das vias aéreas (FRYER et al., 1999).

Alguns estudos propõem que a alteração do calibre das vias aéreas de ratos induzida pelo TNF é devido ao aumento da secreção de muco (FISCHER et al, 1995) ou pela formação de edema (AMRANI; MARTINET; BRONNER, 1995). Ainda, alguns autores sugerem um efeito direto sobre a contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas a estímulos colinérgicos e a bradicinina, visto que o TNF aumenta os níveis de cálcio livre no citosol em traquéia isolada de ratos (AMRANI; MARTINET; BRONNER, 1995). Neste sentido, Parris et al (1999), observaram que o TNF pode ativar uma nova via de sinalização na musculatura lisa brônquica de cobaias, levando ao aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina e subsequente aumento da sensibilidade desses filamentos ao cálcio, representando um possível mecanismo responsável pela hiperreatividade desses segmentos.

Como já descrito, o TNF é considerado o principal mediador da injúria pulmonar induzida por endotoxina (KWON et al. 1994). Estudos têm mostrado que o uso de antiinflamatórios que inibem seletivamente a COX-2 pode atenuar a hiper-reatividade das vias aéreas e a inflamação pulmonar. Belvisi et al. (1997) mostraram que as células da musculatura lisa das vias aéreas de humanos quando incubadas com TNF, têm a expressão aumentada de COX-2 com conseqüente síntese exagerada de prostanóides, com destaque para a TXA₂. Estes dados vêm ao encontro com os resultados obtidos por Kettelhut; Fiers e Goldberg (1987), os quais indicam que o aumento da produção de TXA₂ é prejudicial no choque endotóxico, e questionam se os inibidores da COX poderiam ser usados na terapêutica. No mesmo sentido, Wheeler et al. (1991) demonstraram em carneiros, que as alterações pulmonares induzidas pelo TNF, semelhantes àquelas induzidas pelo LPS, são em parte mediadas pelos prostanóides e reduzidas pelo antiinflamatório ibuprofen.

Em outra série de experimentos, Ermert *et al.* (2000) observaram que as vias aéreas de ratos que possuem “priming” (memória) para o LPS têm propensão a responder ao aumento da formação de edema e a broncoconstrição, exclusivamente por estarem relacionadas à ativação da COX-2 e formação exagerada de prostanóides. Portanto, é razoável supor que o TNF liberado após a exposição ao LPS, é capaz de estimular a COX-2, e esta por sua vez produz quantidades apreciáveis de mediadores inflamatórios, os quais determinam a hiperreatividade das vias aéreas frente ao estímulo colinérgico e inflamação pulmonar. Por fim, é possível correlacionar o TNF e a liberação de PGE₂ e TXA₂.

1.4 Hiper-reatividade das vias aéreas

A hiper-reatividade das vias aéreas é caracterizada pelo aumento da resposta contrátil do músculo liso frente a estímulos inespecíficos. Vários autores têm mostrado que o LPS é capaz de aumentar a resposta contrátil do músculo liso brônquico e da traquéia frente ao estímulo colinérgico. De fato, Dupont et al. (1999) e Sukkar et al. (2001), mostraram que a injeção intravenosa de LPS causa hiper-reatividade das vias aéreas quando esses tecidos são estimulados com acetilcolina ou carbacol. Além disso, esses autores observaram que o efeito do LPS é dependente do tempo e da forma de administração. KIPS; CUVELLIER; PAUWELS, (1993) sugerem que a administração de LPS causa liberação de mediadores capazes de modular a reatividade das vias aéreas. É importante ressaltar que a exposição de ratos ao LPS por via inalatória pode causar aumento da reatividade das vias aéreas quando estimuladas por carbacol, e que essa resposta contrátil exacerbada tem perfil temporal distinto quando comparada com modelos experimentais de inflamação pulmonar induzidos pela injeção intravenosa de LPS (KIPS; CUVELLIER; PAUWELS, 1993).

É importante lembrar que os autofármacos liberados na vigência da intoxicação com LPS são em essência os mesmos que se relacionam com a hiperreatividade das vias aéreas observada na ARDS. Como exemplos, citam-se os eicosanóides e o TNF (KAYE; SMITH, 1989; SIMPSON; CASEY, 1989).

A hiper-reatividade das vias aéreas e a lesão vascular observada no pulmão de ratos submetidos à administração de LPS são modulados por produtos liberados pelos neutrófilos. De fato, animais “depletados” de neutrófilos circulantes e expostos ao LPS desenvolvem menor lesão endotelial (UCHIBA et al, 1996). Estes dados poderiam sugerir, portanto, que as alterações pulmonares causadas pelo LPS envolvem de alguma forma os mecanismos reguladores do tônus muscular. É razoável admitir, portanto, que o LPS possa comprometer o tônus da musculatura lisa das vias aéreas.

Vários autores demonstraram em modelos experimentais de inflamação pulmonar induzida por LPS que neutrófilos do lavado broncoalveolar de camundongos e ratos produzem PGE₂ e TXA₂. Além disso, a atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente em neutrófilos ativados, está aumentada após a instilação intratraqueal de LPS. Esses neutrófilos e os eicosanóides derivados do metabolismo da COX-2 podem contribuir para o desencadeamento da hiperreatividade das vias aéreas e da inflamação pulmonar, como também para a perpetuação desses eventos. Assim, existem dados indicando que a perfusão de pulmão isolado de ratos com LPS causa indução da atividade da COX-2, com conseqüente liberação de PGE₂ e TXA₂. Dessa liberação, há ativação da musculatura lisa das vias aéreas com conseqüente constrição da traquéia e de bronquíolos terminais (UHLIG et al, 1996).

Experimentos realizados por Ermert et al. (2000) demonstraram nas vias aéreas de ratos que o LPS é capaz de induzir "priming" para a COX-2, conseqüentemente aumentando a síntese de TXA₂ que parece estar envolvida no aumento da resposta constritora do músculo liso das vias aéreas destes animais. O aumento da síntese de prostanóides está envolvido em anormalidades vasculares decorrentes da endotoxemia ou sepse, e as vias aéreas são alvo de tais eventos, principalmente no que diz respeito à ARDS (STEUDEL et al., 1997). Ainda nesse sentido, Steudel et al., (1997) observaram que o LPS é capaz de estimular a síntese de grandes quantidades de TXA₂, que têm importante efeito nos distúrbios vasculares das vias aéreas e nas alterações do tônus broncomotor. Desta forma, é provável que o LPS seja capaz de estimular diretamente a síntese de PGE₂ e TXA₂ via COX-2 nas vias aéreas de ratos.

Em síntese, a hiperreatividade das vias aéreas e a inflamação pulmonar observada durante processos inflamatórios como a asma, também pode ser desencadeada pelo LPS.

Outro aspecto importante que deve ser considerado a partir da intoxicação com LPS, é seu efeito sobre a resposta constritora parassimpática para as vias aéreas. Os nervos do sistema parassimpático estabelecem o controle autonômico contrátil da musculatura lisa desse sistema. A liberação de ACh dos nervos parassimpáticos é controlada pelos autoreceptores muscarínicos M_2 localizados na superfície dos nervos. Esses receptores são pré-juncionais e regulam a liberação de ACh, através de um mecanismo de retro-alimentação negativa. Entretanto, alguns autores acreditam que a despeito de técnicas que possam mensurar as variações funcionais dos receptores muscarínicos que medeiam à contração da musculatura lisa das vias aéreas, é possível que a liberação excessiva de ACh seja um dos mecanismos de desenvolvimento da hiperreatividade (FRYER et al., 1999). De fato, a expressão e o estado funcional dos receptores muscarínicos podem estar alterados durante o processo de inflamação pulmonar (FRYER et al., 1999).

Modelos de hiperreatividade das vias aéreas são mais bem caracterizados pelo aumento da liberação de acetilcolina do nervo vago. Alguns animais (cobaia, cão, camundongo e rato) quando sensibilizados e desafiados com antígeno ou intoxicados com LPS, liberam ACh resultando numa resposta broncoconstritora maior do que a do controle experimental (LARSEN et al, 1994). A liberação de ACh de nervos ativados parece ser modulada por várias substâncias incluindo certos peptídeos e autacóides (BARNES, 1992). Vários estudos mostram que alguns eicosanóides como a TXA_2 , e citocinas como o TNF potencializam os efeitos parassimpáticos constritores sobre a musculatura lisa das vias aéreas, via liberação exacerbada de ACh do nervo vago.

O controle colinérgico é anormal em pacientes com inflamação pulmonar (BARNES, 1986), e a hiperreatividade é em parte mediada pela liberação de ACh sobre os receptores M_3 das vias aéreas. Entretanto, não existem evidências quanto ao

aumento do número desses receptores ou alterações no seu estado funcional (EVANS et al, 1997; SCHULTHEIS; BASSET; FRYER, 1994). Dessa forma, a hiperreatividade parece ser caracterizada muito mais por um aumento da liberação de ACh, do que por um aumento de sensibilidade dos receptores muscarínicos M_3 sobre o músculo liso das vias aéreas. Por fim, a redução da funcionalidade do receptor M_2 , aumenta a concentração de ACh na fenda sináptica, resultando em aumento do tônus e da broncoconstrição, podendo levar a hiperreatividade das vias aéreas (FRYER et al., 1999). Tanto as infecções (LPS) quanto a exposição direta à citocinas inflamatórias, como o TNF podem levar a disfunção do receptor M_2 das vias aéreas de cobaias (JOHNSON, 1998). De fato, parece que existem algumas células inflamatórias (neutrófilos) que secretam eicosanóides, em especial a TXA_2 , e citocinas, como o TNF que podem inibir a função do receptor M_2 contribuindo para o aumento da concentração de ACh.

Ainda sobre o TNF, esta citocina parece estar envolvida em diversos processos inflamatórios que acometem as vias aéreas e o pulmão. Quando administrado por via intravenosa, o TNF é capaz de causar alterações metabólicas importantes no que diz respeito ao metabolismo da glicose, hipertemia, além de efeito pirogênico (DINARELLO et al., 1984; KETTELHUT; FIERS; GOLDBERG, 1987). Vários autores mostram que tanto na asma quanto na intoxicação com LPS, o TNF é capaz de modular a reatividade da musculatura lisa das vias aéreas e alterar o número de células inflamatórias que migram para o pulmão (REYNOLDS; HOLMES; SCCCHITANO, 2000; VLAHOS; STEWART, 1999; WAGNER, 2000). Além disso, estudos reportam que células de endotélio vascular de artéria de coelho quando expostas ao TNF apresentam desorganização de seu cito-esqueleto com conseqüente formação de edema e lesão vascular que contribui para a hiperreatividade tardia das

vias aéreas (ONARAN; COSTA; RODBARD, 1993, TASAKA et al., 2005).

1.5 Hiporresponsividade das vias aéreas ao estímulo β -Adrenérgico

O receptor β -adrenérgico é integrante da família dos receptores transmembrana, codificado pelo cromossomo cinco (5). O receptor β -adrenérgico tem sido classificado nos subgrupos β 1, β 2 e β 3, sendo o subtipo β -2 amplamente distribuído no trato respiratório, particularmente na musculatura lisa das vias aéreas. O receptor β -adrenérgico desencadeia uma sinalização intracelular que depende da proteína G acoplada a enzima adenilato ciclase (AC). A ativação da AC induz relaxamento do músculo liso das vias aéreas através da fosforilação de proteínas do músculo liso e da redução da disponibilidade de concentrações intracelulares de cálcio. Outros mecanismos que não são dependentes de AC também são capazes de induzir relaxamento do músculo liso das vias aéreas. É o caso dos canais de potássio, que quando ativados por receptor ou por diferenças no próprio potencial de ação da membrana do músculo liso, causam relaxamento das vias aéreas (JOHNSON, 1998).

Desde a década de 60, que se conhece que a ativação de receptores β -adrenérgicos aumenta o nível intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Existem evidências mostrando que o receptor β -adrenérgico pode apresentar dois (2) estados distintos: ativado e inativado, e que em condições de homeostasia essas duas isoformas estão em equilíbrio, mas com o predomínio do estado inativado (ONARAN; COSTA; RODBARD, 1993). Como já mencionado, o receptor β -adrenérgico ativa a AC, através da proteína G que é constituída de três (3) subunidades: α , β e γ . O receptor encontra-se ativado quando está associado à subunidade α da proteína G junto com a molécula de trifosfato de guanosina (GTP), e é

através desta molécula localizada na subunidade α que o receptor está acoplado a AC. A partir dessa observação, alguns autores acreditam que a ativação do receptor β -adrenérgico não depende de uma mudança de conformação do receptor, mas sim de um estado de energia (JOHNSON. 1998; ONARAN; COSTA; RODBARD, 1993). No momento em que o receptor se dissocia da subunidade α da proteína G, ele apresenta uma baixa energia, e assim retorna ao seu estado inativado.

O mecanismo pelo qual o AMPc induz relaxamento das células da musculatura lisa das vias aéreas ainda não está totalmente elucidado, mas existem algumas evidências de que a ativação de proteínas quinases esteja envolvida no controle do tônus muscular liso. O aumento do AMPc também resulta em inibição da liberação de íons cálcio de estoques intracelulares, redução do potencial elétrico de membrana para o cálcio e seqüestro dos íons cálcio, resultando dessa forma em relaxamento das vias aéreas (JOHNSON; COLEMAN, 1995). Entretanto, Cook et al. (1993) tem mostrado que existem respostas de relaxamento das vias aéreas induzidas por agonistas β -adrenérgicos que são mediadas por mecanismos independentes de AMPc, envolvendo interação direta de canais de potássio com a subunidade da proteína G. De fato a membrana das células da musculatura lisa das vias aéreas apresentam canais iônicos de potássio.

A literatura reporta evidências de que várias citocinas, incluindo o mediador inflamatório TNF tem importante função na orquestração e perpetuação da resposta inflamatória das vias aéreas em condições tais como asma e intoxicação por LPS (BRADDING et al., 1994; GUO et al., 2005; HAMBLIN, 1991). Neste aspecto, vários estudos têm mostrado aumento da concentração de diversas citocinas no lavado broncoalveolar de indivíduos asmáticos (BROIDE et al., 1992; HAMID et al., 1991;

RUSSO; POLOSA, 2005). O aumento da expressão de citocinas tem sido identificado em diferentes sítios das vias aéreas de indivíduos asmáticos (BENTLEY et al., 1993; KELLEY, 1990). Estes mesmos autores confirmaram em biópsias realizadas em brônquios de indivíduos asmáticos, aumento da expressão de RNAm para diversas citocinas. Além disso, durante a inflamação pulmonar, células de epitélio brônquico sintetizam e liberam fatores que estimulam colônias de macrófagos (GM-CSF). Coletivamente, esses agentes desempenham ações diversas, incluindo indução da produção de IgE a partir de células mononucleares (DEL PRETE et al., 1988; TANG et al., 2003), apresentação de antígenos a macrófagos, ativação de células de função estrutural das vias aéreas (FAHY, 2001; FRANCO-PENTEADO et al., 2005; MANTOVANI; BUSSOLINO; DEJANA, 1992), aumento da expressão de moléculas de adesão (ANDO et al., 2001; MASINOVSKY et al., 1990; THORNHILL et al., 1991), indução da secreção de fatores do crescimento (THORNHILL et al., 1991) e recrutamento de células inflamatórias da circulação (MARATHE et al., 2002; SCHLEIMER et al. 1992).

A partir dessas evidências dos efeitos das citocinas, existem também relatos de que citocinas específicas, mais notavelmente o TNF, tem importante função na regulação das variações de contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas caracterizada por fenótipos asmáticos. Neste mesmo contexto, a administração exógena de TNF causa hiperreatividade das vias aéreas em modelo experimental de inflamação pulmonar (KIPS; TAVERNIER; PAUWELS, 1992; MARTIN; WOHLSEN; UHLIG, 2001; WHEELER et al., 1991). Nesse mesmo sentido, segmentos de vias aéreas de ratos após exposição ao TNF apresentaram redução da capacidade de relaxamento das vias aéreas quando estimulados com o agonista β -adrenérgico isoproterenol (CHEN et al., 2003). Bradding et al. (1994) e Lotvall; Inman e O'byrne

(1998), mostraram em modelo experimental de animais sensibilizados com antígeno que antagonistas do receptor do TNF restauram a hiperreatividade brônquica frente à histamina ou substância P (PIEDIMONTE, 2003). Estudo *post-mortem* em indivíduos asmáticos revelou sinais de inflamação e redução do relaxamento das vias aéreas mediado por agonista β -adrenérgico, independente do número de receptores (BAI; MAK; BARNES, 1992).

As variações observadas no mecanismo de transdução de sinal da musculatura lisa das vias aéreas após a exposição ao TNF parecem similares àquelas observadas em pacientes com asma severa (BAI; MAK; BARNES, 1992). A asma é caracterizada pela inflamação das vias aéreas associada ao aumento da reatividade broncoconstritora frente aos agonistas contráteis e perda da capacidade de relaxamento da musculatura lisa frente ao agonista β -adrenérgico (SPINA et al., 1989).

Embora os receptores β -adrenérgicos sejam conhecidos pelo seu efeito sobre o tônus do músculo liso das vias aéreas, este tipo de receptor também pode ser expresso em outros tipos celulares nas vias aéreas, incluindo células inflamatórias e células responsáveis pela resposta inflamatória na asma. A exsudação de plasma das vênulas pós-capilares é importante evento da inflamação. Os receptores β -adrenérgicos estão presentes nas células endoteliais, e agonistas desses receptores inibem a exsudação plasmática (BALUK; MCDONALD, 1994). Desta forma, os agonistas β -adrenérgicos podem exercer efeitos antiinflamatórios e anti-edematogênicos nas vias aéreas. Além disso, agonistas β -adrenérgicos de longa duração como formoterol são capazes de reduzir a adesão de neutrófilos e eosinófilos no endotélio das vênulas, inibindo desta forma o tráfico de granulócitos para o interior da parede pulmonar (BOWDEN; SULAKVELIDZE; MCDONALD, 1994).

Os mastócitos também expressam receptores β -adrenérgicos que são capazes de inibir a liberação de histamina de pulmão de indivíduos asmáticos. Tanto os agonistas de curta ou longa duração tem efeito *in vitro*, e inibem a liberação de histamina e leucotrienos (BUTCHERS et al., 1980; CHURCH; HIROI, 1987; DRURY et al., 1998; PETERS et al., 1982). Parece que esse efeito também é mediado pelo aumento sustentado de AMPc. Os eosinófilos, células inflamatórias de grande importância nos processos inflamatórios alérgicos, expressam os receptores β -adrenérgicos, e a ativação desses receptores atenua o estresse oxidativo e reduz a liberação de leucotrienos e TXA_2 (HADJOKAS et al., 1995; MUNOZ et al., 1994; YUKAWA et al., 1990).

Os neutrófilos expressam receptores β -adrenérgicos e parece que a estimulação resulta em aumento intracelular da concentração de AMPc (GALANT; ALLRED S.; GRIFFITHS, 1980). Nos neutrófilos a ativação dos agonistas β -adrenérgicos diminui a adesão dessas células no endotélio vascular pulmonar de humanos através da redução da expressão da molécula de adesão Mac-1 (BLOEMEN et al., 1997). Além de secretar diversas citocinas, tais como TNF e IL-6 durante as afecções pulmonares (FOLKERTS; NIJKAMP, 1998), as células epiteliais das vias aéreas quando estimuladas com agonista β -adrenérgico aumentam o batimento dos cílios das vias aéreas (DEVALIA et al., 1992; SANDERSON; DIRKSEN, 1989), porém outras funções do sistema respiratório não são afetadas. Dessa forma é razoável admitir que a inflamação das vias aéreas e pulmonares induzida pela exposição ao TNF e que acomete o sistema de sinalização do receptor β -adrenérgico pode contribuir para a hiporresponsividade das vias aéreas e para a perpetuação deste tipo de resposta inflamatória.

Por fim, os dados referidos acima parecem de fato evidenciar o TNF como

importante mediador da resposta inflamatória das vias aéreas de pacientes asmáticos, visto que esta citocina é produzida localmente no pulmão e está em estreito contato com as células de músculo liso das vias aéreas.

1.6 Reação por imuno-complexo

A inflamação pulmonar aguda é uma característica importante encontrada em diversas patologias que acometem as vias aéreas e o pulmão, incluindo a SARA. Muitos trabalhos têm mostrado a maneira pela qual as vias aéreas e o pulmão podem ser acometidos por diferentes reações inflamatórias tais como infecção ou trauma. A inflamação pulmonar tem o seu início com o recrutamento de neutrófilos para o interior dos alvéolos e das vias aéreas de menor calibre, resultando em lesão de parênquima e disfunção pulmonar. Além disso, tem-se discutido os mecanismos endógenos no qual o pulmão é capaz de regular a resposta inflamatória em ratos desencadeada pela deposição de complexos imunológicos relacionados a imunoglobulinas (IgG). A deposição de complexos imunológicos no pulmão de ratos induz uma reação inflamatória que é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, ativação de macrófagos alveolares e lesão hemorrágica. Vários mediadores têm sido mostrados participando de lesões induzidas por complexo imunológico, não somente no pulmão, como também em outros órgãos.

A deposição intrapulmonar de complexo imune de IgG causa intensa ativação de macrófagos alveolares e ativação local do sistema complemento no interior das vias aéreas. A ativação de macrófagos alveolares é caracterizada pelo aumento da translocação nuclear e transcrição do fator NF- κ B ligado ao DNA, e subsequente

produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-1 β . Neste modelo de inflamação pulmonar aparecem duas vias de ativação do fator NF-kB: a resposta inicial envolve macrófagos e mais tardiamente outras células, incluindo células de epitélio e endotélio pulmonar. O fator NF-kB é um fator de transcrição que controla a expressão gênica de uma vasta diversidade de mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF, e várias moléculas de adesão. A ativação do fator NF-kB em macrófagos pulmonares por reação de complexo imune induz geração local de C5a, o que resulta em síntese e liberação de IL-1 e TNF.

Os mecanismos de injúria pulmonar induzida por complexo imunológico têm sido extensivamente estudados, e atualmente sabe-se a importância do recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, da ativação de macrófagos alveolares e do envolvimento de citocinas para o desenvolvimento e perpetuação desta condição. Alguns eventos celulares similares têm sido observados quando se compara a injúria de pele com a lesão hemorrágica pulmonar. Apesar de ocorrerem em tecidos completamente distintos (pele e pulmão), parece que os processos inflamatórios induzidos por resposta imunológica apresentam reações iniciais muito semelhantes. Esse fenômeno pode ser confirmado, visto que a resposta inflamatória pulmonar tem seu início com a ligação de complexos imunes aos receptores Fc de macrófagos, o que acarreta no desencadeamento da resposta inicial da inflamação com a geração de citocinas, com destaque para o TNF, IL-1 β e IL-6. Essas citocinas liberadas no início da reação inflamatória são capazes de persistir com a inflamação. Subsequentemente a produção dessas citocinas, ocorre a expressão de moléculas no endotélio vascular pulmonar, e a partir daí neutrófilos são recrutados para o sítio da inflamação. Dessa forma, as células inflamatórias e os mediadores inflamatórios por elas liberados desencadeiam a lesão pulmonar, aumentando a permeabilidade

vascular e possibilitando a lesão hemorrágica.

A principal fonte de citocinas pró-inflamatórias são os macrófagos alveolares. Diversos autores já mostraram que os macrófagos são células capazes de sintetizar e secretar diferentes fatores do complemento. Assim, a clivagem de um fator do complemento por uma protease derivada de células fagocitárias, indica que este composto, capaz de induzir quimiotaxia, pode ser gerado por macrófagos através de enzimas do complemento ou por enzimas derivadas de células inflamatórias ou de células do próprio tecido pulmonar.

A aderência de neutrófilos ao endotélio vascular pulmonar não é um processo aleatório, mas sim diretamente relacionada à interação de moléculas de adesão com seus receptores localizados sobre neutrófilos. As moléculas de adesão incluem selectinas e integrinas, que fazem parte de uma grande família de moléculas de adesão intercelular denominada ICAMS e moléculas de adesão ao endotélio vascular, conhecidas como VCAM-1. As interações de adesividade entre os neutrófilos e as células endoteliais incluem interações com as selectinas as quais são ligadas a carboidratos. As interações de ICAM-1 são com as β_2 integrinas CD11/CD18. Já as moléculas de adesão do tipo VCAM interagem com as α_4 integrinas. A P-selectina e a E-selectina são expressas sobre as células endoteliais, enquanto a L-selectina é expressa sobre os leucócitos. As selectinas sobre o endotélio vascular pulmonar iniciam a migração de neutrófilos através da ligação de sua estrutura glicoprotéica sobre os neutrófilos, resultando em intensa marginalização de neutrófilos para a parede do endotélio vascular pulmonar, causando o processo de rolagem (“rolling”) sobre a monocamada endotelial seguido de uma adesão estacionária que é mediada por essas moléculas de adesão.

O papel das selectinas em mediar a migração de neutrófilos para o pulmão é confirmado por estudos realizados por Shanley; Wamer e Ward (1995) e Bless et al. (1998), que utilizando anticorpos que neutralizavam as proteínas selectina e animais geneticamente modificados que apresentavam deficiência de selectinas, observaram redução da lesão hemorrágica em modelo de injúria pulmonar induzida por complexo imune. O bloqueio tanto de L-, P - ou E-selectina resulta em redução da permeabilidade vascular em 36, 43 e 48 % respectivamente; no que diz respeito ao bloqueio dessas selectinas sobre o recrutamento de neutrófilos, houve redução em 47, 74 e 54 % respectivamente (Bless et al, 1998). O aumento da expressão de ICAM em tecido pulmonar também apresenta papel importante no recrutamento de neutrófilos e desenvolvimento de lesão pulmonar. Mulligan; Miyasaka e Ward (1996) e Lentsch et al. (1999) demonstraram, em modelo de deposição de complexo imune intrapulmonar, aumento significativo da expressão de ICAM no endotélio pulmonar. Além disso, esses mesmos autores observaram que o bloqueio de ICAM com anticorpos resultou em 49 % de redução da permeabilidade vascular e 40 % de redução da enzima MPO. Como já mencionado, a atividade da MPO serve como indicador da presença de neutrófilos ativados no interior do pulmão.

O TNF é um importante mediador celular no desenvolvimento da inflamação pulmonar em modelo de alveolite (inflamação dos alvéolos) desencadeada por IgG Mulligan e Ward (1992). Esses autores demonstraram através de interferência farmacológica, que o bloqueio de fatores do complemento e de TNF atenua a injúria pulmonar em ratos induzida por reação imunológica. Bozic et al. (1996), estudando camundongos geneticamente modificados que apresentavam deficiência de C5a, um importante fator do complemento, observaram que esses animais eram resistentes a inflamação pulmonar induzida por IgG. Neste mesmo modelo experimental,

camundongos apresentaram concentrações reduzidas de TNF. Este resultado mostra a estreita relação entre a resposta imunológica e a participação do TNF na injúria pulmonar, caracterizada principalmente por lesão hemorrágica (HÖPKEN et al. 1997). De fato tem sido mostrado que durante a fase inicial da injúria pulmonar, a presença de TNF é determinante para o aumento da expressão de moléculas de adesão, que dessa forma facilitariam a infiltração de células inflamatórias.

Ainda no que diz respeito às moléculas de adesão, Shanley; Wamer e Ward (1995) observaram que após a reação imunológica por complemento em pulmão de rato, as citocinas TNF e IL-6, além de proteína inflamatória de macrófago (MIP) induziram lesão pulmonar através da ativação e recrutamento de neutrófilos, que são fundamentais no aumento da permeabilidade vascular. Embora a atividade de quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos tenha sido demonstrada através da MIP, parece que através de ação autócrina, esta proteína pode causar aumento da produção de TNF a partir de macrófagos contribuindo para a injúria pulmonar e lesão hemorrágica. O bloqueio do receptor de TNF *in vivo* minimiza a injúria pulmonar em ratos através da redução da permeabilidade vascular e do recrutamento de neutrófilos, presumivelmente relacionada à diminuição dos níveis de TNF no lavado broncoalveolar desses animais.

Por fim, parece que a injúria pulmonar induzida por reação imunológica por complexo é regulada por fatores referentes à migração de neutrófilos e ativação de macrófagos pulmonares, e que essas células no sítio inflamatório pulmonar são capazes de secretar TNF, que contribui de forma importante para o aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente para a lesão hemorrágica.

1.7 Hiper-sensibilidade brônquica ao cálcio após estimulação com TNF

A exacerbação do estreitamento das vias aéreas em resposta a um estímulo não-específico é um fator característico de algumas afecções pulmonares incluindo a asma brônquica. Esta anormalidade é um importante sintoma da doença, embora as variações fisiopatológicas que levam a essa hiperreatividade ainda permanecem não elucidadas. Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a hiperreatividade das vias aéreas, tais como alterações no controle neural dessa musculatura e aumento da secreção de muco (MARTIN; DUGUET; EIDELMAN, 2000) e fatores relacionados ao remodelamento das vias aéreas (WIGGS et al., 1990). Além disso, tem sido proposto que um dos fatores que contribuem para a exacerbação da resposta contrátil em indivíduos asmáticos é uma anormalidade do músculo liso das vias aéreas (SEOW; SCHELLENBERG; PARE 1998). O alívio da limitação das vias aéreas de pacientes asmáticos através da inalação de agonistas β -adrenérgicos também sugere o envolvimento do aumento da contração da musculatura lisa desses tecidos na obstrução das vias aéreas. Dessa forma, é de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias anti-asma, compreender as alterações na sinalização contrátil das células de músculo liso das vias aéreas.

Tipicamente, a contração da musculatura lisa é mediada principalmente pelo aumento da concentração de cálcio livre no citosol via ativação de canais de cálcio na membrana da célula muscular lisa ou via liberação de cálcio dos estoques no interior do retículo sarcoplasmático. O músculo liso das vias aéreas é predominantemente inervado por nervos eferentes vagais os quais liberam ACh na fenda sináptica quando estimulados e subsequentemente ativam os receptores muscarínicos pós-sinápticos. Atualmente existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5) clonados (HULME; BIRDSALL; BUCKLEY, 1990), e três deles são funcionalmente caracterizados nas vias aéreas; os receptores M1 são mediadores da bronco-

constricção estimulados pelos gânglios parassimpáticos (BECK et al., 1987), os receptores M2 são auto-receptores localizados sobre as terminações nervosas parassimpáticas e inibem a liberação de ACh mediada pelo nervo vago (FRYER; MACLAGAN, 1984), por fim, os receptores M3 estão localizados sobre as células do músculo liso das vias aéreas e são mediadores da contração através da ativação do metabolismo do fosfato de inositol (ROFFEL et al., 1990). O receptor M3 tem sido considerado o principal subtipo dentre os receptores muscarínicos que contribuem para a contração do músculo liso das vias aéreas (BECK et al., 1987).

Ao se ligar ao receptor muscarínico no músculo liso das vias aéreas, a ACh altera a conformação desse receptor. Essa alteração na conformação do receptor colinérgico ativa a proteína G que está acoplada a alça transmembrana do receptor (BECK et al., 1987). A ativação da proteína G determina a fosforilação da enzima fosfolipase C (LINDER; GILMAN, 1992). A fosfolipase C fosforilada dá origem a dois importantes segundo-mensageiros: o diacilglicerol e o inositol trifosfato. O diacilglicerol promove fosforilação de outras quinases e o inositol trifosfato é o responsável pela mobilização do cálcio do retículo sarcoplasmático dessas células para o citoplasma. O inositol trifosfato induz a mobilização de cálcio através da ligação ao seu receptor específico localizado no retículo sarcoplasmático (BECK et al., 1987). O cálcio, agora livre no citoplasma, inicia o processo de contração da musculatura lisa das vias aéreas.

Quando livre no citoplasma, o cálcio se liga a calmodulina e ativa a quinase da cadeia leve de miosina, fosforilando a proteína regulatória da cadeia leve de miosina, e com isso permitindo o deslizamento entre miosina e actina e a formação de pontes cruzadas. A formação de pontes cruzadas entre actina e miosina garante a geração de força contrátil das células do músculo liso das vias aéreas. O término da contração

ocorre quando a fosfatase da cadeia leve de miosina defosforila a proteína regulatória da cadeia leve de miosina, dessa forma cessa o ciclo de pontes cruzadas e a musculatura lisa das vias aéreas relaxa (AMRANI; PANETTIERI, 1998). É importante considerar que a amplitude da contração do músculo liso das vias aéreas depende do tipo de agonista contrátil, do grau de estimulação, e do tipo de tecido (brônquio ou traquéia). Resultados experimentais sugerem que a sinalização celular de cálcio é um fator integrador do estímulo extracelular que modula a reatividade da musculatura lisa das vias aéreas (CHIBA; MISAWA, 2004).

Além da fosforilação da cadeia leve de miosina dependente de cálcio, a fosforilação dessa proteína também é regulada pela fosfatase da cadeia leve de miosina independentemente de cálcio. Dessa forma, esse mecanismo é capaz de causar mais contração, essa resposta celular sinérgica independente de cálcio caracteriza o aumento de sensibilidade frente ao cálcio (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A contração de segmentos de músculo liso sensibilizados ao cálcio induzida por agonistas têm sido mostrada através de resultados obtidos com técnicas de avaliação da força de contração desses segmentos e da concentração do cálcio intracelular (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Neste mesmo sentido, Fujita et al (1995) demonstraram a mobilização de cálcio em preparações permeabilizadas quimicamente em vários tipos de músculo liso, incluindo a musculatura lisa das vias aéreas. Vários autores reportam que a estimulação com agonista contrátil aumenta a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio em preparações de músculo liso de artéria coronária de rato (SATO et al., 1994), de *vas deferens* de cobaia (FUJITA et al., 1995), de segmentos de traquéia de cão e de brônquios de ratos (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Dentro desse contexto, a musculatura lisa das vias aéreas torna-se alvo de estudo, devido à capacidade de modular a atividade do tônus broncomotor induzido

por agonistas contráteis. Entretanto, evidências sugerem que anormalidades nas funções das vias aéreas, induzidas por estímulo extracelular, podem desempenhar função importante no desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas. Estudos experimentais com segmentos de brônquio isolado de ratos ou cultura de células de brônquio mostram que os mediadores químicos inflamatórios e citocinas podem alterar a homeostasia do cálcio no músculo liso das vias aéreas e contribuir para o desenvolvimento de hiperreatividade desses tecidos frente à agonistas contráteis.

Vários autores têm demonstrado que em processos inflamatórios como a SARA, mediadores químicos sintetizados pelas células inflamatórias ativadas são capazes de alterar a resposta contrátil de segmentos de músculo liso das vias aéreas, e alguns autores sugerem que essa hiperreatividade se deve ao aumento da sensibilidade desses tecidos frente ao cálcio (HSU; CHIU; WANG, 2001; YANG et al., 2001). Mediadores químicos do processo inflamatório, tais como, prostanoídes, interleucinas, óxido nítrico, PAF e citocinas como o TNF são capazes de alterar a sensibilidade de segmentos de vias aéreas ao cálcio. Por ser uma citocina pró-inflamatória presente em processos alérgicos e não alérgicos, há muito que o TNF tem destaque em várias afecções, e parece que não é diferente com as afecções pulmonares.

O TNF é uma citocina produzida por vários tipos celulares nas vias aéreas, tais como células epiteliais (KWON et al., 1994), macrófagos (GOSSET et al., 1991), mastócitos (GORDON; GALLI, 1990, BRADDING et al., 1994) eosinófilos (COSTA et al., 1993, FINOTTO et al., 1994) e está diretamente ligada a inflamação e hiperreatividade das vias aéreas observada na asma (SHAH et al., 1995).

A fisiopatologia da asma brônquica é regulada pela liberação de citocinas a partir de células inflamatórias (BROIDE et al., 1992). O pré-tratamento *in vivo* através

de inalação em diferentes espécies, incluindo humanos, causou aumento da resistência brônquica após estimulação com agonistas endógenos (KIPS; TAVERNIER; PAUWELS, 1992; THOMAS; YATES; BARNES, 1995).

Vários autores têm reportado que o TNF é capaz de produzir hiperreatividade de segmentos de músculo liso de vias aéreas, como traquéia e brônquio, através do aumento da sensibilização ao cálcio quando estimulados com agonistas colinérgicos (IIUZUKA et al., 1999; ITO et al., 2001; SAKAI et al., 2004). Evidências mostram que tecidos de vias aéreas quando incubados com TNF e estimulados com agonistas contráteis acoplados a proteína G, apresentam aumento da sensibilidade ao íon cálcio (HUNTER et al., 2003; CHIBA; MISAWA, 2004). Alguns autores acreditam que o TNF aumenta a reatividade de segmentos de brônquio através da hiper-sensibilidade desses tecidos ao cálcio, em particular quando estimulados com agonistas colinérgicos tais como ACh ou carbacol (AMRANI; AUBIER; BRONNER, 1996; AMRANI; MARTINET; BRONNER, 1995; BOUSQUET et al., 2000; BROIDE et al., 1992).

Considerando os dados descritos acima, é razoável sugerir que o TNF é capaz de alterar a reatividade da musculatura lisa das vias aéreas depois de estimuladas com agonistas contráteis colinérgicos. Além disso, resultados experimentais sustentam a hipótese de que a hiperreatividade das vias aéreas induzida pelo TNF pode ser resultado de alterações no metabolismo do cálcio no interior dessas células, aumentando a fosforilação dos miofilamentos de miosina e conseqüentemente contribuindo para o aumento da sensibilidade de segmentos das vias aéreas de ratos ao cálcio. Por fim, embora seja conhecido o mecanismo de ação dos agonistas contráteis colinérgicos, ainda não está completamente elucidado de que forma o TNF altera a resposta contrátil e o metabolismo de cálcio de segmentos de músculo liso

das vias aéreas.

1.8 Disfunção contrátil do músculo diafragma

A respiração depende da bomba ventilatória que é um exercício muscular contínuo realizado através dos músculos respiratórios que se contraem para gerar um gradiente de pressão neste sistema vencendo assim, as forças de resistência que se opõem à inspiração. O diafragma é o principal músculo respiratório sendo ele responsável por 60% da inspiração e representa 70% da atividade muscular respiratória de um indivíduo atuando ininterruptamente. A inervação motora para o músculo diafragma é feita através das terminações nervosas que fazem sinapse com a membrana da musculatura. Esse tipo de junção neuromuscular tem como principal neurotransmissor a ACh. O acoplamento da ACh ao receptor nicotínico desencadeia a despolarização da membrana da célula muscular esquelética que culmina no início do processo de contração muscular. As terminações nervosas motoras do diafragma também respondem com contração muscular a estimulação elétrica (SANTAFE et al., 2000, SANTAFE et al., 2001, SANTAFE et al., 2002).

Existe um grande interesse sobre os efeitos da estimulação elétrica sobre o músculo diafragma no que se refere à disfunção contrátil deste músculo. A estimulação elétrica vem desde o século passado, e existem relatos de que estímulos elétricos aplicados na superfície da base do pescoço produziam contrações do diafragma. Atualmente, a estimulação elétrica do diafragma vem sendo utilizada em disfunções da capacidade contrátil que pode estar alteradas, decorrentes de patologias que levam ao comprometimento da função respiratória do diafragma.

O LPS também altera a mecânica pulmonar. Assim, durante a sua intoxicação,

observam-se aumentos do gradiente de oxigênio alveolar/arterial e da ventilação do espaço morto alveolar. A mecânica pulmonar também sofre alteração causada pelo LPS e coincide com o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, a qual é caracterizada por aumento da resistência ao fluxo de ar através do pulmão e redução da complacência vascular (TAILLE et al., 2001). A disfunção contrátil do diafragma frequentemente acomete pacientes em unidade de terapia intensiva (UTI) que apresentam inflamação sistêmica. A fase tardia da inflamação sistêmica induzida por LPS causa perda progressiva da massa muscular do diafragma a qual corresponde com a redução da capacidade contrátil deste músculo. Estudos relatam que a perda da função do diafragma pode ser observada em modelos de inflamação experimental, como por exemplo, peritonite séptica (FUJIMURA et al., 2000), administração de endotoxina (TAILLE et al., 2001) ou injeção intravenosa de LPS (COMTOIS et al., 2001). A fraqueza muscular do diafragma é mais grave em indivíduos que apresentam insuficiência ventilatória e sedentarismo.

A disfunção do diafragma é frequentemente relacionada com a perda de massa muscular desde que o desgaste muscular e a caquexia são complicações características da inflamação crônica (KOTLER, 2000). Este tipo de disfunção contrátil pode ser mediado por alterações hormonais, desequilíbrio nutricional, sedentarismo e através do metabolismo de citocinas (FAHAL et al., 1997). A capacidade de mediadores inflamatórios em reduzir a força contrátil do músculo diafragma foi primeiramente reportada por Wilcox; Osborne e Bressler. (1992). Esses autores observaram redução da resposta contrátil do músculo diafragma de camundongos frente ao estímulo elétrico quando incubados com monócitos ativados. Subseqüentes estudos identificaram o TNF como principal mediador dessa resposta. Dentre os mediadores inflamatórios que podem causar alteração da força contrátil do diafragma,

o NO e o PAF desempenham função importante no processo de disfunção contrátil do diafragma induzida por TNF. Alloatti et al. (2000) observaram que o NO e o PAF agem como mediadores dos efeitos do TNF sobre a contratilidade da musculatura esquelética.

De fato, a administração sistêmica de TNF causa rápida redução da força de contração do músculo diafragma *in vivo* (WILCOX et al., 1994). Em modelo experimental com miócitos cardíacos de camundongos, a expressão exacerbada de TNF promove aumento do TNF circulante, e assim causa perda de massa muscular comprometendo estruturas do diafragma e contribuindo para a disfunção contrátil desse músculo (LI et al., 2000). Resultados similares têm sido obtidos quando segmentos de músculo de diafragma isolado de ratos são expostos ao TNF recombinante (ALLOATTI et al., 2000; LI et al., 2000).

Em modelo experimental com cães, Wilcox et al. (1994) mostraram que a infusão intravenosa de TNF reduziu a força de contração do diafragma e que este efeito pode ter sido mediado por alterações do potencial de ação da membrana desse músculo. Outros autores acreditam que o TNF pode reduzir o influxo de cálcio nas células musculares do diafragma, e desta forma contribuir para a disfunção contrátil do diafragma (REID; LÄNNERGRÉN; WETERBLAD, 2002; YOKOHAMA et al., 1993). De fato, Yokohama et al. (1993), investigando o efeito do TNF sobre a força de contração de músculo esquelético e cardíaco, mostrou que a exposição direta ao TNF induz efeito inotrópico negativo causado pela redução dos níveis de concentração de cálcio durante a contração sistólica. Wilcox; Miliiken e Bressler (1996) demonstraram que a administração intravenosa de TNF reduz o potencial de ação da membrana de músculo diafragma de ratos. Esses resultados sugerem que o TNF pode deprimir a liberação de cálcio que é dependente de voltagem.

Outro importante aspecto a ser considerado é o efeito do TNF sobre a transmissão neural para o músculo diafragma. Goluszko et al. (2002) investigaram o efeito do TNF sobre a miastenia grave experimental, um modelo caracterizado pelo comprometimento da transmissão neuromuscular de origem auto-imune. Esses autores observaram que camundongos geneticamente modificados que apresentavam deficiência de receptores para o TNF, eram protegidos contra a miastenia grave. Esses mesmos autores, avaliando pacientes com miastenia grave concluíram que a gravidade da doença esta relacionada à produção espontânea de grandes quantidades de TNF a partir de células mononucleares do sangue.

Os fatores relacionados ao metabolismo energético da musculatura esquelética do diafragma podem interferir na função contrátil deste músculo, desde que a taxa de síntese de glicogênio estimulada pela insulina tem uma importante função na geração de força muscular. Brealey et al. (2002) investigaram em modelo *in vitro* de cultura de células de músculo esquelético de diafragma humano o efeito do TNF sobre a diferenciação de fibras musculares e sobre o metabolismo modulado pela insulina. Esses autores observaram que o TNF compromete a diferenciação de células musculares em cultura e reduz o efeito da insulina sobre a taxa de síntese de glicogênio.

Considerando os dados apresentados acima, parece que o TNF desencadeia um importante efeito pró-inflamatório sobre as células da musculatura esquelética do diafragma. A partir do desencadeamento do processo inflamatório, outros mediadores são capazes de perpetuar a inflamação e conseqüentemente contribuir para o agravamento da disfunção contrátil. Portanto, estudos que permitem uma maior compreensão dos efeitos deletérios da intoxicação com LPS ou TNF sobre a capacidade contrátil do diafragma se fazem pertinentes. A compreensão do

mecanismo da disfunção contrátil do diafragma permite o uso de terapias mais adequadas.

Como já mencionado, a injeção intravenosa de LPS em modelos experimentais com ratos mimetiza as anormalidades da síndrome séptica observada em humanos. Alguns autores têm mostrado que a intoxicação com LPS pode causar disfunção de mitocôndrias, e que esse evento pode acarretar anormalidades bioquímicas que são características da síndrome séptica (BREALEY et al., 2002). Por exemplo, Crouser; Julian e Dorinsky (1999) mostraram que as alterações no consumo de oxigênio tecidual durante o desenvolvimento do choque séptico esta relacionado às evidências histológicas de lesão mitocondrial, mas não interfere na disponibilidade de oxigênio para os tecidos. Essas observações revelam que as alterações da mitocôndria podem ser as principais causas de anormalidades durante a extração e consumo de oxigênio, produção de ácido láctico, e disfunção de órgão durante a síndrome séptica. A produção de ácido láctico sem a disponibilidade suficiente de oxigênio, causa fadiga muscular do diafragma, que cronicamente pode causar perda de massa muscular e disfunção contrátil.

Por fim, embora se tenha conhecimento sobre as afecções pulmonares ou sistêmicas que comprometem a função contrátil do diafragma, muito pouco tem sido estabelecido sobre qual o fator que seria o responsável pelo desencadeamento e perpetuação da disfunção contrátil. Dessa forma, além de citocinas como o TNF, fatores que dizem respeito a alterações da função de mitocôndrias também podem agravar a capacidade de contração dessa musculatura.

1.9. Laser de Baixa Potência (LBP)

O termo LASER é um acrônimo da versão em inglês de “amplificação da luz

pela emissão estimulada da radiação”, e designa atualmente uma vasta série de dispositivos com emissão de radiação eletromagnética em diversas faixas do espectro eletromagnético, indo de raios X até a microonda. As características que diferem a luz laser e a luz de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação, e coerência.

Baseado no conceito de energia quântica de Max Planck, Albert Einstein publicou em 1917 o artigo “Zur Quantum Theori der Strahlung”, onde ele destaca o princípio da emissão estimulada de fótons. Entretanto, o primeiro laser no qual o espectro se encontrava na faixa de luz visível foi construído em 1960 por Theodore Maiman. A partir disso, Maiman criou um campo fértil para estudos posteriores que culminaram em 1961 com a fabricação dos lasers de Hélio-Neônio (He-Ne), Neodímio-Yttrium Aluminum Garnet (Nd:YAG), o laser de Argônio (Ar) em 1962, e em 1964 o laser de dióxido de carbono e os semicondutores como o Arseneto de Gálio (GaAs).

Nas ciências da saúde a utilização do laser ocorre devido aos fenômenos: reflexão, transmissão, absorção e espalhamento em um sistema biológico. Esses fenômenos possuem características distintas, e dependem dos comprimentos de onda do laser e de sua interação com os tecidos biológicos. O precursor de estudos com laser na Medicina foi Mester (1966), que publicou resultados dos efeitos não-térmicos do laser e também foi primeiro a utilizar o termo “bioestimulação”, descrevendo 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.

Os lasers são classificados em dois grandes grupos: alta potência e baixa potência. São utilizados diversos termos para designar os lasers de baixa potência, como por exemplo: “soft”, frio, baixa energia, “mid”, biológico, terapêutico, não-

cirúrgico. Mas o que deve definir a nomenclatura são os mecanismos de interação (fototérmico ou fotoquímico) do laser com os tecidos, o que tornam alguns destes termos inadequados, pois se referem à saída de potência do equipamento utilizado. O termo “low (reactive) level laser therapy”, ou simplesmente LLLT, é o mais comumente usado para se referir ao efeito do laser de baixa potência sobre tecidos biológicos em conduta terapêutica (KARU, 2003). Além disso, os lasers ainda podem ser classificados quanto à forma de emissão de radiação em contínuos, pulsáveis e “Q-switched”. O meio ativo desses lasers pode ser sólido, líquido ou gasoso (KARU, 2003).

Os parâmetros físicos da radiação laser são: potência, irradiância (densidade de potência), energia, densidade de energia (fluência). A potência de um aparelho é comumente expressa em miliwatts (mW). A irradiância é a relação entre potência administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio ou spot. O cálculo da irradiância depende da área de saída do feixe laser. A energia de raios pulsáveis é descrita em joules (J), e corresponde a potência entregue em um determinado período de tempo. A densidade de energia é a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio de luz laser ou spot e é expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2).

Al-Watban e Zhang (1997) e Maegawa et al. (2000), concordam em afirmar que o acréscimo da temperatura na terapia laser seria no máximo de $1^{\circ}C$, pois a energia dos fótons absorvidos por fotorreceptores de uma célula não será transformada em calor o suficiente para produzir o efeito fototérmico. De outra forma, os efeitos do LLLT poderiam ser explicados por efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/o fotobiológicos nas células submetidas a este tipo de radiação. Essa radiação faz com que a energia possa orquestrar mudanças nas moléculas, que por sua vez promoveriam respostas

biológicas. Existem três possíveis níveis onde os aspectos da fototerapia podem ser analisados: nível molecular, celular e orgânico.

A luz laser estimula a atividade energética da membrana celular, induzindo processos de bioestimulação (BASFORD, 1995), que conduzem à liberação de fatores de crescimento por macrófagos (YOUNG et al., 1989), proliferação de queratinócitos (HAAS et al, 1990), aumento da população e degranulação de mastócitos (EL SAYED; DYSON, 1996) e angiogênese (SCHINDL; NEUMANN, 1999).

A terapia de baixa intensidade é uma denominação genérica que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminosos monocromáticos de intensidade relativamente baixa (<1W) para o tratamento de afecções e lesões. Esta intensidade é considerada demasiadamente baixa para qualquer aquecimento detectável dos tecidos irradiados. Assim, a terapia laser de baixa potência é uma modalidade terapêutica atérmica e seus efeitos são de fotobiomodulação por laser (EL SAYED; DYSON, 1996).

Os dois meios mais comumente utilizados nas aplicações de terapia laser de baixa potência são o laser de hélio e neônio (He-Ne), operando num comprimento de onda de 632,8 nm (luz vermelha), ou, alternativamente, semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al), que tipicamente produzem radiação na faixa situada entre 630 e 950 nm (vermelho visível até o infravermelho próximo) (EL SAYED; DYSON, 1996).

A luz proveniente de um aparelho de LBP ou terapia por luz monocromática pode interagir com o tecido irradiado de duas formas: espalhamento da luz incidente e absorção da luz incidente por um cromóforo. O espalhamento da luz incidente é uma mudança na direção de propagação da luz, quando esta transita através dos tecidos, devendo-se à variabilidade nos índices refrativos dos componentes do tecido com

relação à água. Este espalhamento provocará “alargamento” do feixe durante sua passagem através do tecido irradiado, resultando na rápida perda da coerência (EL SAYED; DYSON, 1996). Na absorção da luz por um cromóforo, a luz incidente é absorvida por um cromóforo, isto é, uma biomolécula que é capaz, através de sua configuração eletrônica ou atômica, de ser excitada pelo fóton ou fótons incidentes. A luz nos comprimentos de onda tipicamente empregados na terapia com LBP é prontamente absorvida por uma série de biomoléculas, inclusive a melanina e a hemoglobina; em consequência disto, a profundidade de penetração associada aos aparelhos de uso terapêutico fica limitada a não mais que alguns milímetros (KARU, 2003).

Karu (2003) 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 prostaglandina, maior conteúdo de enzimas específicas, aumento da formação de produtos celulares), função nervosa estimulada (aumento na 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 (KARU, 2003).

Ainda no intuito de descrever os efeitos biológicos do laser, Karu (2003)

mostrou que os efeitos biomodulatórios desta terapia, definem a bioestimulação como um fenômeno fotoquímico e/ou fotobiológico. Além disso, enfatiza a importante função dos fotorreceptores primários como componentes da cascata de eventos que ocorrem na cadeia respiratória nas mitocôndrias, estimulando reações de oxido-redução (redox) do metabolismo celular, na qual a foto-ativação enzimática contribui para as reações químicas metabólicas, realizando a transdução do sinal luminoso detectado pelos fotorreceptores (processo onde a energia é transferida de um sistema a outro) a outras partes celulares (membranas), assim interferindo na produção de uma fotorresposta (biomodulação). O quantum de luz é apenas o desencadeador do metabolismo celular. A magnitude do efeito biomodulador depende do estado fisiológico em que as células são encontradas no momento da irradiação, o que explica o motivo pelos quais os efeitos não seguem uma padronização.

Karu e Tiflova (1987) referem-se aos mecanismos de ação primária como aqueles referentes aos efeitos da fotoexcitação de estados eletrônicos, tais como: mudanças nas propriedades redoxes dos componentes da cadeia respiratória após excitação dos seus estados eletrônicos, liberação de óxido nítrico (NO) do centro catalítico do citocromo c oxidase, formação de oxigênio singleto, aquecimento transitório local de cromóforos receptores e aumento da produção do ânion superóxido com subsequente aumento na concentração dos produtos de sua dismutação. Também são descritos mecanismos secundários, como: metabolismo celular e síntese de colágeno mais acentuada em fibroblastos, aumento do potencial de ação de células nervosas, estímulo da formação de DNA e RNA, efeitos sobre o sistema imunológico, formação de capilares mais pronunciados pela liberação de fatores de crescimento, aumento de atividade de leucócitos, aumento das radiações emitidas sobre as células. Neste mesmo contexto, Karu (2003) ainda afirma que a enzima citocromo c oxidase

seria o provável fotorreceptor.

Karu (2003) corrobora que a irradiação infravermelha sobre os cromóforos, por razões de propriedades fotofísicas e fotoquímicas, é importante para desencadear a cascata de eventos metabólicos sobre as membranas celulares (provavelmente nos canais de cálcio), conduzindo à mesma resposta terapêutica final.

Células de pH mais baixo que o normal são consideradas mais sensíveis à ação estimuladora da luz, contribuindo para as diferenças de efeito observadas após a LLLT. O mecanismo de regulação redox proposto por Karu e descrito acima pode explicar alguns efeitos clínicos da radiação. Por exemplo, os resultados positivos obtidos em tratamento de feridas e inflamações crônicas, ambas caracterizadas por acidose (pH diminuído) e hipoxia (pO_2 , tensão de oxigênio, diminuída). A transdução e amplificação do sinal fotobiológico da célula conduziria a uma cascata de reações ligadas a alterações nos parâmetros da homeostase celular, que pode acontecer em ausência de luz. Ainda, nos relatos de Karu e Tiflova (1987), não se deve ter uma visão reducionista desses efeitos, e imaginar que somente um destes processos possa ocorrer quando uma célula é irradiada.

É importante ressaltar que, uma vez observada a resposta biológica, e de fundamental importância determinar a densidade de energia (dose ou fluência), comprimento de onda, densidade de potência (intensidade), tipo do regime operacional, frequência do pulso (taxa de repetição), número de tratamentos e dados ópticos do tecido, como características de absorção e espalhamento. Esses são parâmetros que devem ser associados à irradiação, para que a absorção desta energia produza uma mudança física e/ou química que resulte em resposta biológica ideal.

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos da

LLLT sobre as células em diferentes situações metabólicas, é importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do laser não-térmico sobre tecidos biológicos não são conclusivas, mas sim inconsistentes e conflitantes. Por isso, estudos de investigação farmacológica que permitem compreender qual o tipo de sinalização celular e desencadeado pelo laser se fazem pertinentes, visto que a eficácia desta terapia depende fundamentalmente da quantidade de energia que é entregue ao tecido que esta sendo irradiado. A partir da compreensão da sinalização celular de cada tipo de laser de baixa potência e de sua respectiva dosimetria, será possível estabelecer qual é o laser mais indicado para determinada patologia.

1.9.1 Laser de baixa potência (LBP) e inflamação

A ação do LBP sobre o tecido está relacionada à possibilidade desta terapia inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação; de interferir com os efeitos dos mediadores químicos sintetizados na inflamação (CAMPANA et. al. ,1999); inibir a síntese das prostaglandinas (CAMPANA et. al., 1998), além de modular o tônus do esfíncter pré-capilar através de mediadores químicos. O uso de lasers na prática clínica como antiinflamatório em diferentes patologias, baseia-se em um reduzido número de publicações de caráter científico (VILLARROYA-APARICIO, 1994).

Outros autores relatam os efeitos benéficos da aplicação do laser em patologias inflamatórias, sugerindo vantagens terapêuticas comparadas aos placebos e a outros tratamentos (BASFOR, 1989; BASFOR, 1993; BASFOR, 1995;

BOULNOIS, 1985; KING, 1990; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). Dentre estes trabalhos se destaca o de Goldman et al. (1980), no qual é relatado que pacientes portadores de artrite reumatóide obtiveram melhora no quadro clínico quando irradiados com laser de diodo As-Ga-Al (780 nm) com DE (densidade de energia) de $2,3 \text{ J/cm}^2$. Ferreira et al. (2005) compararam a laserterapia e a terapia medicamentosa com o antiinflamatório naproxeno sódico (550 mg) no tratamento de pacientes com tendinite bicipital e do músculo supra-espinhoso e observaram melhora significativa da dor, mobilidade e função nos pacientes tratados com LBP (AsGa) quando comparados com o tratamento medicamentoso. Brosseau et al. (2000) estudaram a terapia com LBP em pacientes com artrite reumatóide e observaram 70% de redução da dor em relação ao placebo, e aumento de 1,3 cm de flexibilidade.

O tratamento convencional das doenças que atingem a musculatura esquelética inclui uma variedade de corticosteróides, metotrexato e outros agentes capazes de modificar a doença inflamatória, tais como ciclosporina e imunoglobulinas por via intravenosa (PILKINGTON; WEDENBURG, 2005). A terapia com LBP tem sido utilizada no tratamento de doenças inflamatórias, principalmente aquelas que acometem o sistema músculo-esquelético, como a artrite reumatóide (BROSSEAU, WELLS; MARCHAND, 2005; GUR; COSUT; SARAC, 2003). As vantagens terapêuticas da terapia com LBP têm sido reportadas por vários autores. O laser é indicado no tratamento de artrite reumatóide como moderador da dor e do edema ao contrário do que preconiza os padrões do estudo através de revisão de literatura (Cochrane review) sobre os efeitos clínicos do laser realizados (BROSSEAU; WELLS; MARCHAND, 2005).

Embora tenha evidências clínicas de alívio da dor na artrite inflamatória, a terapia laser ainda tem resultados controversos, visto que alguns autores não

observaram eficácia do laser sobre a função de células inflamatórias, tais como monócitos (BOUMA; BUURMAN; VAN DEN WILDENBERG, 1996). Entretanto, estudos mais recentes revelaram que a laserterapia, de maneira dependente da dose, mostrou-se eficaz sobre o acúmulo de PGE2 e formação de edema tanto em modelos experimentais *in vitro* (SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000) quanto *in vivo* (CAMPANA et al., 1999; ALBERTINI et al., 2004).

Outros autores avaliaram o efeito da TLBP sobre outros sistemas, tais como a inflamação da mucosa gástrica de ratos. Shao et al. (2005) avaliaram o efeito do LBP sobre um modelo de gastrite atrófica crônica em ratos. Os resultados obtidos mostraram que o laser de He-Ne (632.8 nm) foi eficaz em reduzir o número de células inflamatórias da cavidade gástrica. A consistência e o pH do muco produzido pelas células parietais foram normalizados após a irradiação com LBP. A espessura da parede do estômago também sofreu influência da ação do laser, que reverteu o processo de proliferação celular. Desta forma, o efeito antiinflamatório do laser é evidenciado em várias patologias que tem como característica o processo inflamatório.

As desordens temporomandibulares também sofrem a ação da terapia laser porque nesse tipo de patologia é referida dor pelos pacientes. Conti et al. (1997) estudaram o efeito do laser de baixa potência sobre pacientes que apresentavam dor têmporo-mandibular. Os resultados mostraram que o Arsenieto de Gálio Alumínio (As-Ga-Al, 830 nm) aliviou a dor de pacientes com dor miogênica e artrítica comparando com o efeito placebo.

Flemming; Cullum e Nelson (1999) observaram o efeito do LBP sobre pacientes portadores de úlcera venosa. Esses autores demonstraram que a irradiação somente com laser não foi eficaz, porém ao associar a luz laser com a luz infravermelha a cicatrização foi mais rápida e de melhor qualidade. Além disso,

avaliando pacientes portadores de edema idiopático, Gao; Liu e Tang (1998) demonstraram eficácia da terapia com LBP. Ainda que controversos, a maioria dos resultados revelou eficácia da terapia com LBP.

Considerando a arteriosclerose uma doença inflamatória, Khotiainstev et al. (1996) avaliaram o efeito do laser sobre pacientes que sofreram infarto do miocárdio, e foi possível observar que a terapia laser teve efeito similar aos agentes anti-arritmicos. Esses dados sugerem que o laser pode interferir com o potencial elétrico da membrana do miocárdio.

Considerando esses resultados, parece que independentemente do tecido e da patologia investigada, a TLBP é capaz de interferir em distintos níveis celulares. Evidências clínicas têm mostrado a eficácia do laser em diferentes processos de indução da inflamação, aliviando a dor e reduzindo o edema. De fato, o laser consegue estabilizar a resposta inflamatória, e ainda que a dosimetria ideal, buscando a melhor resposta, seja um paradoxo entre os pesquisadores e clínicos, parece que efeitos colaterais ainda não foram observados com esta terapia.

No que diz respeito ao efeito do LBP em reduzir a dor inflamatória (Ferreira et al., 2005), a literatura ainda reporta dados controversos. Além disso, embora alguns resultados sejam importantes, a medicina tradicional ainda observa com ceticismo os efeitos antiinflamatórios do laser sobre a dor. Provavelmente porque apesar de vários estudos que mostram a eficácia antiinflamatória do laser, muito pouco sobre o mecanismo de ação desta terapia tem sido elucidado. A partir dos resultados obtidos, vários grupos de pesquisa têm formulado hipóteses para explicar como o laser de baixa potência é capaz de reduzir a dor inflamatória, principalmente àquelas relacionadas às afecções que acometem a musculatura esquelética.

Bjordal et al. (2006) realizaram um estudo sistemático de revisão da literatura

mostrando os possíveis mecanismos de ação e os efeitos clínicos da terapia com LBP. Nesta revisão, Bjordal conclui que a terapia com LBP pode modular processos inflamatórios de maneira dependente da dose, e que esta terapia reduz significativamente a dor inflamatória na clínica médica. Dessa forma ainda que muito controversa e pouco explorada, a terapia com LBP aparece como importante adjuvante no controle das reações inflamatórias, com destaque para dor e edema, em pacientes portadores de desordens que acometem o sistema músculo-esquelético.

Recentes estudos mostraram que o LBP Arsenieto de Gálio ($2,5 \text{ J/cm}^2$) reduziu o edema de pata de ratos induzido por carragenina, apresentando um perfil de resposta antiinflamatória semelhante ao diclofenaco de sódio administrado na dose de 1 mg/kg (Albertini et al. 2004). Ainda neste mesmo estudo, Albertini et al. (2004) mostraram que o LBP não inibiu o edema induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados (retirada da glândula adrenal). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram ainda o efeito inibitório do LBP sobre a migração de leucócitos para o espaço pleural após exposição ao LPS, assim como a produção de IL-1, importante citocina pró-inflamatória, quantificada no exsudato pleural. Esses resultados, ainda que primários, sugerem que o mecanismo de ação do LBP pode estar relacionado com a estimulação do eixo endócrino hipotálamo-hipófise-adrenal, e conseqüente liberação de corticóides endógenos.

Em outra série de experimentos, esses mesmos autores sugerem mais uma vez, em modelo de pleurisia induzido por carragenina, o envolvimento do metabolismo de corticóides nos efeitos antiinflamatórios do LBP. Neste estudo, os receptores de corticóide foram antagonizados pelo mifepristone, um antagonista dos receptores de corticóide, e o laser foi testado. Os resultados mostraram que nos animais tratados com mifepristone, o efeito antiinflamatório do laser foi bloqueado. Desta forma, é

razoável sugerir que, enquanto não há evidências clínicas desta condição, pacientes que fazem uso de terapia com corticóides e que serão tratados com LBP devem suspender a terapia medicamentosa pelo menos por seis meses antes do início o tratamento com LBP.

Tomados em conjunto, os resultados descritos sugerem a importante contribuição da terapia laser, com atenção especial à terapia com LBP, visto que este tipo de laser é capaz de reduzir o processo inflamatório em diferentes patologias. Além disso, a terapia com LBP parece ser mais eficaz em relação ao tempo de duração de seu efeito antiinflamatório quando comparado com os antiinflamatórios convencionais.

1.9.2 Laser de baixa potência (LBP) e inflamação das vias aéreas

A maioria dos trabalhos descritos na literatura avalia o efeito do laser nas vias aéreas em condições patológicas tais como câncer, nas anormalidades de trocas gasosas, ou em processos de endoscopia e cicatrização após procedimentos cirúrgicos. Alguns trabalhos avaliam também os processos fibroproliferativos relacionados à síndrome obliterante dos brônquios e na inflamação pulmonar aguda. Outro exemplo de aplicação do laser nas vias aéreas é a utilização da microscopia intravital, onde é possível analisar a microcirculação pulmonar e o perfil temporal da formação de exsudato em modelo de isquemia e reperfusão intestinal. A microscopia luminescente associada ao laser confocal pode ser utilizada para avaliação da importância das moléculas de adesão e do comportamento de leucócitos em patologias pulmonares como a injúria pulmonar aguda induzida pela bleomicina. A bleomicina é conhecida por seus efeitos sobre o aumento da expressão gênica de metaloproteinases. Apesar dos estudos já descritos na literatura sobre o efeito

antiinflamatório do LBP em diversas patologias, não existem estudos que avaliam o fenômeno da hiperreatividade das vias aéreas e de inflamação pulmonar sob o ponto de vista terapêutico do LBP. Vale lembrar que a hiperreatividade das vias aéreas pode estar associada à inflamação pulmonar (DAFFONCHIO et al, 1985; LEFORT et al, 1998). De fato, alguns autores observaram que células inflamatórias podem estar interferindo com diversos processos fisiopatológicos, desde alterações na musculatura lisa das vias aéreas até fenômenos de disfunção contrátil do músculo do diafragma (FRYER et al. 1999; ALLOATTI et al., 2000).

É possível que apesar de seus efeitos antiinflamatórios já descritos, a terapia com LBP provavelmente não substituirá os medicamentos utilizados hoje no tratamento de afecções pulmonares agudas. Apesar de estar proposto na literatura que um dos mecanismos de ação do LBP como agente antiinflamatório é a inibição dos estímulos quimiotáticos na fase inicial do processo inflamatório, a terapia utilizada com eficácia emergencial na crise aguda da asma ou em infecções pulmonares como aquelas causadas por bactérias Gram-negativas ainda recai sobre os broncodilatadores e corticóides. Embora as células inflamatórias sejam fundamentais no desencadeamento da hiperreatividade das vias aéreas, no momento da crise aguda após o estímulo sensibilizante, a maior urgência é tentar aumentar o fluxo respiratório e a dinâmica das trocas gasosas através da broncodilatação. Entretanto, após o alívio da fase aguda do broncoconstrição, as células inflamatórias (por exemplo, macrófagos alveolares e neutrófilos) permanecem/migram para o tecido pulmonar, e são capazes de perpetuar o processo inflamatório, estabelecendo assim a fase crônica. Portanto, o estudo da utilização da terapia com LBP na hiperreatividade das vias aéreas é relevante no sentido de que o tratamento com LBP durante determinado período de tempo poderia atenuar a resposta inflamatória aguda, desta forma contribuindo para um menor

impacto da reação inflamatória.

Vale a pena ressaltar que alguns estudos admitem que o fenômeno da hiperreatividade brônquica e da traquéia reflete mais as conseqüências da inflamação pulmonar tanto na asma, como na ARDS induzida pelo LPS (COSTELLO et al, 1999; LOUIE; HALLIWELL; CROSS, 1997). Nesse sentido, modelos de avaliação farmacológica *in vitro* da hiperreatividade das vias aéreas na vigência da inflamação pulmonar constituem estudo interessante dos mecanismos orquestradores da obstrução das vias aéreas (COSTELLO et al, 1999), e tomando como base as referências que propõem a terapia antiinflamatória com LBP, é razoável propor o uso da terapia com LBP na hiper-reatividade das vias aéreas, sugerindo que o efeito antiinflamatório do laser poderia atenuar a resposta contrátil da musculatura lisa das vias aéreas e/ou reduzir o número de células inflamatórias em modelo de hiperreatividade e inflamação pulmonar.

Alguns autores mostram o efeito do laser em doenças que acometem as vias aéreas e o pulmão. Mikhailov; Aleksandrova e Gol'dina (1998) investigaram a ação da terapia com LBP em pacientes que apresentavam asma brônquica e observaram que a terapia com LBP, irradiando duas vezes ao dia, aumentou a complacência pulmonar e a eficácia de troca gasosa nesses pacientes. Nesse mesmo contexto, Pidaev (1997), analisando pacientes acometidos por inflamação pulmonar crônica não específica, observou que a irradiação com LBP foi capaz de reduzir a migração celular. Apesar de a terapia medicamentosa ser a mais eficaz, pois possui agentes broncodilatadores, antibióticos e corticosteróides, esses autores indicam a TLBP como tratamento nas condições de hipercapnia, hipóxia e disfunção de trocas gasosas. É importante ressaltar que a terapia com LBP representa uma “ferramenta” não farmacológica no tratamento das afecções pulmonares.

A dinâmica de troca entre os capilares pulmonares e o sangue constitui uma característica importante no que diz respeito à avaliação funcional pulmonar e mecânica do pulmão. As principais afecções pulmonares comprometem não somente a musculatura lisa das vias aéreas, mas também a mecânica pulmonar. A inflamação brônquica em pacientes asmáticos foi estudada no que se refere à dinâmica de troca de gases e líquidos entre os capilares pulmonares e o sangue. Neste estudo, Rakitina et al. (1997) observaram que a TLBP foi eficaz em aumentar a atividade metabólica e proliferativa das células endoteliais e na lâmina própria da mucosa brônquica. Além disso, a TLBP reorganizou o tecido fibroso brônquico, permitindo que a estrutura dos brônquios voltasse ao normal, ou seja, um tecido brônquico menos espesso.

Ainda na terapia endobrônquica com laser, Prozorova et al. (1997) investigaram o efeito da terapia com LBP em indivíduos portadores de bronquite crônica. Esses autores compararam a eficácia do laser com agentes anti-oxidantes, tais como piracetam e solcoseril. Os resultados mostraram que a laser terapia endobrônquica reduziu a concentração de compostos oxidantes sintetizados durante a inflamação. Além disso, foi capaz de aumentar a resposta humoral e imune, estabilizar a cascata de coagulação sangüínea e reduzir a peroxidação lipídica. Esses resultados são relevantes, pois apresentam a eficácia da terapia com LBP em estabilizar o metabolismo oxidativo da membrana das células de brônquio, permitindo que as reações químicas inflamatórias que comprometem a estrutura da membrana dessas células sejam atenuadas.

Por fim, Rakitina et al. (1997) mostraram que a terapia laser mais a terapia farmacológica convencional são capazes de reduzir os níveis de radicais livres no plasma e no sangue de indivíduos com asma brônquica. Esses resultados mostram a eficácia da terapia laser em proteger a membrana lipídica das células das vias aéreas

de agentes oxidantes. As observações descritas sobre o efeito antiinflamatório do LBP em diferentes modelos de inflamação das vias aérea e pulmonar sugerem que essa terapia é capaz de interferir com sistemas de sinalização celular bem complexos. Apesar de muitos resultados experimentais e clínicos evidenciando a ação da TLBP, ainda não se conhece claramente de que forma o cromóforo que absorve a luz laser é capaz de transmitir esse sinal celular. Ainda não foi descrito, pelo menos no que diz respeito às patologias que acometem o sistema respiratório, qual o mecanismo de transdução de sinal entre os cromóforos e a célula alvo.

Recentemente, Milojevic e Kuruc (2003) demonstraram que a TLBP aumentou a capacidade respiratória de indivíduos asmáticos através do aumento da complacência e da perfusão sanguínea pulmonar. Em modelo experimental de pleurisia em ratos, esses mesmos autores demonstraram mais uma vez a eficácia do laser, visto que esta terapia reduziu o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar após indução da inflamação. Parece que de fato a TLBP consegue atenuar a resposta inflamatória pulmonar de indivíduos asmáticos, mas qual o mecanismo de ação deste efeito ainda não foi descrito.

É razoável admitir que o laser seja capaz de interferir na inflamação pulmonar através da inibição ou síntese de mediadores inflamatórios que modulam a resposta celular a inflamação. De que forma os cromóforos poderiam interagir com canais iônicos, enzimas, receptores acoplados a proteína G ou até mesmo o núcleo da célula ainda são perguntas que não podemos responder.

Nossos resultados mostram que a terapia com As-Ga-Al com densidade de energia de 650 nm foi eficaz em reduzir a inflamação pulmonar e das vias aéreas a partir da redução dos níveis de PGE₂ e TXA₂ no lavado bronco-alveolar de ratos após a instilação de LPS. Outro ponto importante é o efeito do laser sobre a

hiperreatividade das vias aéreas desses animais. A terapia com LBP reduziu o grau de contração do músculo liso de traquéias de ratos após injeção intravenosa de LPS. Apesar do envolvimento dos derivados do metabolismo da COX-2 na inflamação pulmonar e hiperreatividade das vias aéreas, esses não são os únicos responsáveis pelo desencadeamento e perpetuação da resposta inflamatória pulmonar. Outros importantes mediadores pró-inflamatórios também se destacam no que se refere a inflamação pulmonar. De fato, nossos resultados mostram a eficácia do LBP sobre a inflamação pulmonar induzida por TNF e pela reação por imuno-complexo, onde o TNF também é o principal mediador. A laserterapia reduziu a hiperreatividade da musculatura lisa de brônquios de ratos incubados com TNF. Além disso, atenuou a lesão hemorrágica e diminuiu a concentração de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos submetidos à reação por imuno-complexo. Esses resultados apontam para um efeito do laser sobre o TNF mesmo em diferentes modelos de inflamação pulmonar.

No que diz respeito à hiporresponsividade da musculatura lisa das vias aéreas de ratos após a incubação com TNF, nossos resultados demonstraram que o LBP é capaz de interferir na capacidade de relaxamento da musculatura lisa de traquéia de ratos neste modelo de inflamação pulmonar experimental. De fato, nossos resultados mostram que a irradiação de segmentos de traquéia após a incubação com TNF restaurou a capacidade de relaxamento desses segmentos frente ao isoproterenol. Além disso, os resultados sugerem que o efeito do laser seja relacionado com o mecanismo de sinalização celular dos agonistas β -adrenérgicos, visto que a irradiação com LBP elevou a concentração de AMPc, o segundo mensageiro da sinalização celular dos agonistas β -adrenérgicos.

Como já foi mencionada a inflamação sistêmica que causa alterações no trato respiratório também pode comprometer a mecânica pulmonar. A disfunção contrátil do

músculo diafragma observada após administração intravenosa de LPS pode ser atenuada pelo LBP. Nossos resultados mostram quando irradiados com laser a musculatura esquelética do diafragma de ratos recupera a força contrátil após o estímulo elétrico. Parece que este efeito é mediado pelo TNF visto que o tratamento com clorpromazina, um inibidor da síntese de TNF, também foi eficaz em aumentar a capacidade contrátil do diafragma desses animais após estimulação elétrica desses tecidos. Além disso, a clorpromazina reduziu também a concentração de TNF encontrada no tecido de diafragma de ratos após a injeção intravenosa de LPS. A TLBP obteve efeito similar ao da clorpromazina no que diz respeito à concentração de TNF no homogenato de diafragma de rato após injeção intravenosa de LPS.

O metabolismo do cálcio é de importância fundamental no controle do tônus da musculatura lisa das vias aéreas de animais e seres humanos. O mecanismo contrátil dessa musculatura é dependente de cálcio. A maioria dos eventos inflamatórios tais como a expressão de moléculas de adesão, migração celular e reparação tecidual são dependentes de cálcio. As enzimas que permitem a síntese dos segundos mensageiros são em sua grande maioria dependentes de cálcio. Diversos trabalhos mostram a relevância do cálcio no mecanismo de sinalização celular dos eventos inflamatórios que ocorrem nas vias aéreas e no pulmão.

As evidências de que o TNF é o desencadeador da resposta inflamatória pulmonar estão em crescente aumento. Vários autores mostraram o efeito do TNF sobre as vias aéreas. Nossos resultados mostram que o músculo liso brônquico de ratos após incubação com TNF apresenta aumento da reatividade frente ao agonista colinérgico acetilcolina. Parris et al. (1999) demonstraram que o TNF produz hiperreatividade tanto de traquéia quanto de brônquio de ratos, levando a um aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina com conseqüente aumento da sensibilidade

dos filamentos contráteis desses tecidos ao cálcio. Hunter et al. (2003) observaram que o músculo liso das vias aéreas respondia de forma exacerbada aos agonistas colinérgicos, tais como acetilcolina e carbacol, durante a inflamação, e que esta resposta contrátil potencializada era devido ao aumento da sensibilidade dos miofilamentos da cadeia leve da miosina. Tem sido proposto por vários autores que os agonistas colinérgicos são capazes de aumentar a sensibilidade da cadeia leve de miosina de segmentos de brônquio de ratos ao cálcio após desafio antigênico ou com TNF (SAKAI et al., 2004).

Nossos resultados corroboram com aqueles que mostram o TNF causando hiperreatividade da vias aéreas e inflamação pulmonar. O aumento da sensibilidade dos miofilamentos de miosina de segmentos de brônquio ao cálcio pode originar e perpetuar a hiperreatividade brônquica. Nossos resultados também estão de acordo com Hunter et al. (2003) que observaram que o TNF era capaz de aumentar a sensibilidade da musculatura lisa brônquica ao cálcio. No que diz respeito à terapia com LBP, a hiperreatividade brônquica foi reduzida e a sensibilidade desses tecidos ao cálcio também apresentou efeito similar. Ainda há muito que se investigar sobre o mecanismo de ação antiinflamatória do laser, e principalmente de seu efeito sobre a inflamação das vias aérea e pulmonar.

Tomados em conjunto, o efeito do laser de baixa potência sobre as afecções pulmonares sugere que esta terapia pode atenuar o processo inflamatório das vias aéreas e de pulmão em diferentes modelos experimentais de inflamação pulmonar. A interação da radiação laser com células e mediadores inflamatórios pode ser o principal eixo do mecanismo de ação antiinflamatória desta terapia. Embora ainda não se tenha esclarecido por completo o mecanismo de ação do laser sobre a inflamação pulmonar, é razoável sugerir que esta terapia pode ser utilizada como co-adjuvante da

terapia medicamentosa convencional.

2. OBJETIVOS

Avaliar o efeito da terapia com laser de baixa potência sobre:

- a hiperreatividade das vias aéreas e a inflamação pulmonar após exposição ao LPS;
- a concentração de TNF no lavado bronco-alveolar após reação de imuno-complexo;
- a inflamação pulmonar alérgica induzida por reação de imuno-complexo;
- a hiporresponsividade β -adrenérgica das vias aéreas após incubação com TNF.
- a hipersensibilidade brônquica ao cálcio após incubação com TNF;
- a disfunção contrátil do músculo diafragma após administração intravenosa de LPS.

3. RESULTADOS

Trabalhos publicados

3.1. AIMBIRE, F.; ALBERTINE, R.; MAGALHÃES, R. G.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; CASTRO FARIA NETO, H. C.; ZANGARO, R. A.; CHAVANTES, C.; PACHECO, M. T. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med Sci (2005)** 20 (1): 11-20.

Os resultados descritos neste primeiro estudo mostram a eficácia da terapia com LBP em atenuar a hiperreatividade de segmentos de traquéia, o número de células inflamatórias no fluido do lavado bronco-alveolar e a atividade da MPO após exposição ao LPS. Os resultados obtidos sugerem que a ação antiinflamatória do LBP envolve a interação desse tipo de luz com os produtos do metabolismo da COX-2, principalmente PGE2 e TXA2.

3.2. AIMBIRE, F., ALBERTINI, R., PACHECO, M. T., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., LEONARDO, P. S., IVERSEN, V. V., LOPES-MARTINS, R. A., BJORDAL, J. M. Low-Level Laser Therapy induces dose – dependent reduction of TNF- α levels in acute inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery (2006)** 24 (1): 33-37.

No presente estudo a TLBP foi capaz de reduzir, de forma dependente da dosimetria, a concentração de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos após a reação alérgica por imuno-complexo.

3.3. AIMBIRE, F., LOPES-MARTINS, R. A. B., ALBERTINI, R., PACHECO, M. T. T., CASTRO-FARIA-NETO, H., LEONARDO, P. S. L. M., BJORDAL, J. M. The effect of low level laser therapy (LLLT) on hemorrhagic lesions induced by immune-complex in rat lungs. **Photomedicine Laser Surgery (2006)** 28: 14-20.

Os resultados apresentados nesse estudo mostram a eficácia da TLBP em reduzir a hemorragia pulmonar e a atividade da MPO de ratos após a reação alérgica por imuno-complexo. Além disso, o LBP (2.6 J/cm^2) reduziu a atividade da MPO na lesão hemorrágica a qual foi não significativamente diferente do tratamento dos animais com celecoxib. Outro importante resultado é que a dexametasona foi ligeiramente mais eficaz que o LBP em reduzir a lesão hemorrágica, mas não mais eficaz em reduzir a atividade da MPO.

3.4. AIMBIRE, F., BJORDAL, J. M., IVERSEN, V. V., ALBERTINI, R., FRIGO, L., PACHECO, M. T., CASTRO-CAIRE-FARIA-NETO, H. C., CHAVANTES, M. C., LABAT, R. M., LOPES-MARTINS, R. A. B. Low Level Laser Therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with Tumor Necrosis Factor- α mediated smooth airway muscle dysfunction. **Lasers in Surgery and Medicine (2006) 38(8): 773-778.**

Os resultados deste artigo mostram que o LBP é capaz de interferir sobre a hiporresponsividade brônquica aos β -adrenérgicos induzida por exposição ao TNF. O laser foi capaz de restaurar a reatividade de segmentos de brônquio intrapulmonar tratados com TNF e isoproterenol. Esse efeito significa maior capacidade de relaxamento do músculo liso brônquico induzido por agonista β -adrenérgico isoproterenol. Além disso, o laser foi capaz de normalizar os níveis de AMPc em homogenato de segmentos de brônquio intrapulmonar incubados com TNF e estimulados com isoproterenol.

3.5. AIMBIRE, F., COSTA, M. S., ALBERTINI, R., PACHECO, M. T. T., BJORDAL, J. M. Bronchial smooth muscle hyper-responsiveness induced by inflammatory Tumor Necrosis Factor- α can be reduced by Low Level Laser Therapy (655 nm, 2.6 J/cm² through modulation of Ca⁺²-sensitization.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a ação do LBP sobre a hiperreatividade brônquica pode ser mediada pelo Ca⁺², desde que a terapia com LBP reduziu a sensibilidade ao Ca⁺² de segmentos de brônquio intrapulmonar após exposição ao TNF.

3.6. AIMBIRE, F., LOPES-MARTINS, R. A. B., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., ALBERTINI, R., CHAVANTES, M. C., PACHECO, M. T. T., LEONARDO, PS. L., IVERSEN, V. V., BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy can reduce lipopolisaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF-alpha levels in rat diaphragm muscle. **Lasers Med Sci. (2006)** 4: 238-244.

Este estudo mostra o efeito do LBP sobre a mecânica pulmonar de ratos após a administração intravenosa de LPS. O laser foi capaz de aumentar a contratilidade do músculo diafragma isolado de ratos induzida por estimulação elétrica. Além disso, os resultados sugerem que o efeito do LBP sobre a reatividade do diafragma é mediado pelo TNF, visto que o LBP reduziu a concentração de TNF no homogenato de músculo diafragma de ratos após exposição ao LPS.

4. Discussão

A idéia inicial do presente estudo foi concebida com o objetivo de avaliar o efeito da TLBP sobre afecções pulmonares nas seguintes condições: 1) hiperreatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar induzidas por LPS; 2) inflamação pulmonar aguda induzida por TNF e; 3) hiporesponsividade das vias aéreas ao estímulo β -adrenérgico. Paralelamente a esse objetivo principal, nós delineamos o estudo do efeito da TLBP sobre os seguintes modelos experimentais de inflamação: 1) hiper-sensibilidade de segmentos de brônquio ao cálcio após estimulação com TNF; 2) lesão hemorrágica induzida através de reação por imuno-complexo e; 3) disfunção contrátil do diafragma de ratos estimulados com LPS.

Nesse sentido, nós inicialmente caracterizamos o efeito do LBP sobre a inflamação pulmonar abrangendo a hiperreatividade das vias aéreas e a migração de células para o pulmão. Os efeitos do LBP são produzidos através de mecanismos não térmicos (KING, 1990) da luz sobre os tecidos biológicos. A interação da luz com o tecido induz efeitos de modulação sobre algumas atividades celulares, através de mecanismos fotoquímicos. Muitos autores têm explorado a compreensão dos efeitos da terapia com LBP. Uma melhor compreensão do mecanismo fotoquímico sobre a célula é a garantia de maior confiabilidade no que diz respeito à dosimetria do laser, o período de irradiação e a quantidade de energia entregue ao tecido.

A partir de resultados prévios do efeito da intoxicação com LPS sobre a reatividade da musculatura lisa das vias aéreas de ratos, o presente estudo mostra que o LBP foi capaz de reduzir a resposta contrátil máxima e a sensibilidade de segmentos de traquéia a metacolina. A participação dos eicosanóides foi confirmada através do efeito atenuante do celecoxib (um inibidor específico da COX-2) sobre a

hiperreatividade de segmentos de traquéia a metacolina. Paralelamente, o LBP também foi capaz de reduzir a migração de células inflamatórias para o pulmão de ratos que receberam LPS. O celecoxib também reduziu o influxo de células inflamatórias para o pulmão, confirmando novamente a participação de produtos derivados do metabolismo da COX-2 no processo inflamatório pulmonar induzido por LPS.

A presença de neutrófilos durante o processo inflamatório pulmonar foi confirmada a partir da análise da enzima mieloperoxidase (MPO), que após estímulos alérgicos ou infecciosos mostra-se aumentada em sua atividade. Células como neutrófilos e macrófagos expressam esta enzima e quando ativadas apresentam atividade enzimática da MPO aumentada, portanto, o aumento da atividade enzimática da MPO serve como marcador indireto da presença de neutrófilos e macrófagos ativados após a administração de LPS. O celecoxib foi capaz de reduzir a atividade enzimática da MPO após a injeção intravenosa de LPS. Além de participarem da exacerbação da resposta contrátil de segmentos de traquéia e da migração de células inflamatórias para o pulmão, os eicosanóides, com destaque para a PGE₂ e TXA₂, participam também da modulação da ativação de neutrófilos e macrófagos.

Apesar de serem sintetizados pela mesma via metabólica da COX, os eicosanóides PGE e TXA₂, possuem efeitos fisiológicos diferentes. Vários autores mostraram o efeito da PGE₂ sobre segmentos de vias aéreas, e os resultados apresentados indicam que a PGE₂ em condições fisiológicas garante o tônus de relaxamento da musculatura lisa desses segmentos. No entanto, estudos têm mostrado que após a indução de processos inflamatórios, os macrófagos alveolares e as células de epitélio e endotélio pulmonar são capazes de produzir grande quantidade de PGE₂. JOHNSON (1998) observaram importante efeito antiinflamatório sobre a PGE₂,

incluindo redução de mediadores liberados por mastócitos, redução da quimiotaxia para neutrófilos, inibição de processos mitóticos e aumento da viabilidade celular. De fato, alguns estudos mostram que após a exposição ao LPS, algumas células das vias aéreas e pulmão apresentam aumento da atividade da COX-2 em detrimento da redução da atividade de COX-1. Com isso a concentração de PGE2 aumenta e esse eicosanóide passa a desempenhar função bronco-constritora. Alguns autores acreditam que um mecanismo de retro-alimentação negativa é capaz de limitar a inflamação. Dessa forma, é possível sugerir que a exacerbação do tônus constritor da musculatura lisa das vias aéreas pode ser devido ao efeito constritor da TXA₂ potencializado pela redução da concentração de PGE2.

Neste estudo, a terapia com LBP foi capaz de reduzir a atividade da MPO e a concentração de PGE2 e TXA₂ no lavado bronco-alveolar de ratos após a instilação intratraqueal de LPS. Vale ressaltar que o LBP apresentou um efeito antiinflamatório menos pronunciado sobre a concentração de PGE2. Esses resultados, ainda que preliminares podem sugerir que o LBP não age de forma idêntica sobre os mediadores inflamatórios ainda que estes sejam oriundos da mesma via metabólica. É provável que a eficácia do LBP sobre a inflamação pulmonar seja devido à redução menos significativa da concentração de PGE2, garantindo assim o efeito bronco-dilatador desse eicosanóide, e dessa forma atenuando a inflamação pulmonar e a hiperreatividade das vias aéreas após a injeção intravenosa ou instilação intratraqueal de LPS.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o LBP não foi eficaz durante os primeiros 90 minutos após a exposição ao LPS. Além disso, analisando o perfil temporal do efeito do laser podemos observar que o LBP foi capaz de manter a redução da hiperreatividade das vias aéreas e da migração de células inflamatórias

para o pulmão durante 48 horas após a intoxicação com LPS. Vale ressaltar que o efeito mais significativo da terapia laser utilizada nestes ensaios experimentais pode ser observado na fase tardia da hiperreatividade das vias aéreas e da inflamação pulmonar. Apesar de terem sido irradiados quatro vezes a cada 12 horas durante 48 horas, é possível especular que o LBP possa estar interferindo em mecanismos tardios do processo inflamatório. O envolvimento de mediadores da COX-2 na inflamação pulmonar e exacerbação da resposta contrátil de segmentos de vias aéreas já foi reportado por diversos autores (BELVISI et al. 1997, ERMERT et al., 2000; GUO et al., 2005; LAPORTE et al., 1999; NAKATA et al., 2005; PANG; KNOX, 1997). Ainda nesse sentido, o efeito do LBP sobre a fase tardia da inflamação sugere que essa terapia possa interferir em mecanismos de ação relacionados à indução e expressão de mediadores capazes de perpetuar o processo inflamatório das vias aéreas.

Um ponto importante e particular desse estudo é que apesar de demonstrar o efeito antiinflamatório do LBP sobre a hiperreatividade das vias aéreas e a inflamação pulmonar, existe um contraponto no que diz respeito ao protocolo experimental quando comparamos os efeitos do laser. Os resultados obtidos nos induzem a supor que a redução da hiperreatividade de segmentos de traquéia se deve a redução da migração de células inflamatórias para pulmão. E de fato, com uma menor concentração de células inflamatórias no fluido do lavado bronco-alveolar, vários autores demonstraram que a presença de mediadores inflamatórios também é reduzida. Dessa forma, a resposta inflamatória é atenuada. No entanto, é importante considerar que a indução da inflamação pulmonar, embora também tenha sido induzida através da exposição ao LPS, foi através de instilação intratraqueal. Esse modelo experimental de instilação intratraqueal é bem diferente daquele que foi utilizado no presente estudo para a avaliação do efeito do LBP sobre da

hiperreatividade de segmentos de traquéia de ratos. Apesar de constituírem modelos de inflamação com sinais já bem caracterizados, a instilação intratraqueal de LPS, diferentemente da injeção intravenosa, não é capaz de desencadear uma resposta sistêmica que ativa processos inflamatórios em células de tecidos diferentes visto que é uma resposta local, e por isso apenas as células que compõem as vias aéreas e os pulmões participam.

Outro tópico que desperta interesse sobre os nossos resultados é o perfil temporal do efeito do LPS sobre a hiperreatividade de traquéia e a inflamação pulmonar. Embora sendo administrado por vias distintas, instilação intratraqueal e injeção intravenosa, o LPS foi capaz de aumentar a resposta contrátil máxima frente ao agonista colinérgico e a infiltração de células inflamatórias para o pulmão de maneira dependente do tempo. Os resultados obtidos a partir da exposição ao LPS, tanto instilado intratraqueal quanto via venosa, mostram que na fase inicial (90 min, 1 e 3 horas) da hiperreatividade o LPS não apresenta efeito significativo. No entanto, no decorrer do tempo, os efeitos do LPS começam a causar alterações importantes na resposta contrátil de segmentos de traquéia. Essas alterações correspondem temporalmente com a migração de células inflamatórias para o pulmão.

Ainda neste contexto, a concentração de PGE₂ e TXA₂ no lavado broncoalveolar de ratos submetidos à instilação intratraqueal de LPS aumentou de forma significativa somente 6 horas após a instilação de LPS, e continuou aumentando gradativamente dentro de um período de 48 horas. Não surpreendentemente, a redução da concentração de PGE₂ e TXA₂ corresponde com a redução do número de células inflamatórias e da atividade da MPO. Esses resultados nos fazem supor que os neutrófilos podem estar modulando essa resposta inflamatória temporal do LPS através do aumento da expressão e atividade da COX-2. Curiosamente, o tratamento

com Celecoxib foi o que apresentou melhores resultados, indicando uma importante participação dos mediadores lipídicos derivados da COX-2. Os mediadores inflamatórios derivados da COX-2, com destaque para PGE2 e TXA₂, são capazes de modular a fase tardia (48 horas) da resposta inflamatória pulmonar. A exacerbação da resposta contrátil de segmentos de traquéia também coincide com o aparecimento de concentrações aumentadas de PGE2 e TXA₂ no lavado bronco-alveolar.

O protocolo de irradiação dos animais com LBP adotado no presente estudo variou de acordo com o tempo de exposição ao LPS. Dessa forma, em cada protocolo de irradiação os animais receberam quantidade de energia diferente. Nossos resultados mostram que o efeito antiinflamatório da TLBP sobre as vias aéreas e pulmão também obedece a um perfil temporal após a exposição ao LPS. De fato o efeito do LBP, tanto sobre a hiperreatividade de segmentos de traquéia quanto sobre a inflamação pulmonar, fica mais evidente com o passar do tempo. Por outro lado, é razoável sugerir que o efeito antiinflamatório tardio do LBP seja devido ao maior número de aplicações de laser nos períodos de 24 e 48 horas após a instilação intratraqueal ou a injeção intravenosa de LPS.

Por fim, os resultados apresentados neste presente estudo mostraram que a hiperreatividade de segmentos de traquéia, o acúmulo de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar e a migração de células inflamatórias para o pulmão podem ser atenuadas pelo efeito fotoquímico do LBP, o qual parece ser devido à interação seletiva dos produtos do metabolismo da COX-2.

Como descrito anteriormente, outros mediadores químicos além dos produtos do metabolismo da COX, participam da resposta inflamatória pulmonar e das vias aéreas. O TNF é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir ativação e migração de células para o pulmão, além de seus efeitos diretos sobre as células de músculo

liso das vias aéreas. Apesar de sua participação na resposta inflamatória induzida por LPS, alguns autores reportam que o TNF participa da lesão hemorrágica pulmonar induzida por reação imunológica (TAVARES DE LIMA et al., 1998).

Considerando esses estudos, nós investigamos se a TLBP é capaz de modular a concentração de TNF no lavado bronco-alveolar e a formação de lesões hemorrágicas no pulmão induzida por reação imunológica em ratos. Além disso, no presente estudo nós investigamos o efeito da TLBP sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em tecido pulmonar de ratos. No presente estudo, comparamos o efeito do LBP com tratamentos antiinflamatórios convencionais tais como dexametasona e celecoxib. Os animais foram irradiados com uma dose fixa de $1,3 \text{ J/cm}^2$ a cada duas sessões com 42 segundos de duração. Os animais foram irradiados cinco minutos e 12 horas após a indução da reação imunológica. Dessa forma, o total de energia entregue foi de 0,44 Joules. Os animais foram sacrificados 12 horas após a última irradiação e 24 horas após a indução da reação imunológica.

A literatura reporta que a resposta inflamatória induzida por reação imunológica é um dos principais fatores de praticamente todas as patologias que acometem o trato respiratório. Essa reação imunológica pulmonar é caracterizada pela ativação de células endoteliais, células de epitélio pulmonar, macrófagos alveolares e recrutamento e ativação de diversas células inflamatórias tais como, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos. A migração de neutrófilos da circulação para o pulmão requer uma série de reações que envolvem a participação de moléculas de adesão, tais como as selectinas, integrinas, e a família das imunoglobulinas. A ativação de moléculas de adesão da família das integrinas induz a interação dessas moléculas com a superfície do endotélio celular. A presença de moléculas de adesão determina a migração de neutrófilos em uma série de modelos experimentais de inflamação aguda.

Além disso, a expressão de moléculas de adesão sobre o endotélio vascular pulmonar pode ser induzida por diversos mediadores inflamatórios tais como o TNF, a IL-1, interferon-gama (INF- γ) e endotoxinas. É importante ressaltar que a migração celular neste tipo de resposta inflamatória é dependente da presença de fatores quimiotáticos como leucotrieno B₄, C5a, IL-8 e MIP.

A resposta inflamatória pulmonar desencadeada por reação imunológica apresenta características particulares em decorrência de ser induzida no microambiente pulmonar, visto que o principal sítio de migração leucocitária são os capilares pulmonares, os quais possuem um diâmetro mais similar ao dos leucócitos quando comparado aos outros leitos vasculares da microcirculação pulmonar, que são mais semelhantes aos vasos sanguíneos da circulação sistêmica.

Os neutrófilos migram para o espaço alveolar através de uma via bem definida. O sítio de migração, como já descrito por vários autores, é o capilar pulmonar e as vênulas pós-capilares. Os neutrófilos migram entre as células endoteliais através de junções celulares localizadas entre as paredes celulares dos capilares. Este sítio de migração apresenta uma descontinuidade em sua lâmina basal, e é o sítio de interação com os fibroblastos intersticiais dentro da parede dos capilares alveolares. Os neutrófilos então migram até o interstício, onde frequentemente estão em contato com os fibroblastos e podem dessa forma migrar longitudinalmente a eles. Assim, eles migram para o sítio onde os pneumócitos do tipo I são adjacentes aos pneumócitos do tipo II, e exatamente neste ponto os neutrófilos entram no espaço alveolar.

Dentre as intervenções terapêuticas não farmacológicas, o LBP aparece como uma terapia promissora, pois além de não apresentar efeitos adversos, é uma terapia alternativa ou coadjuvante eficaz nas patologias que necessitam de terapia medicamentosa. Atualmente, a comunidade científica ainda não apresentou resultados

sobre os efeitos fotoquímicos do LBP sobre tecidos biológicos em longo prazo. Embora vários autores tenham descrito que a irradiação com luz laser não altera os sistemas celulares de tecidos biológicos em homeostasia, alguns resultados demonstram que é preciso existir um estado de “perturbação da homeostasia” para que a energia entregue pelo laser possa interferir nos sistemas celulares (KARU, 2003; KARU; TIFLOVA, 1987; SMITH, 1991). Dessa forma, durante a terapia com LBP as células normais adjacentes ao tecido lesado não sofrem alterações em seus sistemas celulares. Porém como já mencionado, os efeitos tardios do LBP sobre o tecido biológico ainda não foram elucidados.

Embora a terapia medicamentosa e a com LBP sejam comumente administradas em lesões hemorrágicas agudas tais como aquelas relacionadas ao esporte que acometem o sistema músculo-esquelético, pouca atenção tem sido dispensada no que se refere ao mecanismo de modulação da formação da hemorragia. Estudos têm revelado que os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são capazes de atenuar a inflamação nos primeiros três dias. Entretanto, a terapia contínua com AINES parece interferir no processo de regeneração das fibras musculares (BJORDAL et al., 2006). Atualmente os resultados que mostram se os AINES podem modular a lesão hemorrágica ainda são escassos.

Em contrapartida aos efeitos dos AINES e dos antiinflamatórios esteroidais, autores têm descrito que a TLBP é capaz de apresentar efeito antiinflamatório e cicatrizante durante duas semanas após injúrias teciduais tais como lesão muscular esquelética e cardíaca (BJORDAL et al., 2006). Ainda assim, os efeitos do LBP sobre a lesão hemorrágica ainda são muito incipientes.

Diversos autores têm demonstrado que a foto-radiação com LBP é capaz de atenuar o processo inflamatório através da inibição da COX-2 e da redução dos níveis

de PGE2 em cultura de células. Os efeitos antiinflamatórios da terapia com LBP também tem sido demonstrados em alguns modelos experimentais de edema e artropatia. Albertini et al. (2004), investigando o edema de pata e a pleurisia induzida por carragenina, demonstraram que o LBP reduziu o edema de pata e o acúmulo de células inflamatórias no pulmão de ratos. Em outra série de experimentos, mas utilizando o mesmo modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina, esses mesmos autores demonstraram que o antagonismo farmacológico dos receptores de cortisona foi capaz de reduzir de forma significativa o efeito antiinflamatório do LBP, caracterizado pela redução da migração de neutrófilos. Esses resultados corroboram com a nossa hipótese inicial de que a terapia com LBP poderia estar agindo sistemicamente e interferindo no eixo endócrino levando a liberação de cortisol.

O estímulo para a migração de células inflamatórias pode ser dividido em citocinas capazes de atrair quimicamente essas células e em citocinas que, apesar de participarem do processo inflamatório, não apresentam essa capacidade. As citocinas inflamatórias TNF e IL-1 são capazes de orquestrar a expressão de moléculas de adesão sobre os polimorfonucleares (PMN) e as células endoteliais. Embora essas citocinas sejam capazes de promover a adesão das células inflamatórias sobre o endotélio vascular em modelos experimentais *in vitro*, TNF e IL-1 não são suficientes para promover a migração das células inflamatórias para o pulmão. Para isso é necessário presença de fatores quimiotáticos específicos que possibilitem a migração das células inflamatórias para o espaço alveolar. Alguns fatores quimiotáticos promovem a expressão de moléculas de adesão sobre os PMN de maneira semelhante às respostas induzidas por TNF e IL-1.

As duas citocinas mais importantes no que se refere à expressão de moléculas de adesão durante a maioria dos processos inflamatórios são exatamente TNF e IL-1.

Como já mencionado, a principal fonte celular de ambos, TNF e IL-1, são os monócitos/macrófagos, e o LPS é talvez o seu principal indutor. Existem dois tipos de receptores de TNF sobre os PMN e as células endoteliais. Os PMN podem responder ao TNF pela ativação e expressão de integrinas, produzindo PAF e outros mediadores inflamatórios contidos nos seus grânulos. Da mesma forma, as células endoteliais mobilizam as selectinas, retro-alimentam positivamente as ICAM-1 e ativam componente da cascata de coagulação em resposta ao TNF.

Em modelos de lesão hemorrágica pulmonar desencadeada por reação imunológica, o TNF contribui de forma importante para a migração de neutrófilos e para o extravasamento vascular (MULLIGAN; WARD, 1992; TAVARES DE LIMA et al., 1998). Paralelamente aos resultados apresentados no presente estudo, mas utilizando o mesmo modelo experimental de lesão hemorrágica, nós observamos um aumento significativo nos níveis de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos após a indução da reação imunológica que foi reduzido através da terapia com LBP. Os resultados apresentados nesse estudo reforçam a idéia prévia de que a redução da concentração de produtos derivados da COX-2 significativamente reduz a resposta inflamatória e lesão hemorrágica induzida por reação imunológica. Além disso, este efeito poderia ser modulado pela inibição da produção de TNF com conseqüente redução do infiltrado leucocitário e da lesão hemorrágica pulmonar.

No presente modelo experimental, as drogas imunossupressoras são farmacologicamente conhecidas por sua eficácia. A expectativa de um resultado mais significativo após o tratamento com dexametasona era esperada, mais não foi observada. De forma surpreendente, os resultados obtidos com a irradiação laser mostraram que esta terapia foi capaz de reduzir a lesão hemorrágica de forma significativa similar aos tratamentos com dexametasona e celecoxib. Nossos estudos

têm mostrado que o LBP é capaz de atenuar a resposta inflamatória em diferentes modelos experimentais de inflamação pulmonar e parece que os eicosanóides derivados do metabolismo da COX-2 e o TNF modulam esse efeito.

Por fim, neste estudo mostramos que a TLBP reduziu a lesão hemorrágica, o acúmulo de neutrófilos e a concentração de TNF no lavado bronco-alveolar em modelo experimental de injúria pulmonar desencadeado por reação imunológica, e que este efeito antiinflamatório foi similar ao tratamento convencional com dexametasona e celecoxib.

Os resultados discutidos até o momento reportam o efeito do LBP sobre a hiperreatividade das vias aéreas e a inflamação pulmonar não alérgica e alérgica. Vale ressaltar que a inflamação também interfere na resposta de relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas. De fato, quando expostas ao LPS (YAMAWAKI et al., 1990), ao TNF (GUO et al., 2005; MOORE et al., 2001) ou ao antígeno (HAKONARSON et al., 1997) a musculatura lisa do trato respiratório apresenta redução de sua capacidade de relaxamento frente ao estímulo β -adrenérgico. Dessa forma é importante considerar que, embora a hiperreatividade seja a principal característica de afecções pulmonares tais como asma, SARA e choque séptico, a redução da reatividade do músculo liso das vias aéreas frente à citocinas como o TNF também é capaz de contribuir para o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas.

Neste contexto o presente estudo tratou de investigar o efeito da TLBP sobre a reatividade de segmentos de traquéia incubados com TNF. Após um período de incubação com TNF, os segmentos de traquéia apresentaram redução na capacidade de relaxamento frente ao estímulo β -adrenérgico. A foto-radiação com LBP foi eficaz em restaurar, ainda que parcialmente, a capacidade de relaxamento desses

segmentos de traquéia após a exposição ao TNF. Esses resultados abrem um leque bem variado de hipóteses que evidentemente ainda não foram testadas, mas que são fundamentais para a compreensão do mecanismo de ação do LBP sobre a hiperreatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar. Os resultados mais importantes desse estudo demonstraram que a inibição do TNF parece ser a responsável pelo efeito antiinflamatório da radiação laser.

No presente estudo é importante ressaltar que embora os segmentos de traquéia tenham sido irradiados com dosimetrias diferentes, apenas uma única dose foi capaz de restaurar a disfunção da musculatura lisa desses segmentos frente ao agonista β -adrenérgico. Por isso esta dose ($2,6 \text{ J/cm}^2$) foi fixada como a dosimetria a ser utilizada em todos os protocolos experimentais. Neste estudo avaliamos o efeito da foto-irradiação sobre a resposta de relaxamento de segmentos de traquéia frente ao estímulo β -adrenérgico do isoproterenol. Ao contrário dos outros estudos já descritos, neste presente trabalho o laser foi irradiado sobre os segmentos de traquéia isolados de ratos. Nossos resultados demonstraram que tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a foto-irradiação com LBP foi eficaz em reduzir a inflamação pulmonar.

Apesar dos resultados obtidos neste presente trabalho fazerem sugerir que o efeito antiinflamatório do LBP é mediado pela redução dos efeitos do TNF, ainda são muito incipientes para indicar que o mecanismo de normalização da resposta de relaxamento de segmentos de traquéia seja dependente desta via pró-inflamatória. Nossa investigação não avaliou os níveis de TNF nos segmentos de traquéia isolados de ratos após a irradiação com laser. Por outro lado, é possível que o LBP possa interagir com outros sistemas enzimáticos que quando ativados estariam aumentando a síntese e liberação de TNF. Dessa forma, o efeito antiinflamatório do LBP pode estar relacionado com a diminuição da inflamação pulmonar via efeito indireto sobre o TNF.

De fato, vários autores demonstraram que o TNF pode induzir o aumento da atividade da COX-2 e com isso exacerbar a resposta contrátil de segmentos de músculo liso das vias aéreas de ratos. Com a atividade aumentada da COX-2, a concentração de eicosanóides, com destaque para a TXA₂ e PGE₂, também aumenta e com isso potencializa o efeito constritor colinérgico. Embora a “maquinaria” enzimática responsável pelo mecanismo de relaxamento e contração de segmentos das vias aéreas seja diferente, uma exacerbação da reatividade contrátil frente ao estímulo colinérgico pode aumentar o tônus da musculatura lisa das vias aéreas, e assim comprometer a capacidade de relaxamento desses segmentos. Nossos resultados demonstraram que os segmentos de traquéia após incubação com TNF e estimulação com ACh apresentaram aumento da resposta contrátil máxima. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos por outros autores, e indica que o TNF está envolvido tanto na hiperreatividade como também na hiporresponsividade de segmentos de traquéia ao agonista β -adrenérgico.

Um outro ponto que desperta interesse são os resultados que mostram o efeito do forskolim, um ativador direto da proteína G, sobre a resposta de relaxamento de segmentos de traquéia após o período de incubação com TNF. O TNF não alterou a resposta de relaxamento dos segmentos de traquéia quando estimulados com diferentes concentrações de forskolim. De fato, quando comparamos o efeito do TNF sobre a resposta de relaxamento de segmentos das vias aéreas frente a ambos, isoproterenol e forskolim, é possível observar que a resposta de relaxamento desses segmentos só foi modificada quando os segmentos foram estimulados com isoproterenol. Os mesmos resultados foram obtidos com a foto-radiação, ou seja, o LBP interferiu apenas nos segmentos de traquéia que após a incubação com TNF foram estimulados com isoproterenol. Esses resultados nos fazem sugerir que o efeito

do LBP pode acontecer através de alterações na sinalização celular do TNF. Ainda neste sentido, é razoável especular que o LBP pode modular a inflamação pulmonar a partir de receptores de TNF nas vias aéreas, ou da distribuição de TNF nesses tecidos. Apesar dos resultados apontarem para o TNF como o principal alvo de modulação da resposta antiinflamatória, vale lembrar que o efeito antiinflamatório do LBP pode estar relacionado a outras citocinas que não o TNF, cromóforos ou a outros receptores. Uma hipótese pouco explorada é a possibilidade de o LBP agir diretamente sobre o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas após a exposição ao TNF.

Autores como Barnes (1999) observaram que as variações na transdução de sinal da musculatura lisa das vias aéreas após exposição ao TNF são similares àquelas observadas em pacientes terminais com asma. Na asma, a inflamação das vias aéreas está associada ao aumento da reatividade bronco-constritora frente ao agonista contrátil e a redução da capacidade de relaxamento dessa musculatura lisa quando estimulada com o agonista β -adrenérgico. A redução da responsividade β -adrenérgica das vias aéreas de indivíduos asmáticos não pode ser unicamente atribuída à redução da quantidade e afinidade dos receptores β -adrenérgicos, mas pode refletir uma alteração na sinalização celular transmembrana acoplada a adenilato ciclase. Como já citado, o TNF não interferiu sobre a resposta de relaxamento de segmentos de traquéia estimulado pelo isoproterenol. Esse resultado reforça a idéia de que o LBP pode interferir no mecanismo de sinalização celular entre o receptor β -adrenérgico e a proteína G.

Barnes (1999) demonstrou que pacientes com asma refratária ao tratamento com agentes β -adrenérgicos apresentam alterações na via do TNF no que diz respeito ao aumento de sua liberação e ativação de seus receptores. Esses autores

observaram ainda que esses pacientes apresentam melhora da função pulmonar quando tratados com a terapia medicamentosa a base de inibidores do TNF. Como já mencionado, ainda não se conhece se a concentração de TNF encontrada próxima às células de músculo liso das vias aéreas é maior ou menor que aquela encontrada nas secreções do trato respiratório. Entretanto, a concentração de TNF usada no presente estudo (10ng/mL) é a mesma encontrada próxima às células das vias aéreas de pacientes asmáticos. Além disso, nossos resultados corroboram com Barnes (1999) que demonstraram que o efeito mais significativo do TNF sobre a capacidade de relaxamento desses tecidos estimulados com isoproterenol aconteceu 72 horas após o início da exposição ao TNF.

Outro importante ponto a ser destacado é que embora a maioria dos estudos que se refere ao uso de agonistas β -adrenérgicos relacione seus efeitos à resposta de relaxamento das vias aéreas, esses receptores também podem ser expressos na superfície de outras células que não as da musculatura lisa (BARNES, 1999). Alguns autores têm mostrado que a ativação de receptores β -adrenérgicos sobre células inflamatórias tais como, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células de epitélio das vias aéreas contribuem para o alívio da asma. De fato, diversos autores demonstraram que o uso de agonistas β -adrenérgicos sobre os receptores de vênulas pós-capilares foi capaz de reduzir o exsudato inflamatório das vias aéreas (BARNES, 1999; JOHNSON, 1998). Além disso, a ativação desses receptores sobre mastócitos induz inibição da liberação de mediadores bronco-constritores, além de reduzir o número de mediadores pró-inflamatórios liberados de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos.

Considerando os resultados citados acima é possível especular que o efeito do LBP sobre a concentração de AMPc de segmentos de traquéia possa contribuir para a

ação antiinflamatória desta terapia. Nossos resultados mostraram que o LBP foi capaz de aumentar a concentração de AMPc após a exposição ao TNF. Embora não tenhamos analisado o efeito do LBP sobre a concentração de AMPc de outras células inflamatórias que não as células de músculo liso das vias aéreas, não podemos descartar a idéia de que o aumento de AMPc pode ter influência não somente na restauração da resposta de relaxamento dos segmentos de traquéia, mas também na atenuação da resposta inflamatória pulmonar como um todo. Em outra série de experimentos, nosso grupo mostrou que o LBP é capaz de reduzir o número de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar de ratos expostos ao LPS ou a reação imunológica. Nesse sentido é razoável sugerir que o LBP ao reduzir o infiltrado pulmonar de células inflamatórias, não permite que grandes quantidades de TNF sejam produzidas e liberadas no pulmão. Dessa forma, talvez os níveis de AMPc não fossem alterados a ponto de comprometer a capacidade de relaxamento dos segmentos de músculo liso de traquéia de rato.

A despeito do efeito antiinflamatório dos agonistas β -adrenérgicos sobre as células inflamatórias, esse mecanismo antiinflamatório parece não ser eficaz em reduzir a inflamação crônica da asma. Isso ocorre devido à dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos das células inflamatórias acontecer mais rapidamente do que as células da musculatura lisa das vias aéreas. Nesse sentido a terapia com corticosteróide torna-se importante, pois é capaz de aumentar a expressão de receptores β -adrenérgicos compensando a dessensibilização desses receptores.

Ainda não se conhece exatamente qual a concentração de TNF a qual as células do interstício das vias aéreas são expostas durante uma reação inflamatória. Alguns autores como Broide et al. (1992) encontraram níveis altos de TNF no fluido do lavado bronco-alveolar de pacientes asmáticos que apresentaram variações entre 0,05

e 3,1ng/mL. Recentemente nosso grupo mostrou que o LBP foi capaz de reduzir a concentração de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos após o desencadeamento de uma reação inflamatória imune. Esse resultado nos deu a idéia de que o efeito antiinflamatório do LBP estaria relacionado à redução dos níveis de TNF. Surpreendentemente o LBP aumentou a concentração de AMPc de tecidos de traquéia estimulados com isoproterenol após a exposição ao TNF. Embora sejam modelos experimentais distintos, esses resultados não descartam a idéia de que o LBP possa apresentar o mesmo mecanismo de ação observado na resposta imune. Vale ressaltar que o efeito do laser foi observado sobre modelos de inflamação pulmonar induzidos de forma distinta. Apesar de desencadearem resposta inflamatória pulmonar e terem o TNF como um dos mediadores mais importantes desse processo, é importante considerar que os estímulos que levam a inflamação pulmonar ativam células e possuem um perfil temporal de ativação distinta.

Por fim, considerando os resultados mostrados neste presente estudo, nós sugerimos que a TLBP é capaz de restaurar a capacidade de relaxamento da musculatura lisa de segmentos de traquéia de ratos provavelmente devido à inibição do TNF.

A hiperreatividade das vias aéreas pode ser desencadeada a partir de estímulos diferentes (alérgico e não alérgico). Além disso, vários fatores podem contribuir para a exacerbação da resposta contrátil do músculo liso das vias aéreas, sejam eles referentes às alterações diretas sobre as células de músculo liso, aos efeitos de mediadores químicos liberados por células inflamatórias, ao aumento da liberação de ACh pelas terminações nervosas parassimpáticas, às alterações no metabolismo de cálcio e ao aumento da sensibilidade de segmentos de traquéia e brônquio ao cálcio.

O presente estudo demonstrou que a TLBP é capaz de reduzir a hiperreatividade de tecidos de brônquio de ratos após a exposição ao TNF, e os resultados obtidos parecem que este efeito é modulado pela redução da sensibilidade desses segmentos ao cálcio quando estimulados com o agonista colinérgico. Resultados prévios de nosso grupo já citados anteriormente, revelam que a terapia com LBP foi eficaz em reduzir a hiperreatividade de segmentos de traquéia frente ao estímulo colinérgico com metacolina após exposição ao LPS.

Existem evidências substanciais de que o TNF é o mediador inflamatório responsável pelo desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas na asma (KIPS; TAVERNIER; PAUWELS, 1992; THOMAS; YATES; BARNES, 1995; RENZETTI et al., 1996). Vários autores têm especulado um possível mecanismo para explicar como o TNF pode induzir hiperreatividade brônquica colinérgica (HADDAD; ROUSELL, 1998; SAKAI et al., 2004). Alguns estudos têm demonstrado o efeito modulador do TNF sobre a homeostasia do cálcio como um mecanismo que altera a reatividade da musculatura lisa das vias aéreas na asma (AMRANI; PANETTIERI, 2002). O íon cálcio é o principal segundo mensageiro no processo de sinalização da contração de músculo liso das vias aéreas. Por isso, Tao et al. (1999) especularam se as anormalidades no metabolismo do cálcio, caracterizados por aumento do influxo de cálcio ou alteração nas proteínas contráteis que são reguladas pelo cálcio, não seriam as principais causas da hiperreatividade observada na asma. O fato é que dentre os eventos de sinalização celular que modulam a atividade de tônus contrátil das vias aéreas, inclui-se o aumento da concentração de cálcio livre no citoplasma da célula muscular lisa. Além disso, a sinalização celular induzida pelo cálcio é responsável pela fosforilação das cadeias leves de miosina através da atividade da quinase da cadeia leve da miosina. (AMRANI; PANETTIERI, 2002).

Outro importante aspecto a ser considerado é o tipo de receptor localizado sobre o músculo liso das vias aéreas que é o responsável pela resposta contrátil induzida pelo agonista colinérgico. Dentre os subtipos de receptores muscarínicos localizados na musculatura lisa das vias aéreas, o subtipo de receptor M3 é o responsável pela resposta contrátil da musculatura lisa das vias aéreas tanto em preparações de músculo liso das vias aéreas isolada de animais quanto de indivíduos. O eixo neural que comanda a resposta contrátil da musculatura lisa das vias aéreas é controlado por neurônios parassimpáticos que inervam a superfície dessas células. Esses neurônios apresentam em sua terminação uma grande quantidade de vesículas sinápticas que armazenam o neurotransmissor sintetizado pela própria célula nervosa. O neurotransmissor liberado pela terminação nervosa parassimpática é a ACh. Uma vez na fenda sináptica a ACh é capaz de ligar-se ao receptor muscarínico e então desencadear o processo de sinalização celular para a contração das vias aéreas. Além disso, os neurônios parassimpáticos também inervam as células das glândulas responsáveis pela produção e secreção de muco. O subtipo de receptor muscarínico M3 também é responsável pela sinalização celular que culmina com a secreção de muco.

O receptor muscarínico M3 localizado na musculatura lisa das vias aéreas é um tipo de receptor transmembrana acoplado a proteína G. A ativação desse receptor é a responsável pelo aumento de atividade enzimática que resultará na síntese de mensageiros secundários. Os mensageiros secundários sintetizados são, no interior da célula muscular lisa das vias aéreas, os responsáveis pela resposta celular final frente ao estímulo colinérgico. Apesar de Yang; Mitzner e Hirshman (1991) demonstrarem que o receptor muscarínico das vias aéreas está acoplado a síntese de diversos mensageiros secundários, os principais segundos mensageiros responsáveis

pela resposta contrátil da musculatura lisa das vias aéreas são o trifosfato de inositol trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). No retículo rugoso das células musculares lisas das vias aéreas existem receptores de IP3. Ao se ligar a seus específicos receptores, o IP3 é capaz de aumentar o influxo de cálcio para fora do retículo, deixando-o livre para a interação com as cadeias leves de miosina. O DAG é responsável por ativar outras quinases que contribuem para o aumento da concentração de cálcio livre no citoplasma das células muscular lisa das vias aéreas.

O grupo de pesquisa de AMRANI e PANETTIERI (1998) demonstrou que o TNF é capaz de aumentar o acúmulo de IP3 induzido por bradicinina e NaF, um agonista que ativa diretamente a proteína G. Dessa forma é razoável sugerir que os efeitos do TNF sobre a responsividade de segmentos das vias aéreas ao cálcio pode ser devido a um efeito modulador direto sobre o mecanismo de transdução de sinal mediado pela proteína G. Chen et al. (2003) demonstraram que o TNF modula a responsividade de segmentos de traquéia estimulados com o agonista colinérgico. E de fato, quando incubados com TNF os segmentos de traquéia apresentaram aumento da resposta contrátil máxima frente ao estímulo colinérgico com carbacol.

Embora nossos resultados não apresentem esse tipo de avaliação, nós não descartamos a hipótese de que a modulação do LBP sobre a hiperreatividade brônquica pode estar relacionada aos agonistas contráteis acoplados a proteína G, visto que o LBP não foi eficaz em reduzir a hiperreatividade induzida por cloreto de potássio. Parece razoável supor que o mecanismo responsável pela hiperreatividade das vias aéreas existe, pelo menos em parte, através da disfunção da sinalização do receptor muscarínico, incluindo a sensibilização ao cálcio induzida por agentes colinérgicos contráteis. Além disso, considerando que este efeito é caracterizado pelo aumento do cálcio intracelular exógeno após a incubação com o TNF, é presumível que

in vivo algum agonista que aumente a concentração intracelular de cálcio através do influxo e/ou da liberação de cálcio seja capaz de produzir esse efeito. Dessa forma este efeito não seria restrito aos agonistas muscarínicos, mas sim um efeito geral a qualquer agonista contrátil.

A maioria dos agonistas que induzem o aumento da sensibilidade de segmentos de músculo liso ao cálcio, incluindo as células das vias aéreas, são agonistas contráteis e membros da família de receptores transmembrana acoplados a proteína G (IIUZUKA et al., 1997). O TNF não é um agonista contrátil por si só e seus receptores não pertencem à família dos receptores de membrana acoplados a proteína G. Os receptores de TNF consistem em uma única subunidade glicoprotéica transmembrana que dimeriza o TNF ativando o receptor (HELLER; KROHKE, 1994). Estas observações sugerem que o mecanismo de ação do LBP sobre a sensibilização de segmentos de brônquio intrapulmonar ao cálcio é pelo menos em parte, diferente da sensibilização acoplada ao receptor transmembrana.

Por outro lado, alguns resultados indicam que o TNF é capaz de alterar a resposta muscarínica do agonista (THOMAS; YATES; BARNES, 1995). Além disso, Takata et al. (1999) demonstraram que a fosfolipase A2 aumenta a contração de segmentos de traquéia de bovinos através de ação de TXA₂. Ainda nesse sentido, Chand et al. (1988) mostraram que esse efeito é inibido por agentes anti-TNF. A elevação do fluxo de cálcio pode contribuir para o aumento da sensibilização de segmentos de músculo liso das vias aéreas ao cálcio, e assim estabelecer a hiperreatividade brônquica. Esses mesmos autores observaram que a resposta contrátil colinérgica de segmentos de músculo liso de brônquio, ativada pela presença de cálcio foi significativamente maior após a incubação com TNF e que, este efeito se deveu aos estoques de cálcio intracelular.

Previamente, nossos resultados demonstraram que os níveis de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos foram reduzidos após a terapia com LBP. Neste estudo, após a irradiação com LBP os segmentos de traquéia incubados com TNF apresentaram um aumento da capacidade de relaxamento frente ao agonista β -adrenérgico. O presente estudo demonstrou que o LBP reduziu a hiperreatividade brônquica após a incubação com TNF. Além disso, o LBP reduziu de forma significativa a sensibilização de segmentos de brônquio ao cálcio após a exposição de TNF. Dessa forma é razoável sugerir, que o LBP foi eficaz em reduzir a hiperreatividade brônquica induzida por TNF através da redução da sensibilidade desses segmentos após a estimulação colinérgica.

Alguns autores demonstraram que o LBP é capaz de estimular a cadeia transportadora de elétrons aumentando a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) (KARU, 2003; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004). O aumento da síntese de ATP é um agente facilitador de reações enzimáticas celulares. Muitos canais iônicos de membrana possuem enzimas que tem como regulador de sua atividade o ATP. Com essa disponibilidade de ATP, o potencial elétrico da superfície da membrana das células pode sofrer alteração no seu limiar. Essas alterações de potencial de membrana podem acarretar em maior influxo de íons de seus reservatórios celulares em direção ao citoplasma celular. Contextualizando para a musculatura lisa das vias aéreas, muitos íons são importantes no controle do tônus contrátil muscular liso e na geração de força máxima, no entanto, dentre eles o íon cálcio desempenha uma importante função no processo de contração da musculatura lisa, como já citado anteriormente. De fato, estudos demonstraram que o LBP é capaz de modificar o potencial de membrana de alguns tecidos alterando o influxo de alguns íons que são importantes no processo de contração muscular.

Considerando os resultados que mostraram o efeito do TNF sobre o influxo de cálcio, é possível sugerir que o LBP possa estar atenuando o padrão de resposta contrátil na hiperreatividade brônquica através da redução da sensibilidade desses segmentos de músculo liso ao cálcio. Embora pareça ter alterado o influxo de cálcio, no presente estudo o LBP não foi eficaz em reduzir a resposta contrátil induzida por despolarização (KCl) direta do músculo liso desses brônquios. É importante ressaltar que a amplitude de contração no músculo liso das vias aéreas pode depender do tipo de agonista contrátil, do grau de estimulação e do próprio tecido (JANSSEN et al., 2001).

Nossos resultados sugerem que a TLBP pode modular a hiperreatividade brônquica através da redução da sensibilidade desses segmentos ao cálcio, induzida pelo agonista colinérgico (carbacol). Broide et al. (1992) demonstraram que o TNF não é capaz de alterar o número e a densidade de receptores de ACh na musculatura lisa das vias aéreas, mas sugere que o TNF pode interferir no processo de sinalização celular pós-receptor. Por outro lado, SAKAI et al. (2004) revelaram que a contração do músculo liso de segmentos de brônquio, induzida por um agonista de TXA₂ (U-46619) também foi aumentada após a exposição ao TNF. Esses resultados indicam que o efeito do TNF sobre as vias aéreas não é específico para a sinalização do receptor muscarínico.

Os efeitos tóxicos do TNF *in vivo*, tais como aumento da temperatura corpórea, redução dos níveis de glicose do plasma e aumento da taxa de mortalidade, são prevenidos com o tratamento de inibidores da COX (KETTELHUT; FIERS; GOLDBERG, 1987). Vários estudos mostram que a exacerbação da resposta contrátil após exposição ao TNF pode ser mediada pelos produtos derivados da COX-2, em

especial pelo TXA₂ (TOWNLEY; HORIBA, 2003). Outros pesquisadores têm mostrado que células de músculo liso das vias aéreas quando expostas a incubação com TNF apresentaram aumento da atividade de COX-2 com conseqüente aumento dos níveis de TXA₂ (ANTICEVICH et al., 1995; BELVISI et al., 1997).

Nesse contexto, a redução da hiperreatividade brônquica induzida pelo TNF pode ser, pelo menos em parte, através da inibição de TXA₂. Nosso grupo demonstrou previamente que o LBP reduziu a hiperreatividade de segmentos de traquéia a metacolina assim como a infiltração de neutrófilos para o pulmão, através da redução dos níveis de TXA₂ do fluido do lavado bronco-alveolar de ratos em um modelo de inflamação pulmonar desencadeado por LPS, já descrito. Considerando essas observações é razoável sugerir que o efeito antiinflamatório do LBP, após a exposição ao TNF, pode ser devido à inibição de TXA₂ derivado de COX-2. Vale ressaltar que embora o efeito antiinflamatório do LBP sobre os níveis de TXA₂ no lavado bronco-alveolar tenha sido analisado em animais que receberam LPS e não TNF, já está bem caracterizado por diversos autores que o LPS causa alterações deletérias nas vias aéreas de ratos e humanos, através da liberação de TNF pelas células inflamatórias e pelas células do próprio tecido (BRANDOLINI et al., 2001).

Ainda nesse sentido, Swierkosz et al. (1995) demonstraram que o aumento da expressão da enzima COX-2 modula a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) após a incubação de células de músculo liso das vias aéreas com TNF. Clancy et al. (2000) demonstraram em cultura de células de macrófagos e fibroblastos de pulmão de camundongos que quando a atividade da COX aumenta inversamente a atividade enzimática da NOS parece diminuir. Desta forma, sem a presença do óxido nítrico derivado da NOS, o balanço entre essas duas vias de efeitos opostos, torna-se mais favorável à síntese de prostanóides bronco-constritores como a TXA₂. A concentração

aumentada de TXA₂ é uma forte candidata a responsável pela hiperreatividade das vias aéreas após intoxicação com LPS ou TNF. Além disso, Gong et al. (1992) demonstraram que o ácido araquidônico (AA) e os derivados do metabolismo da COX-2 são capazes de inibir a fosfatase de miosina, levando a um aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina das vias aéreas.

A despeito do mecanismo da hiperreatividade das vias aéreas ser mais bem compreendido atualmente, ainda existem importantes aspectos desta fisiopatologia que não foram esclarecidos. Além disso, as interações entre as células e os mediadores inflamatórios apresentam particularidades que dependem do modelo de inflamação pulmonar escolhido. O efeito direto do TNF ou aquele mediado pelos produtos do metabolismo da COX-2 interferem na mobilização de cálcio no músculo liso das vias aéreas e dessa forma podem aumentar a sensibilidade desses tecidos aumentando a resposta contrátil. A partir dos nossos resultados foi possível avaliar que o LBP foi eficaz em reduzir o efeito do TNF sobre a reatividade de segmentos de brônquio intrapulmonar, e parece que este efeito é mediado pela redução da sensibilidade desses segmentos ao cálcio. Evidentemente que os resultados apresentados no presente estudo não mostram qual a via sinalização do LBP está envolvida neste tipo de efeito, mas sugere que o LBP pode ser eficaz em alguma condição onde a sinalização celular é capaz de induzir a liberação de cálcio. De fato, a maioria dos agonistas que causam contração do músculo liso das vias aéreas faz uso da disponibilidade aumentada de cálcio para dar início à contração muscular. Dessa forma é possível que o efeito do LBP sobre a hiperreatividade brônquica possa ser modulado pelo aumento da sensibilidade de segmentos das vias aéreas ao cálcio após o estímulo colinérgico. Mais uma vez, o LBP alcançou resultados promissores inibindo a inflamação das vias aéreas em um modelo experimental induzido pelo TNF.

O presente estudo mostrou que o LBP foi eficaz em reduzir a hiperreatividade brônquica através da redução da sensibilidade desses segmentos ao cálcio em um modelo de inflamação das vias aéreas. É importante ressaltar que o efeito antiinflamatório do LBP parece ser realmente mediado pela inibição do TNF, pelo menos no que diz respeito à hiperreatividade de segmentos das vias aéreas e a inflamação pulmonar.

A eficácia da TLBP sobre a inflamação pulmonar e sobre as alterações da musculatura lisa das vias aéreas induzidas pelo TNF, nos estimulou a investigar o efeito da TLBP sobre a mecânica pulmonar de ratos após a administração de LPS. Como já descrito, o LPS altera a capacidade contrátil do diafragma de ratos (WILCOX; OSBORNE; BRESSLER, 1992) e alguns autores demonstraram através de interferência farmacológica, que a inibição de TNF aumenta a força de contração do diafragma (REID; LÄNNERGREN; WETERBLAD, 2002; WILCOX et al., 1994; WILCOX; MILIKEN; BRESSLER, 1996).

A fraqueza da musculatura esquelética é uma complicação comum dentre as principais doenças inflamatórias. Alguns estudos clínicos mostraram que a fraqueza de músculos esqueléticos é comum em indivíduos que apresentam doença pulmonar obstrutiva crônica e sepse. A fraqueza muscular, ou seja, a incapacidade muscular esquelética de realizar contração normal pode ser observada em modelos experimentais de peritonite séptica e endotoxemia. A disfunção contrátil do diafragma pode contribuir para o déficit na relação entre ventilação e perfusão, que é uma importante característica da inflamação crônica. Vários autores relatam o efeito do TNF sobre a contratilidade do diafragma de ratos, e a grande maioria desses estudos indica que esta citocina pró-inflamatória é a principal orquestradora da resposta inflamatória aguda e perpetuadora da resposta inflamatória crônica.

A observação de que mediadores inflamatórios são capazes de comprometer a resposta contrátil de diafragma foi feita pela primeira vez por Wilcox; Osborne e Bressler (1992). Nesse estudo, os autores demonstraram que preparações de diafragma de hamster quando incubadas com sobrenadante de uma suspensão de monócitos ativados, apresentaram redução da força de contração frente ao estímulo elétrico. Estudos realizados por outros dois diferentes grupos de cientistas liderados por Reid et al. (1992) e Alloatti et al. (2000), identificaram o TNF como o principal mediador responsável pela fraqueza muscular esquelética. Ainda nesse sentido, Wilcox et al. (1994) demonstraram que a infusão de TNF recombinante reduziu a pressão trans-diafragmática.

O TNF inibe a força de contração da musculatura esquelética e cardíaca. Ensaio experimental com miócitos cardíacos realizados por Wilcox; Miliiken e Bressler (1996) demonstraram que a exposição direta ao TNF é capaz de causar efeito inotrópico negativo que é desencadeado por uma redução da concentração de cálcio durante a contração sistólica. Neste mesmo viés, Wilcox; Miliiken e Bressler (1996) relataram que a administração intravenosa de TNF reduziu o potencial de ação da membrana de músculo de diafragma de cães. Esses resultados sugerem que o TNF pode reduzir a liberação de cálcio dependente de voltagem. Em contrapartida, esses autores observaram que o TNF não alterou a concentração intracelular de cálcio durante a contração tetânica. Nenhuma alteração na concentração de cálcio foi observada nas fibras musculares em repouso. O fato da produção de força muscular não ter sido afetada pela variação da concentração de cálcio intracelular nos faz sugerir que o efeito do TNF pode ser explicado por uma disfunção na sinalização celular de cálcio frente ao estímulo elétrico.

No presente estudo nós investigamos o efeito da TLBP sobre a resposta

contrátil de diafragma de ratos após a injeção intravenosa de LPS. Os resultados apresentados mostram que o LBP foi capaz de aumentar a resposta contrátil do músculo diafragma e reduzir a concentração de TNF em homogenato de tecidos de diafragma após a exposição ao LPS. Os resultados descritos presentemente discutem o efeito da TLBP sobre a contratilidade da musculatura diafragmática e se a modulação deste efeito pode ser mediada pelo TNF. Mais uma vez o TNF parece ser alvo da TLBP. É importante lembrar que o efeito benéfico do LBP pode ser mediado também através de outros mediadores inflamatórios que participam da inflamação pulmonar e que, em outros modelos experimentais de inflamação, já foram inibidos pelo laser (AIMBIRE et al., 2005). No entanto, os resultados mostram que o efeito inibitório do LBP sobre o TNF parece ser uma importante via de sinalização capaz de atenuar a resposta inflamatória.

A literatura relata resultados que mostram que o LBP é capaz de modificar o potencial de membrana de diafragma de camundongos (ROCHKIND et al., 1989; ROCHKIND; OUAKNINE, 1992; SAMOLILOV, 1991). Esta modificação do potencial da superfície da membrana celular altera o influxo de alguns íons que são importantes no processo de contração da musculatura esquelética. O cálcio é um íon particularmente importante neste processo, e estudos demonstram que o TNF é capaz de alterar o potencial de membrana da musculatura esquelética (TRACEY; BEUTLER; LOWRY, 1986; YOKOHAMA et al., 1993). Tomados em conjunto, essas observações nos fazem sugerir que o LBP pode estar melhorando a resposta contrátil do diafragma de ratos submetidos à injeção intravenosa de LPS através da inibição desta citocina. Uma concentração menor de TNF sendo liberada pelas células presentes e que migraram para o local da inflamação poderia contribuir para a normalização do potencial de membrana desses tecidos.

Alguns estudos mostram o efeito do LBP sobre a junção neuromuscular de músculo diafragma de ratos. Nicolau et al. (2004) demonstraram que o LBP pode estimular a liberação de neurotransmissor na junção neuromuscular após a estimulação elétrica de diafragma de ratos. A partir desses resultados, é possível especular que o aumento da resposta contrátil de diafragma de ratos após a injeção intravenosa de LPS se deve a um efeito do laser sobre a transmissão neuronal, aumentando a neurotransmissão muscular. Ou talvez, como os resultados ainda são muito primários, a melhor explicação para o efeito benéfico do LBP seja a redução dos níveis de TNF, e conseqüentemente a melhora da resposta contrátil desses segmentos.

Além dos resultados do efeito da TLBP sobre a disfunção contrátil do diafragma, o presente estudo avaliou também a concentração de TNF em homogenato de tecidos de diafragma de ratos após a administração intravenosa de LPS. Vários estudos mostram que indivíduos e animais experimentais intoxicados com LPS apresentam níveis aumentados de TNF circulante e tecidual. Resultados prévios apresentados pelo nosso grupo já mostraram que a TLBP reduz o nível de TNF do fluido do lavado bronco-alveolar de ratos em modelo de inflamação pulmonar desencadeado por reação imunológica (AIMBIRE et al., 2006). Mais uma vez, parece que o efeito benéfico do LBP está relacionado à inibição do TNF.

O ensaio experimental utilizado no presente estudo não permite uma análise precisa de como o LBP pode estar interferindo com a concentração de TNF nos tecidos de diafragma de ratos após a exposição ao LPS. Os resultados obtidos com clorpromazina, um inibidor da síntese de TNF, indicam a participação deste mediador na disfunção contrátil do diafragma frente à estimulação elétrica. Além disso, como era de se esperar, a clorpromazina reduziu a concentração de TNF no homogenato de

tecido de diafragma de ratos após a exposição ao TNF. Apesar do efeito do LBP sobre a concentração de TNF em homogenato de diafragma ser similar àquele observado após o tratamento com clorpromazina, não é correto imaginar que o laser esteja agindo da mesma forma que a clorpromazina, ou seja, inibindo a síntese de TNF. É possível que o LBP possa estar restaurando a resposta contrátil do diafragma e reduzindo os níveis de TNF em homogenato desses tecidos através de uma outra via de sinalização que pode ser diferente do efeito da clorpromazina.

Outro ponto de vista abordado neste estudo é que fatores metabólicos podem alterar a resposta contrátil da musculatura esquelética, desde que a taxa de síntese de glicogênio induzida pela insulina é de fundamental importância na geração de força muscular. Dinarello et al. (1984) demonstraram o efeito do TNF sobre a diferenciação muscular e o metabolismo modulado pela insulina em cultura de células musculares esqueléticas. Esses autores observaram que o TNF impediu de forma significativa a diferenciação de células musculares e atenuou o efeito da insulina sobre a síntese de glicogênio. Alguns autores têm mostrado que o TNF é capaz de interferir com o metabolismo celular (DINARELLO et al., 1984). Kettelhut; Fiers e Goldberg (1987) demonstraram ainda que esses efeitos possam ser mediados pelos produtos da COX, visto que o pré-tratamento desses animais com indometacina ou ibuprofen, preveniu completamente a diarreia, a cianose, a hipotermia, a acidose e a letalidade desses animais. Considerando esses resultados, é razoável sugerir que o LBP, ao inibir o TNF, possa melhorar a relação entre fatores metabólicos importantes como a insulina e o glicogênio, aumentando assim a capacidade contrátil da musculatura esquelética do diafragma de ratos após a exposição ao LPS.

Por fim, nossos resultados concluem que a TLBP é capaz de atenuar a disfunção contrátil através do aumento da contratilidade desses tecidos frente à

estimulação elétrica e da redução dos níveis de TNF tecidual. O mecanismo de ação do LBP anda não está totalmente elucidado, mas nossos resultados indicam que o efeito antiinflamatório da TLBP possa ser modulado pelos níveis de TNF.

5. Conclusão

1 – O laser de baixa potência é capaz de atenuar a hiperreatividade de segmentos de traquéia e a migração de células inflamatórias para o pulmão através da redução dos níveis de TXA_2 e PGE_2 , em lavado bronco-alveolar de ratos após a exposição ao LPS.

2 – A irradiação com laser de baixa potência é capaz de reduzir os níveis de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos após a reação imunológica induzida através de imuno-complexo.

3 – A terapia com laser de baixa potência reduziu a hemorragia pulmonar e os níveis de TNF no lavado bronco-alveolar de ratos após reação imunológica induzida através de imuno-complexo.

4 – A capacidade de relaxamento e a concentração de AMPc de segmentos de traquéia expostos ao TNF foi restaurada pelo laser de baixa potência após a irradiação com laser.

5 – A fotorradiação com laser de baixa potência reduziu a hiperreatividade e a hipersensibilidade brônquica de ratos ao cálcio após a exposição ao TNF.

6 – O laser de baixa potência aumentou a resposta contrátil de músculo diafragma e reduziu os níveis de TNF nesses tecidos, após a administração intravenosa de LPS.

Referências Bibliográficas

AIMBIRE, F.; ALBERTINE, R.; MAGALHÃES, R. G.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; CASTRO FARIA NETO, H. C.; ZANGARO, R. A.; CHAVANTES, C.; PACHECO, M. T. T. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 1, p. 11-20, 2005.

AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M. T.; CASTRO –FARIA- NETO, H. C.; LEONARDO, P. S.; IVERSEN, V. V.; LOPES-MARTINS R. A .B.; BJORDAL, J. M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 1, p. 33-37, 2006.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S. A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; ZANGARO, R. (2004). Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan-induced paw oedema. **J Photochem Photobiol B**, v. 74, 101-107, 2004.

ALLOATTI, G.; PENNA, C.; MARIANO, F.; CAMUSSI, G. Role of NO and PAF in the impairment of skeletal muscle contractility induced by TNF-alpha. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 6, p. 2156-2163, 2000.

AL-WATBAN, F. A.; ZHANG, X. Y. Comparison of wound healing process using Argon and Krypton lasers. **J Clin Laser Med Surg**, v. 15, n. 5, p. 209-215, 1997.

AMRANI, Y.; AUBIER, M.; BRONNER, C. Interaction between tumor necrosis factor-alpha and the smooth muscle cells of the airway: implication in the physiopathology of asthma. **Rev Mal Respir**, v. 13, n. 6, p. 539-546, 1996.

AMRANI, Y.; MARTINET, N.; BRONNER, C. Potentiation by tumor necrosis factor-a of calcium signals induced by bradykinin and carbachol in human tracheal smooth muscle cells. **Br J Pharmacol**, v. 114, p. 4-5, 1995.

AMRANI, Y.; PANETTIERI, R. A. Jr. Cytokines induce airway smooth muscle cell hyper-responsiveness to contractile agonists. **Thorax**, v. 53, n. 8, p. 713-716, 1998.

AMRANI, Y.; PANETTIERI, R. A. Modulation of calcium homeostasis as a mechanism for altering smooth muscle responsiveness in asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 2, n. 1, p. 39-45, 2002.

ANDO, M.; SHIMA, M.; ADACHI, M.; TSUNETOSHI, Y. The role of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES) in the relationship between air pollution and asthma among children. **Arch Environ Health**, v. 56, n. 3, p. 227-233, 2001.

ANTICEVICH, S. J.; HUGHES, J. M.; BLACK, J. L.; ARMOUR, C. L. Induction of human airway hyper-responsiveness by tumor necrosis factor- α . **Eur J Pharmacol**, v. 284, p. 221-225, 1995.

ARM, J. P.; SPUR, B. W.; LEE, T. H. Leukotrienes C₄, D₄, E₄ enhance histamine responsiveness in asthmatic airways. **Am Rev Resp Dis**, v. 144, p. 1053-1057, 1991.

BAI, T. R.; MAK, J. C.; BARNES, P. J. Beta 2 adrenergic receptors in asthma: a current perspective. **Lung**, v. 170, n. 3, p. 125-141, 1992.

BALUK, P.; MCDONALD, D. M. The beta 2-adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvascular leakage by inhibiting endothelial gap formation. **Am J Physiol**, v. 266, n. 4, p. 461-468, 1994.

BARNES, P. J. Neural control of human airways in health and disease. **Am Rev Respir Dis**, v. 134, p. 1289-1314, 1986.

BARNES, P. J. Neural mechanisms in asthma. **Br Med Bull**, v. 48, n. 1, p.149-168, 1992.

BARNES, P. J. Effect of beta-agonists on inflammatory cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 104, n. 2, p. 10-17, 1999.

BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg. Med**, v. 9, p. 1-5, 1989.

BASFORD, J. R. Laser Therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopaedics**, v.16, n. 5: 541-547, 1993.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.

BECK, K. C.; VETTERMANN, J.; FLAYAHAN, N. A.; REHDER, K. Muscarinic M₁ receptors mediate the increase in pulmonary resistance during vagus nerve stimulation in dogs. **Am Rev Respir Dis**, v. 136, n. 5, p. 1135-1139, 1987.

BELVISI, M. G.; SAUNDERS, M. A.; HADDAD, E-B.; HIRST, S. J.; YACOUB, M. H.; BARNES, P. J.; MITCHELL, J. A. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. **Br J. Pharmacol**, v. 120, p. 919-916, 1997.

BENTLEY, A. M.; MENG, Q.; ROBINSON, D. S.; HAMID, Q.; KAY, A. B.; DURHAM, S. R. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 1993.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 625-55, 1989.

BIGAUD, M.; JULOU-SHAEFFER, G.; PARRAT, J. C.; STOCLET, J. C. Endotoxin induced impairment of vascular smooth muscle contractions elicited by different mechanisms. **Eur J Pharmacol.**, v.190, p. 1985-1992, 1992.

BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M. I.; IVERSEN, V.; AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Low Level Laser Therapy (LLLT) I 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. 160-170, 2006.

BLESS, N. M.; TOJO, S. K.; KAWARAI, H.; NATSUME, Y.; LENTSCH, A. B.; PADGAONKAR, V. A.; CZEMAK, B. J.; SCHMAL, H.; FRIEDL, H.P.; WARD, P. A. Differing patterns of P-selectin expression in lung injury. **Am J pathol**, v. 153, n. 4, p. 1113-1222, 1998.

BLOEMEN, P. G.; VAN DEN TWEEL, M. C.; HENRICKS, P. A.; ENGELS, F.; KESTER, M. H.; VAN DE LOO, P. G.; BLOMJOUS, F. J.; NIJKAMP, F. P. Increased cAMP levels in stimulated neutrophils inhibit their adhesion to human bronchial epithelial cells. **Am J physiol**, v. 272, n. 4, p. 580-587, 1997.

BOULNOIS, J. L. Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. **Lasers surg med**, v. 1, p. 47-66, 1985.

BOUMA, M. G.; BUURMAN, W. A.; VAN DEN WILDENBERG, F. A. (1996). Low energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells. **Lasers surg med**, v. 19, n. 2, p. 207-215, 1996.

BOUSQUET, J.; JEFFERY, P. K.; JOHNSON, M.; VIGNOLA, A. M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **Am j respir crit care med**, v. 161, n. 5, p. 1720-1745, 2000.

BOWDEN, J.J.; SULAKVELIDZE, I.; MCDONALD, D. M. Inhibition of neutrophil and eosinophil adhesion to venules of rat trachea by beta 2-adrenergic agonist formoterol. **J appl physiol**, v.77, n. 1, p. 397-405, 1994.

BOZIC, C. R.; LU, B.; HOPKEN, U. E.; GERARD, C.; GERARD, N. P. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. **Science**, v. 20, n. 273, p. 1722-1725, 1996.

BRADDING, P.; ROBERTS, J. A.; BRITTEN, K. M.; MONTEFORT, S.; DJUKANOVIC, R.; MUELLER, R.; HEUSSER, C. H.; HOWARTH, P. H.; HOLTGATE, S. T. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.10, n. 5, p. 471-480, 1994.

BRANDOLINI, L.; INTILANGELO, A.; CASELLI, G.; BERTINI, R. Role of tumor necrosis factor-alpha in endotoxin-induced lung parenchymal hyporesponsiveness in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 8, p. 1141-1144, 2001.

BREALEY, D.; BRAND, M.; HARGEAVES, I.; HEALES, S.; LAND, J.; SMOLENSKI, R.; DAVIES, N. A.; COOPER, C. E.; SINGER, M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. **Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 219-223, 2002.

BROIDE, D. H.; LOTZ, M.; CUOMO, A. J.; COBURN, D. A.; FEDERMAN, E. C.; WASSERMAN, S. I. Cytokines in symptomatic asthma airways. **J Allergy Clin Immunol**, v. 89, n. 5, p. 958-967, 1992

BROSSEAU, L.; WELCH, V.; WELLS, G.; TUGWELL, P.; DE BIE, R.; GAM, A.; HARMAN, K.; SHEA, B.; MORIN, M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **J Rheumatol**, v. 27, n. 8, p. 1961-1969, 2000.

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

BUTCHERS, P. R.; SKIDMORE, I. F.; VARDEY, C. J.; WHEELDON, A. Characterization of the receptor mediating the antianaphylactic effects of beta-adrenoceptor agonists in human lung tissue in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 71, n. 2, p. 663-667, 1980.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J. A. Effects of diclofenac sodium and HeNe laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J. Clin Laser Med Surg**, v. 16, n. 6, p. 317-320, 1998.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J. A. The relative effects of He Ne laser and meloxicam on experimentally induced inflammation. **Laser Therapy**, v. 11, n. 1, p. 36-41. 1999

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci**, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CAVAILLON, J-M.; MUNOZ, C.; FITTING, C.; MISSET, B.; CARLET, J. Circulating Cytokines: The tip of the iceberg? **Circulatory Shock**, v. 38, p. 145-152, 1992.

CHAND, N.; DIAMANTIS, W.; MAHONEY, T. P.; SOFIA, R. D. Phospholipase A2 induced airway hyper-reactivity to cooling and acetylcholine in rat trachea: pharmacological modulation. **Br J Pharmacol**, v. 94, n. 4, p. 1057-1062, 1988.

CHEN, H.; TLIBA, O.; VAN BESIEN, C. R.; PANETTIERI, R. A.; AMRANI, Y. TNF- α modulates murine tracheal rings responsiveness to G-protein-coupled receptor agonists and KCl. **J Appl Physiol**, v. 95, p. 864-872, 2003.

CHIBA, Y.; MISAWA, M. The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyper-responsiveness. **J Smooth Muscle Res**, v. 40, n. 4-5, p. 155-67, 2004.

CHURCH, M. K.; HIROI, J. Inhibition of IgE-dependent histamine release from human

dispersed lung mast cells by anti-allergic drugs and salbutamol. **Br J Pharmacol**, v. 90, n. 2, p. 421-429, 1987.

CLANCY, R. M.; AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis Rheum**, v. 41, p. 1141, 1998.

CLANCY, R.; VARENIKA, B.; HUANG, W.; BALLOU, L.; ATTUR, M.; AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. **J Immunol**, v. 165, n. 3, p. 1582-1587, 2000.

COMTOIS, A. S.; BERREIRO, E.; HUANG, P. L.; MARETTE, A.; PRRALD, M.; HUSSAIN, S. N. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction and sarcolemmal injury in mice lacking the neuronal nitric oxide synthase. **Am J Respir Crit Care Med**, v.163, n.4, p.977-982, 2001.

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.

COOK, S. J.; SMALL, R. C.; BERRY, J. L.; CHIU, P.; DOWNING, S. J.; FOSTER, R. W. β -adrenoceptor subtypes and plasmalemmal K^+ -channels in trachealis muscle. **Br. J. Pharmacol**, v.109, p. 1140-1148, 1993.

COSTA J. J.; MATOSSIAN, K.; RESNICK, M. B.; WONG, D. T.; GORDON, J. R.; DVORAK, A. M.; WELLER, P. F.; GALLI, S. J. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. **J Clin Invest**, v. 91, n. 6, p. 2673-2684, 1993.

COSTELLO, R. W.; EVANS, C. M.; YOST, B. L.; BELMONTE, K. E.; GLEICH, G. J.; JACOBY, D. B.; FRYER, A. D. Antigen-induced hyper-reactivity to histamine: role of the vagus nerves and eosinophils. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5, p. 709-714, 1999.

CROUSER, E. D.; JULIAN, M. W.; DORINSKY, P. M. Ileal VO(2)-O(2) alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 4, p. 1347-1353, 1999.

DAFFONCHIO, L.; ABBRACCHIO, M. P.; HERNADEZ, A.; GIANI, E.; CATTABENI, F.; OMINI, C. Arachidonic acid metabolites induce beta-adrenoceptor desensitization in rat lung in vitro. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 799-809, 1985.

DEL PRETE, G.; MAGGI, E.; PARRONCHI, P.; CHRETIEN, I.; TIRI, A.; MACHIA, D.; RICCI, M.; BANCHEREAU, J.; DE VRIES, J.; ROMAGNANI, S. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. **J Immunol**, v. 15, n.140, p. 4193-4198, 1988.

DEVALIA, J. L.; SAPSFORD, R. J.; RUSZNAK, C.; TOUMBIS, M. J.; DAVIES, R. J. The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro. **Pulm Pharmacol**, v. 5, n. 4, p. 257-263, 1992.

DINARELLO, C. A.; BEMHEIM, H. A.; DUFF, G. W.; LE, H. V.; NAGABHUSHAN, T. L.; HAMILTON, N. C.; COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. **J Clin Invest**, v. 74, n. 3, p. 906-913, 1984.

DRAZEN, J. M.; AUSTEN, K. F.; LEWIS, R. A.; CLARCK, D. A.; GOTO, G.; MARFAT, A.; COREY, E. J. Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro. **Proc. Nat. Acad. Sci**, v. 77, p. 4354-4358, 1980.

DRURY, D. E.; CHONG, L. K.; GHARAMANI, P.; PEACHELL, P. T. Influence of receptor reserve on beta-adrenoceptor-mediated responses in human lung mast cells. **Br J Pharmacol**, v. 124, n. 4, p. 711-718, 1998.

DUPONT, L. J.; PYPE, J. L.; DEMEDTS, M. G.; DE LEYN, P.; DENEFFE, G.; VERLEDEN, G. M. The effects of 5-HT on cholinergic contraction in human airways *in vitro*. **Eur Respir J**, v. 14, p. 642-649, 1999.

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, n. 4, 433-437, 1996.

ERMERT, L.; ERMERT, M.; GPELT-STRUEBE, M.; WALMRATH, D.; GRIMMINGER, F.; STEUDEL, W.; GHOFRANI, H. A.; HOMBERGER, C.; DUNCKER, H-R.; SEEGER, W. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lung. **Am. J. Respir Cell Mol Biol**, v.18, p. 479-488, 1998.

ERMERT, M.; MERKLE, M.; MOOTZ, R.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; ERMERT, L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 278, p. 1195-1203, 2000.

EVANS, C. M.; JACOBY, D. B.; GLEICH, G. J.; FRYER, A. D.; COSTELLO, W.. Antibody to eosinophil major basic protein protects M2 receptor function in antigen challenged guinea pigs *in vivo*. **J Clin Invest**. v. 100, p. 2254-2262, 1997.

FAHAL, I. H.; BELL, G. M.; BONE, J. M.; EDWARDS, R. H. Physiological abnormalities of skeletal muscle in dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, n. 1, p. 119-127, 1997.

FAHY, J. J. Remodeling of the airway epithelium in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 15, n. 164(10 Pt 2), p. 46-51, 2001.

FERREIRA, D. M., ZANGARO, R. A., VILLAVARDE, A. B., CURY, Y., FRIGO, L., PICCOLO, G., LONGO, I., BARBOSA, D. G. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed Laser Surg**, v.23, n.2, p.177-181, 2005.

FINOTTO, S.; OHNO, I.; MARSHALL, J. S.; GAULDIES, J.; DENBURG, J. A.; DOLOVICH, J.; CLARK, D. A.; JORDANA, M. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). **J Immunol**, v. 153, n. 5, p. 2278-2289, 1994.

FISCHER, B. M.; KRUNKOSKY, T. M.; WRIGHT, D. T.; DOLAN-O'KEEFE, M.; ADLER,

K. B. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates mucin secretion and gene expression in airway epithelium in vitro. **Chest**, v. 107, n. 3, p. 133-135, 1995.

FLEMMING, K. A.; CULLUM, N. A.; NELSON, E. A. A systematic review of laser therapy for venous leg ulcers. **J Wound Care**, v. 8, n. 3, p. 111-114, 1999.

FOLKERTS, G. ; NIJKAMP. Airway epithelium: more than just a barrier! **Trends Pharmacol Sci**, v. 19, n. 8, p. 334-341, 1998.

FRANCO-PENTEADO, C. F.; DE SOUZA, I. A.; CAMARGO, E. A.; TEIXEIRA, S. A.; MUSCARA, M. N.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Mechanisms involved in the enhancement of allergic airways neutrophil influx by permanent C-fiber degeneration in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, n. 1, p. 440-448, 2005.

FRYER, A. D.; ADAMKO, D. J.; YOST, B. L.; JACOBY, D. B. Effects of inflammatory cells on neuronal M2 muscarinic receptor function in the lung. **Life Sci**, v. 64, n. (6-7), p. 449-455, 1999.

FRYER, A. D.; MACLAGAN, J. Muscarinic inhibitory receptors in pulmonary parasympathetic nerves in the guinea-pig. **Br J Pharmacol**, v. 83, n. 4, p. 973-978, 1984.

FUJIMURA, N.; SUMITA, S.; AIMONO, M.; MASUDA, Y.; SHICHINOHE, Y.; NARIMATSU, E.; NAMIKI, A. Effect of free radical scavengers on diaphragmatic contractility in septic peritonitis. **Am J Respir Crit Care Med**. v.162, n. 6, p. 2159-2165, 2000.

FUJITA, A.; TAKEUCHI, T.; NAKAJIMA, H.; NISHIO, H.; HATA, F. Involvement of heterotrimeric GTP-binding protein and rho protein, but not protein kinase C, in agonist-induced Ca^{+2} sensitization of skinned muscle of guinea pig vas deferens. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 274, p. 555-561, 1995.

GALANT, S. P.; ALLRED, S.; GRIFFITHS, R. Characterization of adenylate cyclase activity in asthmatic neutrophil sonicates. **Am Rev Respir Dis**, v. 122, n. 2, p. 231-238, 1980.

GAO, Y. Q.; LIU, T. C.; TANG, X. J. Intravascular low-intensity He-Ne laser irradiation therapy on idiopathic edema. **Proc SPIE**, v. 3344, p. 167-170, 1998.

GOLDMAN, J. A.; CHIAPELLA, J.; CASEY, H.; BASS, N.; GRAHAM, J.; MCCLATCHEY, W.; DRONAVALLI, R. V.; BROWN, R.; BENNETT, W. J.; MILLER, S. B.; WILSON, C. H.; PEARSON, B.; HAUN, C.; PERSISNKY, L.; HUEY, H.; MUCKERHEIDE, M. Laser therapy of rheumatoid arthritis. **Lasers Surg Med**. v. 1, n. 1, p. 93-101, 1980.

GOLUSZKO, E.; DENG, C.; POUSSIN, M. A.; CHRITADOSS, P. Tumor necrosis factor receptor p55 and p75 deficiency protects mice from developing experimental autoimmune myasthenia gravis. **J Immunol**. p. 85 – 93, 2002.

GONG, M. C.; FUGLSANG, A.; ALESSI, D.; KOBAYASHI, S.; COHEN, P.; SOMLYO, A.

V.; SOMLYO, A. P. Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. **J Biol Chem**, v. 267, n. 30, p. 21492-21498, 1992.

GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. **Immunol Today**, v. 11, n. 12, p. 458-464, 1990.

GOSSET, P.; TSICOPOULOS, A.; WALLAERT, B.; VANNIMENUS, C.; JOSEPH, M.; TONNEL, A. B.; CAPRON, A. Increased secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. **J Allergy Clin Immunol**, v. 88, n. 4, p. 561-571, 1991.

GUO, M.; PASCUAL, R. M.; WANG, S.; FONTANA, M. F.; VALANCIUS, C. A.; PANETTIERI, R. A.; TILLEY, S. L.; PENN, R. B. Cytokines regulate β_2 adrenergic receptor responsiveness in airway smooth muscle via multiple PKA- and EP2 receptor-dependent mechanism. **Biochemistry**, v. 44, p. 13771-13782, 2005.

GUR, A.; COSUT, A.; SARAC, A. J. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. **Lasers Surg Med**, v.33, p. 330-338, 2003.

HAAS, A. F.; ISSEROFF, R. R.; WHEELAND, R. G.; ROOD, P. A.; GRAVES, P. J. Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 94, n. 6, p. 822-826, 1990.

HADDAD, E. B.; ROUSSEL, J. Regulation of the expression and function of the M2 muscarinic receptor. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19, p. 322-327, 1998.

HADJOKAS, N. E.; CROWLEY, J. J.; BAYER, C. R.; NIELSON, C. P. Beta-adrenergic regulation of the eosinophil respiratory burst as detected by lucigenin-dependent luminescence. **J Allergy Clin Immunol**, v. 95, n. 3, 735-741, 1995.

HAKONARSON, H.; HERRICK, D. J.; SERRANO, P. G.; GRUNSTEIN, M. M. Autocrine role of interleukin 1beta in altered responsiveness of atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. **J Clin Invest**, v.99, n. 1, p. 117-124, 1997.

HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; HEDQUIST, P.; STRANDBERG, K., SAMUELSON, B. Involvement of endoperoxides and thromboxanes in anaphilatic reactions. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res**, v. 1, p. 495-501, 1976.

HAMBLIN, A. S. The role of cytokines in asthma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 629, p. 250-61, 1991.

HAMID, Q.; AZZAWI, M.; YING, S.; MOQBEL, R.; WARDLAW, A. J.; CORRIGAN, C. J.; BRADLEY, B.; DURHAM, S. R.; COLLINS, J. V.; JEFFERY, P. K. Interleukin-5 mRNA in mucosal bronchial biopsies from asthmatic subjects. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 94, n. 1-4, p. 169-170, 1991.

HELLER, R. A.; KRONKE, M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. **J Cell Biol**, v. 126, n. 1, p. 5-9, 1994.

HITCHCOCK, P. J.; LEIVE, L., MAKELA, H.; RIETSCHHELL, E. T.; STRITTMATTER, W.; MORRISON, D. C. Lipopolysaccharide nomenclature- past, present and future. **J. Bacteriol**, v. 166, p. 696-705, 1986.

HÖPKEN, U. E.; LU, B.; GERARD, N. P.; GERARD, C. Impaired inflammatory responses in the reverse Arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. **J Exp Med**, v.186, n. 5, p. 749-756, 1997.

HSU, Y.; CHIU, C.; WANG, C. Tumor necrosis factor-alpha enhances bradykinin-induced signal transduction via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK in canine tracheal smooth muscle cells. **Cell Signal**, v. 13, p. 633-643, 2001.

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 30, p. 633-673, 1990.

HUNTER, I.; COBBAN, H. J.; VANDENABEELE, P.; MACEWAN, D. J.; NIXON, G. F. Tumor necrosis factor-alpha-induced activation of RhoA in airway smooth muscle cells: role in the Ca²⁺ sensitization of myosin light chain20 phosphorylation. **Mol Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 714-721, 2003.

IIZUKA, K.; DOBASHI, K.; YOSHII, A.; HORIE, T.; NAKAZAWA, T.; MORI, M. Receptor-dependent G protein-mediated Ca²⁺ sensitization in canine airway smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 22, n. 1, p. 21-30, 1997.

IIZUKA, K.; YOSHII, A.; SAMIZO, K.; TSUKAGOSHI, H.; ISHIZUKA, T.; DOBASHI, K.; NAKAZAWA, T.; MORI, M. A major role for the rho-associated coiled coil forming protein kinase in G-protein-mediated Ca²⁺ sensitization through inhibition of myosin phosphatase in rabbit trachea. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 4, p. 925-933, 1999.

ISEKI, S. Immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the rat stomach. **Histochem J**, v. 27, n. 4, p. 323-328, 1995.

ITO, S; KUME, H.; HONJO, H.; KATOH, H.; KODAMA, I.; YAMAKI, K.; HAYASHI, H. Possible involvement of Rho kinase in Ca²⁺ sensitization and mobilization by MCh in tracheal smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 280, n. 6, p. 1218-1224, 2001.

JANSSEN, L. J.; WATTIE, J.; CHAO, L.; TAZZEO, T. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 3, p. 1142-1151, 2001.

JOHNSON, M.; COLEMAN, R. A. Mechanism of action of β -2 adrenoceptor agonists. *In* : BUSSE, W. W. ; HOLGATE, S. T. (ED.) **Asthma and Rhinitis**. Blackwell, Cambridge,1995. p. 1278-1295.

JOHNSON, M. The β -adrenoceptor. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, p. 146-153, 1998.

KARU, T. Low Power Laser Therapy. **Biomedical Photonics Handbook**, v.3, 1-25, 2003

KARU, T. I.; TIFLOVA, O. A. Effect of low-intensity monochromatic visible light on the growth of *Escherichia coli* cultures. **Mikrobiologia**, v. 56, n. 4, p. 626-630, 1987.

KAYE, M. G.; SMITH, L. J. Effect of inhaled leukotriene (LT) D₄ on the airway hyper-reactivity in normal subjects: Comparison with histamine and platelet activating factor (PAF) **Clin. Res**, v. 37, p. 478-480, 1989.

KELLEY, J. Cytokines of the lung. **Am Rev Respir Dis**, v. 141, n. 3, p. 765-788, 1990.

KETTELHUT, I. C.; FIERS, W.; GOLDBERG, A. L. The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by cyclooxygenase inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 84, p. 4237-4277, 1987.

KHOTIAINSTEV, K. S.; DOGER-GUERRERO, E.; GLABOVA, L.; SVIRID, V.; SIRENKO, Y. Laser blood irradiation effect on electrophysiological characteristics of acute coronary syndrome patients. **Proc SPIE**, v. 2929, p. 132-137, 1996.

KIELIAN, T. L.; ROSS, C. R.; MCVEY, D. S.; CHAPES, S. K.; BLECHA, F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. **Immunopharmacology**, v. 29, n. 3, p.187-205, 1995.

KING, P. R. Low-level laser therapy: a review. **Physio Theory Pract**, v. 6, p. 127-138. 1990.

KIPS, J. C.; CUVELLIER, C. A.; PAUWELS, R. A. Effect of acute and chronic antigen inhalation on air way morphology and responsiveness in actively sensitized rats. **Am Rev Respir Dis**, v. 145, n. 6, p. 1306-1310, 1993.

KIPS, J. C.; TAVERNIER, J.; PAUWELS, R. A. Tumor necrosis factor causes bronchial hyper-responsiveness in rats. **Am Rev Respir Dis**, v. 145, n. (2 Pt 1), p. 332-336, 1992.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. H. A review of low level laser therapy parts I: Background, physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n. 3, p. 161-163, 1991.

KOTLER, D. P. Cachexia. **Ann Intern Med**, v. 133, n. 8, p. 622-634, 2000.

KWON, O.J.; AU, B. T.; COLLINS, P. D.; ADCOCK, I, M.; MAK, J. C.; ROBBINS, R. R.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells. **Am J Physiol**, v. 267, n. (4 Pt 1), p. 398-405, 1994.

LACHMAN, E.; PITSOE, S. B.; GAFFIN, S. L. Anti-lipopolysaccharide antibodies: update. **Lancet**, v. 13, n. 2(8407), p. 875-876, 1984.

LAPORTE, J. D.; MOORE, P. E.; ABRAHAM, J. H.; MAKSYM, G. N.; FABRY, B.; PANATTIERI, R. A.; SHORE, S. A. Role of ERK MAP kinases in responses of cultured human airway smooth muscle cells to IL-1 β . **Am J Physiol**, v. 277, n. 5, 943-951, 1999.

LARSEN, G. L.; FAME, T. M.; RENZ, H.; LOADER, J. E.; GRAVES, J.; HILL, M.; GELFAND, E. W. Increased acetylcholine release in tracheas from allergen-exposed IgE-immune mice. **Am J Physiol**, v. 266, p. 263-270, 1994.

LEFORT, J.; SINGER, M.; LEDUC, D.; RENESTO, P.; NAHORU, M. A.; CREMINON, C.; CHIGNARD, M.; VARGAFTIG, B. B. Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyper-reactivity dissociated from TNF-alpha formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. **J Immunol**, v.161, n. 1, p. 474-480, 1998.

LENTSCH, A. B.; CZERMAK, B. J.; JORDAN, J. A.; WARD, P. A. Regulation of acute lung inflammation injury by endogenous IL-13. **J. Immunol**, v. 162, p. 1071-1076, 1999.

LEWIS, M.; TARTAGLIA, L. A.; LEE, A.; BENNETT, G. L.; RICE, G. C.; WONG, G. H.; CHEN, E. Y.; GOEDEL, D. V. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88, n. 7, p. 2830-2834, 1991.

LI, X.; MOODY, M. R.; ENGEL, D.; WALKER, S.; CLUBB, F. L. Jr.; SIVASUBRAMANIAN, N.; MANN, D. L.; REID, M. B. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes oxidative stress and contractile dysfunction in mouse diaphragm. **Circulation**, v.102, n. 14, p.16906, 2000.

LINDER, M. E.; GILMAN, A. G. G proteins. **Sci Am**, v. 267, n. 1, p. 56-61, 64-5, 1992.

LOTVALL, J.; INMAN, M.; O'BYRNE, P. Measurement of airway hyper-responsiveness: new considerations. **Thorax**, v. 53, n. 5, p. 219-241, 1998.

LOUIE, S.; HALLIWELL, B.; CROSS, E. C. Adult Respiratory Distress Syndrome: A Radical Perspective. **Adv. Pharmacol**, v. 38, p. 457-490, 1997.

MAEGAWA, Y.; ITOH, T.; YAEGASHI, K.; NISHI, M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. **Lasers Surg Med**, v.27, n. 5, p. 427-437, 2000.

MAIER, J. A.; HLA, T.; MACIAG. Cyclo-oxygenase is an immediate early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. **J. Biol. Chem**, v. 265, p. 10805-10808, 1990.

MANTOVANI, A.; BUSSOLINO, F.; DEJANA, E. Cytokine regulation of endothelial cell function. **FASEB J**, v. 6, n. 8, p. 2591-2599, 1992.

MARATHE, G. K.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL. **Vascul Pharmacol**, v. 38, n. 4, p.193-200, 2002.

MARTIN, A.; SILVERMAN, H. J. Gram-negative sepsis and the Adult Respiratory Distress Syndrome. **Clin. Infect. Dis**, v.14, p. 1213-1228, 1992.

MARTIN, C.; WOHLSEN, A.; UHLIG, S. Changes in airway resistance by simultaneous exposure to TNF-alpha and IL-1beta in perfused rat lungs. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 280, n. 4, p. 595-601, 2001.

MARTIN, J. G.; DUGUET, A.; EIDELMAN, D. H. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyper-responsiveness in disease. **Eur Respir J**, v. 16, n. 2, p. 349-354, 2000.

MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; ZWEIFEL, B.; NEEDLEMAN, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n. 9, p. 3917-3921, 1992.

MASINOVSKY, B.; URDAL, D.; GALLATIN, W. M. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. **J.Immunol.** v. 145, n. 9, p. 2886-2895, 1990.

MC KENNA T. M.; MARTIN, F. M.; CHERNOW, B. AND BRIGLIA, F. A. Vascular endothelium contributes to decreased aortic contractility in experimental sepsis. **Circ. Shock**, v. 19, p. 267-273, 1990.

MESTER, E. The use of the laser beam in therapy. **Orv Hetil**, v. 29, p. 1012-1016, 1966.

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.

MILOJEVIC, M.; KURUC, V. Low power laser biostimulation in the treatment of bronchial asthma. **Med Pregl**, v. 56, n. 9-10, p. 413-418, 2003.

MIOTLA, J. M.; FEFERY, P. K.; HELLEWELL, P. G. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.18, n. 2, p. 197-204, 1998.

MOORE, P. E.; LAHIRI, T.; LAPORTE, J. D.; CHURCH, T.; PANATTIERI, R. A.; SHORE, S. A. Selected contribution: synergism between TNF-alpha and IL-1 beta in airway smooth muscle cells: implications for beta-adrenergic responsiveness. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 3, p. 1467-1474, 2001.

MORRISON, D. C. Bacterial endotoxins and pathogenesis. **Rev Infect Dis**, v. 5, n.4, p. 733-747, 1983.

MULLIGAN, M. S.; MIYASAKA, M.; WARD, P. A. Protective effects of combined adhesion molecule blockade in models of acute lung injury. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v.108, p.198-208, 1996.

MULLIGAN, M. S.; WARD, P.A. Immune complex-induced lung and dermal vascular injury. Differing requirements for tumor necrosis factor-alpha and IL-1. **J Immunol.** v. 149, n. 1, p. 331-339, 1992.

MUNOZ, N. M.; VITA, A. J.; NEELEY, S. P.; MCALLISTER, K; SPAETHE, S. M.; WHITE, S. R.; LEFF, A. R. Beta adrenergic modulation of formyl-methionine-leucine-phenylalanine-stimulated secretion of eosinophil peroxidase and leukotriene C4. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 268, n. 1, p. 139-143, 1994.

NAKATA, J.; KONDO, M.; TAMAOKI, J.; TAKEMIYA, T.; NOHARA, M.; YAMAGATA, K.; NAGAI, A. Augmentation of allergic inflammation in the airways of cyclooxygenase-2-deficient mice. **Respirology**, v. 10, n. 2, p. 149-156, 2005.

NICOLAU, R. A.; MARTINEZ, M. S.; RIGAU, J.; TOMAS, J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. **Lasers Surg Med**, v. 34, n. 3, p. 277-284, 2004.

NOWOTNY, A. Review of the molecular requirements of endotoxin actions. **Rev. Infect. Dis**, v. 9, p. 5503-5511, 1987.

ONARAN, H. O.; COSTA, T.; RODBARD, D.. Subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. **Mol Pharmacol**, v. 43, p. 245-256, 1993.

PANG, L.; KNOX, A. J. Effect on interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ on the induction of cyclo-oxygenase in cultured human airway smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 579-587, 1997.

PARRIS, J. R.; COBBAN, H. J.; LITTLEJOHN, A.; MACEWAN, D. J.; NIXON, G. F. Tumor necrosis factor- α activates a calcium sensitization pathway in guinea-pig bronchial smooth muscle. **J Physiol**, v. 518, n. 2, p. 561-569, 1999.

PARSONS, P. C.; WORTHEN, G. S.; MOORE, E. E.; TATE, R. M.; HENSON, P. M. The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. **Am Rev Respir Dis**, v.140, p. 294-301, 1989.

PETERS, S. P.; SCHULMAN, E. S.; SCHLEIMER, R. P.; MACGLASHAN, D. W.; NEWBALL, H. H.; LICHTENSTEIN, L. M. Dispersed human lung mast cells. Pharmacologic aspects and comparison with human lung tissue fragments. **Am Rev Respir Dis**, v. 126, n. 6, p.1034-1039, 1982.

PFEIFFER, R. Untersuchungen über das Cholera. **Gift. Z. Hyg. Infektionskr**, v.11, p. 393 -412, 1892.

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

PIEDIMONTE, G. Contribution of neuroimmune mechanisms to airway inflammation and remodeling during and after respiratory syncytial virus infection. **Pediatr Infect Dis J**, v.22, n. 2 p. 66-74, 2003.

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

PIPER, P. J. Pharmacology of leukotrienes. **Br Med. Bull**, v. 39, p. 255-259, 1983.

PROZOROVA, G. G.; SIL'VESTROV, V. P.; SIMVOLOKOV, S. I.; NIKITIN, A. V. The

efficacy of membrane-stabilizing therapy in patients with chronic obstructive bronchitis. **Ter Arkh**, v. 69, n.10, p. 34-36, 1997.

RAETZ, C. R.; ULEVITCH, R. J.; WRIGHT, S. D.; SIBLEY, C. H.; DING, A.; NATHAN, C. F. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **FASEB J**, v.5, n. 12, p. 2652-2620, 1991.

RAKITINA, D. R.; URIAS'EV, O. M.; GARMASH, V I.; IVANOVA, M. V., KRASNOVID, N. I.; LEBEDEV, A. V. Effects of laser therapy on lipids and antioxidants in blood of patients with bronchial asthma. **Ter Arkh**, v. 69, n. 12, p. 49-50.1997.

REID, C. D.; STACKPOOLE, A.; MEAGER, A.; TIKERPAE. J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. **J Immunol**, v. 149, n. 8, p. 2681-2688, 1992.

REID, M. B.; LÄNNERGREN, J.; WETERBLAD, H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- α . on insulin action in cultured human muscle cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v.166, p. 479-484, 2002.

RENZETTI, L.M.; PACIOREK, P. M.; TANNU, S. A.; RINALDI, N. C.; TOCKER, J. E.; WASSERMAN, M. A.; GATER, P.R. Pharmacological evidence for tumor necrosis factor as a mediator of allergic inflammation in the airways. **J. Pharmacol Exp Ther**, v. 278, n. 2, p. 847-853, 1996.

REYNOLDS, A. M.; HOLMES, M. D.; SCCCHITANO, R. Cytokines enhance airway smooth muscle contractility in response to acetylcholine and neurokinin A. **Respirology**, v. 5. p. 153-160, 2000.

RIETSCHHEL, E. T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Sci Am**, v. 267, n. 2, p. 54-61, 1992.

RIETSCHHEL, E.; CAVAILLON, J. M. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. **Microbes and Infection**, v. 5, p.1407-1414, 2003.

ROCHKIND, S.; OUAKNINE, G. E. New trend in neuroscience: low-power laser effect on peripheral and central nervous system (basic science, preclinical and clinical studies). **Neurol Res**, v.14, n.1, p. 2-11,1992.

ROCKHIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES. D. G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, .9. n. 2, p. 174-182, 1989.

ROFFEL, A. F.; MEURS, H.; ELZINGA, C. R.; ZAAGSMA, J. Characterization of the muscarinic receptor subtype involved in phosphoinositide metabolism in bovine tracheal smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v. 99, n. 2, p. 293-6, 1990.

ROUX, E.; MOLIMARD, M.; SAVINEAU, J-P.; MARTHAN, R. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. **Gen. Pharmacol**, v. 31, n. 3, p. 349-356. 1998.

RUSSO, C.; POLOSA, R. TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. **Clinical Science**, v. 109, p. 135-142, 2005.

SAKAI, H.; OTOGOTO, S.; CHIBA, Y.; ABE, K.; MISAWA, M. TNF- α augments the expression of RhoA in the rat bronchus. **J Smooth Muscle Res**, v. 40, n. 1, p. 25-34, 2004.

SAKURAI, Y.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. (2000). 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.

SAMOLILOV, N. G. Effectiveness of laser acupuncture in the preservation of the structure of the skeletal muscles during long-term hypokinesia. **Kosm Biol Aviakosm Med**, v. 25, n. 2, p. 61-63, 1991.

SANDERSON, M. J.; DIRKSEN, E. R. Mechanosensitive and beta-adrenergic control of the ciliary beat frequency of mammalian respiratory tract cells in culture. **Am Rev Respir Dis**, v. 139, n. 2, p. 432-440, 1989.

SANTAFE, M.M.; GARCIA, N.; LANUZA, M. A.; UCHUTEL, O. D.; TOMAS, J. Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. **Neuroscience**, v. 102, n. 3, p. 697-708, 2001.

SANTAFE, M. M.; GARCIA, N.; LANUZA, M. A.; UCHITEL, O. D.; SALON, I.; TOMAS, J. Decreased calcium influx into the neonatal rat motor nerve terminals can recruit additional neuromuscular junctions during the synapse elimination period. **Neuroscience**, v.110, n. 1, p. 147-154, 2002.

SANTAFE, M. M.; URBANO, F. J.; LANUZA, M. A.; UCHITEL, O. D. Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 227-234, 2000.

SATOH, S.; KREUTZ, R.; WLM, C.; GANTEN, D.; PFITZER, G. Augmented agonist-induced Ca^{+2} sensitization of coronary artery contraction in genetically hypertensive rats. Evidence for altered signal transduction in the coronary smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v. 94, p. 1397-1403, 1994.

SCHINDL, A.; NEUMANN, R. Low-intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection. Results from a randomized double-blind placebo-controlled study. **J Invest Dermatol**, v. 113, n. 2, p. 221-223, 1999.

SCHLEIMER, R. P.; STERBINSKY, S. A.; KAISER, J.; BICKEL, C. A.; KLUNK, D. A.; TOMIOKA, K.; NEWMAN, W.; LUSCINSKAS, F. W.; GIMBRONE, M. A. Jr.; MCINTYRE, B. W. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. **J Immunol**, v. 48, n. 4, p. 1086-1092, 1992.

SCHULTHEIS, A.; BASSET, D.; FRYER, A.. Ozone-induced airway hyper-responsiveness and loss of neuronal M2 muscarinic receptor function. **J Appl Physiol**,

v. 76, p. 1088-1097, 1994.

SEOW, C. Y.; SCHELLENBERG, R. R.; PARE, P. D. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 5, p. 179-186, 1998.

SHAH, R.; SABANATHAN, S.; MEAMS, A. J.; FEATHERSTONE, H. Self-expanding tracheobronchial stents in the management of major airway problems. **J Cardiovasc Surg**, v. 36, n. 4, p. 343-348, 1995.

SHANLEY, T. P.; WAMER, R. L.; WARD, P. A. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. **Mol Med Today**, v.1, n. 1, p. 40-45, 1995

SHAO, X-H.; YANG, Y-P.; WU, J-F.; DAI, J.; WU, J-F.; BO, A-H. Effects of He-Ne laser irradiation on chronic atrophic gastritis in rats. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 25, p. 3958-3961, 2005.

SHIBA, T.; KUSOMOTO, S.; INAGE, M.; IMOTO, M.; CHAKI, H.; SHIMAMOTO, T. Recent developments in the organic synthesis of lipid A in relation to biologic activities. **Rev Infect Dis**, v. 6, n. 4, p. 478-82, 1984.

SIMPSON, S. Q.; CASEY, L. C. Role of tumor necrosis factor in sepsis and acute lung injury. **Crit. Care. Clin**, v. 5, n. 1, p. 27-47, 1989.

SMITH, C. J.; MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J. MAMETT, L. J. Differentiation of monocytoid THP-1 cells with phorbol ester induces expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 192, n. 2, p. 787-793, 1993.

SMITH, W. L.; MARNETT, L. J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1083, n. 1, p. 1-17, 1991.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiol Rev**, v.83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SPINA, D.; RIGBY, P. J.; PATERSON, J. W.; GOLDIE, R. G. Alpha 1-adrenoceptor function and autoradiographic distribution in human asthmatic lung. **Br J Pharmacol**, v. 97, n. 3, p. 701-708, 1989.

STEUDEL, W.; KRAMER, H-J.; DEGNER, D.; ROSSEAU, S.; SCHÜTTE, H., WALMRATH, D.; SEEGER, W. Endotoxin priming of thromboxane-related vasoconstrictor responses in perfused rabbit lungs. **J Appl Physiol**, v. 83, p. 18-24, 1997.

SUKKAR, M. B.; HUGHES, J. M.; ARMOUR, C. L.; JOHNSON. R. A. Tumor necrosis factor- α potentiates contraction of human bronchus *in vitro*. **Respirology**, v. 6, p. 199-203, 2001.

SWIERKOSZ, T. A.; MITCHELL, J. A.; WARMER, T. D.; BOTTING, R. M., VANE, J. R. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. **Br J Pharmacol**, v. 114 n. 7, p. 1335-42, 1995.

TAILLE, C.; FORESTI, R.; LANONE, S.; ZEDDA, C.; GREEN, C.; AUBIER, M.; MOTTERLINI, R.; BOCZKOWSKI, J. Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 3, p. 753-761, 2001.

TAKATA, Y.; NISHIMURA, Y.; MAEDA, H.; YOKOYAMA, M. Phospholipase A2 augments contraction and intracellular calcium mobilization through thromboxane A2 in bovine tracheal smooth muscle. **Eur Respir J**, v. 14, n. 2, p. 396-404, 1999.

TANG, R. B.; SHEN, H. D.; CHEN, S. J.; LEE, C. Y. Detection of IgE reactivity to fungus antigens by immunoblotting in allergic diseases in children. **J Chin Med Assoc**, v.66, n. 8, p. 453-459, 2003.

TAO, F. C.; TOLLOCZKO, B.; EIDELMAN, D. H.; MARTIN, J. G. Enhanced Ca(2+) mobilization in airway smooth muscle contributes to airway hyper-responsiveness in an inbred strain of rat. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 2, p. 446-453, 1999.

TASAKA, S.; KOH, H.; YAMADA, W.; SHIMIZU, M.; OGAWA, N.; HASEGAWA, N.; YANAGUCHI, K.; ISHII, Y.; RICHER, S.; DOERSCHUK, C.; ISHIZAKA, A. Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 32, p. 504-510, 2005.

TAVARES DE LIMA, W.; STEIL, A. A.; RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; TEIXEIRA, C. F.; JANCAR, S. 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 sputum neutrophilia in normal human subjects. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 152, n. 1, p. 76-80, 1995.

THORNHILL, M. H.; WELLICOME, S. M.; MAHIOUZ, D. L.; LANCHBURY, J. S.; KYAN-AUNG, U.; HASKARD, D. O. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. **J Immunol**, v. 146, n. 2, p. 592-598, 1991.

TOWNLEY, R.G.; HORIBA, M. Airway hyper-responsiveness: a story of mice and men and cytokines. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 24, n. 1, p. 85-110, 2003.

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

UCHIBA, M.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; OKABE, H.; TAKATSUKI, K. Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin III. **Am J Physiol**, v. 270, p. 921-939, 1996.

UHLIG, S.; NUSING, R.; VON BETHMANN, A.; FEATHERSTONE, R.L.; KLEIN, T.; BRASCH, F.; MULLER, K. M.; ULLRICH, V.; WENDE, A. Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. **Mol Med**, v. 2, n. 3, p. 373-383, 1996.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation bacterial endotoxin. **Ann Rev Immunol**, v. 13, p. 437-457, 1995.

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.

VANE, J. R.; MITCHELL, J. A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D. Inducible isoform of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, p. 2046-2050, 1994.

VARGAFTIG, B. B. Modifications of experimental bronchopulmonary hyper-responsiveness. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, n. (4 Pt 2), p. 97-102, 1997.

VILCEK, J.; LEE, T. H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. **J Biol Chem**, v. 266, n. 12, p. 7313-7316, 1991.

VILLARROYA-APARICIO, A. El laser y el dolor. **Rehabilitacion**, v. 28, n. 5, p. 346-353, 1994.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

VLAHOS, R. STEWART, A. G.. Interleukin-1a and tumor necrosis factor-a modulate airway smooth muscle DNA synthesis by induction of cyclooxygenase-2: inhibition by dexamethasone and fluticasone propionate. **Br J Pharmacol**, v. 126, p. 1315-1324, 1999.

WAGNER, E. TNF-a induced bronchial vasoconstriction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, p. 946-951, 2000.

WHEELER, A. W.; DEARDS, M. J.; HICKMANN, B. E. SPACKMAN, V. M.; JOHANSSON, S. G. 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, 1991.

WIGGS, B. R.; MORENO, R.; HOGG, J.C.; HILLIAM, C.; PARE, P. D. A model of the mechanics of airway narrowing. **J Appl Physiol**, v. 69, n. 3, p. 849-60, 1990.

WILCOX, P.; MILIKEN, C.; BRESSLER, B. High-dose tumor necrosis factor alpha produces an impairment of hamster diaphragm contractility. Attenuation with a prostaglandin inhibitor. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 5, p. 1611-1615, 1996.

WILCOX, P.; OSBORNE, S.; BRESSLER, B. Monocyte inflammatory mediators impair in vitro hamster diaphragm contractility. **Am Rev Respir Dis**, v. 146, n. 2, p. 462, 1992

WILCOX, P. G.; WAKAI, Y.; WALLEY, K. R.; COOPER, D. J.; ROAD, J. Tumor necrosis factor alpha decreases in vivo diaphragm contractility in dogs. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 150, n. 5, p. 1368-1373, 1994.

WOLFE, T. A.; DASTA, J. F. Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 29, p. 36-46, 1995.

YAMAWAKI, I.; TAMAOKI, J.; KANEMURA, T.; HORII, S.; TAKIAWA, T. Effects of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* on airway smooth muscle functions in guinea pigs. **Respiration**, v. 57, n. 4, p. 268-274, 1990.

YANG, C. M.; CHIEN, C. S.; WANG, C. C.; HSU, Y. M.; CHIU, C. T.; LIN, C. C.; LUO, S. F.; HSIA, L. D. Interleukin-1beta enhances bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization in canine tracheal smooth-muscle cells: involvement of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)/MAPK pathway. **Biochem J**, v. 354, n. 2, p. 439-446, 2001.

YANG, J. N.; MITZNER, W.; HIRSHMAN, C. Role of the epithelium in airway smooth muscle responses to relaxant agonists. **J Appl Physiol**, v. 71, n. 4, p. 1434-1440, 1991.

YOKOHAMA, T.; VACCA, L.; ROSSEN, R. D.; DURANTE, W.; HAZARIKA, P.; MANN, D. L. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor -alpha in the adult mammalian heart. **J Clin Invest**, v. 92, p. 2303-2312, 1993.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMATOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med**, v. 9, n. 5, p. 497-505, 1989.

YUKAWA, T.; UKENA, D.; KROEGEL, C.; CHANEZ, P.; DENT, G.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Beta 2-adrenergic receptors on eosinophils. Binding and functional studies. **Am Rev respire Dis**, v. 141, n. 6, p.1446-1452, 1990.

ZAPOL, W. M., LEMAIRE, F. **Adult Respiratory Distress Syndrome**. New York; Dekker. 1991, p. 1-18.