

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

DANIELA BEZERRA MACEDO

**INFLUÊNCIA DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO
TRATAMENTO DE CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS PULMONARES E
SEU IMPACTO SOBRE O COVID-19**

**INFLUENCE OF PHOTOTHERAPY IN THE TREATMENT OF
PULMONARY INFLAMMATORY CONDITIONS AND ITS IMPACT ON
COVID-19**

São Paulo – SP

2021

DANIELA BEZERRA MACEDO

**INFLUÊNCIA DA FOTOTERAPIA NO TRATAMENTO DE CONDIÇÕES
INFLAMATÓRIAS PULMONARES E SEU IMPACTO SOBRE O
COVID-19**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Prof (a). Dr (a). Lívia Assis Garcia
Orientador(a)

Prof (a). Dr (a). Carla Roberta Tim
Coorientador(a)

São Paulo – SP
2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M12i MACEDO, Daniela Bezerra

Influência da Terapia por Fotobiomodulação no tratamento de condições inflamatórias pulmonares e seu impacto sobre o Covid-19 / Daniela Bezerra Macedo. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.
57 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.
Orientação: Profa. Dra. Livia Assis Garcia.
Coorientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim

1. Fotobiomodulação. 2. Fototerapia. 3. Laser de baixa intensidade. 4. Lesão pulmonar aguda. 5. Covid-19. I. Garcia, Livia Assis. II. Tim, Carla Roberta. III. Título.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA BEZERRA MACEDO

"INFLUÊNCIA DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO TRATAMENTO DE CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS PULMONARES E SEU IMPACTO SOBRE O COVID-19"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a). Dr.(a) Livia Assis Garcia (presidente-orientadora)

Prof.(a). Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a). Dr.(a) Hueliton Wiliam Kido (UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO)

São Paulo, 17 de março de 2021
Presidente da Banca Prof.(a). Dr.(a) Livia Assis Garcia

Houve alteração do Título: sim () não ():



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"INFLUÊNCIA DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NO TRATAMENTO DE CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS PULMONARES E SEU IMPACTO SOBRE O COVID-19"**

Houve alteração do Título: sim () não (X)

Autor(es):

Discente: **Daniela Bezerra Macedo**

Assinatura: *Daniela Bezerra Macedo*

Orientador(a): **Profa. Dra. Lívia Assis Garcia**

Assinatura: *Livia Assis Garcia*

Coorientador(a):

Assinatura: *[Assinatura]*

Data: 17/03/2021

“Dedico esse trabalho aos meus pais, Hildebrando e Marilene, a minha filha Lohane e a minha irmã Juliana, por me acompanharem nessa trajetória, sempre me incentivando a adquirir novos conhecimentos e alcançar meus objetivos.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar fé para seguir e vencer os obstáculos para que eu pudesse chegar ao meu objetivo.

Aos meus pais, Hildebrando Macedo Filho e Marilene de Sousa Bezerra Macedo, por sempre segurarem na minha mão nos momentos em que mais precisei.

A minha filha Lohane Bezerra Macedo Leal Barros, por existir na minha vida e tornar os meus dias mais alegres, sempre me encorajando a estudar mesmo a saudade persistindo com a nossa distância.

Aos meus irmãos, Juliana Bezerra Macedo e Glauber Bezerra Macedo, por estarem comigo nessa caminhada sempre unidos e firmes.

A minha sobrinha Sueny Lara Carvalho Macedo, por adicionar alegria à nossa família.

Ao meu cunhado Claudio Scott Bortoleto, pela ajuda quando eu precisei.

A minha orientadora Livia Assis Garcia pelos ensinamentos a mim repassados e pela paciência durante essa trajetória para que eu pudesse adquirir novos conhecimentos que levarei para a vida.

A CAPES por me permitir ser bolsista e ingressar no mundo científico.

"Se avexe não amanhã pode acontecer tudo inclusive nada, se avexe não a lagarta rasteja até o dia em que cria asas, se avexe não que a burrinha da felicidade nunca se atrasa, se avexe não amanhã ela para na porta da tua casa, se avexe não toda caminhada começa com o primeiro passo, a natureza não tem pressa segue seu compasso, inexoravelmente chega lá..."

(Flávio José)

RESUMO

Atualmente estamos diante de uma pandemia que continuamente ocasiona altos índices de mortes e consequências econômicas e psicossociais catastróficas e incontáveis. Desta forma, este período exige uma rápida busca de procedimentos viáveis que possam nos permitir o uso de ferramentas clínicas seguras e não invasivas como métodos profiláticos ou mesmo adjuvantes no tratamento do COVID-19, constituindo assim, um importante desafio à clínica médica. As evidências mostram que a terapia de fotobiomodulação (PBMT) mostra-se atenuar o processo inflamatório e reduzir distúrbios respiratórios semelhantes à lesão pulmonar aguda (LPA), complicações associadas às infecções, como o ocasionado pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da PBMT a laser no comprimento infravermelho no tratamento da LPA, uma das principais complicações críticas da infecção por COVID-19, em modelo experimental de ratos. Vinte e quatro ratos Wistar machos foram alocados aleatoriamente em três grupos experimentais (n = 8): Controle (CG); LPA (LPA); LPA tratado com laser (LPAL). Para o tratamento, utilizou-se um equipamento laser (808 nm; 30 mw; 1,8 J) aplicados em três pontos (região anterior da traquéia e nas regiões ventrais do tórax, bilateralmente) no período de 1 e 24 horas após a indução da LPA. Para avaliação do tratamento realizou-se análises histopatológica descritiva, escore de lesão pulmonar, análise do número de células inflamatórias, expressão de interleucina 1 β (IL-1 β) e níveis de interleucina 10 (IL-10). Nos resultados, foi possível observar que o tratamento reduziu os infiltrados inflamatórios, houve espessamento do septo alveolar e o escore de lesão pulmonar quando comparado ao grupo LPA. Além disso, a PBMT a laser apresentou menor imunexpressão de IL-1 β , entretanto, não alterou os níveis de IL-10 pulmonar. Assim, pode-se concluir com esse estudo experimental que a PBMT a laser infravermelho foi eficiente em atenuar a LPA, uma das principais complicações do COVID-19, visto que foi capaz de reduzir o processo inflamatório, assim como aumentar a produção de citocinas anti-inflamatória.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; fototerapia; laser de baixa intensidade; lesão pulmonar aguda, covid 19.

ABSTRACT

Today we are facing a pandemic that continually causes high rates of deaths and catastrophic and countless economic and psychosocial consequences. Thus, this period requires a rapid search for viable procedures that can allow us to use safe and noninvasive clinical tools as prophylactic or even adjuvant methods in the treatment of COVID-19, thus constituting an important challenge to the medical clinic. Evidence shows that photobiomodulation therapy (PBMT) is shown to attenuate the inflammatory process and reduce respiratory disorders similar to acute lung injury (ALI), complications associated with infections, such as that caused by the new Coronavirus (SARS-CoV-2). Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of laser PBMT on infrared length in the treatment of ALI, one of the main critical complications of COVID-19 infection, in an experimental model of rats. Twenty-four male Wistar rats were randomly allocated into three experimental groups (n = 8): Control (CG); LPA (LPA); LASER-treated LPA (LPAL). For the treatment, a laser equipment (808 nm; 30 mw; 1.8 J) was applied at three points (anterior region of the trachea and in the venereal regions of the thorax bilaterally) in the period of 1 and 24 hours after lpa induction. Descriptive histopathological analysis, lung injury score, analysis of the number of inflammatory cells, interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin 10 levels (IL-10) were performed for treatment evaluation. In the results, it was possible to observe that the treatment reduced inflammatory infiltrates, there was thickening of the alveolar septum and the pulmonary injury score when compared to the LPA group. In addition, laser PBMT showed lower immunoexpression of IL-1 β , however, it did not alter the levels of pulmonary IL-10. Thus, it can be concluded with this experimental study that infrared laser PBMT was efficient in attenuating ALI, one of the main complications of COVID-19, since it was able to reduce the inflammatory process, as well as increase the production of anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Photobiomodulation; phototherapy; low intensity laser; acute lung injury, covid 19.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo do modelo experimental de LPA através de sepse por ligadura e perfusão cecal (CLP).....	32
Figura 2 – Esquema representativo da aplicação do protocolo de PBMT a laser.....	33
Figura 3 – Fotomicrografias representativas da análise morfológica das secções transversais do pulmão.....	37
Figura 4 – Análise do escore da lesão pulmonar.....	38
Figura 5 – Análise morfométrica do número de células inflamatórias.....	39
Figura 6 – Análise dos níveis de IL-10.....	40
Figura 7 – Análise da expressão de IL-1 β	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Síntese de dados obtidos em publicações referente ao uso da PBMT em distúrbios pulmonares.....	28
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BIREME	Biblioteca virtual de saúde
CEDEME	Centro de Bioterismo de D. de Modelos Experimentais
CK-MB	Enzima creatinoquinase da isoenzima MB
CLP	Perfusão cecal
COVID-19	Coronavírus disease 2019
DAD	Dano alveolar difuso
DeCS	Descritores em ciências da saúde
IL	Interleucina
LBA	Lavado Broncoalveolar
LEDs	Diodos emissores de luz
LILACS	Literatura Americana e do Caribe em ciências da saúde
LPA	Lesão pulmonar aguda
MEDLINE	Medical literature analysis and retrieval system online
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio
MeSH	Medical subject headings
NF-kB	Complexo proteico que controla a transcrição do DNA
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBM	Fotobiomodulação
PBMT	<i>Photobiomodulationtherapy</i>
ROS	Radicais livres
SARSCoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave <i>coronavírus 2</i>
SCIELO	Scientific Electronic Library Online
SDRA	Síndrome do distúrbio respiratório agudo
PBMT	Terapia de fotobiomobulação

TGF	Fator de crescimento transformante
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo α

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
cm	Centímetro
FiO ₂	Fração de oxigênio inspirado
G	Gramas
J	Joule
K_F	Constante de capacidade de adsorção de Freundlich
kg	Quilogramas
ug	Microgramas
mmhg	Milímetros de Mercúrio
mw	Miliwhats
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PAWP	Pressão de oclusão de artéria Pulmonar
pKa	Constante de dissociação
Q	Vazão
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDA (SDRA) E LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)	20
3.2 TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 LOCAL E ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	31
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA).....	31
4.4 PROTOCOLO DA PBMT A LASER	32
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	33
4.6 ANÁLISES.....	33
4.6.1 Análise histológica descritiva.....	33
4.6.2 Análise da lesão pulmonar.....	34
4.6.3 Análise do número de células inflamatórias.....	35
4.6.4 Análises de expressões proteicas por imunohistoquímica.....	35
4.6.5 Quantificação de citocinas do pulmão (ELISA).....	35
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5 RESULTADOS	36
5.1 OBSERVAÇÃO GERAL DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	36
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA.....	36
5.3 ESCORE DA LESÃO PULMONAR.....	37
5.4 NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.....	38
5.5 NÍVEIS DE IL-10.....	39
5.6 EXPRESSÃO DE IL-1 β	40
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO	56
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA	57

1 INTRODUÇÃO

A literatura mostra que em 1918, o mundo foi tomado de pânico e apreensão com a "gripe espanhola" ocasionada pelo vírus influenza H1N1. Esta pandemia originou-se em um momento em que não havia antibióticos e a medicina era, essencialmente, um campo em desenvolvimento (JESTER *et al.*, 2018). O alto poder de propagação do vírus associado a superlotação em recintos mal iluminados e mal ventilados aumentaram os riscos associados à infecção (SPINNEY, 2018).

Na pandemia atual causada pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2), a maioria das pessoas infectadas foram a óbito devido complicações relacionadas à doença como: lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome do distúrbio respiratório agudo (SDRA) (STEFFENS, 2020; SANTIAGO *et al.*, 2020).

Essas informações inspiraram interesse renovado na compreensão da doença LPA/ SDRA após a infecção, porque os casos fatais de COVID-19 são comumente associados a insuficiência respiratória devido a presença dessa doença (LIU *et al.*, 2020).

Como um termo clínico, a LPA foi previamente definida junto com SDRA pela classificação de consenso norte-americano-europeu de 1994. Ambos preencheram critérios clínicos e radiográficos e foram diferenciados pela relação da pressão arterial de oxigênio pela fração de oxigênio inspirado (PaO_2/FiO_2), inferior ≤ 300 mm Hg na LPA e ≤ 20 mm Hg na SDRA (HUGHES; BEASLEY, 2017). Um novo consenso em 2012, publicou a "Definição de Berlim" atualizou e categorizou o termo clínico SDRA como leve, moderada e grave com base em uma relação PaO_2/ FiO_2 inferior a 300, 200 e 100 mm Hg, respectivamente, e assim termo clínico LPA foi substituído por SDRA leve (BERNARD *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 2012; HUGHES; BEASLEY, 2017).

De maneira geral, caracteriza-se pelo início rápido de insuficiência respiratória após lesões pulmonares diretas ou indiretas (ASHBAUGH *et al.*, 1967; HUGHES; BEASLEY, 2017; MOWERY *et al.*, 2020). No início, a fase aguda da LPA/SRDA, identifica-se o dano alveolar difuso (DAD) e formação de membranas hialinas ricas em proteínas. Nesse processo há um influxo de células inflamatórias, com destaque aos neutrófilos, característica importante da LPA, visto que essas células são os principais perpetradores da inflamação. A ativação excessiva e/ou prolongada de neutrófilos contribui para a destruição da membrana basal e aumento da

permeabilidade da barreira alveolar-capilar, resultando em edema intersticial e alveolar (WARE; MATTHAY, 2000; MOWERY *et al.*, 2020; JOHNSON *et al.*, 2010). Ainda, os neutrófilos também liberam vários mediadores pró-inflamatórios como as citocinas, interleucina (IL) IL- 1, IL- 6, IL-8 e fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α), que atuam estimulando a inflamação e eventual fibrose, além de promoverem a quimiotaxia e a ativação de mais células inflamatórias, liberação de oxidantes, proteases, leucotrienos e outras moléculas pró-inflamatórias que contribuem para a lesão do epitélio (LANG *et al.*, 2002). O processo inflamatório instalado leva à morte das células epiteliais alveolares dos tipos I e II e à inativação de surfactantes, diminuindo a complacência pulmonar (WARE; MATTHAY, 2000). Assim, esses biomarcadores encontrados no epitélio e endotélio e que estão envolvidos nas cascatas inflamatórias e de coagulação predizem morbidade e mortalidade na LPA. As evidências clínicas atuais sugerem que alguns pacientes com COVID-19 podem apresentar uma síndrome de tempestade de citocinas que ocasionam lesão do parênquima pulmonar.

A restauração da função pulmonar normal é baseada na redução do edema, depuração de células inflamatórias e reparo da barreira alveolar, entre outros. Nesse contexto, o tratamento da LPA é um problema clínico, visto que as terapias disponíveis muitas vezes ainda são ineficazes. Abordagens adicionais foram integradas à terapia, como ventilações mecânicas com baixo volume, posição prona e oxigenação por membrana extracorpórea, além de diversas estratégias farmacológicas. No entanto, esses tratamentos exigem custos elevados e não são suficientemente eficazes (FAN *et al.*, 2018).

Com a alta prevalência e a taxa de mortalidade ainda inaceitavelmente elevada, a LPA/SDRA ainda se qualificam como crise médica. Dessa forma, terapias mais inovadoras precisam ser desenvolvidas com objetivo de atenuar o processo inflamatório e aumentar os mecanismos de reparo do pulmão.

A terapia de fotobiomodulação (PBMT) a laser de baixa intensidade e díodos emissores de luz (LEDs), é baseada nos efeitos da luz nos tecidos danificados e tem sido apontada como ferramenta promissora para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares (MIRANDA *et al.*, 2015; SILVA MACEDO *et al.*, 2016; IUS *et al.*, 2002; AIMBIRI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014; da-PALMA_CRUZ *et al.*, 2018). Têm sido mostrado que a PBMT, em condições de afecções pulmonares, é capaz de reduzir um complexo proteico que controla a

transcrição do DNA (NF- κ B), o influxo celular de neutrófilos, bem como a síntese de citocinas pró-inflamatória (IL-1 β , IL-6, TNF- α), aumentar as defesas imunológicas e antioxidantes, atenuando estresse oxidativo (DE VASCONCELOS *et al.*, 2020; AIMBIRE *et al.*, 2008; DE LIMA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Desta forma, embora haja alguns trabalhos mostrando o efeito positivo do laser de baixa intensidade em alterações pulmonares, algumas questões referentes a lesão pulmonar na sepse ainda não são conhecidos. Em particular, há carência de estudos na literatura investigando o efeito da PBMT a laser no comprimento de onda infravermelho no tratamento de distúrbios pulmonares. Nesse contexto, foi levantada a hipótese de que a PBMT a laser infravermelho, poderia modular a resolução do processo inflamatório e favorecer o reestabelecimento da homeostasia pulmonar, constituindo-se em um tratamento adequado e eficaz a ser utilizado na prática clínica. Nesse sentido, evidências celulares perante esse cenário seriam de grande valia para compreender com exatidão os benefícios da utilização desta abordagem terapêutica no tecido pulmonar, particularmente porque as evidências são escassas nessa área de conhecimento. Usando um modelo experimental de LPA através de um modelo de ligadura e perfusão cecal (CLP) realizamos um estudo focando na análise histopatológica e secreção de citocinas inflamatórias.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da PBMT a laser no comprimento de onda infravermelho no tratamento da LPA, uma das principais complicações críticas da infecção por COVID-19, em modelo experimental de ratos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Uma das pandemias mais devastadoras já registradas na história da humanidade que matou milhões de pessoas em todo mundo foi causada pelo vírus influenza H1N1 em 1918, conhecida popularmente como “gripe espanhola” (JOHNSON; MUELLER, 2002). As estimativas sugerem que a gripe espanhola tenha levado a uma mortalidade de aproximadamente 50 a 100 milhões de pessoas em todo mundo (JESTER *et al.*, 2018). Nos anos de 1957 e 1968 mais de 3 milhões de vidas

foram perdidas com a pandemia da influenza asiática H2N2 e H3N2 “influenza de Hong Kong”, respectivamente (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2004). Mais recentemente, a pandemia do Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARSCoV) em 2002 e do Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em 2012, resultou em aproximadamente 300.000 mortes (HOPKINS, 2020).

Atualmente, com mais de 9 milhões de casos confirmados e mais de 484.000 mortes em todo o mundo em apenas seis meses, o novo Coronavírus (SARS-CoV-2) COVID-19 vêm causando, além do alto índice de mortalidade a cada minuto, incontáveis consequências econômicas e psicossociais catastróficas mundiais (OMS, 2020).

Desta forma, a busca frenética por ferramentas clínicas disponíveis para conter a pandemia e dar esperança a bilhões de infectados vêm mobilizando o mundo. Enquanto isso, o distanciamento social, o uso de máscaras faciais e a busca de novos medicamentos e vacinas, estão sendo praticados para mitigar a pandemia (STEFFENS, 2020).

Relatos iniciais apontam claramente que o distúrbio respiratório agudo foi a principal causa de morte pelo coronavírus na China, sendo a lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) uma das complicações crítica da infecção por COVID-19 (GUO *et al.*, 2020). Dessa forma, a pandemia de SARS-CoV-2 inspirou interesse renovado na compreensão dos conceitos e fisiopatologia da insuficiência respiratória causada pela LPA/SDRA (LIU *et al.*, 2020).

3.1 SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDA (SDRA) E LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)

Em 1967, Ashbaugh e colaboradores foram os primeiros a usar a expressão síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA) caracterizada por “dispneia grave, taquipneia, cianose refratária à oxigenoterapia, perda de complacência pulmonar e infiltração alveolar difusa observada na radiografia de tórax”. Essa síndrome clínica foi baseada em um coorte de 12 pacientes (dos quais 7 morreram) que necessitaram de ventilação mecânica com pressão positiva. O início da síndrome foi aguda e a maioria dos pacientes não apresentava história de doença pulmonar. Os exames histológicos desses pacientes revelaram membranas de hialina nos alvéolos

com atelectasia microscópica e hemorragia intra-alveolar semelhante à síndrome do desconforto respiratório infantil (BELLANI *et al.*, 2016).

Quatro anos após, Petty (1971) e Ashbaugh (1967) descreveram a chamada "síndrome do desconforto respiratório do adulto", após observação de 40 casos de pacientes com lesão pulmonar causada pelo mecanismo direto (trauma torácico, aspiração) ou indireto (pancreatite, sepse) e, em alguns casos, foi atribuída à ventilação mecânica. Apesar das inúmeras etiologias, a resposta fisiopatológica do pulmão foi uniforme, de início agudo e a resolução abrangia uma ampla gama de resultados, sendo que em alguns pacientes, a recuperação foi rápida e completa e em outros resultaram em uma incapacidade permanente secundária à fibrose intersticial.

Em 1994, após décadas de diferentes definições, o *American-European Consensus Conference Committee* recomendou a adoção de uma definição de consenso para LPA e / ou SDRA. Essa definição requer três critérios: início agudo de infiltrados pulmonares bilaterais difusos por radiografia de tórax; pela relação da pressão de oxigênio pela fração de oxigênio inspirado $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ para LPA e ≤ 200 para SDRA; e uma pressão de oclusão da artéria pulmonar (PAWP) ≤ 18 ou nenhuma evidência clínica de hipertensão atrial esquerda (BERNARD *et al.*, 1994). As vantagens principais desta definição foram a simplicidade da aplicação clínica e a capacidade de quantificar a gravidade da lesão pulmonar, entretanto apresentava desvantagens devido à grande variabilidade na PAWP baseado no quadro clínico de cada paciente.

Na tentativa de tornar a definição puramente objetiva, a "Definição de Berlim" foi sugerida em 2012. Essa definição substituiu a LPA por SDRA leve, moderada e grave conforme definido pela relação PaO_2 / FiO_2 (leve ≤ 300 mm Hg, moderada ≤ 200 mm Hg e grave ≤ 100 mm Hg) (BERNARD *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 2012).

Assim, essa definição chega ao ponto de que SDRA e LPA são a mesma doença em escala progressiva. A criação de uma definição comum permitiu aos pesquisadores trabalhar a partir de um ponto de partida comum que deu início a uma era de pesquisa clínica significativa, levando a melhores resultados para os pacientes (HUGHES; BEASLEY, 2016; MOWERY *et al.*, 2020).

A incidência de LPA / SDRA tem sido difícil de avaliar devido às definições não uniformes, variações etiológicas, variação geográfica, documentação inadequada e sub-reconhecimento da entidade da doença (JOHNSON *et al.*, 2010).

A descrição original da LPA associava a disfunção pulmonar a etiologias predisponentes, como trauma, pneumonia e pancreatite, entretanto, estudos epidemiológicos descrevem as doenças antecedentes mais comuns como sepse, pneumonia, aspiração, trauma, pancreatite, transfusões de sangue de grande volume e inalação de fumaça ou gás tóxico. Sepse grave e múltiplas transfusões de sangue têm sido associadas à maior incidência de LPA (SHEU *et al.*, 2010; MOWERY *et al.*, 2020).

As causas podem ser essencialmente colocadas em 2 grandes grupos. Eles podem ser agrupados em causas pulmonares diretas (infecções virais e/ou bacterianas, contusão pulmonar ou lesão por inalação) ou causas indiretas (trauma, queimaduras, sepse e múltiplas transfusões de sangue). Embora os grupos possam ter diferentes incidências de desenvolvimento de LPA, não há uma associação clara com a taxa de mortalidade. Sabe-se que a sepse está associada à maior taxa de mortalidade, enquanto os diagnósticos não infecciosos, como traumas graves, apresentam um risco significativamente menor de morte (JOHNSON *et al.*, 2010; MOWERY *et al.*, 2020).

Liu *et al.*, 2020 descreve em um recente trabalho que alterações patológicas conhecidas como dano alveolar difuso nas células endoteliais e epiteliais é uma característica crítica da lesão pulmonar aguda na LPA/SDRA decorrente do novo coronavírus. No entanto, a patogênese da LPA/SDRA após a infecção por SARS-CoV-2) permanece amplamente desconhecida.

A literatura mostra que a partir de estudos histológicos de LPA/SDRA, observou-se um DAD e essa alteração patológica prossegue consistentemente por meio de fases discretas, mas sobrepostas: uma fase exsudativa precoce (aguda), uma fase proliferativa subaguda (em organização) e uma fase fibrótica tardia (WARE; MATTHAY, 2000).

Resumidamente, a fase aguda (1 - 6 dias) é caracterizada por um influxo de neutrófilos, macrófagos e glóbulos vermelhos nos alvéolos, desenvolvimento inicial de uma membrana hialina distinta revestindo os espaços alveolares, edema alveolar e intersticial, além de hemorragia alveolar aguda que também pode estar presente. Na fase proliferativa e subaguda (7 - 14 dias), as células endoteliais e os pneumócitos sofrem necrose, as membranas hialinas amadurecem conforme o DAD continua e o tecido de granulação se desenvolve nos espaços alveolares. Ademais, os pneumócitos do tipo II demonstram acentuada reatividade e tornam-se hiperplásicos

(na tentativa de estabelecer os alvéolos). Na fase fibrótica tardia (após 14 dias), pode surgir metaplasia escamosa, (podendo mimetizar carcinoma) e o tecido de granulação pode levar à fibrose (conforme o colágeno é depositado por fibroblastos). Na fase de resolução tardia ou fibrótica, há fibrose de colágeno densa e hialinização das paredes alveolares (WARE; MATTHAY, 2000; MOWERY *et al.*, 2020; JOHNSON *et al.*, 2010).

É importante destacar que os estágios ocorrem sobrepostos, em vez de em uma forma cronológica estrita, visto que em amostras de biópsia de pacientes com LPA observam-se várias fases simultaneamente. Para pacientes que sobrevivem à SDRA, muitos casos se resolvem com dano pulmonar mínimo; no entanto, os pacientes podem desenvolver vários graus de danos permanentes que mimetizam as alterações encontradas na doença pulmonar em estágio terminal (JOHNSON *et al.*, 2010; MOWERY *et al.*, 2020).

Com relação a patogênese da LPA, sabe-se que ela é um distúrbio de inflamação aguda que causa a ruptura das barreiras endoteliais e epiteliais do pulmão. A membrana alveolar-capilar é composta pelo endotélio microvascular, interstício e epitélio alveolar. As características celulares da LPA incluem perda da integridade da membrana alveolar-capilar, migração excessiva de neutrófilos para o epitélio e liberação de mediadores citotóxicos pró-inflamatórios. A perda precoce da integridade vascular pulmonar permite o influxo do fluido rico em proteínas no espaço intersticial e, em seguida, nos alvéolos. (SHEU *et al.*, 2010; MOWERY *et al.*, 2020).

Normalmente, as células epiteliais alveolares do tipo I e do tipo II formam junções herméticas entre si, regulando seletivamente o fluxo de fluido através da barreira epitelial. Secundariamente a essa migração em massa de células inflamatórias (com destaque aos neutrófilos), o epitélio lesado resulta em aumento da permeabilidade durante a fase aguda da lesão pulmonar e permite a deposição de fluido de edema rico em proteínas no espaço alveolar. A lesão das células epiteliais favorece a formação do edema e de evacuação desse edema, além da perda da produção de surfactante, diminuindo a complacência pulmonar geral (WARE; MATTHAY, 2000).

Ainda, as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α), interleucina (IL) como as IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-18, liberados por células inflamatórias, são as mais estudadas e correlacionam-se com a morbidade e mortalidade da LPA/SDRA (LANG *et al.*, 2002).

Com a alta prevalência e a taxa de mortalidade ainda inaceitavelmente alta, a LPA/SDRA ainda se qualifica como crise médica. Para pacientes que sobrevivem à fase aguda de LPA, é evidente que a qualidade de vida a longo prazo é afetada adversamente (WARE; MATTHAY, 2000).

O tratamento da lesão pulmonar aguda é baseado em estratégias ventilatórias (ventilações mecânicas com baixo volume; oxigenação por membrana extracorpórea) e não ventilatórias (posição prona). Até o momento, os avanços mais significativos no tratamento de suporte de pacientes com lesão pulmonar têm sido associados a um melhor manejo do ventilador e uma variedade de melhorias em cuidados intensivos. Ensaio clínicos mostraram que um grande número de estratégias farmacológicas (o uso de surfactante exógeno, óxido nítrico inalado, prostaglandina E1 intravenosa, glicocorticóides, cetoconazol, lisofilina, N-acetilcisteína e proteína C ativada) não foram eficazes na redução da mortalidade (FAN *et al.*, 2018). Dessa forma, terapias mais inovadoras precisam ser desenvolvidas com objetivo de reduzir a mortalidade/morbidade causada pela LPA, assim como melhorar os resultados clínicos e a recuperação dos pacientes.

Mais especificamente ao COVID-19, diversas drogas antivirais comumente usadas como os inibidores da neuraminidase (oseltamivir, peramivir, zanamivir e outros), aciclovir, o corticosteróide - metilprednisolona e ribavirina vêm sendo testadas, entretanto os dados sobre as eficácias das mesmas ainda são inconclusivas a curto prazo (GUO *et al.*, 2020). Desta forma, acredita-se que os danos causados pelo vírus podem ser mitigados com uma terapia adjuvante que atinja todos os órgãos, logicamente com um interesse especial no sistema respiratório (ENWEMEKA, 2020).

3.2 TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO

Relatos científicos nos mostram que o tratamento através da luz, terapia por fotobiomodulação, têm sido preconizado como uma ferramenta eficaz usada para minimizar os impactos da LPA/SDRA nas pandemia de 1918 e de outras epidemias (HOBDAI; CASON, 2009), entretanto esta terapêutica foi, por muitas vezes negligenciada (ENWEMEKA *et al.*, 2020).

É possível observar evidências que demonstram claramente o potencial da luz solar (helioterapia) na redução da mortalidade e morbidade relacionadas à gripe H1N1. Hobday e Cason, (2009), evidenciaram que pacientes diagnosticados com

infecções graves quando expostos à terapia solar, ao ar livre, se recuperavam mais rápido do que aqueles tratados em ambientes fechados. Além disso, os autores relataram que a luz solar preveniu a contaminação entre os pacientes e entre os profissionais da área da saúde (ENWEMEKA *et al.*, 2020).

Desde então, a helioterapia, ou seja, tratamento através da luz solar começou a se tornar uma prática clínica comum e popular, fato evidenciado pelos efeitos positivos para o tratamento não apenas de alguns distúrbios respiratórios, como exemplo da tuberculose, mas também para o tratamento de lesões tegumentares como feridas cutâneas, acne vulgar, psoríase e a icterícia, além de doenças que acometem o sistema nervoso central, como a depressão (SNELLMAN *et al.*, 1993; BENEDETTI *et al.*, 2001; ROELANDTS, 2002; HOBDAÏ; DANCER, 2013).

Com o passar dos anos, esta terapêutica foi sendo adaptada e substituída por lâmpadas que geravam luz a partir do quartzo, vapor de mercúrio e outras fontes e, na década de 60, o desenvolvimento de uma variedade de tecnologias emissoras de luz por lasers e o subsequente surgimento dos diodos emissores de luz (LEDs) revolucionaram a fototerapia dando origem à laserterapia ou terapia laser de baixa intensidade, atualmente conhecida como terapia por fotobiomodulação, do inglês, *photobiomodulationtherapy* (PBMT) (ENWEMEKA, 2020).

A PBMT emprega a utilização de recursos a lasers e LEDs na faixa do vermelho ou infravermelho próxima do espectro de radiação eletromagnética, atômico, não ionizante, e não invasiva, provou ser um tratamento eficaz e com poucos efeitos colaterais em comparação com outras terapias prescritas para doenças inflamatórias e traumáticas (KARU *et al.*, 2013).

Essa terapia geralmente usa dispositivos na faixa de potência de 1 e 500 mW, a fim de promover a regeneração do tecido e a redução da inflamação e da dor. A luz é tipicamente de largura espectral estreita e contempla o espectro do vermelho ao infravermelho próximo (600 – 1000 nm), com uma densidade de potência entre 1 e 5000 mW / cm² (HUANG *et al.*, 2011; CHUNG *et al.*, 2012).

A PBMT parece aumentar o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória na mitocôndria, como resultado da interação de fótons com o citocromo C oxidase, levando ao aumento da produção de Adenosina trifosfato (ATP) e de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como consequência desse desequilíbrio de sinalização redox, diversos fatores de transcrição podem ser ativados, levando a uma resposta gênica massiva e direcionada à resolução da inflamação e promoção do reparo tecidual. Além

disso, a PBMT também pode afetar a sinalização intracelular por meio da homeostase do cálcio, do óxido nítrico (NO), ou das cascatas de fosforilação de outras proteínas celulares (KARU *et al.*, 2013; HAMBLIN; NELSON; STRAHAN, 2018).

Esses efeitos na sinalização intracelular podem levar a vários efeitos biológicos, demonstrados tanto em ensaios clínicos quanto em modelos experimentais (OSTRONOSOVA, 2006; AIMBIRE *et al.*, 2008; KASHANSKAIA *et al.*, 2009; DE LIMA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Do ponto de vista clínico, a PBMT é utilizada para atingir três objetivos principais: promover o reparo, aliviar a inflamação associada a distúrbios traumáticos ou inflamatórios e como analgésico, particularmente para o tratamento de dor relacionada a doenças inflamatórias ou neurológicas (HAMBLIN; NELSON; STRAHAN, 2018). Essas aplicações clínicas têm um forte suporte de modelos experimentais. Em nosso grupo, demonstramos que a PBMT é capaz de reduzir a resposta inflamatória após lesão muscular esquelética (ASSIS *et al.*, 2013), articular (ASSIS *et al.*, 2018) e melhorar a angiogênese em retalhos cutâneos (MARTIGNAGO *et al.*, 2019), levando a resultados favoráveis na regeneração tecidual.

Atualmente, a PBMT tem sido proposta para o tratamento de distúrbios respiratórios (IUS *et al.*, 2002; AIMBIRI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2015; SILVA MACEDO *et al.*, 2016; da-PALMA_CRUZ *et al.*, 2018; DE VASCONCELOS *et al.*, 2020). Dentre as doenças inflamatórias em que a PBMT apresenta efeito benéfico, a bronquite crônica (IUS *et al.*, 2002), pneumonias (AMIROV, 2002) e a asma (OSTRONOSOVA, 2006; KASHANSKAIA *et al.*, 2009) aguda vêm ganhando destaque em alguns estudos clínicos devido ao fato de a PBMT ter sido associada ao alívio dos sinais clínicos dos sintomas tardios e precoces das doenças.

Dados experimentais emergentes mostram que a PBMT é capaz de reduzir o edema de vias aéreas, inflamação pulmonar, distúrbios respiratórios agudos, fibrose pulmonar e outras complicações respiratórias (de LIMA *et al.*, 2011; BROCHETTI *et al.*, 2017; de BRITO *et al.*, 2020).

O estudo desenvolvido por Lima *et al.* (2010), mostrou que a PBMT a laser no comprimento de onda vermelho (650 nm), aplicada em um modelo de indução de inflamação pulmonar em ratos, reduziu o influxo de neutrófilos, quantidade de citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no pulmão e no lavado broncoalveolar, assim como inibiu o edema pulmonar.

Brochetti *et al.* (2017), identificou através de achados histopatológicos que os animais que foram tratados com luz no espectro vermelho (660 nm) apresentaram um menor número de células inflamatórias nos alvéolos e reduziram a produção de colágeno, otimizando a elasticidade pulmonar estática e dinâmica. Utilizando o mesmo modelo experimental Brito *et al.* (2020), recentemente mostrou que a luz no espectro infravermelho (780 nm) também foi capaz de reduzir citocinas pré-inflamatórias e aumentar a secreção de IL-10, citocina pro-inflamatória, de fibroblastos e pneumócitos. Outro aspecto interessante deste trabalho é que os autores verificaram que a PBMT foi capaz de reduzir significativamente a expressão do fator de crescimento transformador do tipo β (TGF- β), grande responsável por deposição de colágeno no parênquima pulmonar, ocasionando a fibrose do órgão. Ademais, recentes resultados clínicos indicam que pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e outros com asma brônquica e alergia melhoraram significativamente após o tratamento com PBMT (АКСЕНОВА; БУРДУЛИ, 2016; YUSUPALIEVA; SAVTCHENKO, 2017). Outros grupos confirmaram esses resultados em um modelo experimental semelhante conforme descritos na tabela 1.

Em suma, os relatos supracitados sugerem que a PBMT têm o potencial de reduzir algumas das complicações críticas das infecções por coronavírus relatadas, isto é, inflamação pulmonar e fibrose pulmonar.

No entanto, mesmo após décadas de pesquisas contínuas, algumas questões ainda permanecem em relação ao efeito da PBMT nos pulmões inflamados. Portanto, neste trabalho, abordamos algumas dessas questões não resolvidas. O comprimento de onda utilizado difere de outros grupos. Aplicamos PBMT no comprimento de onda infravermelho apenas duas vezes, imediatamente após a indução e 24 horas após LPA, mimetizando um tratamento precoce. Acredita-se que o comprimento de onda utilizado possa ter uma maior penetração e assim, conseguindo irradiar uma maior área do tecido pulmonar. Em segundo lugar, avaliamos a morfologia do tecido e citocinas inflamatórias, uma característica proeminente neste modelo experimental.

Tabela 1 – Síntese de dados obtidos em publicações referente ao uso da PBMT em distúrbios pulmonares

Autor/Ano	Tipo de estudo	Doença/Modelo	Comprimento de onda (nm)	Resultados encontrados
Amirov <i>et al.</i> 2002	Experimento in vivo	Pneumonia	Laser vermelho (nm não informado)	Reduziu a permeabilidade da membrana celular, aumentou as concentrações de ferro e cromo no soro sanguíneo, melhorou a microcirculação.
Aimbire <i>et al.</i> 2005	Modelo experimental em camundongos	Lavado broncoalveolar	Luz vermelha 685 nm	Aumentou o efeito anti-inflamatório na hiperreatividade, no lavado broncoalveolar e no influxo de neutrófilos (avaliado pela atividade de MPO) associado com a inibição de metabolitos derivados da COX-2.
Aimbire <i>et al.</i> 2006	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 650 nm	Diminuiu significativa a atividade de TNF- α no grupo que recebeu o tratamento laser ou clorpromazina comparado com o grupo não tratado.
Aimbire <i>et al.</i> 2007	Experimento em camundongos	Lesões hemorrágicas induzidas por complexo imune em pulmão	Luz vermelha 650 nm	Reduziu o índice hemorrágico e atividade de MPO
Aimbire <i>et al.</i> 2008	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 660 nm	Atenuou os níveis de mRNA de Bcl- xL e A1 em neutrófilos pulmonares.
Mafra <i>et al.</i> 2009	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 685 nm	Reduziu a permeabilidade vascular, número de neutrófilos do tecido pulmonar e diminuiu TNF- α no tecido
Mafra <i>et al.</i> 2009	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 650 nm	Diminuiu o edema pulmonar, o influxo e a ativação de neutrófilos, TNF- α e IL-1 β no pulmão e no

				lavabrocoaveolar (LBA), assim como o tratamento com dexametasona.
De Lima <i>et al.</i> 2010	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar Aguda	Luz vermelha 660 nm	Inibiu o edema pulmonar e o dano ao citoesqueleto endotelial, bem como o influxo e ativação de neutrófilos, reduziu o TNF- α e IL-1 β , no pulmão e no BALF, impediu a regulação positiva de ICAM-1 do pulmão.
Lima <i>et al.</i> 2010	Experimento in vivo	Inflamação Pulmonar Aguda	Luz vermelha 650 nm	Inibiu o edema pulmonar e os danos no citoesqueleto endotelial, reduziu o TNF- α e IL-1 β , no pulmão e LBA
Mafra <i>et al.</i> 2009	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 660 nm	Diminuiu o número de neutrófilos e os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar dos grupos estimulados com LPS
Mafra <i>et al.</i> 2009	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 660 nm	Diminuiu a atividade de mieloperoxidase, do influxo de neutrófilos, da quantidade de proteína e da expressão de mRNA de TNF- α , enquanto houve aumento da expressão de mRNA de IL-10.
De Lima <i>et al.</i> 2011	Experimento em camundongos	Inflamação Pulmonar Aguda	Luz vermelha 660 nm	Atenuou o influxo de neutrófilos e o TNF no BALF, aumentou o cAMP e reduziu o mRNA do TNF- α .
De Lima <i>et al.</i> 2011	Camundongos	Inflamação Pulmonar Aguda	Luz vermelha 660 nm	Reduziu o edema ($80,1 \pm 41,8 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco), influxo de neutrófilos ($0,83 \pm 0,02 \times 10^6$ células ml^{-1}), atividade de MPO ($2,91 \pm 0,60$) e TNF ($153,0 \pm 21,0 \text{pg mg}^{-1}$ de tecido) no pulmão quando comparados com os respectivos grupos de controle. Aumentou a IL - 10 ($0,65 \pm 0,13$) no pulmão de animais submetidos a i - I / R. Reduziu o nível de TNF - α em RPAECs quando comparado com o grupo i - I / R
De Lima <i>et al.</i> 2013	Ratos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 660 nm	Reduziu nitidamente o edema, influxo de neutrófilos, atividade de MPO e expressão de mRNA de ICAM-1, a formação de ROS e aumentou de forma oposta a concentração de GSH no pulmão dos grupos i - I / R

Miranda <i>et al.</i> 2015	Ratos	Inflamação Pulmonar	Luz vermelha 660 nm	Eliminou a inflamação pulmonar neutrofílica induzida por FA por uma redução das citocinas inflamatórias e degranulação dos mastócitos.
Rigonato <i>et al.</i> 2015	Camundongos C57BL	Fibrose Pulmonar Idiopática	Luz vermelha 660 nm	Reduziu o impacto da FPI mediado pela modulação da inibição de citocinas pró-inflamatórias e aumentou a expressão do PCNA
Oliveira <i>et al.</i> 2014	Camundongos	LPS Pulmonar e Extrapulmonar	Luz infavermelha 830 nm	Reduziu significativamente a inflamação pulmonar e extrapulmonar na SDRA induzida por LPS
Brochetti <i>et al.</i> 2017	Experimento in vivo	Fibrose Pulmonar	Luz vermelha (660 +/- 20 nm)	Reduziu o número de células inflamatórias no espaço alveolar
Costa <i>et al.</i> 2017	Camundongos	Lesão Pulmonar Aguda	LED vermelho	Reduziu o influxo de neutrófilos e os níveis de interleucinas 1 β , 17 A e fator de necrose tumoral- α ; além de níveis aumentados de interferon γ no fluido broncoalveolar
Da Cunha <i>et al.</i> 2018	Camundongos	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica	Luz vermelha 660 nm	Reduziu significativamente o número de células inflamatórias e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α no líquido do lavado broncoalveolar (LBA) e diminuiu a deposição de colágeno e também a expressão do receptor P2X7 purinérgico.
Da Silva <i>et al.</i> 2018	Ratos	LPA e SDRA	Luz vermelha 605 nm	Alterou os níveis relativos de mRNA em genes envolvidos no processo apoptótico e fragmentação de DNA em células inflamatórias e alveolares após lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Experimental Uso de Animais da Universidade Brasil (CEUA nº 2000090). Todo o manuseio de animais e os procedimentos cirúrgicos foram realizados estritamente de acordo com os Princípios Orientados para o Uso de Animais de Laboratório. Durante todo o procedimento experimental os animais permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas sob temperatura de $(22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$, períodos de claro-escuro de 12 horas, e com livre acesso à água e ração própria comum. Utilizou-se 24 ratos machos *Wistar* (pesando $300 \pm 20 \text{ g}$).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (n = 8):

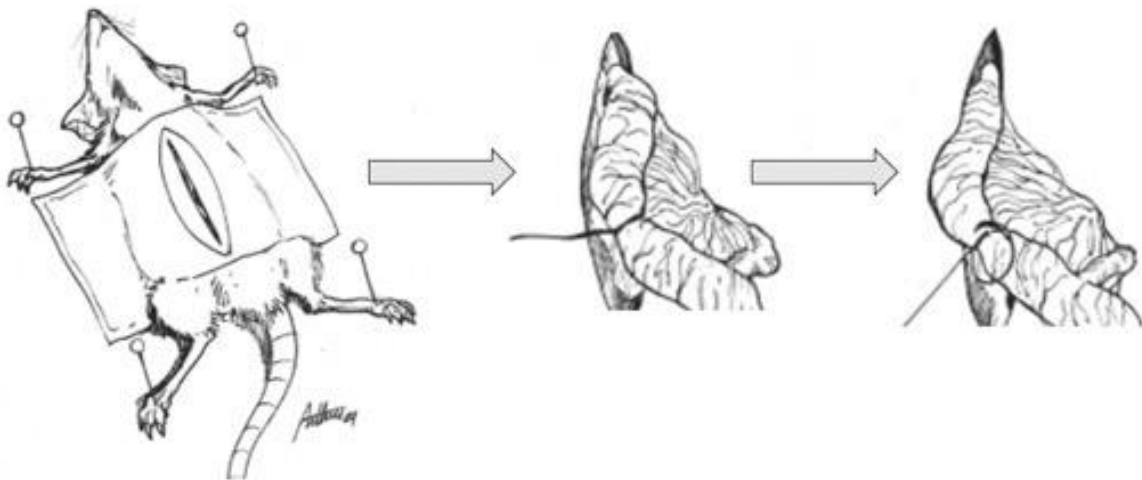
- Grupo Controle (CG): nenhuma intervenção cirúrgica e nenhum tratamento.
- Grupo LPA (LPA): indução da LPA
- Grupo LPA tratado com Laser (LPAL): indução da LPA e tratados com laser

4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)

Realizou-se a técnica de ligadura e perfusão cecal (CLP) para a indução da sepse (Langet *al.*, 2007). Para isso, os animais foram anestesiados, via intraperitoneal, com a associação de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia mediana, com extensão de 2 a 3 cm e o ceco foi identificado. Utilizando-se a manobra digital, para o preenchimento do conteúdo do ceco, em sentido proximal. A ligadura total oclusiva do ceco foi feita na região central da porção do ceco entre a junção ileocecal e a porção apical e utilizou-se um paquímetro para a padronização. Dando sequência, duas punções foram feitas na superfície antimesentérica do ceco ligado com uma agulha de calibre de 22 G e por meio de compressão leve o material fecal foi exposto na cavidade abdominal. O ceco foi umedecido com soro fisiológico aquecido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ reintroduzido

na cavidade abdominal. A incisão foi suturada e limpeza local foi realizada. No período pós-operatório, os animais foram mantidos em analgesia de horário (morfina 4/4 horas; 5 mg/kg) e em ambiente aquecido a fim de evitar hipotermia. Cabe salientar que este é um modelo experimental de sepse leve/moderado que induz a LPA.

Figura 1– Esquema representativo do modelo experimental de LPA através de sepse por ligadura e perfusão cecal (CLP)

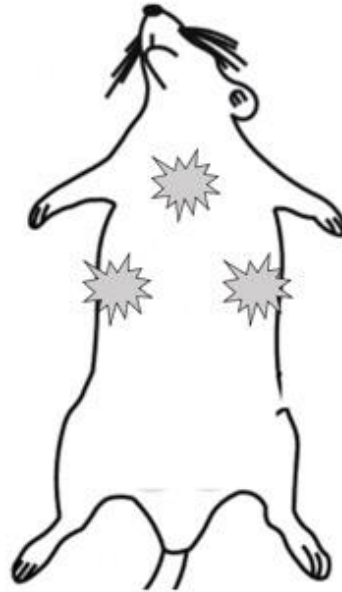


Fonte: Adaptado de KREIMER *et al.*, (2005)

4.4 PROTOCOLO DA PBMT A LASER

Para o tratamento, foi utilizado um equipamento de laser de baixa intensidade (Photon laser II, DMC[®] equipamentos Ltda, SP, São Carlos, Brasil) com os seguintes parâmetros de irradiação: 808 nm, GaAIs, emissão contínua, potência de saída de 30 mW, área do feixe de 0.028 cm², dose de 65 J/cm², energia de irradiação pontual de 1.8 J, respectivamente e tempo de irradiação de 60 segundos. O tratamento foi realizado pela técnica pontual com contato, 1 e 24 horas após a cirurgia (totalizando 2 sessões) em 3 pontos, sendo eles a região anterior da traqueia e nas regiões ventrais do tórax, bilateralmente, logo abaixo das costelas (Figura 2).

Figura 2 – Esquema representativo da aplicação do protocolo de PBMT a laser



Fonte: Autor

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de anestésico (três vezes o valor de anestésicos previamente estipulados para a anestesia do animal) ao término do período experimental (2 dias após a indução da LPA). Verificou-se a ausência de batimento cardíaco e da frequência respiratória para constatar a morte de cada animal. Em seguida, os pulmões foram retirados, sendo que o lado esquerdo foi armazenado para realização do processamento histológico e o lado direito para análise de ELISA.

4.6 ANÁLISES

4.6.1 Análise histológica descritiva

Os pulmões permaneceram em soluções de formaldeído a 10% para a fixação durante 24 horas. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 24 horas. Na sequência, passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70%, 90% e 100% (1 hora). Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização

das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro, também por 1 hora cada banho. Logo depois, as peças foram incluídas em parafina e cortadas por meio de um micrótomo rotativo (Leica SP 1600).

Foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes de 5 µm de espessura. Essas lâminas foram coradas com corante Hematoxilina e Eosina (H.E., Merck) para avaliação da inflamação pulmonar. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (*Axiostar plus, Zeiss, Alemanha*) com objetiva de 20X. As avaliações foram realizadas de acordo com estudo de Zhai *et al.* (2015), por dois pesquisadores treinados, e a identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita adesiva com o intuito de não haver um conhecimento prévio do avaliador sobre qual grupo estava sendo avaliado, evitando-se, assim, qualquer possibilidade de indução nos resultados obtidos. Ao término da análise, a fita foi retirada e o resultado anotado no respectivo grupo.

4.6.2 Análise da lesão pulmonar

Utilizou-se o sistema de graduação histopatológico para tecido pulmonar proposto pela Sociedade Americana Torácica para análise da lesão pulmonar (MATUTE-BELLO *et al.*, 2011). Para a avaliação utiliza-se uma escala de 0 a 2 pontos para cada critério: A) Neutrófilo do espaço alveolar; B) Neutrófilo do espaço intersticial; C) Presença de membrana hialina; D) presença de débris no espaço alveolar; E) espessamento do septo alveolar. Ao final, calcula-se o escore de lesão pulmonar através da seguinte fórmula: $\text{Escore} = [(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{número de campos} \times 100)$. Utilizou-se as lâminas coradas com HE e a mesma foi realizada por 2 avaliadores cegamente treinados. Cabe ressaltar que o sistema avalia o grau (através de escore) que corresponde à gravidade da lesão pulmonar, ou seja, quanto maior a pontuação, maior o dano pulmonar. Ainda, os cortes histológicos foram avaliados por toda sua extensão em um microscópio de luz com um aumento de 400X.

4.6.3 Análise do número de células inflamatórias

Para a análise morfométrica do número de células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no infiltrado inflamatório no espaço peribronquiolar foi utilizando um microscópio ótico comum e as células foram quantificadas utilizando o *software* Image J. Foram mensurados 3 campos de cada corte, totalizando 30 avaliações por grupo (em aumento de 400X).

4.6.4 Análises de expressões proteicas por imunohistoquímica

Para a análise semi-quantitativa de imunohistoquímica as lâminas serão imunocoradas para detectar a expressão de IL-1 β . Após a desparafinização e hidratação dos cortes foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em que os mesmos serão incubados em solução a 30% de peróxido de hidrogênio. As lâminas serão incubadas com anticorpos primários por 30 min na diluição de 1:150 (polyclonal rabbit anti-rat, Sta Cruz biotechnology, California, USA). Após lavagem em PBS, será aplicado o anticorpo secundário (ABC kit, PK-6200, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) na diluição 1:5 por 30 minutos. Em seguida os cortes serão novamente lavados em PBS e corados com diaminobenzidina (DAB, SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos. Por fim, será realizada a coloração por hematoxilina e montagem das lâminas. Para o controle negativo os anticorpos primários serão omitidos. A análise semi-quantitativa de imunohistoquímica será desenvolvida de acordo com Alves *et al.* (2020). Em seguida, será realizada a captura de 10 imagens por lâmina de cada animal para a quantificação da imunohistoquímica.

4.6.5 Quantificação de citocinas do pulmão (ELISA)

A citocina IL-10 foi dosada a partir de homogenato de tecido pulmonar. As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de rato, diluído em PBS por 12 h. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0.05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1 h. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras

(100 ml) e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 h. Ao final do período, as placas foram lavadas. O anticorpo de detecção foi adicionado, conjugado a peroxidase, e incubado por 2 h. As placas foram lavadas novamente. Ao final das lavagens, foi adicionado o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando reagir por 15 a 20 min. Ao final da incubação, foi adicionada solução de parada ($\text{H}_2\text{SO}_4 - 2\text{N}$). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450 nm) usando leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Os resultados foram expressos em picograma de antígeno por μg de proteína.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados utilizou-se as técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk's* foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações entre os grupos foram feitas utilizando ANOVA com post hoc de *Tukey*. Nos casos não paramétricos, o teste de *Kruskall-Wallis* com post hoc de *Dunn* foi adotado. As análises foram realizadas no software *GraphPad Prism*, versão 6.01 (San Diego CA, EUA). Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 OBSERVAÇÃO GERAL DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

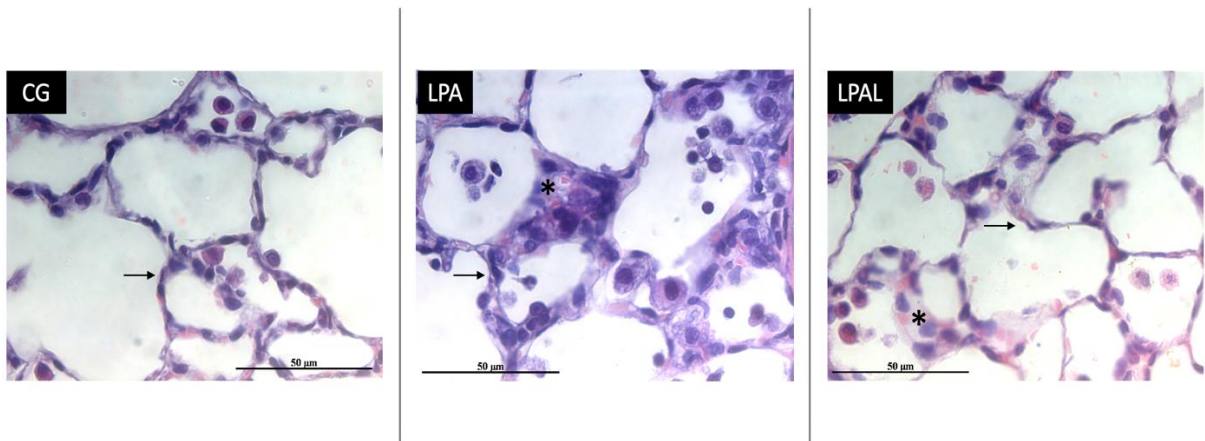
No presente estudo, dois animais morreram no período de recuperação do procedimento cirúrgico. Os demais animais não apresentaram nenhum tipo de intercorrência durante o período experimental.

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

As imagens representativas dos cortes de tecido pulmonar estão apresentadas na Figura 3. A análise histopatológica, o grupo GC revelou sacos alveolares revestidos por epitélio simples pavimentoso epiteliais e macrófagos alveolares. Os grupos LPA e

LPAL demonstraram alterações morfológicas caracterizadas por intenso infiltrado inflamatório celular, edema na área intersticial e espessamento do septo alveolar. Entretanto, no grupo LPA foi observado um menor espessamento do septo alveolar e reduzido infiltrados inflamatórios em relação ao grupo LPA.

Figura 3 - Fotomicrografias representativas da análise morfológica das secções transversais do pulmão

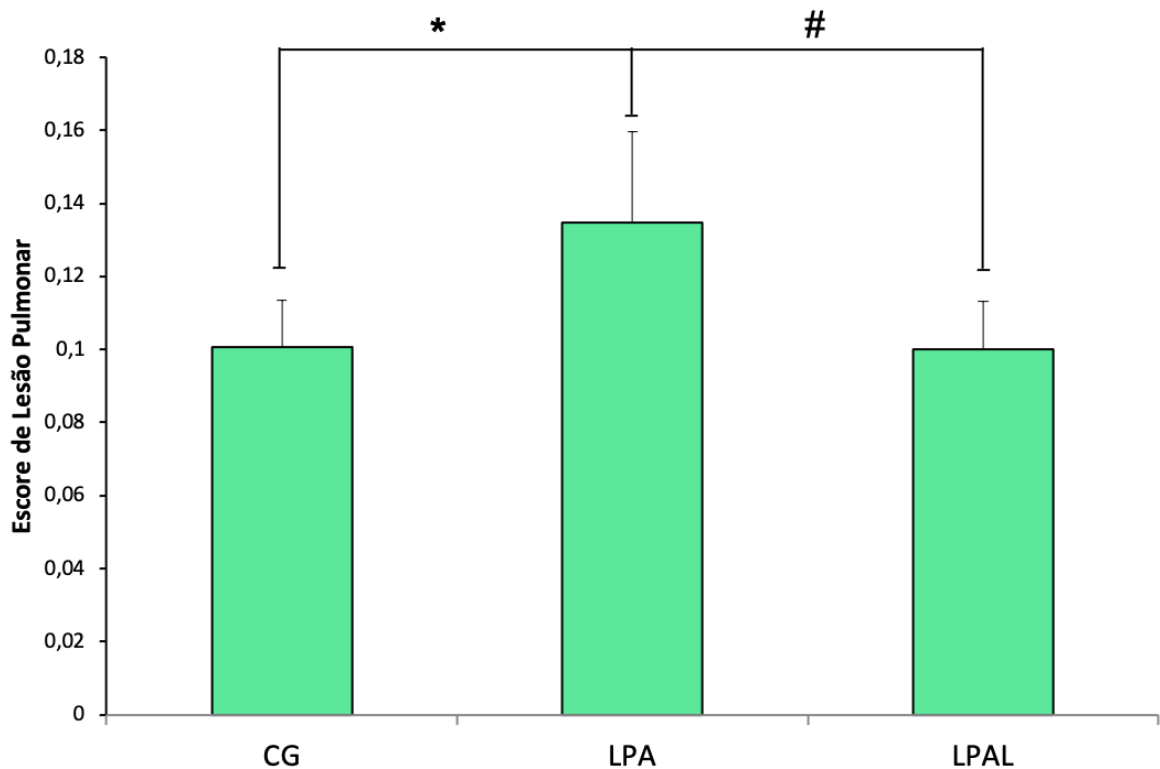


Presença de processo inflamatório (asteriscos). Septo alveolar (seta); Grupo Controle (GC); Grupo LPA (LPA); Grupo LPA tratado com Laser (LPAL). (HE; 20 µm)

5.3 ESCORE DA LESÃO PULMONAR

Os valores do escore de lesão pulmonar estão ilustrados na Figura 4. Foi possível observar um escore significativamente maior no grupos LPA em comparação com a LPAL ($p = 0,0041$) e GC ($p = 0,039$). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos GC e LPAL.

Figura 4 - Análise do escore da lesão pulmonar



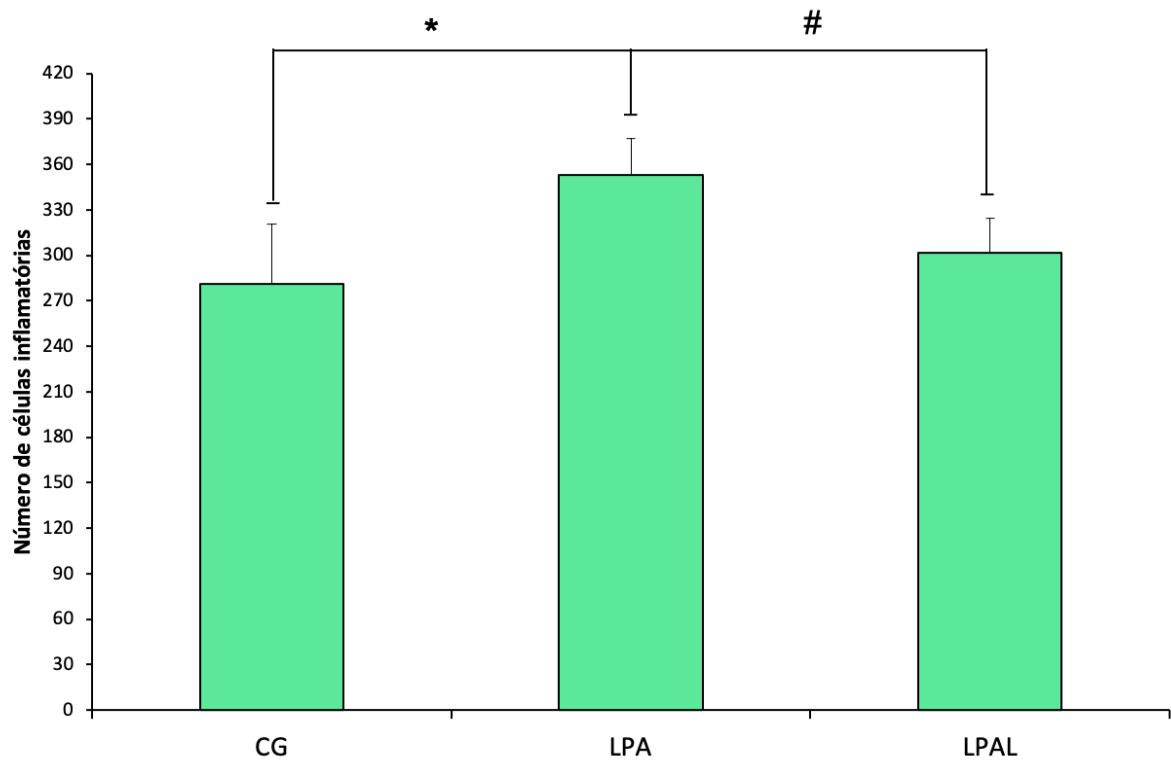
Grupo Controle (CG); Grupo LPA (LPA); Grupo LPA tratado com Laser (LPAL).

*LPA vs GC (0,039); # LPA vs LPAL (0,0041)

5.4 NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Os resultados da análise referente número de células inflamatórias estão demonstrados na Figura 5. Foi observado um número significativamente maior de células inflamatórias no grupos LPA quando comparado aos grupo GC ($p=0,0036$), e LPAL (0,0284). Nenhuma diferença adicional foi observada.

Figura 5 - Análise morfométrica do número de células inflamatórias



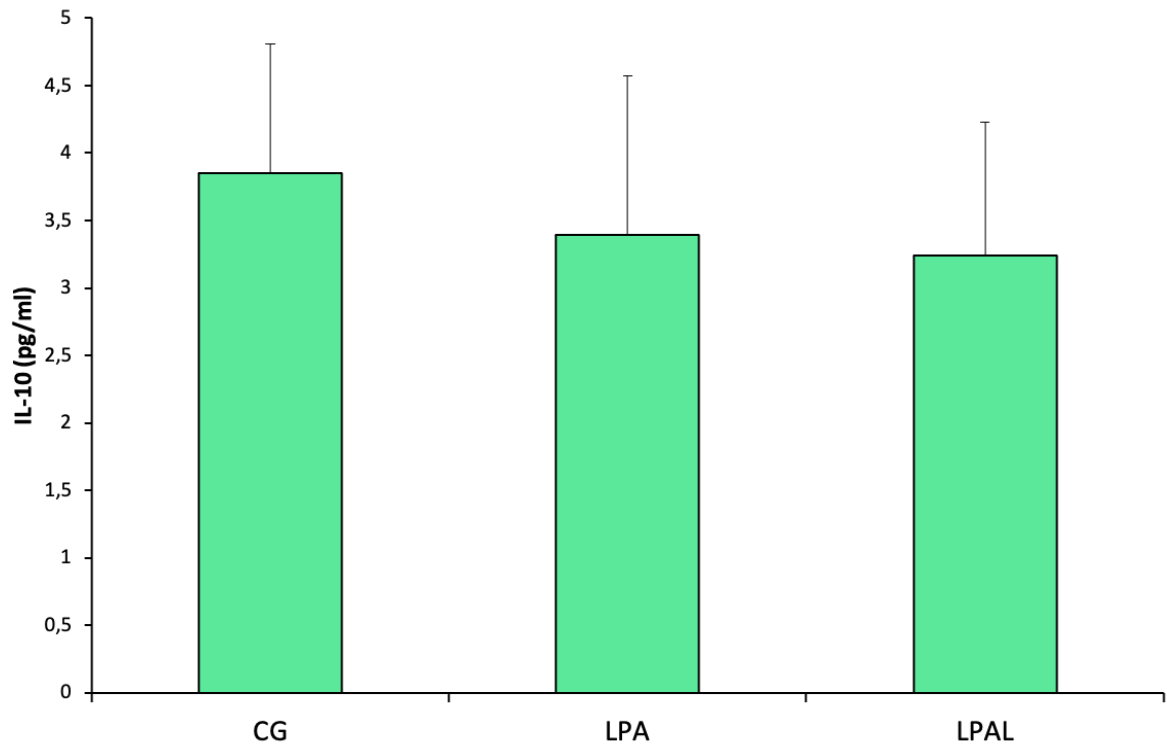
Grupo Controle (CG); Grupo LPA (LPA); Grupo LPA tratado com Laser (LPAL).

*LPA vs CG (0,0036); # LPA vs LPAL (0,0284)

5.5 NÍVEIS DE IL-10

Na Figura 6 pode ser observado os resultados dos níveis de IL-10. Não houve diferença estatística dos níveis de IL-10 entre os grupos analisados.

Figura 6 - Análise dos níveis de IL-10

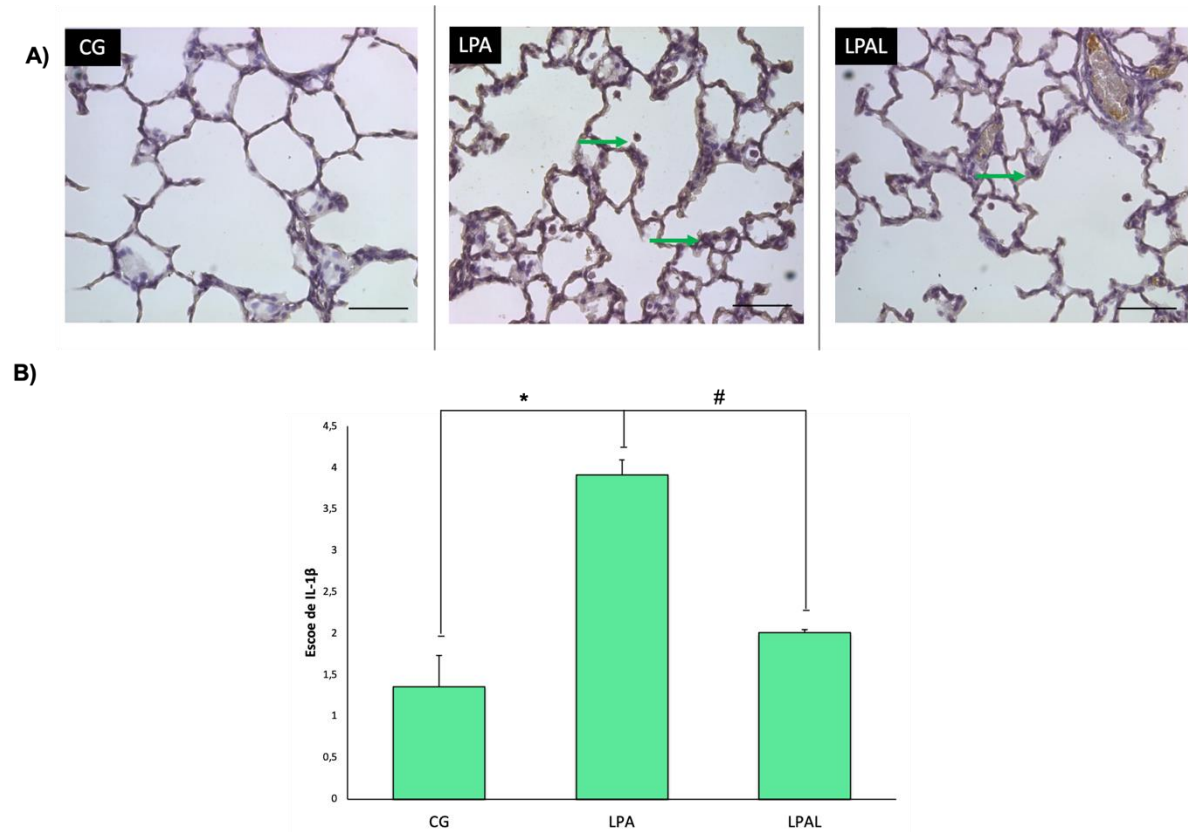


Grupo Controle (CG); Grupo LPA (LPA); Grupo LPA tratado com Laser (LPAL)

5.6 EXPRESSÃO DE IL-1 β

A figura 7A apresenta os resultados da avaliação da imunoexpressão da citocina IL-1 β . Foi possível observar que todos os grupos LPA (LPA e LPAL) tiveram células imunomarcadas para IL-1 β . Além disso, a análise semiquantitativa exibiu menor expressão de IL-1 β em GC ($p < 0,0001$) e LPAL ($p = 0,0341$) quando comparado com LPA (Figura 7B).

Figura 7 - Análise da expressão de IL-1 β



Fotomicrografias representativas da imunoexpressão de IL-1 β ; B) Resultados do escore da expressão de IL-1 β ; Grupo Controle (CG); Grupo LPA (LPA); Grupo LPA tratado com Laser (LPAL). *LPA vs CG (<0,0001); # LAP vs LPAL ($p = 0,0341$)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o intuito de avaliar a influência da PBMT a laser na fase aguda da LPA em modelo experimental de ratos. Os principais resultados mostram que o tratamento com laser foi eficaz em atenuar o infiltrado inflamatório, reduzir o espessamento do septo alveolar e o escore de lesão pulmonar. Além disso, a PBMT a laser reduziu a imunoexpressão de IL-1 β , entretanto, não alterou os níveis de IL-10 pulmonar.

A LPA continua sendo um desafio clínico prevalente e os métodos utilizados para o tratamento, muitas vezes ainda são insuficientemente compreendidos. Para investigar os complexos mecanismos celulares e moleculares acionados por diferentes tipos de tratamentos, modelos animais têm sido utilizados, sendo da técnica de ligadura e punção cecal (CLP), o mais frequentemente utilizado para indução de

LPA decorrente da sepse. Neste modelo, a sepse se origina de um foco infeccioso polimicrobiano inserido dentro da cavidade abdominal, seguida pela translocação bacteriana para o compartimento do sangue, ocasionando uma resposta inflamatória sistêmica, que afeta os pulmões e desencadeia um quadro de LPA. Um requisito deste modelo é que ele seja executado com alta consistência para que se possa obter resultados reproduzíveis (RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Em humanos, a LPA é definida baseado no conjunto bem definido de parâmetros clínicos desenvolvidos por: início agudo, evidência radiológica de infiltrados pulmonares bilaterais difusos, uma proporção da PaO_2 / FIO_2 menor que 300 (BERNARD *et al.*, 1994). No entanto, para a avaliação da LPA induzida em modelo animal, não é prático usar esses mesmos critérios, pois os parâmetros utilizados não são diretamente traduzidos, visto que os dispositivos necessários para essas mensurações são custosos e de difícil acesso, além do fato de que essas mensurações podem ser incompatíveis com o projeto de muitos sistemas experimentais. Como abordagem alternativa para o diagnóstico da LPA em animais, vêm sendo utilizados critérios histopatológicos semelhantes aos observados em humanos com LPA e os correlatos patológicos da LPA são definidos por: dano alveolar difuso, caracterizado por infiltrados inflamatórios, septos alveolares espessados e deposição de membranas hialinas (MATUTE-BELLO *et al.*, 2011).

A análise histológica do presente estudo condiz com os critérios de diagnóstico de LPA estabelecidos por Matute-Bello *et al.* (2011), visto que nos animais que foram submetidos ao modelo de CLP apresentaram alterações morfológicas caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, edema intersticial e espessamento do septo alveolar. Resultados similares foram observados no estudo de Yin *et al.* (2000), os quais verificaram, a ocorrência de uma lesão grave no tecido pulmonar, caracterizada por hemorragia alveolar difusa, espessamento das paredes alveolares e aumento de células inflamatrias, 48 horas após a indução CLP. Curiosamente, no presente estudo, após o tratamento com PBMT a laser em vias aéreas inferiores, os animais apresentaram reduzido infiltrados inflamatórios e menor espessamento do septo alveolar quando comparado aos não tratados. Ainda, é conhecido que o aumento de células inflamatórias, em especial os neutrófilos, é a via comum para essa perda de integridade vascular independente na LPA. Quando ocorre um insulto, os neutrófilos se acumulam na microvasculatura pulmonar e são ativados levando à liberação de vários mediadores tóxicos, incluindo proteases, espécies reativas de oxigênio,

citocinas pró-inflamatórias e moléculas pró-coagulantes, o que resulta em aumento da permeabilidade vascular e subsequente instalação do edema (SHEU *et al.*, 2010; MOWERY *et al.*, 2020). Na análise morfométrica no presente estudo, do número de células inflamatórias, observou-se um menor número das mesmas no grupo tratado com PBMT. Baseado nesses achados, infere-se que a PBMT a laser foi capaz de reduzir os mediadores e sinais inflamação do tecido pulmonar, atenuando o DAD.

Ainda, com relação ao escore de lesão pulmonar proposto pela *American Thoracic Society* (MATUTE-BELLO *et al.*, 2011), observou-se que os animais tratados com PBMT apresentaram menor pontuação quando comparado ao grupo LPA. É importante destacar que esses achados se correlacionam com os achados histopatológicos do presente estudo, sugerindo que a terapia foi eficiente em atenuar os danos do parênquima pulmonar observados na fase aguda da LPA.

Com relação à terapia utilizada, a eficácia da PBMT no tratamento de afecção do trato respiratório vêm sendo demonstrada desde a época dos estudos de Finsen, 1901, onde o autor mostrou recuperação significativa mais rápido de pacientes com infecções pulmonares quando submetidos ao tratamento com fototerapia. Além disso, a prática empírica mostrou que a luz exerce efeitos positivos no tratamento de asma, bronquite e pneumonias aguda e crônica (AMIROV, 2002; ERKINOYNA, TULKUNOYNA, 2006; OSTRONOSOVA, 2006). Embora haja evidências de que a PBMT impulsou reabilitação desses pacientes, ainda existe uma lacuna na literatura com relação aos mecanismos de ação e parâmetros ideais de tratamento, principalmente perante a modulação do processo inflamatório decorrente da LPA.

Como citado anteriormente, a fisiopatologia da LPA está associada ao aumento expressivo de citocinas inflamatórias. Biomarcadores envolvidos nas cascatas inflamatórias e de coagulação, encontradas no epitélio e endotélio predizem morbidade e mortalidade na LPA, com destaque para IL-1 β , ativada por várias células inflamatórias. É conhecido que a ativação de IL-1 β , gera um aumento significativo da síntese de outros fatores pró-inflamatórios, contribuindo assim para a gravidade da DAD. Alguns estudos experimentais mostram que a PBMT no comprimento de onda vermelho é capaz de modular o processo inflamatório pulmonar (AIMBIRE *et al.*, 2005; AIMBIRE *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2011). Lima *et al.*, (2010) e Lima *et al.*, (2011), utilizando um modelo experimental de inflamação pulmonar por instilação de LPS em ratos, demonstraram que o laser 685 nm, 24 horas após a indução da inflamação, foi capaz de minimizar a inflamação pulmonar e lesão endotelial, evidenciado por uma

redução na permeabilidade vascular, edema pulmonar, ativação de neutrófilos no tecido pulmonar e diminuição do TNF- α e IL-1 β . Recentemente, de Cunha *et al.*, 2018 mostraram que a PBMT minimizou significativamente o número de células inflamatórias e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α no líquido do lavado broncoalveolar (LBA) em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica. No presente estudo, foi observado que a PBMT reduziu a expressão proteica local das citocinas pro-inflamatória IL-1 β , inferindo e que a PBMT promoveu a modulação do processo inflamatório e atenuou a progressão da severidade da lesão pulmonar.

Vários mediadores antiinflamatórios também estão presentes no meio alveolar na LAP, incluindo as citocinas IL-10. Essa citocina anti-inflamatórias podem modular uma resposta inflamatória na LPA, minimizando o recrutamento de neutrófilos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α e IL-1 β , além de atuarem de maneira protetora do tecido pulmonar. Há evidência indicando que IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória e pode desempenhar um papel crucial na limitação da imunopatologia da hospedeira durante a LPA ao controlar a ativação de linfócitos T (LEECH *et al.*, 2017). Contudo, é demonstrado que o estresse oxidativo sistêmico é responsável pela redução dos níveis desta citocina, resultando em uma amplificação da resposta inflamatória pulmonar (HOTCHKISS *et al.*, 2016). Utilizando o mesmo modelo experimental do presente estudo, Assis *et al.* (2018) evidenciaram que a terapia PBMT foi eficiente em aumentar a atividade de IL-10 do tecido muscular em fases iniciais do processo (48 horas após indução de sepse). Interessantemente, no presente estudo, não foi possível observar alterações na expressão dessa citocina anti-inflamatória após o tratamento de PBMT. Baseado nesses fatos, pode-se inferir que os parâmetros da PBMT usados não foram capazes de oferecer energia suficiente para induzir a liberação de IL-10 no período experimental estudado.

Assim, baseado nos resultados observados no presente estudo, pode-se sugerir que o comprimento de onda infravermelho foi capaz de induzir uma resposta tecidual adequada capaz de modular os sinais de processo inflamatório agudo pulmonar existente. A atenuação do recrutamento de células inflamatórias comprovada no presente estudo e a redução de IL-1 β , provavelmente está associada com a diminuição de danos no parênquima pulmonar, e, conseqüentemente, redução de lesões pulmonares que ocorrem durante a LPA.

Desta forma, este estudo fornece importantes informações sobre o efeito da PBMT a laser no comprimento de onda infravermelho como coadjuvante do tratamento da LPA.

Ainda, como parte do esforço contínuo de mobilizar todas as ferramentas clínicas com potencial para aliviar o COVID-19 e minimizar sua disseminação, esse estudo oferece razões convincentes para explorar os efeitos potenciais do comprimento de onda infravermelho na contínua luta contra doenças ocasionadas por COVID-19. Entretanto, é necessário investirmos urgentemente, através de estudos experimentais e clínicos controlados e randomizados, com intuito de validar se esse e outros espectros de luz poderiam ser benéficos na luta contínua contra doenças por coronavírus que parece desafiar os sistemas de saúde em todo o mundo.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo apresentamos evidências de que apenas duas aplicações de PBMT a laser no comprimento de onda infravermelho é capaz de reduzir a inflamação em um modelo experimental de LPA, uma das principais complicações críticas da infecção por COVID-19. Esse fenômeno ocorre por meio da atenuação do influxo de células inflamatórias e inibição da secreção de citocina pro-inflamatória, levando a uma diminuição do dano pulmonar. Este tipo de evidência experimental é necessária para o desenho de outros ensaios clínicos envolvendo o uso de PBMT em distúrbios respiratórios semelhantes às complicações associadas às infecções pelo coronavírus.

REFERÊNCIAS

ABOUALIZADEH, Ebrahim et al. Compreender a atividade antimicrobiana de desinfetantes selecionados contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). **Plos um**, v. 12, n. 10, pág. e0186375, 2017.

AIMBIRE, F. et al. Effect of LLLT Ga–Al–As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers in medical science**, v. 20, n. 1, p. 11-20, 2005.

AIMBIRE, F. et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 1, p. 33-37, 2006.

AIMBIRE, F. et al. A terapia a laser de baixo nível (LLLT) diminui o vazamento microvascular pulmonar, o influxo de neutrófilos e os níveis de IL-1 β nas vias aéreas e nos pulmões de ratos submetidos à inflamação induzida por LPS. **Inflamação**, v. 31, n. 3, pág. 189, 2008.

AIMBIRE, F. et al. A terapia a laser de baixo nível (LLLT) diminui o vazamento microvascular pulmonar, o influxo de neutrófilos e os níveis de IL-1 β nas vias aéreas e nos pulmões de ratos submetidos à inflamação induzida por LPS. **Inflamação**, v. 31, n. 3, pág. 189, 2008.

AIMBIRE, F. et al. Efeito da terapia a laser de baixa potência em lesões hemorrágicas induzidas por imunocomplexo em pulmões de ratos. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 2, pág. 112-117, 2007.

Aksenova IZ, Burduli NM. Pathogenetic effects of low-intensity laser therapy for chronic obstructive pulmonary disease. **Ter Arkh.** v. 88, n.3. pág. 32-35, 2016.

ALPERT, Joseph S. A Palestra de Jeremiah Metzger: Jeremiah Metzger e a Era da Helioterapia. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 126, p. 219, 2015.

ALPERT, Joseph S. Sunshine: clínico amigo ou inimigo?. **The American Journal of medicine**, v. 123, n. 4, pág. 291-292, 2010.

AMIROV, N. B. Parameters of membrane permeability, microcirculation, external respiration, and trace element levels in the drug-laser treatment of pneumonia. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 74, n. 3, p. 40, 2002.

ANDERS, Juanita J.; LANZAFAME, Raymond J.; ARANY, Praveen R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomedicine and laser surgery**, v. 33, n. 4, p. 183-184, 2015.

ASHBAUGH, David G et al. Acute respiratory distress in adults. **The Lancet**, v. 290, n. 7511, p. 319-323, 1967.

ASSIS, Livia et al. Interleukin-10 and collagen type II immunoexpression are modulated by photobiomodulation associated to aerobic and aquatic exercises in an experimental model of osteoarthritis. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 9, p. 1875-1882, 2018.

ASSIS, Livia et al. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 3, p. 947-955, 2013.

BELLANI, Giacomo et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. **Jama**, v. 315, n. 8, p. 788-800, 2016.

BENEDETTI, Francesco et al. Morning sunlight reduces length of hospitalization in bipolar depression. **Journal of affective disorders**, v. 62, n. 3, p. 221-223, 2001.

BERNARD, G. R. et al. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 149, n. 3 Pt 1, p. 818-824, 1994.

BIENER, Gabriel et al. Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, p. 118-124, 2017.

BROCHETTI, Robson Alexandre et al. Photobiomodulation therapy improves both inflammatory and fibrotic parameters in experimental model of lung fibrosis in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 8, p. 1825-1834, 2017.

BUMAH, Violet V.; MASSON-MEYERS, Daniela S.; ENWEMEKA, Chukuka S. Blue 470 nm light suppresses the growth of *Salmonella enterica* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. **Lasers in surgery and medicine**, v. 47, n. 7, p. 595-601, 2015.

BUMAH, Violet Vakunseh; MASSON-MEYERS, Daniela Santos; ENWEMEKA, Chukuka Samuel. Pulsed 450 nm blue light suppresses MRSA and *Propionibacterium acnes* in planktonic cultures and bacterial biofilms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 202, p. 111702, 2020.

CAMACHO, Alessandra Conceição Leite Funchal et al. Students in social vulnerability in distance education disciplines in times of COVID-19. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 275973979, 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL: Basic information about SARS, pages 1-2, January 13, 2004.

CHUNG, Hoon et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of biomedical engineering**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012.

COSTA, Silvia Goes et al. Beneficial effects of Red Light-Emitting Diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

DA CUNHA MORAES, Gabriel et al. Low-level laser therapy reduces lung inflammation in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease involving P2X7 receptor. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

DA SILVA SERGIO, Luiz Philippe et al. A fotobiomodulação evita a fragmentação do DNA de células epiteliais alveolares e altera os níveis de mRNA dos genes da caspase 3 e Bcl-2 na lesão pulmonar aguda. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 7, p. 975-983, 2018.

DA-PALMA-CRUZ, Marlon et al. Photobiomodulation modulates the resolution of inflammation during acute lung injury induced by sepsis. **Lasers in medical science**, v. 34, n. 1, p. 191-199, 2018.

DE BRITO, Auriléia Aparecida et al. Low-level laser therapy attenuates lung inflammation and airway remodeling in a murine model of idiopathic pulmonary fibrosis: Relevance to cytokines secretion from lung structural cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111731, 2020.

DE LIMA, F. Mafra et al. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* in rat. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, n. 3, p. 271-278, 2010.

DE LIMA, Flávia Mafra et al. "Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome." **Lasers in medical science** ,v. 26, n.3, p. 389-400, 2011.

DE LIMA, Flávia Mafra et al. Low-level laser therapy attenuates the myeloperoxidase activity and inflammatory mediator generation in lung inflammation induced by gut ischemia and reperfusion: a dose-response study. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 5, n. 2, p. 63, 2014.

DE SOUSA, Natanael Teixeira Alves et al. Blue laser inhibits bacterial growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 5, p. 278-282, 2015.

DE VASCONCELOS, Dantas Emanuelle Paiva et al. Fotobiomodulação como coadjuvante no tratamento na lesão pulmonar aguda decorrente da sepse. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5929109024-e5929109024, 2020.

ENWEMEKA, Chukuka Samuel; BUMAH, Violet Vakunseh; MASSON-MEYERS, Daniela Santos. Luz como um tratamento potencial para infecções pandêmicas de coronavírus: uma perspectiva. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , p. 111891, 2020.

ERKINOVNA, Tashmukhamedova Barno; TULKUNOVNA, Mukhamedova Hadicha. Efficacy of laser therapy in infants with infectious-inflammatory respiratory diseases. **European science review**, n. 1-2, 2016.

FAN, Eddy; BRODIE, Daniel; SLUTSKY, Arthur S. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment. **Jama**, v. 319, n. 7, p. 698-710, 2018.

FERGUSON, Niall D. et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. **Intensive care medicine**, v. 38, n. 10, p. 1573-1582, 2012.

GØTZSCHE, P. C. Niels Finsen's treatment for lupus vulgaris. **Journal of the royal society of medicine**, v. 104, n. 1, p. 41-42, 2011.

GUO, Yan-Rong et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2020.

HAMBLIN, Michael R. et al. Helicobacter pylori accumulates photoactive porphyrins and is killed by visible light. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2822-2827, 2005.

HAMBLIN, Michael R. Fotobiomodulação ou terapia a laser de baixa intensidade. **Journal of biophotonics**, v. 9, n. 11-12, pág. 1122, 2016.

HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337, 2017.

HAMBLIN, Michael R.; NELSON, Scott T.; STRAHAN, Justin R. Photobiomodulation and cancer: what is the truth?. **Photomedicine and laser surgery**, v. 36, n. 5, p. 241-245, 2018.

HOBDAY, R. A.; DANCER, S. J. Roles of sunlight and natural ventilation for controlling infection: historical and current perspectives. **Journal of hospital infection**, v. 84, n. 4, p. 271-282, 2013.

HOBDAY, Richard A.; CASON, John W. O tratamento ao ar livre da pandemia de influenza. **Jornal americano de saúde pública**, v. 99, n. S2, pág. S236-S242, 2009.

HOCKBERGER, Philip E. The discovery of the damaging effect of sunlight on bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 58, n. 2-3, p. 185-191, 2000.

HOPKINS, J. (2020). Coronavirus Resource Center. *Im Internet (Stand: 19.04. 2020):* <https://coronavirus.jhu.edu/data>.

HOTCHKISS, Richard S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2016.

HUANG, Ying-Ying et al. Biphasic dose response in low level light therapy—an update. **Dose-Response**, v. 9, n. 4, p. dose-response. 11-009. Hamblin, 2011

HUGHES, Kenneth T.; BEASLEY, Mary Beth. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 141, n. 7, p. 916-922, 2017.

IUS, Landyshev et al. Efficacy of low intensity laser irradiation and sodium nedocromil in the complex treatment of patients with bronchial asthma. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 74, n. 3, p. 25-28, 2002.

JESTER, Barbara J. et al. 100 Years of medical countermeasures and pandemic influenza preparedness. **American journal of public health**, v. 108, n. 11, p. 1469-1472, 2018.

JOHNSON, Elizabeth R.; MATTHAY, Michael A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery**, v. 23, n. 4, p. 243-252, 2010.

JOHNSON, Niall PAS; MUELLER, Juergen. Atualizando as contas: mortalidade global da pandemia de influenza "espanhola" de 1918-1920. **Boletim de História da Medicina**, p. 105-115, 2002.

KARU, Tiina. Is it time to consider photobiomodulation as a drug equivalent?. 2013.

KASHANSKAIA, E. P.; FEDOROV, A. A. Low-intensity laser radiation in the combined treatment of patients with chronic obstructive bronchitis. **Voprosy kurortologii, fizioterapii, i lechebnoi fizicheskoi kultury**, n. 2, p. 19-22, 2009.

KREIMER, Flávio et al. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, p. 31-39, 2005.

LANG, John D. et al. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. **Chest**, v. 122, n. 6, p. 314S-320S, 2002.

LEECH, John M. et al. IL-10 plays opposing roles during Staphylococcus aureus systemic and localized infections. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 6, p. 2352-2365, 2017.

LIMA, Flávia Mafra de et al. Estudo do efeito do laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar induzida por isquemia e reperfusão intestinal. 2013.

LIU, Yakun et al. Cell-type apoptosis in lung during SARS-CoV-2 infection. **bioRxiv**, 2020.

MACLEAN, M. et al. Environmental decontamination of a hospital isolation room using high-intensity narrow-spectrum light. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, n. 3, p. 247-251, 2010.

MACLEAN, Michelle et al. Continuous decontamination of an intensive care isolation room during patient occupancy using 405 nm light technology. **Journal of Infection Prevention**, v. 14, n. 5, p. 176-181, 2013.

MAFRA DE LIMA, F. et al. Non invasive laser therapy reduces cholinergic hyperactivity and hypo activity of airways in experimental model of acute lung inflammation induced by ischemia and intestinal perfusion in rats; Laserterapia nao-invasiva reduz a hiperreatividade ea hiporreatividade colinergica das vias aereas em modelo experimental de inflamacao pulmonar aguda induzida por isquemia e reperfusao intertinal em ratos. 2009.

MARTIGNAGO, Cintia Cristina Santi et al. Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats. **Lasers in medical science**, v. 34, n. 5, p. 1041-1047, 2019.

MASSON-MEYERS, Daniela Santos et al. Pulsed 450 nm blue light significantly inactivates Propionibacterium acnes more than continuous wave blue light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 202, p. 111719, 2020.

MATUTE-BELLO, Gustavo et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.

MCDONAGH, Antony F. Phototherapy: from ancient Egypt to the new millennium. **Journal of Perinatology**, v. 21, n. 1, p. S7-S12, 2001.

MESTER, E. et al. Clinical electron optic and enzyme-histochemical studies on the effect of laser irradiation on wound healing. **Langenbecks Archiv fur Chirurgie**, p. 261-265, 1974.

MIRANDA DA SILVA, Cristiane et al. Low level laser therapy reduces the development of lung inflammation induced by formaldehyde exposure. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0142816, 2015.

MØLLER, Kirsten Iversen et al. How Finsen's light cured lupus vulgaris. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 21, n. 3, p. 118-124, 2005.

MOWERY, Nathan T et al. "Acute lung injury." *Current problems in surgery* vol. 57, n.5, 2020.

OLIVEIRA JR, Manoel Carneiro et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS-induced ARDS. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 134, p. 57-63, 2014.

OMS: Atualização oficial do COVID. [Citado 2020 jun 27].
Disponível em: <https://www.paho.org/bra>.

OSTRONOSOVA, N. S. Outpatient use of laser therapy in bronchial asthma. **Terapevticheskii arkhiv**, v. 78, n. 3, p. 41-44, 2006.

PANDEY, Kanti Bhooshan; RIZVI, Syed Ibrahim. Marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos e plasma durante o envelhecimento em humanos. **Medicina oxidativa e longevidade celular**, v. 3, 2010.

PETTY, Thomas L.; ASHBAUGH, David G. The adult respiratory distress syndrome: clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. **Chest**, v. 60, n. 3, p. 233-239, 1971.

RIGONATO-OLIVEIRA, Nicole Cristine et al. Effect of low level laser therapy in a model of pulmonary idiopathic fibrosis. 2015.

RITTIRSCH, Daniel et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2009.

ROELANDTS, Rik. A história da fototerapia: uma novidade sob o sol?. **Jornal da Academia Americana de Dermatologia**, v. 46, n. 6, pág. 926-930, 2002.

SANTIAGO, Edgo Jackson Pinto et al. Velocity of deaths and confirmed cases of COVID-19 in Brazil, Italy and worldwide. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 263974085, 2020.

SHANY-KDOSIM, Sharon et al. Killing mechanism of bacteria within multi-species biofilm by blue light. **Journal of oral microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1628577, 2019.

SHEU, Chau-Chyun et al. The influence of infection sites on development and mortality of ARDS. **Intensive care medicine**, v. 36, n. 6, p. 963-970, 2010.

SILVA MACEDO, Rodrigo et al. Photobiomodulation therapy decreases oxidative stress in the lung tissue after formaldehyde exposure: role of oxidant/antioxidant enzymes. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

SILVA, Vanessa R. et al. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 194, p. 37-48, 2014.

SNELLMAN, E. et al. Effect of heliotherapy on skin and joint symptoms in psoriasis: a 6-month follow-up study. **British Journal of Dermatology**, v. 128, n. 2, p. 172-177, 1993.

SPINNEY, Laura. A gripe espanhola: um problema interdisciplinar. **The Lancet**, v. 392, n. 10164, p. 2552, 2018.

STEFFENS, Ines. A hundred days into the coronavirus disease (COVID-19) pandemic. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 14, p. 2000550, 2020.

WANG, Ying; GU, Ying; DAI, Tianhong. Inativação antimicrobiana pela luz azul de *Neisseria gonorrhoeae*. In: **Diagnóstico baseado em luz e tratamento de doenças infecciosas**. Sociedade Internacional de Óptica e fotônica, 2018. p. 1047900.

WARE, Lorraine B.; MATTHAY, Michael A. The acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334-1349, 2000.

YANG, Penggao et al. 460 nm visible light irradiation eradicates MRSA via inducing prophage activation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 311-322, 2017.

YIN, Kingsley et al. Lung compartmentalization of inflammatory cells in sepsis. **Inflammation**, v. 24, n. 6, p. 547-557, 2000

YOSHIDA, Ayaka et al. Antimicrobial effect of blue light using *Porphyromonas gingivalis* pigment. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

YUSUPALIEVA, M. M.; SAVTCHENKO, V. M. The effectiveness of combined laser therapy for the treatment of the patients presenting with bronchial asthma and concomitant allergic rhinitis. **Voprosy Kurortologii, Fizioterapii, i Lechebnoi Fizicheskoi Kultury**, v. 94, n. 4, p. 14-18, 2017.

ZHAI, Yu et al. Hydrogen-rich saline ameliorates lung injury associated with cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 2, p. 268-276, 2015.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO

Research, Society and Development, v. 9, n. 8, e766986320, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.6320>

Perspectiva terapêutica da luz para tratamento do coronavírus

Therapeutic perspective of light for coronavirus treatment

Perspectiva terapéutica de la luz para el tratamiento del coronavirus

Recebido: 04/07/2020 | Revisado: 10/07/2020 | Aceito: 14/07/2020 | Publicado: 19/07/2020

Daniela Bezerra Macedo

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7220-5051>

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: dani-lohane@hotmail.com

Carla Roberta Tim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4745-9375>

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: carla.tim@universidadebrasil.edu.br

Juliana Bezerra Macedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2742-0000>

Universidade Estadual do Piauí, Picos, PI, Brasil

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: juliabezmacedo@hotmail.com

Glauber Bezerra Macedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2914-2689>

Universidade Estadual do Piauí, Brasil

E-mail: glaubermacedo@hotmail.com

Cintia Cristina Santi Martignago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3980-6354>

Universidade Federal de São Carlos, Brasil

E-mail: csantimartignago@yahoo.com.br

Lívia Assis Garcia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8343-3375>

Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Brasil

E-mail: livia.assis@universidadebrasil.edu.br

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA



UNIVERSIDADE
BRASIL

RESOLUÇÃO - PARECER
COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS –
CEUA

PROTOCOLO N° 2000090

RESPONSÁVEL

Nome completo	Lívia Assis Garcia
Instituição	Universidade Brasil
Unidade	Itaquera - SP
Departamento / Disciplina	Engenharia Biomédica

Telefone	13991445732
E-mail	livia.assis@universidadebrasil.edu.br

TÍTULO DO PROJETO

**Avaliação da fotobiomodulação no tratamento da lesão pulmonar
aguda em modelo experimental de sepse**

RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 10/12/2020, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão
Cássia Maria Barroso Orlandi