

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**THAIS FERNANDA FAZZA**

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO  
MECÂNICA**

**JUIZ DE FORA  
2019**

**THAIS FERNANDA FAZZA**

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO  
MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo

Coorientadores: Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro

Prof<sup>a</sup>. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda

**JUIZ DE FORA**

**2019**

**THAIS FERNANDA FAZZA**

**EFEITO DA TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO  
MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovado em 01 de março de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo – Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda  
Universidade Federal de Juiz de Fora - Coorientadora

---

Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Dr. Bruno Curty Berganini  
Hospital Militar do Exército de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus. A Ele devo minha existência e todas as vitórias alcançadas até aqui, inclusive esta.

Aos meus pais, Fernando e Cida, pelo apoio incondicional e sempre muito amoroso, em todas as etapas da minha vida. À minha irmã Ana Paula, pela fiel torcida para que tudo sempre dê certo. Ao meu noivo Iury, por compreender minha ausência em dias e noites de estudo, pelo amor e companheirismo diários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Maycon de Moura Reboredo pela atenciosa e impecável ajuda durante esta orientação, transmitindo seus conhecimentos sempre com muita paciência e delicadeza.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Bruno do Valle Pinheiro e Prof<sup>a</sup>. Dra. Leda Marília Fonseca Lucinda por todo ensinamento prestado ao longo desta trajetória, sendo fundamentais na construção deste trabalho.

À Lídia Maria Carneiro da Fonseca por ter me ajudado de forma tão generosa e inteligente, desde a fase experimental até a escrita dessa dissertação.

Às alunas de iniciação científica Andressa Meurer, Mariana Leitão, Júlia Sant'Anna e Jussara Ribeiro pela valiosa ajuda na execução dos experimentos.

Aos meus queridos pacientes pelo apoio e compreensão de sempre.

A todos os colegas e acadêmicos do Núcleo de Pneumologia, pela troca de aprendizado constante durante as nossas reuniões.

Aos integrantes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF que gentilmente nos acolheram e nos ajudaram na condução deste trabalho experimental.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (427984/2016-5), à Rede Mineira TOXIFAR e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

*“A força não provém da capacidade física.  
Provém de uma vontade indomável.”*

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

**JUSTIFICATIVA:** A lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPIV) caracteriza-se por uma resposta inflamatória a um *stress/strain* não fisiológico nos pulmões durante a ventilação mecânica (VM). Estudos observaram os efeitos anti-inflamatórios da terapia a laser de baixa potência (TLBP) em algumas doenças inflamatórias. Neste estudo foi avaliado o efeito da TLBP em um modelo experimental de LPIV em ratos Wistar.

**MÉTODOS:** Vinte e quatro ratos Wistar adultos machos foram alocados aleatoriamente em quatro grupos: VM protetora (VMP), VMP com laser, LPIV e LPIV com laser. Os animais do grupo VMP foram ventilados com o volume corrente (Vt) de 6 ml/Kg, frequência respiratória (FR) de 80 respirações/min, pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cmH<sub>2</sub>O e fração de oxigênio inspirado (FiO<sub>2</sub>) de 1. Os grupos LPIV foram ventilados com Vt de 35 ml/Kg, FR de 18 respirações/min, PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O e FiO<sub>2</sub> de 1. Após os primeiros 60 minutos de ventilação, os animais dos grupos laser foram irradiados (808 nm, densidade de potência de 100 mW, densidade de energia de 20 J/cm<sup>2</sup>) em seis pontos da região torácica anterior por contato direto com a pele. Após o período total de ventilação (90 minutos), os animais foram eutanasiados e as seguintes análises foram realizadas: histologia pulmonar (lesão pulmonar aguda – LPA score), lavado broncoalveolar (LBA) para contagem de células e expressões gênicas do mRNA de IL1-β, IL-6, TNF-α, CXCL2 e IL-10. **RESULTADOS:** Os animais do grupo LPIV apresentaram maior score de LPA com aumento de neutrófilos nos espaços intersticial e alveolar, maior contagem de neutrófilos no LBA e maiores expressões gênicas de citocinas pró-inflamatórias (IL1-β, IL-6, TNF-α) e quimiocina CXCL2, comparados ao grupo VMP (p<0,05). Por outro lado, quando o grupo LPIV com laser foi comparado ao grupo LPIV, foi observado menor score de LPA (0,35 ± 0,08 vs. 0,54 ± 0,13, p<0,05) e neutrófilo alveolar (7,00 ± 5,73 vs. 21,50 ± 9,52, p<0,05), menor contagem total de células (1,90 ± 0,71 vs. 4,09 ± 0,96 x10<sup>5</sup>, p<0,05) e de neutrófilos no LBA (0,60 ± 0,37 vs. 2,28 ± 0,48 x10<sup>5</sup>, p<0,05). Além disso, a TLBP induziu redução significativa da expressão gênica de mRNA das citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), quando comparado ao grupo LPIV (p<0,05).

**CONCLUSÃO:** A TLBP reduziu a resposta inflamatória em um modelo experimental de LPIV ao modular a expressão de citocinas inflamatórias.

**Palavras-chave:** lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica, síndrome do desconforto respiratório do adulto, terapia com luz de baixa intensidade, respiração artificial, inflamação.

## ABSTRACT

**RATIONALE:** Ventilator induced lung injury (VILI) is characterized by inflammatory response to an unphysiological stress/strain imposed to the lungs, during mechanical ventilation (MV). Studies have reported the anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) in different inflammatory diseases. Therefore, in this study we evaluated the effect of LLLT on VILI in Wistar rats.

**METHODS:** Twenty four adult male Wistar rats were randomized to four groups: protective MV (PMV), PMV with laser, VILI and VILI with laser. The animals of protective MV groups were ventilated with tidal volume (Vt) of 6 ml/Kg, respiratory rate (RR) of 80 breaths/min, positive end-expiratory pressure (PEEP) of 5 cmH<sub>2</sub>O, and fraction of inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>) of 1. VILI groups were ventilated with Vt of 35 ml/Kg, RR of 18 breaths/min, PEEP of 0 cmH<sub>2</sub>O, and FiO<sub>2</sub> of 1. After the first 60 minutes of ventilation, the animals of laser groups were irradiated with LLLT (808 nm, power density of 100 mW, energy density of 20 J/cm<sup>2</sup>) in six points of anterior thoracic region by direct contact with skin. After the total period of ventilation (90 minutes), the animals were euthanized and the following analyses were performed: lung histology (acute lung injury - ALI score), bronchoalveolar lavage (BAL) and IL1-β, IL-6, TNF-α, CXCL2 and IL-10 mRNA gene expressions.

**RESULTS:** The animals of VILI group showed greater ALI score with an increase in alveolar and interstitial neutrophil infiltration, higher neutrophil count in the BAL, and greater acute pro-inflammatory cytokines (IL1-β, IL-6, TNF-α) and CXCL2 chemokine mRNA gene expressions compared to PMV groups (p<0.05). On the other hand, when the VILI with laser group was compared to VILI group, it showed lower ALI score (0.35 ± 0.08 vs. 0.54 ± 0.13, p<0.05) and alveolar neutrophil infiltration (7 ± 5.73 vs. 21.50 ± 9.52, p<0.05), and lower total cell count (1.90 ± 0.71 vs. 4.09 ± 0.96 x10<sup>5</sup>, p<0.05) and neutrophil count in the BAL (0.60 ± 0.37 vs. 2.28 ± 0.48 x10<sup>5</sup>, p<0.05). Moreover, LLLT induced a significant decrease in pro-inflammatory cytokines and an increase of anti-inflammatory cytokine (IL-10) mRNA gene expressions compared to VILI group (p<0.05).

**CONCLUSIONS:** LLLT reduced the inflammatory response in an experimental model of VILI by modulating inflammation related cytokines expression.

**KEYWORDS:** ventilator-induced lung injury, respiratory distress syndrome, adult. low-level laser therapy, mechanical ventilation, inflammation.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	SISTEMA DE ESCORE DE LESÃO PULMONAR.....	53
----------	--	----

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	47
FIGURA 2	LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAD	Dano alveolar difuso
FR	Frequência respiratória
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
I:E	Relação inspiração e expiração
KC	Queratinócito quimiotático
i-I/R	Isquemia e reperfusão intestinal
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
LBA	Lavado broncoalveolar
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPIV	Lesão pulmonar induzida pela ventilação
LPS	Lipopolissacáride
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2 (CXCL2)
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear do Kappa B
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PaO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub>	Relação entre a pressão parcial de oxigênio no sangue arterial e a

	fração inspirada de oxigênio
PEEP	Pressão expiratória final positiva
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TLBP	Terapia a laser de baixa potência
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de terapia intensiva
VM	Ventilação mecânica
VMP	Ventilação mecânica protetora
Vt	Volume corrente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.....	20
2.2	LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA.....	26
2.3	MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA .....	32
2.4	TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA .....	36
2.5	TERAPIA A LASER EM MODELOS DE LESÃO PULMONAR AGUDA.....	39
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>5</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
5.1	ANIMAIS.....	46
5.2	CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO .....	46
5.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	47
5.3.1	Grupos experimentais .....	47
5.3.2	Protocolo de ventilação mecânica.....	47
5.3.3	Protocolo de aplicação do laser.....	49
5.3.4	Eutanásia e remoção dos pulmões.....	50
5.4	VARIÁVEIS ANALISADAS.....	51
5.4.1	Lavado bromcoalveolar.....	51
5.4.2	Histologia.....	52

5.4.3	EXTRAÇÃO DE RNA E <i>REAL TIME</i> PCR (qPCR).....	53
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	58
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
	<b>ANEXOS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) representa uma condição clínica de relevância por apresentar fisiopatologia complexa, alta taxa de mortalidade e elevados custos de tratamento, afetando principalmente doentes em estágios críticos em unidades de terapia intensiva (UTI) (WARE; MATTHAY, 2000; WHEELER; BERNARD, 2007). A abordagem terapêutica para SDRA ainda é bem discutida e envolve várias estratégias, como: ventilação mecânica (VM) com baixos volumes correntes, controle da *driving pressure*, manobras de recrutamento, posição prona e ventilação de alta frequência (AMATO et al., 2007; AMATO et al., 2015; FAM et al., 2018). Entre as possibilidades terapêuticas, a VM protetora ainda se mostra o recurso mais efetivo a ser implementado nesta condição clínica (FAM et al., 2018).

Apesar de ser essencial ao suporte a vida de doentes críticos, a VM pode induzir ou agravar a lesão pulmonar (MARINI, 2013; SILVA; NEGRINI; ROCCO, 2015). As principais características patológicas dos danos gerados pela VM são aumento da permeabilidade vascular, infiltrados de células inflamatórias, presença de membranas hialinas, e edema pulmonar, e ao conjunto dessas consequências da VM, foi dado o nome de lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPIV) (SLUTSKY; RANIERI, 2013).

Apesar de vários fatores estarem envolvidos na fisiopatologia da LPIV, classicamente quatro mecanismos estão associados a esta lesão: barotrauma, volutrauma, atelectrauma e biotrauma. Atualmente, sabe-se que o biotrauma é o mecanismo mais complexo da LPIV, representando o processo inflamatório desencadeado pela VM, e que compreende quatro importantes etapas: a mecanotransdução, a ativação de fatores de transcrição, a produção de

mediadores inflamatórios e o recrutamento e a ativação de neutrófilos (INGBER, 1991; CHEN et al., 2018).

A LPIV é amplamente estudada em modelos experimentais o que contribuiu sobremaneira para o entendimento da fisiopatologia da lesão e também para a avaliação de estratégias para a sua prevenção e tratamento. Em um estudo prévio realizado por nosso grupo, foi avaliado e confirmado o efeito protetor da dexametasona na LPIV induzida por alto volume corrente (Vt: 35 ml/kg) em ratos Wistar, sendo esta terapia capaz de atenuar a lesão pulmonar (REIS, et al., 2015). Apesar do efeito benéfico de diferentes estratégias para o tratamento da lesão pulmonar aguda (LPA) em modelos experimentais, poucos estudos avaliaram o uso da terapia a laser de baixa potência (TLBP).

A TLBP tem se mostrado como uma estratégia promissora por modular vários efeitos biológicos observados no comportamento de células específicas (SCHAFFER et al., 2000; MIRSKY et al., 2002; FUKUDA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; MANCHINI et al., 2017). Suas ações anti-inflamatória e preventiva de edema ocorrem mediante a aceleração da microcirculação, que culminam em alterações na pressão hidrostática capilar com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos (SCHAFFER et al., 2000; LINS et al., 2010). No processo inflamatório, estes efeitos da TLBP não são apenas imediatos e não restringem-se ao efeito inibitório na quimiotaxia de células inflamatórias, mas também reduz o número de leucócitos já presentes no local da lesão, mostrando sua eficiência em melhorar a resposta imune (FUKUDA et al., 2013).

Os efeitos da TLBP foram avaliados em diferentes modelos experimentais de LPA e esta terapia foi associada à redução de células inflamatórias no tecido pulmonar, diminuição de secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, além de redução do edema, do influxo de neutrófilos e da atividade da mieloperoxidase (MPO) (LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; CURY et al. 2016).

Apesar das evidências iniciais confirmarem os efeitos benéficos da TLBP na LPA, no melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou o efeito do laser de baixa potência em um modelo de LPiV.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Síndrome do desconforto respiratório agudo

A SDRA representa atualmente uma condição clínica de relevância por apresentar fisiopatologia complexa, alta taxa de mortalidade e elevados custos de tratamento, afetando principalmente doentes em estágios críticos em UTI (WARE; MATTHAY, 2000; WHEELER; BERNARD, 2007).

A primeira definição de SDRA foi estabelecida por Ashbaugh e colaboradores em 1967 após analisarem 272 pacientes dos quais 12 evoluíram, de forma aguda, com taquipneia, hipoxemia, redução da complacência respiratória e infiltrados pulmonares difusos, observados na radiografia de tórax. A esse conjunto de sinais e sintomas denominaram a síndrome (ASHBAUGH et al., 1967). Em 1994, foi realizada a Conferência de Consenso Americano Europeu (AECC) a qual redefiniu SDRA como insuficiência respiratória de início agudo, também com presença de infiltrados bilaterais vistos na radiografia de tórax, pressão capilar pulmonar menor ou igual a 18 mmHg (para descartar edema pulmonar de origem cardiogênica) e hipoxemia, com relação de  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  menor ou igual a 200 mmHg. Neste mesmo consenso a LPA foi determinada seguindo os mesmos critérios, exceto para a relação de  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  que deve ser considerada menor ou igual a 300 mmHg e maior que 200 mmHg (BERNARD et al., 1994). Apesar destes critérios terem sido amplamente utilizados, alguns pesquisadores acreditavam que para definir SDRA era importante especificar o nível de pressão positiva no

final da expiração (PEEP) e/ou a fração de oxigênio inspirado ( $FiO_2$ ) (RANIERI et al., 2012).

Sendo assim, a definição de Berlim, atualmente descreve a SDRA como uma condição de instalação aguda, que ocorre no período de tempo de uma semana, em resposta a um insulto conhecido ou uma piora dos sintomas respiratórios dentro desse mesmo período, acompanhado por opacidades alveolares bilaterais na radiografia ou tomografia computadorizada de tórax, não completamente explicadas por derrame pleural, atelectasias ou nódulos (RANIERI et al., 2012). Outro critério é sua caracterização como falência respiratória não completamente explicada por insuficiência cardíaca ou hipervolemia (podendo ser necessária avaliação objetiva, como ecocardiograma, para excluir edema hidrostático). Adicionalmente, deve-se considerar um quadro de hipoxemia definido por  $PaO_2/FiO_2$  menor ou igual que 300  $cmH_2O$ , estando o paciente recebendo PEEP ou pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP) de pelo menos 5  $cmH_2O$ . A intensidade da hipoxemia irá determinar a classificação da SDRA em: leve, com  $PaO_2/FiO_2$  entre 300 e 201 mmHg (com PEEP ou CPAP  $\geq$  5  $cmH_2O$ ); moderada, com  $PaO_2/FiO_2$  entre 200 e 101 mmHg (com PEEP  $\geq$  5  $cmH_2O$ ); e grave, com  $PaO_2/FiO_2$  menor ou igual a 100 mmHg (com PEEP  $\geq$  5  $cmH_2O$ ) (RANIERI et al., 2012).

A SDRA é uma condição relativamente comum, mas sua epidemiologia ainda varia bastante entre os estudos (RUBENFELD et al., 2005; VILLAR et al., 2011). Um trabalho brasileiro, multicêntrico, envolvendo 14 UTIs clínicas, teve como um de seus objetivos avaliar a prevalência e os desfechos da SDRA em uma grande coorte de pacientes críticos. Este estudo concluiu que a prevalência de SDRA, seguindo os critérios da definição de Berlim, encontrou

incidência de 6,3 casos por 100.000 habitantes por ano (CASER et al., 2014). Bellani et al. (2016), no estudo multicêntrico observacional SAFE LUNG realizado em 459 UTIs de 50 países, observaram que dos 29.144 pacientes incluídos, 3022 preencheram os critérios de SDRA, sendo estes responsáveis por 10,4% do total das admissões. Neste estudo, as prevalências de SDRA leve, moderada e grave foram de 30,0%, 46,6% e 23,4%, respectivamente. Além disso, foi encontrada uma mortalidade hospitalar atribuída à SDRA de 40%, com variação desse índice de acordo com a gravidade da SDRA (baseada na definição de Berlin): 34,9% para SDRA leve; 40,3% para SDRA moderada; e 46,1% para SDRA grave. Outros fatores, além da gravidade da SDRA, também estão associados à maior mortalidade por esta síndrome como presença de comorbidades, cirurgia prévia, maiores escores de gravidade na admissão e escores de falência de órgãos (REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI, 2017; PHUA et al., 2009).

A SDRA origina-se de uma lesão pulmonar aguda, caracterizada por injúria do endotélio e epitélio pulmonar, que culmina com a quebra da barreira alvéolo-capilar. A SDRA é denominada pulmonar quando a resposta inflamatória que lesa a membrana alvéolo-capilar se origina nos pulmões devido a condições que agredem de forma direta o epitélio alveolar tais como aspiração, infecção pulmonar (bacteriana, viral e outros), quase afogamento, inalação tóxica, contusão pulmonar, embolia gordurosa e toxicidade pelo oxigênio. Quando a membrana alvéolo-capilar é lesada por uma resposta inflamatória sistêmica e aguda como ocorre nos casos de sepse, choque circulatório, politrauma, trauma crânio-encefálico, múltiplas transfusões, pancreatite aguda, queimaduras, circulação extracorpórea e overdose de

drogas, a SDRA é denominada extrapulmonar (FOWLER et al., 1983; PEPE et al., 1982; PELOSI et al., 2003).

Esta classificação de SDRA como pulmonar e extrapulmonar não apenas define a etiologia da síndrome, mas também pode caracterizar as lesões pulmonares subsequentes. Na SDRA pulmonar, por exemplo, há marcadamente colapso alveolar mais pronunciado, além de maior material exsudativo fibrinoso, edema alveolar, colágeno e remodelamento quando comparada à SDRA extrapulmonar (PELOSI et al., 2003).

A fisiopatologia da SDRA tem como marco central o dano da membrana alvéolo-capilar. Do mecanismo inflamatório que promove tal dano participam células inflamatórias, citocinas pró-inflamatórias (Fator de necrose tumoral alfa – TNF- $\alpha$ ; interleucina 1 – IL-1 e interleucina 6 – IL-6) e o stress oxidativo pela produção extensiva de radicais livres (PIERRAKOS et al., 2011). A lesão da membrana alvéolo-capilar resulta no aumento da sua permeabilidade, o que permite que haja um influxo de líquido rico em proteínas para o alvéolo. Contribui também para o preenchimento dos alvéolos por líquidos, a remoção deficitária destes, em consequência da SDRA. O edema pulmonar resultante é o principal responsável pelas manifestações clínicas da SDRA pois, a passagem de sangue pelos alvéolos não ventilados, resulta em *shunt pulmonar* que tem como expressão clínica a insuficiência respiratória aguda e hipoxêmica (WARE; MATTHAY, 2000; THILLE et al., 2013).

O achado histopatológico característico da SDRA é o dano alveolar difuso (DAD). Em uma recente revisão, os autores descreveram que a presença de um padrão patológico de DAD associou-se a maior mortalidade em comparação àqueles pacientes que preenchiam os critérios de SDRA e não

apresentaram DAD no exame histopatológico (CARDINAL-FERNÁNDEZ et al., 2016).

A patogênese da SDRA pode ser dividida em três fases: exsudativa, proliferativa e fibrótica.

*Fase exsudativa:* Caracteriza-se por início agudo e ocorre em um prazo de sete dias, tão logo a insuficiência respiratória esteja instalada. Esta fase compreende a resposta inflamatória ao insulto ocorrido, com dano às camadas endotelial e epitelial da membrana alvéolo-capilar havendo a formação de edema alveolar e intersticial com a presença de membranas hialinas no interior dos alvéolos. O achado histopatológico desta fase é o DAD (THILLE et al., 2013; LORENTE et al., 2015). Várias são as citocinas liberadas durante todo o mecanismo de lesão da SDRA, e dentre elas, a mais importante é o TNF- $\alpha$ , que além de ter efeito citotóxico direto no endotélio, estimula a produção de interleucinas que, em associação, agem aumentando a lesão endotelial (PITTET et al., 1997; WHEELER; BERNARD, 2007; VADASZ; SZNAJDER, 2011). Radiograficamente, são observados infiltrados bilaterais irregulares ou assimétricos, podendo incluir derrame pleural. Na tomografia computadorizada de tórax, o enchimento alveolar, a consolidação e as atelectasias observadas, ocorrem em zonas pulmonares dependentes (WARE; MATTHAY, 2000).

*Fase proliferativa:* As alterações observadas nesta fase, embora possam ser vistas já na primeira semana de ocorrência da SDRA, tornam-se marcantes entre o sétimo e o décimo quarto dia. Nesta fase ocorre a alveolite fibrosante, com hipoxemia persistente, aumento do espaço morto alveolar e diminuição da complacência pulmonar (WARE; MATTHAY, 2000; THILLE et al., 2013). É caracterizada pela reabsorção do edema, proliferação de células

alveolares tipo II, metaplasia escamosa, infiltração intersticial por miofibroblastos e deposição de fibras de colágeno (ROCCO et al., 2009). A radiografia de tórax mostra opacidades correspondentes à fibrose em evolução, e a tomografia computadorizada apresenta opacidades intersticiais difusas e presença de bolhas (WARE; MATTHAY, 2000). A intensidade da fase proliferativa e a sua evolução para fibrose e não sua resolução imediata parecem ser os fatores de pior prognóstico para SDRA (ROCCO et al., 2009).

*Fase fibrótica:* Geralmente esta fase ocorre após os 14 dias iniciais da síndrome. Caracterizada pela gradual resolução da hipoxemia e melhora da complacência pulmonar, apresentando depuração de neutrófilos, presença exacerbada de células mononucleares alveolares, macrófagos alveolares e fibrose acentuada, com processo de reparação, envolvendo o epitélio alveolar. Também observam-se obliteração da arquitetura pulmonar, fibrose difusa e possível formação de cistos (KUWANO et al., 2007; ROCCO et al., 2009).

A abordagem terapêutica para SDRA ainda é bem discutida e envolve várias estratégias, como: ventilação com baixos volumes correntes, controle da *driving pressure*, manobras de recrutamento, posição prona e ventilação de alta frequência (AMATO et al., 1998; AMATO et al., 2007; AMATO et al., 2015; TONETTI et al., 2017; FAM et al., 2018). Além disso, existe o que se chama de tratamento de suporte para SDRA considerando o gerenciamento de fluidos, transfusões, sedação, uso de bloqueadores neuromusculares e a nutrição (FAM et al., 2018). O suporte extracorpóreo pode também ser usado como uma terapia de resgate na SDRA, porém está indicado apenas para casos mais graves. De uma maneira geral, entre tantas possibilidades terapêuticas, a

ventilação mecânica protetora ainda se mostra o recurso mais efetivo a ser feito para este perfil de pacientes (FAM et al., 2018).

Nos pacientes com SDRA tem sido preconizada uma estratégia de VM protetora, caracterizada pelo uso de menor volume corrente, pressão de platô e *driving pressure*, além de maiores níveis de PEEP. Esta estratégia protetora está associada a melhores desfechos, como redução da mortalidade, de acordo com ensaios clínicos randomizados que envolveram pacientes com SDRA (AMATO et al., 1998; ARDSNET 2000; AMATO et al., 2015; TONETTI et al., 2017). Acredita-se que essa estratégia protetora possa reduzir o estresse mecânico no pulmão que está associado à LPIV (AMATO et al., 2015; TONETTI et al., 2017; FAM et al., 2018).

## 2.2 LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA

A VM é atualmente uma das medidas terapêuticas mais comumente utilizadas em pacientes com insuficiência respiratória internados em UTI, sendo empregada em 33% a 56% destes casos (ESTEBAN et al., 2000; ESTEBAN et al., 2002). Esse suporte ventilatório tem sido utilizado desde 1952, quando foi considerado tratamento indispensável durante a epidemia de poliomielite, reduzindo a mortalidade dos pacientes de aproximadamente 80% para 40% (LASSEN; 1953). Apesar de ser essencial ao suporte a vida de doentes críticos, a VM pode induzir ou agravar a lesão pulmonar (MARINI, 2013; SILVA; NEGRINI; ROCCO, 2015). De um modo geral, as características patológicas dos danos gerados pela VM são aumento da permeabilidade vascular, infiltrados de células inflamatórias, presença de membranas hialinas, e edema

pulmonar. Ao conjunto dessas consequências da VM, foi dado o nome de LPIV (SLUTSKY; RANIERI, 2013).

Apesar de vários fatores estarem envolvidos na fisiopatologia da LPIV, classicamente quatro mecanismos estão associados a esta lesão: barotrauma, volutrauma, atelectrauma e biotrauma.

A primeira causa de lesão conhecida decorrente da VM foi o barotrauma, relacionado com altas pressões ventilatórias impostas aos pulmões, levando à ruptura macroscópica do parênquima pulmonar. Sabe-se que neste mecanismo ocorre perturbação da parede do espaço aéreo fisiológico, provocando acúmulo de ar além dos alvéolos, levando ao pneumotórax, pneumomediastino, enfisema subcutâneo e embolia gasosa (GATTINONI et al., 2010). Durante anos, foi considerado uma condição tratável (pelo uso de drenos torácicos), porém inevitável, uma vez que o paciente fosse submetido à VM. Atualmente, sabe-se que a variável que leva a vazamentos de ar para além do espaço alveolar é a sobredistensão pulmonar regional e não as altas pressões aplicadas às vias aéreas e, portanto, o termo barotrauma não parece ser o mais adequado (SLUTSKY; RANIERI, 2013).

Neste sentido, o estudo de Dreyfuss et al. (1988) mostrou que altos volumes correntes, e não altas pressões, estavam associados à LPIV. Para avaliar tal possibilidade, animais foram ventilados com pressões elevadas, mas com volumes correntes altos ou baixos e, para isso, utilizaram faixas toracoabdominais que limitavam a expansão pulmonar, reduzindo assim, o volume corrente. Esses autores encontraram que para um mesmo nível de pressão, apenas animais ventilados com alto volume corrente apresentaram lesão pulmonar, o que os permitiu sugerir que o volume seria mais importante

na indução da LPIV do que a pressão em si, dando origem ao que foi chamado de volutrauma. Este mecanismo de lesão estaria associado ao esforço excessivo aplicado ao pulmão como um todo, o que lesa a matriz pulmonar por meio de microfraturas, ativa a inflamação local e aumenta a permeabilidade capilar, podendo gerar edema (DREYFUSS et al., 1988).

Outro componente presente na LPIV é o atelectrauma. Muscedere et al. (1994) encontraram em seu estudo que a VM em volumes muito baixos (abaixo do ponto de inflexão inferior da curva pressão-volume) pode agravar a lesão pulmonar pela abertura e fechamento cíclicos das vias aéreas e alvéolos. A lesão decorre da má distribuição do estresse e da tensão ao longo de um parênquima pulmonar heterogêneo. Em 1970, o trabalho de Mead et al. demonstrou que a atelectasia poderia atuar como esse gerador de estresse e lesão no parênquima pulmonar. Os autores construíram um modelo teórico afim de demonstrar que as forças que atuam no pulmão são variáveis e podem ser muito maiores que aquelas aplicadas às vias aéreas pelo ventilador mecânico. A interface entre áreas atelectasiadas e pulmão aerado poderia ser uma região pulmonar afetada com o aumento da pressão, em que 30 cmH<sub>2</sub>O pode ser efetivamente uma pressão de 140 cmH<sub>2</sub>O (MEAD et al., 1970).

O atelectrauma ocorre em regiões onde há baixos volumes pulmonares e resulta da concentração local de forças de tração sobre as unidades alveolares vizinhas às áreas colapsadas e também do recrutamento cíclico das vias aéreas e alvéolos colapsados a cada ciclo respiratório (MUSCEDERE et al., 1994; PINHU et al., 2003).

Por fim, a VM pode desencadear um processo inflamatório que constitui o mecanismo de geração da LPIV denominado biotrauma. Esta inflamação não

se restringe apenas aos pulmões podendo atuar de forma sistêmica e contribuir para a disfunção de múltiplos órgãos (SLUTSKY; TREMBLAY, 1998; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998).

Em síntese, a resposta inflamatória na LPIV envolve a produção de citocinas originárias de células epiteliais danificadas ou de fragmentos de ácido hialurônico que desencadearão a inflamação mediada por receptores. Uma vez que a cascata inflamatória seja ativada, seguem as consequências típicas do processo inflamatório como aumento da permeabilidade, migração celular, aumento da adesão de plaquetas, entre outras. Todos esses processos levam à uma profunda remodelação da matriz extracelular que aumenta sua degradação e perpetua o estímulo inflamatório (SLUTSKY; TREMBLAY, 1998; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998).

Atualmente, sabe-se que o biotrauma é o mecanismo mais complexo da LPIV e compreende quatro importantes etapas: a mecanotransdução, a ativação de fatores de transcrição, a produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento e a ativação de neutrófilos (INGBER, 1991; CHEN et al., 2018). O biotrauma tem início com a mecanotransdução que consiste na conversão de um estímulo mecânico em sinais bioquímicos e moleculares intracelulares (SILVA; NEGRINI; ROCCO, 2015). A sustentação pulmonar é formada por tecido conjuntivo e, distorções nesse tecido, impostas pelas forças excessivas geradas na VM, são percebidas por células pulmonares como um estímulo mecânico através de receptores e complexos de adesão que têm a função de conectar o citoesqueleto à matriz extracelular. Em sequência, os fatores bioquímicos gerados levam à ativação dos fatores de sinalização e de transcrição gênica resultando na produção de citocinas (INGBER, 1991).

Várias citocinas, pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, participam da resposta inflamatória na LPIV havendo um desbalanço entre elas, em favor das primeiras (PARK et al., 2001). A ventilação com altos volumes, aumenta a produção, principalmente, de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, interleucina 8 (IL-8), TNF- $\alpha$ , proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2) também conhecida como CXCL2 e moléculas de adesão intercelular no lavado broncoalveolar (LBA) (GATTINONI et al., 2003; KIM, et al., 2015; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998). Estes mediadores produzidos na cascata inflamatória do biotrauma, por sua vez, convergem para ativação e atração de neutrófilos para os pulmões (UHLIG; UHLIG, 2004; PUNEET; MOOCHHALA; BHATIA, 2005). Os neutrófilos ativados produzem estresse oxidativo, o que aumenta a inflamação e lesão local, promovendo edema e comprometimento das trocas gasosas (ABRAHAM, 2003).

Mais recentemente dois conceitos têm ajudado a compreender a fisiopatologia da LPIV: *stress* e *strain*. Quando a PEEP é aplicada no sistema respiratório, ocorre aumento na pressão transpulmonar expiratória final. Tal pressão promove uma força reativa dentro do sistema, com magnitude igual à aplicada porém em direção oposta, que na expiração final fica armazenada no pulmão como energia potencial. A essa força dá-se o nome de *stress*. Já a deformação de uma estrutura em relação ao seu estado de relaxamento é o que conceitua o *strain*. Esta deformação no pulmão corresponde à alteração do volume alveolar, a partir de seu estado na capacidade residual funcional (final da expiração) até atingir a capacidade pulmonar total (final da inspiração). Em VM, o que representa o *strain* é a relação entre o volume corrente e a capacidade residual funcional. Os pulmões expostos a elevados níveis de

*stress* e *strain*, apesar de não serem suficientes para romper suas estruturas, acabam por promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de leucócitos, sendo estes responsáveis pela LPIV (PLATAKI; HUBMAYR, 2010; SLUTSKY; RANIERI, 2013; VASQUES et al., 2018).

Outro conceito que está sendo discutido recentemente é o de potência. Estudos prévios mostraram que a LPIV é causada por uma quantidade de energia mecânica entregue aos pulmões capaz, ou de deformar sua estrutura e então ativar uma inflamação relacionada à mecanotransdução, ou até mesmo romper ligações moleculares da matriz extracelular, ativando a inflamação por meio da estimulação de receptores específicos. Todos os fatores envolvidos na VM, como volume corrente, pressão, fluxo, resistência das vias aéreas, frequência respiratória e PEEP são, na verdade, diferentes componentes de uma única variável física, ofertada aos pulmões em um determinado período de tempo, ou seja, potência mecânica. Quanto maior a energia aplicada ao longo do tempo, maior a quantidade do dano pulmonar. Portanto, energia e tempo são dois componentes no desenvolvimento da LPIV (GATTINONI; TONETTI; QUINTEL, 2017; VASQUES et al., 2018).

Para melhor compreender de que forma essa energia gera dano aos pulmões, é importante saber onde esta energia está sendo distribuída e em qual fase do ciclo respiratório isso está acontecendo. A avaliação do padrão de distribuição da energia está relacionada com a homogeneidade do pulmão. Considerando que todo o sistema fosse homogêneo, cada unidade pulmonar receberia a mesma quantidade de energia. Porém, mesmo um pulmão normal não é totalmente uniforme ou homogêneo, e, quando em situação patológica, essa falta de homogeneidade pode estar ainda mais acentuada. Sobre o fator

temporal os dados ainda são muito escassos, porém aventa-se a possibilidade de que o dano aos pulmões ocorra durante o recuo do tecido pulmonar observado durante a expiração (GATTINONI; TONETTI; QUINTEL, 2017; VASQUES et al., 2018).

A LPVI foi amplamente estudada em modelos experimentais o que contribuiu sobremaneira para o entendimento da fisiopatologia da lesão e também para a avaliação de estratégias para a sua prevenção e tratamento.

### 2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA

Estudos em modelos experimentais permitem a avaliação de mecanismos e intervenções em várias doenças que são inviáveis do ponto de vista ético, prático e metodológico em estudos clínicos. Entretanto, alguns aspectos devem ser ponderados nos estudos com modelos experimentais, como a variação existente entre as espécies de animais nas respostas a insultos, bem como no tempo de indução de uma determinada lesão (MATUTEBELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Além disso, devem ser consideradas as diferenças estruturais nos pulmões dos animais que podem responder de forma distinta a danos pulmonares (MATHIEU-COSTELLO, 1995). A parede alveolar e a barreira alvéolo-capilar dos roedores, por exemplo, são menos espessas e suas vias aéreas apresentam menos ramificações (HOFMANN, KOBLINGUER, MARTONEN, 1989). Portanto, apesar dos avanços da medicina translacional, os achados de ensaios experimentais devem ser interpretados com cautela na prática clínica.

Vários modelos experimentais de LPA têm sido utilizados na busca de novas terapias e estratégias ventilatórias para o tratamento desta lesão. Entre estes modelos destacam-se a indução da LPA por injeção intratraqueal ou intraperitoneal de lipolissacáride (LPS), isquemia e reperfusão intestinal, queimadura grave e também indução pela própria VM, ou seja, a LPIV (PALMA-CRUZ et al., 2019; DU et al., 2018; WANG et al., 2017; LIMA et al., 2013; MATUTE-BELLO et al., 2011; CURLEY et al., 2011; NIN et al., 2008; TREMBLAY et al., 1997).

A LPIV tem sido estudada ao longo de anos, afim de se elucidar sua fisiopatologia e evolução. Nesse contexto, o estudo de Tremblay et al. (1997) suportou o conceito, que hoje é claramente considerado, de que a VM tem influência significativa na resposta pró-inflamatória e antiinflamatória do pulmão normal ou séptico, e portanto pode desencadear ou perpetuar um estímulo inflamatório local ou até sistêmico. Os autores examinaram o efeito de diferentes estratégias ventilatórias sobre a produção de mediadores inflamatórios na presença ou não de um estímulo inflamatório pré-existente gerado pela injeção intravenosa de LPS. Após 50 minutos do insulto, os animais foram randomizados para uma das quatro estratégias ventilatórias: Vt de 5 a 7 ml/Kg e PEEP de 3 a 5 cmH<sub>2</sub>O; Vt de 5 a 15 ml/Kg e PEEP de 5 a 10 cmH<sub>2</sub>O; Vt de 5 a 15 ml/Kg e PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O; Vt de 40 ml/Kg e PEEP de 0 cmH<sub>2</sub>O. Todos os animais foram ventilados por um período de duas horas. Os resultados mostraram que todos os animais, tanto os que receberam LPS ou solução salina, submetidos à VM, apresentaram concentrações séricas de TNF- $\alpha$  significativamente elevadas quando comparados aos animais do grupo controle sem ventilação. Nos animais ventilados com alto volume e zero PEEP

dos grupos submetidos ao LPS ou solução salina também foi observado maior concentração de proteínas, bem como níveis mais elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-2 e IFN $\gamma$  no LBA, em comparação ao grupo controle sem ventilação (TREMBLAY et al., 1997).

Em discordância, o trabalho de Ricard, Dreyfuss e Saumon (2001) que investigou a produção de citocinas pró-inflamatórias no pulmão, durante o estiramento *in-vivo* e após injeção de LPS no modelo *ex-vivo*, utilizando dois diferentes níveis de Vt (7 ml/Kg e 42 ml/Kg) na VM por duas horas, concluiu que a VM sozinha, por si só, não causa liberação significativa de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) nos espaços aéreos dos pulmões. Observaram também que nenhum TNF- $\alpha$  foi encontrado nos espaços aéreos e na circulação sistêmica dos animais durante a formação de edema pulmonar grave por VM com alto Vt. E ainda concluíram que a quimiocina MIP-2 é encontrada nos pulmões durante a VM qualquer que seja a magnitude do Vt, mas que o modelo *ex-vivo* sugere uma liberação maior quando o estiramento mecânico é aumentado (RICARD, DREYFUSS E SAUMON, 2001).

Um estudo atual conduzido por Moraes et al. (2018) investigou o impacto de diferentes níveis de Vt (6 ml/Kg, 13 ml/Kg e 22 ml/Kg) e frequências respiratórias (70 rpm para o primeiro grupo, e para os demais foi ajustada afim de gerar baixa potência igualando-a ao primeiro grupo) na função pulmonar, na DAD e na expressão de genes relacionados à inflamação, em animais ventilados mecanicamente com baixa potência. Os ratos receberam LPS intratraqueal e 24 horas após foram submetidos à VM. Mesmo com baixa potência, o uso de altos volumes resultou em LPIV e aventou-se a

possibilidade de que o controle do Vt seja mais importante do que FR na produção de LPIV (MORAES et al., 2018).

Alguns trabalhos já avaliaram quais citocinas estão envolvidas no desenvolvimento da LPIV e, por seus achados, as citocinas pró-inflamatórias estudadas mais frequentemente são IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . A quimiocina CXCL2 e a citocina anti-inflamatória IL-10 também são rotineiramente investigadas (GATTINONI et al., 2003; KIM, S. H. et al., 2015; TREMBLAY; SLUTSKY, 1998).

Algumas terapias já foram estudadas em modelos experimentais de LPIV. Em um estudo prévio, realizado por nosso grupo, foi avaliado o efeito protetor da dexametasona na LPIV induzida por alto Vt (Vt de 35 ml/kg) em ratos Wistar. Os animais foram divididos em dois grupos, ambos com ventilação lesiva, porém um foi tratado com dexametasona e o outro com solução salina, e analisados em três momentos distintos: 4, 24 e 168 horas após lesão. O tratamento com a dexametasona reduziu a lesão pulmonar e o score no grupo dexametasona foi significativamente menor que o grupo controle às 4 e 24 horas. A dexametasona também melhorou a oxigenação imediatamente após VM lesiva (REIS, et al., 2015). Um outro estudo, conduzido por Wang et al. (2017), investigou os efeitos protetores e os mecanismos da cetamina sobre a LPIV. Foi observado que a cetamina reduziu a inflamação, atuando principalmente sobre a IL-1 $\beta$ , caspase-1 e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).

Apesar do efeito benéfico de diferentes estratégias para o tratamento da LPA em modelos experimentais, poucos estudos avaliaram o uso da terapia a laser de baixa potência.

## 2.4 TERAPIA A LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O termo laser é um acrônimo da língua inglesa para *light amplification by stimulated emission of radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) e trata-se de um complexo de ondas eletromagnéticas com características e especificidades precisas, como por exemplo, a monocromaticidade, consequência de seu comprimento de onda oscilar na mesma frequência (LINS et al., 2010). O comprimento de onda é o fator determinante dos efeitos terapêuticos produzidos pelo tratamento com laser, uma vez que este parâmetro está relacionado com as biomoléculas que serão absorvidas na radiação incidente (ALVES, 2010). O laser pode ser dividido em duas categorias: lasers de alta potência ou cirúrgicos que geram efeitos térmicos e apresentam características de corte, vaporização e hemostasia; e lasers de baixa potência ou terapêuticos que têm propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (JUNIOR, 2007; ALVES, 2010).

Na categoria de baixa potência existem três tipos de lasers: laser hélio-neon, cujo comprimento de onda é 632,8 nm dentro da faixa de luz visível (luz vermelha); laser de arsenato de gálio-alumínio (Ga-As-Al) ou laser de diodo, com comprimento de onda de 780-830 nm, fora do espectro de luz visível, e por isso chamado de infravermelho; e laser combinado de hélio-neon diodo (LINS et al., 2010).

A TLBP tem se mostrado como uma estratégia promissora por modular vários efeitos biológicos observados no comportamento de células específicas. Nos linfócitos, por exemplo, observa-se aumento de sua proliferação e ativação; e nos macrófagos elevação da fagocitose. Além disso, o laser é capaz de aumentar a secreção de fibroblastos, intensificar a reabsorção de

fibrina e colágeno, melhorar a motilidade de células epiteliais, a quantidade de tecido de granulação, promover angiogênese e reduzir a síntese de mediadores inflamatórios (SCHAFFER et al., 2000; MIRSKY et al., 2002; FUKUDA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; MANCHINI et al., 2017). O alvo intracelular da laserterapia ainda é controverso, mas sugere-se que sua atuação ocorra diretamente na mitocôndria, aumentando a produção de adenosina trifosfato, se relacionando também com a ativação dos fatores de transcrição e com a modulação do equilíbrio redox intracelular (KARU, 1999; KARU, 2008). As ações anti-inflamatória e preventiva de edema consequentes à laserterapia, ocorrem mediante a aceleração da microcirculação, que culminam em alterações na pressão hidrostática capilar com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de metabólitos (SCHAFFER et al., 2000; LINS et al., 2010). No processo inflamatório, estes efeitos da TLBP não são apenas imediatos e não restringem-se ao efeito inibitório na quimiotaxia de células inflamatórias, mas também reduz o número de leucócitos já presentes no local da lesão, mostrando sua eficiência em melhorar a resposta imune (FUKUDA et al., 2013).

Esta terapia é amplamente estudada em vários modelos de inflamação e reparação tecidual (AIMBIRE et al., 2006; ANDRADE et al., 2014; ALVES et al., 2013; MIRANDA da SILVA et al., 2016). Em um destes estudos, Alves et al. (2013) avaliaram a ação da TLBP (comprimento de onda de 808 nm), modulada com duas doses de potência diferentes (50 mW e 100 mW), na inflamação induzida por papaína das articulações de ratos. Após o período de tratamento, foi observado redução significativa da inflamação por meio da análise da expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .

O efeito benéfico do laser no processo de cicatrização de feridas foi observado em outro estudo, em que os autores avaliaram o efeito da TLBP, com diferentes comprimentos de onda, na expressão de fatores de crescimento e de mediadores inflamatórios de etapas específicas do processo de cicatrização de feridas. Os pacientes receberam tratamento padrão associado ou não à aplicação do laser, dependendo do grupo pré-determinado. A cicatrização efetiva das úlceras por pressão esteve relacionada à irradiação com laser em um comprimento de onda de 658nm, e acredita-se que esse efeito estava associado à inibição de processos inflamatórios nas feridas, estimulação da angiogênese e proliferação de fibroblastos (TARADAJ et al., 2018). Costardi et al. (2008) avaliaram os efeitos da terapia a laser no processo de reparação tecidual muscular em ratos, após contusão muscular do gastrocnêmio, e observaram melhora qualitativa dos músculos irradiados.

Em um trabalho recente, conduzido por Anjos et al. (2018), os autores investigaram o perfil de citocinas e células imunes após tratamento com laser de baixa potência em um modelo de artrite induzido por zymosan. Os animais foram irradiados diretamente sobre a pele, na região medial e lateral do tornozelo, utilizando um laser diodo, com comprimento de onda de 830 nm, potência de 10 mW, nas doses de 3 J e 30 J. Após o período de tratamento, foi observado que a laserterapia pode alterar o curso inflamatório da artrite, tendendo a acelerar sua resolução pela fotobioestimulação de células imunes.

Além da utilização do laser nestes modelos de inflamação, alguns estudos foram conduzidos em modelos de lesão pulmonar.

## 2.5 TERAPIA A LASER EM MODELOS DE LESÃO PULMONAR AGUDA

Os efeitos da TLBP foram avaliados em diferentes modelos experimentais de lesão pulmonar. No estudo conduzido por Cury et al (2016) a LPA foi induzida por injeção intratraqueal de LPS e os animais foram irradiados, seis horas após a indução da lesão, utilizando um laser com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 Hz, modo contínuo e intensidade de 10 J/cm<sup>2</sup>. A irradiação foi realizada na região da linha axilar média bilateralmente, por contato direto perpendicular à pele. A terapia a laser gerou redução significativa do influxo de células inflamatórias no tecido pulmonar e diminuição de secreção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) e quimiocinas (MCP-1) tanto no interstício pulmonar, quanto no espaço alveolar, demonstrando que uma única aplicação de laser transtorácica foi capaz de reduzir a inflamação em um modelo de LPA. Além disso, não foi observado efeito deletério na função pulmonar, avaliado por meio de valores obtidos da resistência e elastância do sistema respiratório e elastância tecidual (Cury et al., 2016).

Em outro estudo, Oliveira et al. (2014) avaliaram os efeitos da TLBP em dois modelos de LPA, induzida pela instalação de LPS intraperitoneal e intratraqueal, em camundongos. Após uma hora da indução da lesão, os animais foram irradiados por três vezes (intervalo de uma hora entre cada aplicação) com o laser infravermelho, modo contínuo, com comprimento de onda de 830 nm e potência de 35 mW, em três pontos durante 80 segundos: porção distal da traqueia, pulmão direito e pulmão esquerdo. Vinte e quatro horas após a última administração de LPS, os animais foram estudados e foi

observado que a TLBP promoveu redução da contagem total de células e de neutrófilos no LBA, níveis séricos de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e da quimiocina KC da subfamília CXC, tanto no LBA quanto no soro, e também diminuição da contagem de neutrófilos no parênquima pulmonar. Portanto, a TLBP apresentou efeito anti-inflamatório nos dois modelos de LPA estudados.

No estudo desenvolvido por Miranda da Silva et al. (2015), os autores avaliaram os efeitos locais e sistêmicos da TLBP em um modelo de lesão pulmonar induzida por inalação de formaldeído em ratos Wistar. Durante três dias consecutivos os animais receberam inalação de formaldeído por 90 minutos. O laser foi aplicado uma e cinco horas após cada exposição ao formaldeído, com potência de 30 mW, 660 nm de comprimento de onda, dose de 1 J/min, aplicado em toda extensão do sistema respiratório por contato direto com a pele (três pontos na traqueia e em cada lobo pulmonar). Após 24 horas da última aplicação do laser, foi observado redução do número de células totais, monócitos e linfócitos no soro; diminuição de infiltração neutrofílica no LBA por redução da atividade da MPO; além do decréscimo de citocinas inflamatórias no LBA (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e aumento na expressão da IL-10 no LBA e no tecido pulmonar.

Uma série de estudos conduzida pelo grupo de Lima apresentou como objetivo elucidar o efeito da TLBP em diferentes modelos de LPA (LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2013; LIMA et al., 2014). Em um destes estudos, os autores avaliaram especificamente os mediadores inflamatórios que conduzem o efeito anti-inflamatório da TLBP em um modelo de LPA induzida por inalação de LPS. Foi utilizado o laser com comprimento de onda de 650 nm, 2,5 mW de potência, 0,08 cm<sup>2</sup> de tamanho de ponto, dose de 1,3

J/cm<sup>2</sup>, aplicado diretamente na pele no local da traqueostomia. Após quatro horas da indução da lesão, a TLBP foi capaz de reduzir o edema pulmonar, avaliado pela técnica de extravasamento do corante azul de Evans, e a inflamação neutrofílica confirmada pela diminuição da atividade da MPO no LBA. Foi observado também redução significativa da expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O estudo sugere que a TLBP pode ser útil em patologias pulmonares em que TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sejam os mediadores predominantes (LIMA et al. 2010).

Em outro estudo do mesmo grupo, os autores avaliaram se mediadores pró e antiinflamatórios poderiam ser modulados pela TLBP em um modelo experimental de LPA por isquemia e reperfusão intestinal (i-I/R). Neste estudo, os animais foram irradiados 30 minutos após o início da reperfusão, utilizando um laser com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 mW, 0,08 cm<sup>2</sup> de tamanho de ponto, aplicado diretamente sobre a pele na região da traqueostomia. Os animais foram eutanasiados quatro horas após a indução da lesão e foi confirmado que a TLBP atenua a inflamação aguda por favorecer a produção de IL-10 e reduzir a de TNF- $\alpha$ , além de diminuir o edema, o influxo de neutrófilos e a atividade da MPO (LIMA et al., 2011).

Seguindo a mesma linha de estudo, em 2013, Lima et al. investigaram se a TLBP tem efeito na regulação de uma proteína que protege a célula do stress oxidativo (HSP70) em um modelo de i-I/R em ratos. Para a terapia foi utilizado o laser com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 mW, dose de 5,4 J/cm<sup>2</sup>, aplicado sobre um único ponto na porção distal da traqueia, durante 180 segundos, cinco minutos após o início da reperfusão e cinco minutos antes do seu fim. Os animais foram eutanasiados duas horas após a

reperfusão, e foi demonstrado que a TLBP atenuou a lesão pulmonar por promover aumento de HSP70, além de redução do edema pulmonar e atividade da MPO.

Em outro estudo, Lima et al. (2014), avaliaram o efeito dose-resposta da TLBP na LPA também induzida por i-I/R. Foi utilizado um laser diodo, com comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 mW, 0,08 cm<sup>2</sup> de tamanho de ponto, nas doses de 1, 3, 5 e 7,5 J/cm<sup>2</sup>, aplicado sobre a pele na direção do brônquio, 30 minutos após a i-I/R. As análises foram conduzidas após duas horas da indução da lesão e os resultados mostraram que as doses de 3, 5 e 7,5 J/cm<sup>2</sup> foram capazes de diminuir não só a atividade da MPO, mas também a expressão gênica e a concentração protéica de mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). Nesta análise, apenas o mediador IL-1 $\beta$  apresentou resposta dependente da dose. Quanto à avaliação da IL-10, esta encontrou-se significativamente aumentada no grupo irradiado com 1 J/cm<sup>2</sup>, e curiosamente a dose 7,5 J/cm<sup>2</sup> diminuiu sua concentração. Este foi o primeiro estudo a demonstrar que diferentes doses de laser podem ser eficazes em atenuar a intensidade da resposta inflamatória.

Em um estudo recente, Palma-Cruz et al. (2019), utilizando um modelo experimental de sepse induzida por injeção intraperitoneal de LPS, avaliaram o efeito temporal da TLBP na mobilização de leucócitos e secreção de citocinas. A terapia com laser ocorreu por contato direto com a pele, duas e seis horas após à injeção de LPS, utilizando laser diodo (LED - *light-emitting diode*) com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, dose de 15 J, durante 150 segundos. Após três dias de tratamento, as células inflamatórias, bem como as interleucinas (IL-6 e IL-17) no LBA e no soro encontravam-se

reduzidas. Esse efeito se manteve por pelo menos sete dias, quando os níveis destes marcadores permaneceram diminuídos.

Neste contexto, as evidências iniciais confirmaram os efeitos benéficos da TLBP na LPA. Entretanto, no melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou o efeito do laser de baixa potencia em um modelo de LPIV.

### **3 HIPÓTESES**

H0: A TLBP não promoverá efeito anti-inflamatório em um modelo experimental de LPIV.

H1: A TLBP promoverá efeito anti-inflamatório em um modelo experimental de LPIV.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar o efeito da TLBP em um modelo de LPIV em ratos Wistar.

### 4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar o efeito da TLBP em um modelo de LPIV em ratos Wistar a partir da análise da:

- a) Histopatologia pulmonar;
- b) Contagem total e diferencial de células no LBA;
- c) Expressão do mRNA do TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e CXCL2.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 26 ratos Wistar, previamente saudáveis, com idade aproximada de 90 dias, peso variando entre 250 e 350 gramas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR- UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil).

Os animais receberam cuidados segundo a diretriz do Conselho Nacional de Experimentação Animal (DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS, 2013). O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFJF, protocolo número 011/2016 (Anexo A).

### 5.2 CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

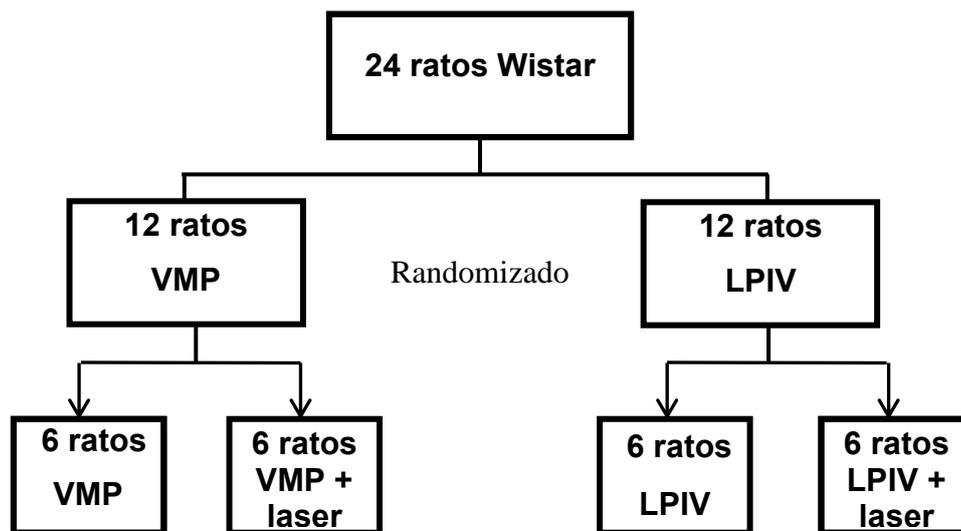
Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha selecionada (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. Cada gaiola abrigava três animais, que foram mantidos em armários climatizados (Alesco, Brasil) pelo período de uma semana antecedendo o procedimento experimental. Os armários localizavam-se em alojamento com lâmpadas incandescentes, controladas automaticamente para acenderem às 6:00 e apagarem às 18:00, mantendo um fotoperíodo de 12 horas de ambiente claro e

12 horas de ambiente escuro. Os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*.

### 5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram alocados, inicialmente em dois grupos experimentais: grupo lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (LPIV, n=12), e grupo ventilação mecânica protetora (VMP, n=12). Cada grupo foi subdividido em outros dois grupos que diferiam entre si, pela aplicação ou não de laser (Figura 1).



**Figura 1:** Distribuição dos animais nos grupos experimentais VMP: ventilação mecânica protetora; LPIV: lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica

#### 5.3.2 PROTOCOLO DE VENTILAÇÃO MECÂNICA

Todos os animais foram pesados (Balança Filizola MF 4006033, Brasil), e a partir do peso individual, foi calculada a sedação. Foram

administradas por via intraperitoneal (i.p.) 64 ml/kg de cloridrato de dextrocetamina (Cristália, Brasil) e 8 mg/kg de xylazina (Ceva, Brasil). Essas dosagens foram suficientes para manter o animal em plano anestésico por aproximadamente uma hora, quando, então, era feito um repique (i.p.) utilizando metade da dose inicial. O plano anestésico era caracterizado pela supressão do reflexo córneo-palpebral e pela ausência de resposta à compressão da pata.

Após sedação, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa aquecida (Heat Pad EFF422, Reino Unido) para prevenir hipotermia e tiveram seus membros superiores fixados por uma fita adesiva a 90° em relação ao corpo. Após posicionamento, foi feita tricotomia da face ventral da região cervical e abdominal completa. Na região cervical foi aplicada anestesia local com injeção subcutânea de 0,3 ml de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Hipolabor, Brasil). Em seguida, iniciou-se o processo de traqueostomia, por meio de um corte longitudinal medial feito na face ventral do pescoço, com aproximadamente dois centímetros de extensão, com posterior divulsão dos tecidos e retirada parcial do músculo traqueal. A traquéia foi então exposta (terço proximal) e com uma lâmina de bisturi número 23 (Maxicor, Brasil) foi realizada uma incisão entre seus anéis de cartilagem, e imediatamente foi introduzida uma cânula de polietileno (PE 240, Intramedic<sup>®</sup>, Clay-Adams Inc., EUA), com 1,5 mm diâmetro interno e 7,5 cm de comprimento, fixada na porção proximal por fio seda 2.0 (Polysuture SP420, Brasil). Com a finalidade de infundir medicamentos, a artéria carótida comum direita foi dissecada e canulada com cateter de polietileno de 20 G (Arrow, EUA).

Ainda na posição supina, pela traqueostomia, os animais foram acoplados à ventilação mecânica (Inspira ASV, Harvard Apparatus, EUA). Foi realizado bloqueio neuromuscular utilizando brometo de rocurônio na dose 1 mg/kg, infundido pelo catéter central (carótida). Os animais foram mantidos em ventilação mecânica por 90 minutos, e aqueles do grupo VMP foram ventilados com os seguintes parâmetros: modo ventilatório volume-controlado, volume corrente ( $V_t$ ) de 6 ml/Kg, frequência respiratória (FR) de 80 incursões por minuto, relação inspiração:expiração (I:E) de 1:2,  $FiO_2$  de 100% e PEEP de 5  $cmH_2O$ . Já os animais do grupo LPIV receberam um  $V_T$  de 35 ml/kg, FR de 18 incursões por minuto, relação I:E de 1:2,  $FiO_2$  de 100% e PEEP de 0  $cmH_2O$ .

### 5.3.3 PROTOCOLO DE APLICAÇÃO DE LASER

O laser terapêutico de baixa potência infravermelho (Photon Lase III, arseneto de gálio e alumínio - AlGaAs), com comprimento de onda de 808 nm, da marca D.M.C. Equipamentos Ltda (São Paulo, Brasil), foi aplicado após os primeiros 60 minutos de ventilação mecânica. Os animais randomizados para os grupos submetidos à aplicação do laser (VMP + laser e LPIV + laser) foram irradiados com os seguintes parâmetros: potência de 100 mW, tamanho do spot de 0,028  $cm^2$ , densidade de energia de 20  $J/cm^2$ , densidade de potência de 3.571  $W/cm^2$ , energia por ponto de 5 J, tempo de aplicação por ponto de 5 s, no modo de emissão contínuo. A dose aplicada no presente estudo foi baseada em estudos prévios.

O laser foi aplicado por contato perpendicular direto na pele, após a tricotomia, em três pontos de cada lado da região anterior do tórax (ápice, terço médio e base pulmonar; identificados pela palpação dos espaços intercostais).

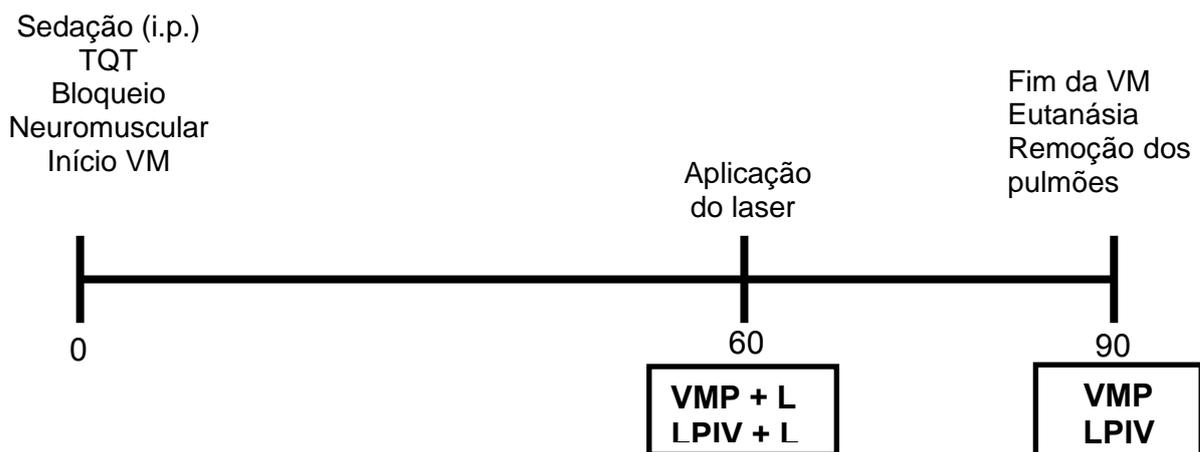
### 5.3.4 EUTANÁSIA E REMOÇÃO DOS PULMÕES

Ao término dos 90 minutos de VM, foi coletado sangue através do catéter inserido na carótida do animal, e estes foram submetidos à eutanásia por exsanguinação pelo mesmo cateter e secção do diafragma ainda sob anestesia.

Para que os pulmões se mantivessem insuflados mesmo após serem retirados do tórax, com os animais ainda em ventilação mecânica, foi realizada uma pausa inspiratória e a traqueia foi ocluída por um fio de algodão.

Após desacoplar o animal do ventilador, o tórax foi aberto, a parede torácica anterior removida e a porção abdominal do esôfago identificada e isolada, sendo presa por uma pinça hemostática Kelly (ABC, Brasil). As estruturas do pescoço foram dissecadas, permitindo a liberação das vias aéreas. A pinça presa ao esôfago foi suavemente tracionada para cima, permitindo separar o conjunto coração-pulmão das demais estruturas aderidas à parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, a traqueia foi seccionada acima do local ocluído pelo fio cirúrgico e, posteriormente, o esôfago e o coração foram separados por leve tração, restando apenas os pulmões e as vias aéreas. O brônquio fonte direito foi ocluído por um fio de algodão e o lobo superior do pulmão direito foi utilizado para o PCR e o inferior foi mantido insuflado para análise histológica, enquanto o pulmão esquerdo foi utilizado para o LBA.

A figura 2 mostra a linha do tempo do experimento.



**Figura 2:** Linha do tempo do experimento

i.p.: intraperitoneal; TQT: traqueostomia; VM: ventilação mecânica; VMP: ventilação mecânica protetora; LPIV: lesão pulmonar induzida pela ventilação.

## 5.4 VARIÁVEIS ANALISADAS

### 5.4.1 LAVADO BRONCOALVEOLAR

O LBA foi obtido pela canulação do brônquio fonte esquerdo e 5 ml de PBS contendo ácido etilenodiamino tetracético (10 nM) foram instilados e aspirados lentamente por três vezes. O LBA coletado foi centrifugado e submetido à contagem total e diferencial de células.

A contagem total de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) após a diluição das amostras em uma solução de Turk (2% ácido acético). O sedimento de células foi diluído em PBS e depois corado pela técnica de May-Grunwald para contagem diferencial de células, sendo esta feita com 300 células.

#### 5.4.2 HISTOLOGIA

O lobo inferior do pulmão direito, mantido inflado (por oclusão do brônquio lobar inferior direito), foi separado do restante do órgão e fixado em formaldeído a 10% por 72 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas a banhos em uma série crescente de álcool etílico e diafanizadas em xilol para posterior impregnação em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais do parênquima pulmonar do lobo inferior, com 4  $\mu\text{m}$  de espessura. Após a montagem do material em lâminas de vidro, os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina para análise histopatológica da LPA. Todas as lâminas foram analisadas por patologista que não tinha conhecimento dos grupos experimentais.

Para avaliação da LPA, foi utilizado um escore preconizado pela *American Thoracic Society* (MATUTE-BELLO et al., 2011), e para sua determinação foi utilizado um microscópio de luz convencional (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha). Neste escore foram avaliados os seguintes parâmetros: número de neutrófilos no interstício (incluindo aqueles próximos aos capilares); número de neutrófilos no espaço alveolar; formação de membrana hialina; presença de debris protéico no espaço alveolar (como filamentos de fibrina) e espessura da parede alveolar. Foram avaliados 20 campos diferentes em cada lâmina, com aumento de 400X, sendo que pelo menos 50% de cada campo deveria estar preenchido por alvéolos pulmonares. Os campos compostos predominantemente por brônquios ou grandes vasos foram excluídos da análise. Cada um dos cinco achados histológicos foi

graduado de acordo com o esquema apresentado na tabela 1. Para gerar o escore, foi realizada a soma dos pontos obtidos em cada campo analisado, para cada uma das cinco variáveis independentes. Estes pontos foram usados em uma equação, que aplica pesos para cada variável, com base em sua relevância na caracterização da lesão pulmonar (equação 1).

**Tabela 1.** Escore de lesão pulmonar precozinado pela *American Thoracic Society*

Parâmetros	Escore por campo		
	0	1	2
A. Neutrófilos no espaço alveolar	Nenhum	1-5	>5
B. Neutrófilos no espaço intersticial	Nenhum	1-5	>5
C. Membrana hialina	Nenhum	1	>1
D. Debrí protéico preenchendo o espaço aéreo	Nenhum	1	>1
E. Espessamento do septo alveolar	< 2x	2x-4x	>4x

Equação 1:

$$\text{Escore} = \frac{[(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)]}{\text{Número de campos} \times 100}$$

#### 5.4.3 EXTRAÇÃO DE RNA e *REAL TIME* PCR (qPCR)

Os lobos superiores direitos dos pulmões foram removidos e pequenos fragmentos foram obtidos. Estes fragmentos foram transferidos para criotubos para trabalhos em criogenia até -196°C livres de RNase e DNase, DNA e

inibidores de PCR, com 1ml de Trizol (Invitrogen, EUA) que é capaz de extrair o RNA total. Todas as amostras permaneceram congeladas em freezer -80°C por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, foram descongeladas e seguiu-se a separação de fases por clorofórmio e isopropanol. A concentração de RNA extraído foi obtida utilizando o NanoDrop™ 1000 Espectrofotômetro (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, 2µg de RNA total foi transcrito a DNA complementar (cDNA) utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Para a reação de qPCR foram utilizados *primers* dos genes: TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e CXCL2. Todos os *primers* foram desenhados em diferentes éxons, para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico utilizando o programa Primer BLAST.

De acordo com os resultados das curvas padrão para determinação da eficiência dos *primers* (eficiência aceitável superior a 90%), padronizou-se a utilização da diluição de 1:5 de cDNA para todas as amostras. As reações foram feitas no volume final de 10 µL, contendo 2,6 µL de água ultrapura, 1,4 µL da mistura de um dos pares de *primers Forward* e *Reverse* de cada gene, 1 µL de cDNA diluído e 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

O ensaio de qPCR foi realizado no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 40 ciclos; em cada ciclo, desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento dos *primers* e extensão a 60 °C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em duplicata e como controle negativo para a reação de qPCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os *primers*,

na ausência do template (cDNA). A análise das curvas de *melting* e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Para análise da expressão gênica através de qPCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Calculou-se inicialmente o  $\Delta CT$  de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene controle ( $\beta$ -actina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do  $\Delta CT$  da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA dos animais controle. Para o cálculo do  $\Delta\Delta CT$  utilizou-se a fórmula seguinte: [ $\Delta CT$  (amostra) –  $\Delta CT$  (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o  $\Delta\Delta CT$ , aplicou-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que resultou no valor da expressão gênica relativa.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, enquanto os dados não paramétricos foram expressos como mediana (intervalo interquartil). Os dados paramétricos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Tukey quando necessário. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney quando necessário. A correção de Bonferroni foi aplicada para as análises repetidas. A diferença foi considerada estatisticamente significativa com resultado de  $p < 0,05$ . Todas as análises

estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc, Illinois, EUA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma do artigo intitulado “*Effect of low-level laser therapy on experimental model of ventilator-induced lung injury*”, o qual foi submetido à revista *Inflammation* (Anexo B).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de serem conhecidos os benefícios da TLBP na LPA, nenhum estudo avaliou os efeitos desta terapia em um modelo experimental de LPIV. Portanto, neste estudo avaliamos o efeito da TLBP em um modelo de LPIV em ratos Wistar. Os animais do grupo LPIV mostraram maior escore de LPA, maior contagem de neutrófilos no LBA e maiores expressões gênicas de citocinas inflamatórias quando comparados aos animais do grupo VMP, confirmando que o nosso modelo foi capaz de induzir a lesão pulmonar. Já os animais do grupo LPIV com laser, comparados aos do grupo LPIV, apresentaram menor escore de LPA e neutrófilos no espaço alveolar, menor contagem total de células e de neutrófilos no LBA, além de significativa redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocina anti-inflamatória. A TLBP reduziu, então, a resposta inflamatória em um modelo de LPIV por meio da modulação da expressão de citocinas.

Nosso estudo mostrou de maneira consistente que o estresse mecânico gerado na LPIV aumenta a expressão de MIP-2, o que estimula o recrutamento de neutrófilos, tendo estes importante papel na lesão pulmonar. Nos animais do grupo LPIV também foi observado aumento das citocinas inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. O dano tecidual geralmente é reconhecido por células imunes, como macrófagos e monócitos, o que poderia levar à ativação de TLR-9, estimular uma via de sinalização NF- $\kappa$ B e assim aumentar a transcrição destas citocinas inflamatórias.

A TLBP promoveu redução da inflamação no modelo experimental de LPIV no presente estudo. O potencial efeito anti-inflamatório da TLBP está

associado com aumento da microcirculação local, estímulo a angiogênese, vasodilatação, além de redução da síntese de mediadores inflamatórios. Apesar destes benefícios já conhecidos, a aplicação da TLBP na prática clínica é limitada, pois tais efeitos ainda precisam ser avaliados e confirmados em ensaios clínicos.

## **8 CONCLUSÃO**

A TLBP reduziu a resposta inflamatória em um modelo experimental de LPIV ao modular a expressão de citocinas inflamatórias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Crit Care Med**, London, v. 31, n. 4 Suppl, p. 5195-5199, 2003.

AIMBIRE, F. et al. Low level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF $\alpha$  levels in acute inflammation. **Photomed Laser Surg**, New York, v. 24, n. 1, p. 33-37, 2006.

ALVES, W. S. Estudo do efeito da terapia com laser de baixa potência sobre a inflamação pulmonar induzida pela doença pulmonar obstrutiva crônica experimental (DPOC) em ratos. 2010. Tese (Mestrado em Engenharia Biomédica). Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

ALVES, A. C. et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther**, London, v. 15, n. 5, 2013.

AMATO, M. B. et al. Effect of a protective ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. **N Eng J Med**, Boston, v. 338, n. 6, p. 347-354, 1998.

AMATO, M. B. P. et al. Ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda/ Síndrome do desconforto respiratório agudo. **Rev Bras Ter Int**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 374-383, 2007.

AMATO, M. B. et al. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. **N Eng J Med**, Boston, v. 372, n. 8, p. 747-755, 2015.

ANDRADE, F. S. S. D.; CLARK, R. M. O.; FERREIRA, M. O. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 129-133, 2014.

ANJOS, L. M. J. et al. Modulation of immune response to induced- arthritis by low-level laser therapy. **J Biophotonics**, Weinheim, e201800120, 2018.

ARDS Definition Task Force, RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. **JAMA**, Chicago, v. 307, n. 23, p. 2526-2533, 2012.

ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, London, v. 2, n. 7511, p. 319-323, 1967.

BELLANI, G. et al. The LUNG SAFE study: a presentation of the prevalence of ARDS according to the Berlin definition. **Crit Care**, London, v. 20, n. 268, 2016.

BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 149, n. 3, p. 818-824, 1994.

CARDINAL- FERNANDÉZ, P. et al. Acute respiratory distress: from syndrome to disease. **Med Intensiva**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 169-175, 2016.

CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients. **Crit Care Med**, New York, v. 42, n. 3, p. 574-582, 2014.

CHEN, L. et al. Molecular mechanisms of ventilator-induced lung injury. **Chin Med J**, Beijing, v. 131, p. 1225-1231, 2018.

COSTARDI, C. H. Z. et al. Efeito do laser de baixa intensidade (670 nm) após contusão muscular em ratos. **Fisiot Mov**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 21-30, 2008.

CURLEY, G. F. et al. Evolution of the inflammatory and fibroproliferative responses during resolution and repair after ventilator-induced lung injury in the rat. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 115, n. 5, p. 1022-1032, 2011.

CURY, V. et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation without impairing lung function. **J Biophotonics**, Berlin, v. 9, n. 11-12, p. 1199-1207, 2016.

DREYFUSS, D. et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. **Am Rev Respir Dis**, New York, v. 137, n. 5, p. 1159-1164, 1988.

DU, P. R. et al. Calpain inhibition ameliorates scald burn- induced acute lung injury in rats. **Burns Trauma**, Mumbai, v. 6, p. 28, 2018.

ESTEBAN, A. et al. How is mechanical ventilation employed in the intensive care unit? An international utilization review. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 161, n. 5, p. 1450-1458, 2000.

ESTEBAN, A. et al. Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. **JAMA**, Chicago, v. 287, n. 3, p. 345-355, 2002.

FAN E.; BRODIE D.; SLUTSKY A. S. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment. **JAMA**, Chicago, v. 319, n. 7, p. 698-710, 2018.

FOWLER, A. A. et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. **Ann Intern Med**, v. 98, p. 5, n. 593-597, 1983.

FUKUDA, T. Y. et al. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. **Lasers Med Sci**, London v. 28, n. 5, p. 1305-1313, 2013.

GATTINONI, L. et al. Physical and biological triggers of ventilator-induced lung injury and its prevention. **Eur Respir J Suppl**, Copenhagen, v. 47, p. 15s-25s, 2003.

GATTINONI, L. et al. Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. **Crit Care Medicine**, New York, v. 38, n. 10 Suppl, p. S539-548, 2010.

GATTIONI, L.; TONETTI, T.; QUINTEL, M. Regional physiology of ARDS. **Crit Care**, London, v. 21, n. Suppl 3, p. 312, 2017.

HOFMANN, W.; KOBLINGER, L.; MARTONEN, T. B. Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. **Health Phys**, New York, v. 57, p. 41-46, 1989.

INGBER, D. Integrins as mechanochemical transducers. **Curr Opin Cell Biol**, London, v. 3, n.5, p. 841-848, 1991.

JUNIOR, O. L. C. A intensidade do infiltrado inflamatório agudo após irradiação laser de baixa potência (InGaAIP 685 nm). 2007. Tese (Doutorado em Odontologia). Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.

KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol**, Augusta, v. 84, n. 5, p. 1091-1099, 2008.

KIM, D. H. et al. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on ventilator-induced lung injury in rats. **J Thorac Dis**, Hong Kong, v. 6, n. 12, p. 1681-1689, 2014.

KUWANO, K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. **Cell Mol Immunol**, Beijing, v. 4, n. 6, p. 419-429, 2007.

LASSEN, H. C. A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency. **Lancet**, London, v. 1, p. 37-41, 1953.

LIMA, F. M. 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. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v. 101, n. 3, p. 271-278, 2010.

LIMA, F. M. et al. Dual effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: action on anti- and pro-inflammatory cytokines. **Lasers Surg Med**, New York, v. 43, n. 5, p. 410-420, 2011.

LIMA, F. M. et al. Low level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. **Photochem Photobiol**, Augusta, v. 89, n. 1, p. 179-188, 2013.

LIMA, F. M. 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. **J Lasers Med Sci**, Tehran, v. 5, n. 2, p. 63-70, 2014.

LINS, R. D. A. U. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Am Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LORENTE, J. A. et al. Acute respiratory distress syndrome in patients with and without diffuse alveolar damage: an autopsy study. **Intensive Care Med**, New York, p. 41, n. 11, p.1921-1930, 2015.

MANCHINI, M. T. et al. Low level laser application in the early myocardial infarction stage has no beneficial role in heart failure. **Front Physiol**, Lausanne, v. 8, n. 23, 2017.

MARINI, J. J. Mechanical ventilation: past lessons and the near future. **Critical Care**, London, v. 17 Suppl 1, p. S1, 2013.

MATHIEU-COSTELLO, O. et al. Pulmonary capillares are more resistant to stress failure in dogs than in rabbits. **J Appl Physiol (1985)**, Bethesda, v. 79, n. 3, p. 908-917, 1995.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 295, n. 3, p. L379-399, 2008.

MATUTE-BELLO, G. et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals, **Am J Respir Cell Mol Biol**, New York, v. 44, n. 5, p. 725-738, 2011.

MEAD, J.; TAKISHIMA, T.; LEITH, D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 28, n. 5, p. 596-608, 1970.

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

MIRSKY, N. et al. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. **Antioxid Redox Signal**, New York, v. 4, n. 5, p. 785-790, 2002.

- MORAES, L. et al. Impact of different tidal volume levels at low mechanical power on ventilator-induced lung injury in rats. **Front Physiol**, Lausanne, v. 9, p. 318, 2018.
- MUSCEDERE, J. et al. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 149, n.5, p. 1327-1334, 1994.
- NIN, N. et al. Rats surviving injurious mechanical ventilation show reversible pulmonary, vascular and inflammatory changes. **Intensive Care Medicine**, New York, v. 34, n. 5, p. 948-956, 2008.
- OLIVEIRA, M. C. Jr. et al. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation in a model of pulmonary and extrapulmonary LPS- induced ARDS. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v. 134, p. 57-63, 2014.
- PALMA-CRUZ, M. et al. Photobiomodulation modulates the resolution in inflammation during acute lung injury induced by sepsis. **Lasers Med Sci**, London, v. 34, n.1, p. 191-199, 2019.
- PARK, W. Y. et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 164, n. 10 Pt 1, p. 1896-1903, 2001.
- PELOSI, P. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome are different. **Eur Respir J Suppl**, Copenhagen, v. 42, p.48s-56s, 2003.
- PEPE, P. E. et al. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. **Am J Surg**, New York, v. 144, n. 1, p. 124-130, 1982.
- PHUA, J. et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time? A systematic review. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 179, n. 3, p. 220-227, 2009.
- PIERRAKOS, C. et al. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. **J Clin Med Res**, Canada, v. 4, n.1, p. 7-16, 2011.
- PINHU, L. et al. Ventilation-associated lung injury, **Lancet**, London, v. 361, n. 9354, p. 332-340, 2003.
- PITTET, J. F. et al. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 155, n. 4, p. 1187-1205, 1997.
- PLATAKI, M.; HUBMAYR, R. D. The physical basis of ventilator-induced lung injury. **Expert Rev Respir Med**, London, v. 4, n. 3, p. 373-385, 2010.

PUNEET, P.; MOOCHHALA, S.; BHATIA, M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Bethesda, v. 288, n. 1, p. L3-15, 2005.

RANIERI, V. M. et al. ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA**, Chicago, v. 307, n. 23, p. 2526-2533, 2012.

REIS, F. F. et al. Pre-treatment with dexamethasone attenuates experimental ventilator-induced lung injury. **J Bras Pneumol**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 166-173, 2016.

REZOAGLI, E.; FUMAGALLI, R.; BELLANI, G. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. **Am Transl Med**, Hong Kong, v. 5, n. 14, p. 282, 2017.

RICARD, J. D.; DREYFUSS, D.; SAUMON, G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 163, n. 5, p. 1176-1180, 2001.

ROCCO, P. R. M.; Dos SANTOS, C.; PELOSI, P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. **Minerva Anesthesiol**, Turim, v. 75, n. 12, p. 730-740, 2009.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **N Engl J Med**, Boston, v. 353, n. 18, p. 1685-1693, 2005.

SCHAFFER, M. et al. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v. 54, n. 1, p. 55-60, 2000.

SILVA, P. L.; NEGRINI, D.; ROCCO, P. R. M. Mechanisms on ventilator-induced lung injury in healthy lungs. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 29, n. 3, p. 301-313, 2015.

SLUTSKY, A. S.; TREMBLAY, L. N. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 157, n. 6 Pt 1, p. 1721-1725, 1998.

SLUTSKY, A.S.; RANIERI, V.M. Ventilator-induced lung injury. **N Eng J Med**, Boston, v. 369, n. 22, p. 2126-2136, 2013.

TARADAJ, J. et al. Effect of laser therapy on expression of angio – and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. **Int J Med Sci**, Australia, v. 15, n. 11, p. 1105-1112, 2018.

THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK et al. Ventilation with low tidal volume as compared with traditional tidal volumes for

acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **N Eng J Med**, Boston, v. 342, n.18, p. 1301-1308, 2000.

THILLE, A. W. et al. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. **Lancet Respir Med**, London, v. 1, n. 5, p. 395-401, 2013.

TONETTI, T. et al. Driving pressure and mechanical power: new targets for VILI prevention. **Am Transl Med**, Hong Kong, v. 5, n. 14, p. 286, 2017.

TREMBLAY, L. et al. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and C-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. **J Clin Invest**, New Haven, v. 99, n. 5, p. 944-952, 1997.

TREMBLAY, L. N.; SLUTSKY, A. S. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. **Proc Assoc Am Physicians**, Cambridge, v. 110, n. 6, p. 482-488, 1998.

UHLIG, S.; UHLIG, U. Pharmacological interventions in ventilator-induced lung injury. **Trends Pharmacol Sci**, Amsterdam, v. 25, n. 11, p. 592-600, 2004.

VADASZ, I. ; SZNAJDER, J. I. Update in acute lung injury and critical care 2010. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 183, n. 9, p. 1147–1152, 2011.

VASQUES, F. et al. Determinants and prevention of ventilator-induced lung injury. **Crit Care Clin**, New York, v. 34, p. 343-356, 2018.

VILLAR J. et al. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. **Intensive Care Med**, New York, v. 37, n. 12, p. 1932-1941, 2011.

WANG, W. F.; LIU, S.; XU, B. A study of the protective effect and mechanism of ketamine on acute lung injury induced by mechanical ventilation. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, Rome, v. 21, n. 6, p. 1362-1367, 2017.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, Boston, v. 342, n. 18, p. 1334-1349, 2000.

WEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**, London, v. 369, p. 1553-1565, 2007.

## ANEXO A



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 011/2016 – CEUA sobre “EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de MAYCON DE MOURA REBOREDO com a colaboração de BRUNO DO VALLE PINHEIRO, FLÁVIA DE PAOLI, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, ADENILSON DE SOUZA DA FONSECA, LUIZ PHILIPPE DA SILVA SÉRGIO e THAIS FERNANDA FAZZA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 48 ratos Wistar (48 machos) de 90 dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 18/08/2016 a 27/07/2018.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 011/2016 – CEUA about “EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO DE BAIXA POTÊNCIA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA PELA VENTILAÇÃO MECÂNICA EM RATOS WISTAR” under responsibility of MAYCON DE MOURA REBOREDO and collaboration of BRUNO DO VALLE PINHEIRO, FLÁVIA DE PAOLI, LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA, ADENILSON DE SOUZA DA FONSECA, LUIZ PHILIPPE DA SILVA SÉRGIO and THAIS FERNANDA FAZZA is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. For the development of this research 48 Wistar rats (48 males) of 90 days of age, will be delivered as requested in the period of 18/08/2016 to 27/07/2018.

Juiz de Fora, 29 de julho de 2016

Coordenadora  
CEUA

Vice-coordenadora  
CEUA

**ANEXO B**

IFLA-D-19-00083 - Submission Confirmation

Yahoo/Entrada

Inflammation <em@editorialmanager.com>

Para:Maycon Moura Reboredo

3 de fev às 17:04

Dear Dr. Reboredo,

Thank you for submitting your manuscript,

"Effect of low-level laser therapy on experimental model of ventilator-induced lung injury", to Inflammation

The submission id is: IFLA-D-19-00083

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

Your username is: [mayconreboredo@yahoo.com.br](mailto:mayconreboredo@yahoo.com.br)

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/ifla/>.

With kind regards,

The Editorial Office

Inflammation