ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA

T.M. Priscila*, A. Regiane*, L.O. Ana Paula**, Aimbire F.*

*Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos, Brasil

**Laboratório de Imunologia Pulmonar e do Exercício, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil

e-mail: flavio.aimbire@unifesp.br

Resumo: A inflamação pulmonar crônica como a asma é uma condição com alto grau de morbidade e mortalidade. É caracterizada pela broncoconstrição. A presença de células inflamatórias no lavado broncoalveolar também caracteriza a asma, e geralmente acompanha a gravidade da doença. A exposição a essas células inflamatórias causa lesão pulmonar, e isso estimula o tecido das vias aéreas à remodelação. A remodelação reduz a luz das vias aéreas, contribuindo para a redução do fluxo de ar. Diversos mediadores químicos liberados pelos eosinófilos na vigência da asma como, por exemplo, as interleucinas- (IL-) 4, 5 e 13 contribuem para o desencadeamento e desenvolvimento da asma. Esses mediadores químicos induzem aumento da permeabilidade vascular, o que causa edema; e contribuem para a perpetuação da asma com remodelamento das vias aéreas caracterizado pela secreção de muco e colágeno. Devido ao alto custo, direto e indireto, do tratamento da asma, e a diversidade de efeitos colaterais da terapia farmacológica convencional, novas terapias vêm sendo desenvolvidas, principalmente aquelas com efeito terapêutico na broncoconstrição e no edema; e que apresentem poucos efeitos colaterais, como por exemplo, a laserterapia. Dessa forma, o presente estudo caracterizou o mecanismo de ação antiinflamatória do laser de baixa potência (LBP) em modelo experimental de asma alérgica. Os resultados indicam que o LBP reduziu a broncoconstrição. Além disso, o LBP reduziu os seguintes marcadores inflamatórios: o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar, a produção de muco e colágeno, a permeabilidade vascular, a concentração de IL-4, IL-5 e IL-13, e as alterações histológicas. Por fim, no presente modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica, o LBP se apresenta como uma terapia não invasiva capaz de controlar a reatividade brônquica e a inflamação.

Palavras-chave: asma, broncoconstrição, eosinofilia, remodelamento das vias aéreas, laserterapia.

Abstract: *Chronic pulmonary inflammation and asthma is a condition with high morbidity and mortality. It is characterized by bronchoconstriction. The presence of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage also features asthma, and usually accompanies the disease severity. Exposure to these cells causes inflammatory lung injury, and this stimulates the tissue remodeling of the airways. The laser reduces remodeling of the airways, thus contributing to the reduction of air flow. Several chemical mediators released by eosinophils in the presence of asthma as, for example, interleukin-(IL-) 4, 5 and 13 contribute to the onset and development of asthma. These chemical mediators induce increases in vascular permeability which causes edema; and contribute to the perpetuation of asthma with airway remodeling characterized for secretion of mucus and collagen. Due to high costs, direct and indirect, of the treatment of asthma, and the diversity of side effects of conventional drug therapy, new therapies are being developed, especially those with a therapeutic effect on bronchoconstriction and edema; and exhibit few side effects, such as laser therapy. Thus, the present study characterized the mechanism of anti-inflammatory action of low level laser in an experimental model of allergic asthma. The results indicate that laser reduced bronchoconstriction. In addition, the laser reduced inflammatory markers following: the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage, sputum production and collagen vascular permeability, the concentration of IL-4, IL-5 and IL-13, and the histological changes. Finally, in this experimental model of allergic pulmonary inflammation, laser is presented as a non-invasive therapy can control the inflammation and bronchial hyperresponsiveness.*

Keywords: *asthma, bronchial reactivity, vascular permeability, airway remodeling, laser therapy.*

Introdução

Dentre as doenças pulmonares obstrutivas que afetam um grande contingente de pessoas no mundo, a asma ocupa lugar de destaque. A consequência social da asma se agrava se adicionarmos aos valores

despendidos, o grau de absenteísmo escolar no trabalho e piora na qualidade de vida dos pacientes asmáticos [1].

A asma é caracterizada pela presença no pulmão, de células inflamatórias, mediadores pró-inflamatórios, expressão de moléculas de adesão, hiperreatividade brônquica e remodelamento das vias aéreas. Dentre as células envolvidas na inflamação destacam-se mastócitos, eosinófilos e linfócitos, mas principalmente pela presença de eosinófilos no sangue, nos alvéolos e nos brônquios. Células estruturais das vias aéreas (musculatura lisa, fibroblastos e epitélio) também produzem mediadores importantes para a persistência da inflamação [2].

Com o crescente avanço de estudos sobre a base molecular da asma, novas terapias vêm sendo desenvolvidas, principalmente àquela com efeito terapêutico sobre a inflamação pulmonar e na exacerbação da resposta contrátil das vias aéreas, e que apresentem poucos efeitos colaterais. A laserterapia de baixa potência é promissora em preencher todos esses requisitos.

Diversos autores tem demonstrado o efeito do LBP em estudos clínicos com indivíduos asmáticos e com portadores de bronquite crônica [3]. Esses autores evidenciam o efeito antiinflamatório do LBP na complacência pulmonar, na melhora da resposta ao corticosteróide, redução na recorrência da crise asmática e nos dias de hospitalização. Além disso, o uso do LBP pode ser realizado em atendimento ambulatorial de forma não invasiva [4].

Apesar dos estudos descritos na literatura sobre o efeito antiinflamatório do LBP na inflamação pulmonar [5], a maioria dos estudos se ocupa em investigar o efeito do laser na inflamação pulmonar aguda. Dessa forma, estudos que avaliem o efeito do LBP sobre a broncoconstrição e a inflamação pulmonar crônica são pertinentes.

No que diz respeito ao efeito do LBP sobre a broncoconstrição, o LBP reduz a hiperreatividade das vias aéreas através redução de prostanoídes no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar em modelo de endotoxemia [6]. Além disso, nós reportamos que o LBP restaura a capacidade de relaxamento do brônquio [7]. No tocante a inflamação pulmonar aguda, o LBP reduz a permeabilidade vascular e o influxo de neutrófilos por um mecanismo no qual a IL-1 β é importante. Ainda nesse sentido, a laserterapia reduziu a lesão endotelial pulmonar e atenuou o edema pulmonar [8].

Tomados em conjunto o efeito do LBP, é razoável sugerir que a laserterapia atenua a broncoconstrição e a inflamação na asma alérgica experimental. A interação da radiação laser com células e mediadores inflamatórios, que atualmente ainda não está elucidada, pode ser o principal eixo do mecanismo de ação desta terapia, e merece ser investigada.

Materiais e métodos

Animais – Camundongos Balb-c machos (25-30 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Nove de Julho. Os animais foram mantidos em gaiolas (5/gaiola) com livre acesso à água e alimentação. Os animais foram anestesiados com Quetamina (20 mg/kg, i.p.) e Xilazina (100 mg/kg, i.p.).

Indução da Asma – Os animais foram sensibilizados com 10 μ g de ovoalbumina (OVA) durante sete dias. Decorridos 14 dias da sensibilização, os animais foram submetidos a broncoprovocação inalatória com OVA. Para tanto, os animais foram expostos à inalação de OVA durante 15 minutos em caixa plástica acoplada a um nebulizador. Decorridas 24 horas da broncoprovocação, a reatividade brônquica e a inflamação foram mensuradas.

Parâmetros de Irradiação – Laser de diodo com potência de 30 mW e comprimento de onda de 660 nm irradiando uma área de 0.785 cm² com densidade de energia de 5.4 J. Os animais foram irradiados 5 minutos, 1, 6 e 12 horas após a broncoprovocação. A potência do laser foi calibrada com a utilização de um potenciômetro (Newport Multifunction Optical Meter model 1835C). A estabilidade do laser durante a irradiação foi avaliada com um coletor de luz com reflexão parcial (4 %). O LBP aplicado sobre a pele na região do brônquio principal.

Reatividade brônquica – Os brônquios foram retirados e montados para registro das contrações isométricas. Para tanto, foi usado um sistema multicanal de tecido isolado, acoplado a um sistema de aquisição, análise e estocagem de dados. Curvas concentração-resposta à metacolina foram construídas para a análise da reatividade brônquica

Avaliação de eosinófilos – O LBA obtido foi centrifugado, por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspenso em 1 ml de PBS. A contagem das células totais foi realizada em câmara de Neubauer.

Permeabilidade vascular pulmonar (Edema pulmonar) – A veia jugular canulada para a administração de azul de Evans (AE; 20 mg/kg) 30 min antes da análise da permeabilidade. Após esse período, os pulmões foram perfundidos com solução salina. O pulmão foi homogeneizado em salina, incubado com formamida e centrifugado. O sobrenadante foi determinado por um espectrofotômetro em 620 nm. A concentração de AE no homogenato de pulmão foi calculada através de uma curva padrão (μ g de AE por pulmão).

Quantificação da produção de muco e colágeno – As secreções dos pulmões foram coradas com hematoxilina/eosina, e as células produtoras de muco ou colágeno foram coradas com ácido periódico de Schiff e picrossírius, respectivamente.

Determinação de mediadores inflamatórios – Os mediadores inflamatórios IL-4, IL-5, IL-13 foram quantificados por leitor de ELISA em alíquotas do sobrenadante do LBA.

Histologia pulmonar – Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina, e quantificados em aumentos de 400X em 10 campos microscópicos aleatórios e não coincidentes.

Análise Estatística – Os resultados foram avaliados estatisticamente através da Análise de Variância (ANOVA) e do Teste de Comparações Múltiplas Tukey-Kramer. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

Resultados

Nossos resultados mostram que o modelo de asma alérgica experimental adotado no presente estudo foi caracterizado pelos sinais clínicos de broncoconstrição exacerbada e inflamação pulmonar com a presença de infiltrado eosinofílico, secreção de mediadores pró-inflamatórios e remodelamento das vias aéreas. Os animais não alérgicos não apresentaram tais características. Os resultados indicam que o LBP foi capaz de reduzir de forma significativa a hiperatividade brônquica frente ao estímulo colinérgico em animais alérgicos quando comparado com animais alérgicos mas não tratados com LBP. De fato, a resposta contrátil brônquica máxima de animais alérgicos foi de $1,91 \pm 0,15$ g/100 mg de brônquio) quando comparado com animais do grupo controle ($1,05 \pm 0,15$ g/100mg de tecido). Quando os animais alérgicos foram tratados com LBP, a resposta contrátil brônquica máxima foi $1,33 \pm 0,15$ g/100 mg de brônquio). Além disso, o LBP reduziu o número de eosinófilos no LBA (Tabela 1), a produção de muco e colágeno (Tabela 2), a permeabilidade vascular (Tabela 3) e a concentração de IL-4, IL-5 e IL-13 (Tabela 4). Vale ressaltar que o LBP não interferiu na reatividade brônquica e na resposta imune de animais não alérgicos ($1,1 \pm 0,15$ g/100 mg de brônquio).

Tabela 1: Células Inflamatórias (10^5 células/mL)

	Total	Monócito	Neutrófilo	Eosinófilo
controle	$5,3 \pm 0,02$	$4,30 \pm 1,10$	$0,5 \pm 0,20$	$0,50 \pm 0,20$
Laser	$5,1 \pm 0,03$	$4,80 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,20$
OVA	$45,1 \pm 3,2$	$30,0 \pm 3,1$	$18,0 \pm 1,10$	$5,50 \pm 0,22$
OVA+L	$22,0 \pm 1,3$	$18,0 \pm 1,10$	$8,0 \pm 1,10$	$1,50 \pm 0,25$

Tabela 2: Concentração de muco e colágeno

	Muco	Colágeno
Controle	$2,10 \pm 0,25$	$1,54 \pm 0,25$
Laser	$2,10 \pm 0,22$	$1,15 \pm 0,22$
OVA	$25,70 \pm 1,10$	$17,55 \pm 1,10$
OVA+L	$8,40 \pm 1,50$	$1,47 \pm 0,20$

Tabela 3: Edema Pulmonar

Controle	$8,15 \pm 2,50$
Laser	$8,10 \pm 2,50$
OVA	$45,80 \pm 3,10$
OVA+L	$18,40 \pm 2,55$

Tabela 4: Concentração de mediadores inflamatórios

	IL-4	IL-5	IL-13
Controle	$1,05 \pm 0,20$	$18,50 \pm 3,5$	$5,10 \pm 1,50$
Laser	$1,0 \pm 0,21$	$33,0 \pm 3,55$	$5,0 \pm 1,50$
OVA	$7,40 \pm 0,50$	$175,0 \pm 10,10$	$45,0 \pm 2,10$
OVA+L	$3,53 \pm 0,55$	$92,40 \pm 10,55$	$11,30 \pm 1,55$

Discussão

No presente estudo, nosso grupo demonstrou o efeito da laserterapia na asma alérgica experimental. A estratégia de tratamento adotada neste modelo experimental revela que o LBP pode controlar a exacerbção da reatividade brônquica e inflamação pulmonar quando administrado de forma intercalada e não invasiva. Dessa forma, quando os animais receberam 3 irradiações após o desafio antigênico, o LBP restaurou a reatividade brônquica a níveis de controle.

No que diz respeito à celularidade no LBA após o desafio antigênico, nossos resultados evidenciam o aumento do número de eosinófilos. Os resultados mostram que o efeito antiinflamatório do LBP sobre o número de eosinófilos parece melhorar a sua eficácia no decorrer do processo inflamatório. Essa informação é importante, pois existe uma estreita relação entre os eosinófilos e a broncoconstrição através da sinalização de IL-13. Vale ressaltar que os eosinófilos estão diretamente associados ao remodelamento das vias aéreas em diversas situações.

Alguns estudos têm avaliado a inflamação pulmonar com ênfase especial ao remodelamento das vias aéreas. O remodelamento das vias aéreas requer proliferação celular, aumento da deposição de proteínas de matriz celular, espessamento da membrana basal, produção de colágeno, aumento da secreção de muco. Nossos resultados mostram que a laserterapia atenuou a secreção de muco e a produção de colágeno após o desafio antigênico. Admitindo essa condição, e considerando o efeito do LBP sobre a eosinofilia no LBA de animais alérgicos, é razoável supor que o efeito do LBP sobre a produção de colágeno e a secreção de muco seja uma resposta secundária advinda do efeito da laserterapia sobre o número de eosinófilos no LBA de animais após o desafio antigênico.

O edema pulmonar caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular pulmonar após o desafio antigênico apresenta uma resposta significativa no grupo de animais alérgicos e tratados com LBP. Isso significa que o LBP reduziu o edema pulmonar durante o período estudado. Isso pode explicar porque o LBP age diferentemente sobre cada sinal inflamatório da asma experimental.

No sentido de dar início a compreensão de qual sinalização celular é a responsável pelos efeitos benéficos do laser de baixa potência, alguns dos principais mediadores inflamatórios que modulam a inflamação pulmonar alérgica foram investigados como possíveis candidatos a alvo da laserterapia. O presente

estudo mostra que o LBP é capaz de reduzir a concentração de mediadores inflamatórios importantes no desencadeamento e manutenção da asma alérgica. É conhecido que a IL-4 promove a síntese local e sistêmica de IgE, e regula a eosinofilia das vias aéreas. A IL-4 estimula ainda as células produtoras de muco, fibroblastos e está relacionada com o remodelamento das vias aéreas. Nossos resultados mostram que o LBP foi eficiente em reduzir a concentração de IL-4 e de IL-5 no LBA de animais alérgicos. O efeito do LBP sobre a concentração de IL-5 se faz importante, visto que a IL-5 regula a liberação de eosinófilos da medula óssea, aumentando a sinalização quimiotática no trato respiratório. Ainda no que se refere ao efeito do LBP sobre os mediadores inflamatórios que modulam a asma, um ponto de destaque foi que a laserterapia reduziu de forma eficaz a concentração de IL-13. Isso porque alguns autores evidenciaram que animais tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-13 apresentaram redução significativa da broncoconstrição na asma alérgica. Esse resultado nos faz supor que o efeito do LBP em restaurar a reatividade brônquica pode ser devido ao marcante efeito da laserterapia sobre a IL-13. Dessa forma, nossos resultados apontam para o fato de que o efeito antiinflamatório do LBP sobre a hiperreatividade brônquica, a inflamação pulmonar e o remodelamento das vias aéreas se deve à redução da secreção de IL-4, IL-5 e IL-13.

Conclusão

O conjunto das informações a respeito da sinalização celular que culmina no efeito benéfico da laserterapia contribuirá de forma bastante significativa para a escolha da abordagem terapêutica do LBP, e ainda quais as associações com a terapia farmacológica convencional podem de fato caracterizar o LBP como uma promissora terapia auxiliar no tratamento das afecções pulmonares alérgicas.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2008/08838-5 e 2011/05890-8).

Referências

- [1] Rochlitzer S, Nassenstein C, Braun A. The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma; 2006.
- [2] Delfino RJ, Zeiger RS, Seltzer JM, Street DH, McLaren CE. Association of asthma symptoms with peak particulate air pollution and effect modification by anti-inflammatory medication use; 2002.
- [3] Mikhaïlov VA, Aleksandrova OIu, Gol'dina EM. The immunomodulating action of low-energy laser radiation in the treatment of bronchial asthma. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 1998 (4): 23-25.
- [4] Milojević M, Kuruc V. Low power laser biostimulation in the treatment of bronchial asthma. *Med Pregl.* 2003 56(9-10): 413-418.
- [5] Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tuner J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RA. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis; 2011;
- [6] Aimbire F, Albertine R, de Magalhães RG, Lopes Martins RA, Castro-Faria-Neto HC, Zângaro RA, Chavantes MC, Pacheco MT. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat; 2005.
- [7] Aimbire F, Bjordal JM, Iversen VV, Albertini R, Frigo L, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Chavantes MC, Labat RM, Lopes-Martins RA. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction; 2006.
- [8] Mafra de Lima F, Costa MS, Albertini R, Silva JA Jr, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): attenuation of cholinergic hyperreactivity, beta(2)-adrenergic hyporesponsiveness and TNF-alpha mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF-kappaB dependent mechanism; 2009.