



Universidade Brasil

Campus Itaquera

Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Biomédica

Rua Carolina Fonseca, 136 – Itaquera – São Paulo – SP - CEP:08230-030, Fone/Fax: (11)2070-0025

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO ATRAVÉS
DE DIODO EMISSOR DE LUZ NO TECIDO PULMONAR EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

WILLER EDUARDO ALVES

SÃO PAULO

2019

Universidade Brasil

Campus Itaquera

Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Biomédica

Rua Carolina Fonseca, 136 – Itaquera – São Paulo – SP - CEP:08230-030, Fone/Fax: (11)2070-0025

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO ATRAVÉS
DE DIODO EMISSOR DE LUZ NO TECIDO PULMONAR EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

WILLER EDUARDO ALVES

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Lívia Assis Garcia

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Roberta Tim

SÃO PAULO

2019

ALVES, Willer Eduardo

A477e Efeitos da terapia por Fotobiomodulação através de Diodo emissor de luz no tecido pulmonar em um modelo experimental de Sepsis / Willer Eduardo Alves. -- São Paulo, SP: Universidade Brasil, 2019.

43 f.

Orientadora: Profa. Dra. Lívia Assis Garcia.

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Roberta Tim

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação Stricto Sensu do curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

1. Fotobiomodulação. 2. LED diodo emissor de luz. 3. Sepsis. 4. Tecido pulmonar. 5. Reabilitação.

I. Título.

CDD 615.831

TERMO DE APROVAÇÃO

WILLER EDUARDO ALVES

"EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ATRAVÉS DE DIODO EMISSOR DE LUZ NO TECIDO PULMONAR EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE"

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



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



Prof.(a). Dr.(a) Marcello Magri Amaral (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Cintia Cristina Santi Martignago (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

São Paulo, 21 de março de 2019
Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Livia Assis Garcia



Termo de Autorização

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

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

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

Título do Trabalho: "EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ATRAVÉS DE DIODO EMISSOR DE LUZ NO TECIDO PULMONAR EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSIS"

Autor(es):

Discente: **Willer Eduardo Alves**

Assinatura: 

Orientador(a): Profa. Dra. Livia Assis Garcia

Assinatura: 

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 21/03/2019

INDICE DE FIGURAS

Figura 1– Esquema representativo do modelo experimental de sepse por ligadura e perfusão cecal (CLP).....	21
Figura 2– Esquema representativo da aplicação do protocolo de LED.....	22
Figura 3– Fotomicrografias representativas da análise morfológica das secções.....	27
Figura 4 – Análise do sistema de pontuação de lesão pulmonar.....	28
Figura 5 – Análise morfométrica da densidade de células inflamatórias.....	29
Figura 6 – A – Secções representativas da imunistoquímica da iNOS.....	30
Figura 6 – B – Resultados da análise semiquantitativa da expressão da iNOS.....	30
Figura 7 – A – Secções representativas da imunistoquímica de IL-10.....	31
Figura 7 – B – Resultados da análise semiquantitativa da expressão de IL-10.....	31

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
1. INTRODUÇÃO.....	09
1.1. Seps e alterações respiratórias.....	09
1.2. Fotobiomodulação.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVO.....	19
3.1. Objetivos gerais.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Local.....	20
4.2. Animais de experimentação.....	20
4.3. Grupos experimentais.....	20
4.4. Modelo experimental de seps – ligadura e perfusão cecal.....	20
4.5. Protocolo da fotobiomodulação através de LED.....	22
4.6. Processamento das amostras e eutanásias dos animais.....	22
4.7. Análises.....	23
4.7.1. Análise morfológica.....	23
4.7.2. Análise da lesão Pulmonar.....	23
4.7.3. Análise da número de células inflamatórias.....	24
4.7.4. Análise da expressão proteica por imunistoquímica.....	24
4.8. Análise estatística dos resultados.....	24
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Observação geral dos animais experimentais.....	26
5.2. Análise histológica descritiva.....	26
5.3. Pontuação de lesão pulmonar.....	27
5.4. Número de células inflamatórias.....	27
5.5. Análise imunistoquímica.....	29
5.5.1. Expressão iNOS.....	29
5.5.2. Expressão de IL-10.....	30
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

A sepse é definida como uma infecção com alterações sistêmicas secundárias, sendo as respiratórias de particular importância devido à gravidade, frequência e impacto considerável na saúde pública. A fotobiomodulação através de diodo emissor de luz (LED) tem sido frequentemente utilizada como estratégia terapêutica não invasiva, segura e efetiva que visa modular a resposta inflamatória de diversas condições patológicas. Contudo, a atuação da LED sobre o tecido pulmonar durante a sepse permanece incerta. O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da fotobiomodulação através de LED vermelho (630 nm) sobre o tecido pulmonar de ratos submetidos a um modelo de sepse por meio da técnica de ligadura e perfusão cecal (CLP). Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, divididos em dois grupos: Sepse (CS), Sepse submetido ao tratamento com LED (SRL). Para o tratamento foi utilizado um LED AsGaAl (contínuo; comprimento de onda = 630 nm; potência = 200 mW; área do feixe = 0,5 cm²; tempo de irradiação = 20 s; dose = 8 J/cm²; energia por ponto = 4 J; irradiância = 0,4 mW/cm²) aplicado em três pontos: região anterior da traqueia e regiões ventrais do tórax, bilateralmente, logo abaixo das costelas, 1 e 24 horas após a cirurgia. Para avaliação e comparação dos efeitos do tratamento foram realizadas análises histológicas, morfométricas e densidade de células inflamatórias, assim como análises da expressão proteína de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e interleucina-10 (IL-10). A análise histológica mostrou que o grupo SRL apresentou menor espessura do septo alveolar e menor recrutamento de células inflamatórias. Além disso, foi possível observar que o SRL apresentou menor pontuação no escore de lesão pulmonar ($p = 0,0077$) e menor número de células inflamatórias ($p = 0,022$) na análise morfométrica. Ademais, na análise de imunohistoquímica foi demonstrada uma expressão de iNOS semelhante em ambos os grupos, entretanto, observou-se maior expressão de IL-10 ($p = 0,036$) no grupo SRL. Desta forma, estes resultados sugerem que a terapia por fotobiomodulação através de LED vermelho foi eficiente em atenuar a lesão pulmonar induzida pela sepse, visto que este recurso foi capaz de reduzir a inflamação e o recrutamento de células inflamatórias, assim como aumentar a produção de citocinas anti-inflamatória.

Palavras-chaves: Fotobiomodulação; LED – diodo emissor de luz; sepse; tecido pulmonar; reabilitação.

ABSTRACT

Sepsis is defined as an infection with secondary systemic changes, and respiratory infections are of particular importance because of their severity, frequency, and considerable impact on public health. Light Emitting Diode (LED) photobiomodulation has often been used as a safe, effective, noninvasive therapeutic strategy that aims to modulate the inflammatory response of various pathological conditions. However, the LED's action on lung tissue during sepsis remains uncertain. The objective of the present study was to evaluate the effects of photobiomodulation by red LED (630 nm) on the pulmonary tissue of rats submitted to a sepsis model using the technique of cecal ligation and perfusion (CLP). Twenty male Wistar rats were divided into two groups: Sepsis (CS), Sepsis submitted to treatment with LED (SRL). For the treatment, an AsGaAl LED (continuous, wavelength = 630 nm, power = 200 mW, beam area = 0.5 cm², irradiation time = 20 s, dose = 8 J / cm², energy per point = 4 J, irradiance = 0.4 mW / cm²) were applied at three points: anterior region of the trachea and ventral regions of the thorax, bilaterally, and just below the ribs, 1 and 24 hours after surgery. For the evaluation and comparison of treatment effects, histological, morphometric and inflammatory cell density analyzes were performed, as well as analyzes of the expression of induced nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin-10 (IL-10). Histological analysis showed that the group treated with LED (SRL) had a smaller thickness of the alveolar septum and less recruitment of inflammatory cells. In addition, it was possible to observe that the SRL had a lower score in the lung injury score ($p = 0.0077$) and a lower number of inflammatory cells ($p = 0.022$) in the morphometric analysis. In addition, immunohistochemistry analysis demonstrated similar iNOS expression in both groups, however, greater IL-10 expression ($p = 0.036$) was observed in the SRL group. Thus, these results suggest that red LED photobiomodulation was effective in attenuating the pulmonary inflammation now induced by sepsis, since this feature was able to reduce the inflammatory cells of the lung tissue and increase the production of anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Photobiomodulation; LED – Light Emitting Diode; sepsis; lung tissue; rehabilitation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Seps e alterações respiratórias

A seps e é definida como a presença de infecção junto com manifestações sistêmicas (DELLINGER *et al.*, 2013; PARRY *et al.*, 2015), é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica seguida de imunossupressão causada por uma infecção grave. É uma frequente causa de admissão nas unidades de terapia intensiva e uma das mais frequentes causas de morte de pacientes hospitalizados devido à síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (BROWN *et al.*, 2016; ALBERTI *et al.*, 2003; MOSS, 2005).

A primeira descrição de seps e foi relatada no Egito em um papiro de 1600 a.C. A etimologia da palavra seps e vem do termo grego antigo *sechas*, cujo significado é “putrefação” ou a “decadência da matéria orgânica”. A utilização do termo grego mais antigo encontrada foi no livro de Homero, *Ilíada*, e no *corpus* hipocrático no 4º século a.C., passou por mais de 2 mil anos para novamente ser feita uma definição da etimologia e rediscussão de abordagens. No século XIX, o médico obstetra Ignaz Phillip Semmelweis foi considerado o pai do controle de infecções hospitalares, o qual afirmou que o simples ato de lavagem das mãos evitava a seps e. O mesmo médico comprovou a íntima relação da febre puerperal com os cuidados médicos. Além disso, foi evidenciado que os médicos que saíam diretamente da sala de autópsia para a de obstetrícia tinham odor desagradável nas mãos, o que estaria relacionado com a febre puerperal, infecção pós-parto (JORDAN A. KEMPKER, 2017).

De acordo com estudo de EDIT *et al.* 2016, aproximadamente, de 25 a 80% dos casos de pacientes com seps e evoluem para choque séptico. Foi identificado que 50% dos pacientes, no período de 1 ano após ter tido choque séptico, foram a óbito e/ou ficaram

com sequelas graves, o que mostra prejuízo na qualidade de vida dos indivíduos sobreviventes. (SHANKAR-HARI et al., 2016; YEALY et al., 2015).

A sepse é uma disfunção causada na sua grande maioria por agentes patogênicos (bactérias gram-negativas e gram-positivas), podendo ser oriunda de uma simples infecção, ou uma resposta ineficiente a agentes infectantes, uma vez que a resposta do sistema imunológico vai depender de sua virulência, da genética do indivíduo e de sua imunidade (COELHO; MARTINS, 2012).

Sendo assim, a sepse trata-se de uma síndrome extremamente complexa e heterogênea, evidenciada pela presença de grande quantidade de mediadores inflamatórios circulantes, produzidos e regulados por células inflamatórias (BROWN *et al.*, 2016). Durante a sepse, tem sido observado um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatória às infecções (EIDT et al., 2016; LIMA et al., 2013). Evidências demonstram que as endotoxinas e lipotoxinas observados na sepse levam a um aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-6) em paciente com sepse (GOLDIE *et al.*, 1995), as quais apresentam importante papel na patogenia da sepse e disfunções de múltiplos órgãos (FAN *et al.*, 2016). Pesquisa relata a ação do TNF- α como uma das principais citocinas a induzir a resposta inflamatória sistêmica após insulto infeccioso, visto que o mesmo está diretamente relacionado à síntese de outros mediadores secundários, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ampliando ainda mais o processo inflamatório (DELLINGER *et al.*, 2013). Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 também são de fundamental importância durante a sepse (DEJAGER *et al.*, 2011), pois, produzidas por monócitos e linfócitos, possuem como objetivo combater a resposta inflamatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (FAN *et al.*, 2016).

A sepse é uma das causas principais para internação em unidade de terapia intensiva (UTI) e principal fator de permanência que eleva a taxa de ocupação dos leitos, esta taxa de permanência gera um custo muito elevado, por se tratar de um tratamento altamente especializado, no mundo todo, elevando-se, assim, os fatores de mortalidade e comorbidade. Apesar dos esforços tecnológicos para diagnóstico e tratamento precoce da sepse, ainda se está aquém do ideal por ter uma grande incidência e prevalência na sociedade (PALOMBA et al., 2015).

A sepse representa a causa de uma a cada três mortes hospitalares, em relação às principais causas desse tipo de morte. Em todo o mundo, a sepse provoca uma mortalidade de cerca de 5 milhões de pessoas, e cerca de 30% dos casos são intra-hospitalares (BRENT, 2017). No Brasil, a sepse é um dos principais problemas de saúde, sendo responsável por 25% da ocupação de leitos em unidades de terapia intensiva. Atualmente é a principal causa de morte nas UTIs e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e o câncer (AMIB 2014). Dados epidemiológicos brasileiros, coordenados pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), apontam que a taxa de mortalidade em nosso país pode chegar a 55% dos pacientes que apresentam sepse nas UTIs brasileiras. Na última década, a taxa de incidência da sepse aumentou de 8% para 13% em relação à década passada, sendo responsável por mais óbitos do que alguns tipos de câncer, como o de mama e o de intestino (AMB 2016).

A mortalidade por sepse em nosso país pode chegar a 70% dos casos registrados, enquanto a média mundial está em torno de 30 a 40% (INSTITUTO LATINO AMERICANO PARA ESTUDOS DA SEPSE (ILAS), 2014). Segundo dados levantados pela Global Sepse Alliance (GSA), surgem a cada ano cerca de 30 milhões de novos casos

no mundo, sendo uma das síndromes mais comuns, tanto em países em desenvolvimento como desenvolvidos (AMIB 2014).

Como resultado de um processo inflamatório exacerbado e sistêmico, uma série de alterações metabólicas acompanha a instalação da sepse, incluindo a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), a mais severa forma de lesão aguda pulmonar (RUBENFELD *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2014). Esta é condição de insuficiência respiratória aguda decorrente da lesão de natureza inflamatória, que tem por característica lesão no epitélio alveolar com aumento da permeabilidade dos capilares pulmonares e a formação de edema pulmonar rico em proteínas (ATABAI e MATTHAY, 2002). As biópsias pulmonares realizadas na fase aguda da SDRA apresentam dano alveolar com edema alveolar rico em proteínas, neutrófilos, macrófagos e eritrócitos dentro do espaço alveolar, além da presença de fibrina na membrana basal, o que conseqüentemente resulta em redução da complacência pulmonar.

Do ponto de vista clínico, a SDRA é caracterizada por um quadro de dispneia, hipoxemia, insuficiência respiratória e infiltrado pulmonar bilateral na radiografia de tórax, compatível com o edema. Devido ao aumento do estresse oxidativo e da atividade de proteases, o processo inflamatório local reduz a produção de surfactante e inativa o surfactante local, levando à formação de atelectasias. Adicionalmente, as elastases lesam a estrutura pulmonar e podem ser observadas lesões alvéolo-capilares e lesão celular epitelial (WHEELER e BERNARD, 2007).

Estudo realizado por Azevedo *et al.*, 2013, em 45 UTIs brasileiras, entre 1º de junho de 2011 e 31 de julho de 2011, diagnosticou 242 (31%) pacientes com SDRA de acordo com a definição de Berlim. O índice de mortalidade na população com SDRA foi de 46% e 52%, em UTIs e hospitais, respectivamente. A mortalidade na UTI combinada

para SDRA moderada e grave pela definição de Berlim foi de 55%, e a mortalidade hospitalar foi de 60%.

Nas últimas décadas, foi evidenciado nos Estados Unidos que a sepse tem crescido significativamente em relação às outras comorbidades, aproximadamente de 300 a 1000 casos por 100.000 pessoas. (YALY et al., 2015; KEMPKER et al., 2016)(JORDAN A. KEMPKER, 2017)

Segundo Palomba observou em estudos da Organização Mundial da Saúde, a sepse vem crescendo exponencialmente entre as pessoas idosas acima de 65 anos, o que se deve ao aumento da incidência e da prevalência de doenças crônicas e suas comorbidades, as quais levam a um déficit motor e reduzem a motricidade, agravando assim o quadro clínico e psíquico social. Além disso, verifica-se que o envelhecimento é fator preditivo para o acometimento de sepse (PALOMBA et al., 2015).

Na gravidez e no pós-parto, a sepse é a causa dos maiores índices de mortalidade e morbidade, uma em cada mil mulheres desenvolve sepse. Os recém-nascidos e as crianças estão em maior risco ao adquirir sepse, pois o sistema imunológico está imaturo, não consegue combater os patógenos. Entre estes os mais comuns são pneumonias bacterianas, virais, fúngicas ou por protozoário, e o tratamento deve ser iniciado rapidamente com terapia direcionada ao patógeno (JORDAN A. KEMPKER, 2017; YEALY et al., 2015). Em relação ao gênero, há uma incidência maior de sepse no masculino e em pessoas negras, neste caso apresentou-se duas vezes mais incidência quando comparadas aos casos de pessoas brancas (JORDAN A. KEMPKER, 2017).

Na Alemanha, entre 2007 e 2013, a incidência de sepse aumentou, em média, 5,7% ao ano, principalmente em neonatos e idosos, linearmente a partir dos 40 anos, ocorrendo aumento no índice de pacientes hospitalizados de 1,21% para 1,54% tendo uma

mortalidade de 43,6% para sepse grave e 58,8% para choque séptico (FLEISCHMANN et al., 2016; MARIANSDATTER et al., 2016; YEALY et al., 2015).

Apesar do avanço da medicina e do uso de antibióticos modernos para combater estas alterações, a resposta ainda é baixa. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de novas abordagens clínicas com o objetivo de reduzir e prevenir os danos relacionados à sepse e possivelmente restaurar a função fisiológica normal.

1.2. Fotobiomodulação

A fotobiomodulação por terapia laser de baixa intensidade (*low-level laser therapy – LLLT*) e diodo emissor de luz (*light-emitting diode – LED*) são consideradas técnicas seguras e eficazes no tratamento clínico de uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos (HAMBLIN, 2010). Embora as vias de interação luz-tecido ainda necessitem de melhor compreensão, a absorção da energia luminosa por parte de cromóforos específicos (especialmente localizados na mitocôndria) parece ser o evento chave para inicializar os processos celulares responsáveis pelos efeitos terapêuticos (HUANG *et al.*, 2009).

Os primeiros relatos já evidenciaram que a luz monocromática não invasiva auxilia a modulação de processos biológicos relacionados ao equilíbrio da homeostasia celular bioestimulando a recuperação do tecido lesado (KARU *et al.*, 2005). Esta terapia baseia-se na utilização de fonte de luz monocromática capaz de produzir reações fotoquímicas e fotofísicas a nível celular, dentre as quais estão o aumento da respiração celular e oxigenação tecidual e o aumento da síntese de RNA e de proteínas reguladoras do ciclo celular (FUKUDA *et al.*, 2013). Estas alterações celulares e moleculares são responsáveis por desencadear os efeitos terapêuticos da fotobiomodulação, ou seja, efeitos analgésicos, bioestimulante celular e modulação do processo inflamatório

(HAMBLIN *et al.*, 2010). Claramente, deve-se destacar que o potencial terapêutico destas modalidades são dependentes da aplicação de parâmetros de tratamento adequados, principalmente comprimento de onda, densidade de energia, potência, irradiância, número e tempo da sessão (RENNÓ *et al.*, 2011).

Os benefícios da fotobiomodulação têm sido evidenciados no tratamento de diversas condições inflamatórias (YOSHIMURA *et al.*, 2016; ASSIS *et al.*, 2016; HASLERUD *et al.*, 2016). A mensuração desta resposta pode ser vista, por exemplo, através da diminuição na produção de proteínas mediadoras do processo inflamatório, entre elas, TNF- α , IL-1 β , iNOS e COX-2 (dos SANTOS *et al.*, 2014, ALVES *et al.*, 2013). Ademais, pode-se observar redução da densidade de células inflamatórias, da síntese de prostaglandinas e citocinas, e aumento nos níveis de enzimas antioxidantes em vários modelos de inflamação (ASSIS *et al.*, 2012; DE LIMA *et al.*, 2013; DE LIMA *et al.*, 2011; AIMBIRE *et al.*, 2008).

A aplicação da LLLT sobre o tecido pulmonar mediante alterações inflamatórias tem sido objeto de intenso estudo científico nos últimos anos. Os trabalhos têm demonstrado efeitos positivos desta terapia na modulação do processo inflamatório que acomete o tecido pulmonar (DE LIMA *et al.*, 2013; DE LIMA *et al.*, 2011; AIMBIRE *et al.*, 2008). Aimbire *et al.* (2005) avaliaram o efeito da LLLT em modelo experimental de inflamação pulmonar induzida por Lipopolissacarídeo (LPS), demonstrando que a terapia foi capaz de reduzir a quantidade de células inflamatórias, assim como metabólitos derivados de COX-2. Em outro estudo, no mesmo grupo, utilizando um modelo de inflamação pulmonar induzida por imunocomplexo, os autores evidenciaram que o laser no comprimento de onda vermelho (650 nm) foi eficiente em reduzir significativamente a atividade de TNF- α . Além disso, De Lima *et al.* (2009) e De Lima *et al.* (2010), utilizando um modelo experimental de inflamação pulmonar por instilação de *Escheria*

Coli Lipopolissacido (LPS) em ratos, demonstraram que o laser (685 nm), 24 horas após a indução da inflamação, foi capaz de minimizar a inflamação pulmonar e lesão endotelial, o que foi evidenciado por uma redução em permeabilidade vascular, edema pulmonar, ativação de neutrófilos no tecido pulmonar e diminuição do TNF- α e IL-1 β . De maneira similar, Cury *et al.* (2015), utilizando o mesmo modelo experimental de inflamação pulmonar, revelaram que a LLLT (660 nm) foi capaz de diminuir o influxo de células inflamatórias quanto à transcrição de diversas citocinas inflamatórias, 6 horas após a instilação de LPS.

Embora exista um significativo número de trabalhos mostrando os efeitos positivos da fotobiomodulação em algumas desordens pulmonares, há uma falta de informação sobre a aplicabilidade de LED nestas desordens. Inicialmente, acreditava-se que a principal diferença física entre laser e led, a coerência da luz emitida, poderia influenciar nos resultados na fotobiomodulação (VICK et al., 2003). Estudos desenvolvidos pela NASA (*National Aero Space Agency*), nos Estados Unidos, demonstraram evidências de que a eficiência dos LEDs em processos de fotobiomodulação molecular e celular é semelhante à da terapia laser de baixa intensidade (VINCK et al., 2003; VINCK et al., 2005).

Assim, atualmente, o uso da terapia por fotobiomodulação na reabilitação tem mostrado ser uma alternativa terapêutica tão eficiente quanto ao laser de baixa intensidade, com a vantagem de apresentar um custo inferior ao deste. Recentemente, Siqueira et al., 2017, demonstraram que a terapia por LED foi capaz de modular o processo inflamatório, reduzir a secreção de muco e o edema, assim como aumentar os níveis de interferon-gama (IFN- γ) e IL-10 em modelo experimental de asma.

Sendo assim, a utilização da LED poderia ser proposta como recurso terapêutico para o tratamento de inflamações que acometem o sistema respiratório. Nesse sentido,

evidências morfológicas e moleculares perante esse cenário seriam de grande valia para compreender com exatidão os benefícios da utilização desta abordagem terapêutica no tecido pulmonar, particularmente, porque as evidências são escassas nessa área de conhecimento.

2. JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, torna-se evidente que a sepse está associada a uma substancial incapacidade física para os indivíduos acometidos e a altos custos socioeconômicos. O dano pulmonar decorrente de um processo inflamatório sistêmico está diretamente associado ao declínio da função física e mental do paciente acometido, constituindo um importante desafio à reabilitação. Com isso, pesquisas que tenham como objetivo desenvolver intervenções que amenizem e/ou previnam as alterações sistêmicas inerentes à evolução da doença são de extrema importância, diminuindo custos e reduzindo os índices de mortalidade relacionados a complicações da doença.

Dentre as intervenções não farmacológicas, o LED demonstra um grande potencial fotobiomodulador e pode constituir um excelente coadjuvante no tratamento da sepse, uma vez que é um método não invasivo e também apresenta custos relativamente baixos. No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos da interação deste com o tecido pulmonar na sepse. Dentro desse contexto, este projeto visou contribuir de forma significativa na elucidação de mecanismos celulares, através dos quais o LED interage com o tecido pulmonar na sepse.

Era esperado ainda que o desenvolvimento deste projeto resultasse em benefícios econômicos e, conseqüentemente, sociais para a população brasileira, haja vista que o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na interação do LED com o processo inflamatório sistêmico determinaria o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e seguros, que poderiam ser aplicados em ampla escala no tratamento de indivíduos portadores de sepse. Assim, poderia esperar uma melhoria da qualidade de vida desses indivíduos, bem como a redução no número de dias de internação e de afastamentos no trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da fotobiomodulação através de diodo emissor de luz (LED) vermelho (630 nm) sobre o tecido pulmonar em modelo experimental de sepse induzida por meio da técnica de ligadura e perfuração cecal (CLP).

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Investigar os efeitos do LED sobre os aspectos morfológicos e morfométricos do tecido pulmonar durante a sepse em modelo de CLP.

- ✓ Analisar a ação do LED sobre a expressão de moléculas IL-10 e iNOS envolvidas no processo inflamatório do tecido pulmonar durante a sepse em modelo de CLP.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Local

Este projeto foi realizado em parceria com o Laboratório de eletrotermofototerapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

4.2. Animais de experimentação

Para a execução do estudo proposto, foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e massa corpórea média de 300 ± 23 g. Os animais foram mantidos por um período menor do que 24 horas. Durante todo o procedimento experimental permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22°-27°C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*.

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios de experimentação animal do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA nº 244360) da UFSCar.

4.3. Grupos experimentais

Foram utilizados 20 animais, os quais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 2 grupos:

- **Grupo 1 – (CS) Sepses (controle)** – indução de sepsis sem nenhum tratamento.
- **Grupo 2 – (SRL) Sepses + LED** – indução de sepsis e tratamento com LED.

4.4. Modelo experimental de sepsis – ligadura e perfusão cecal (CLP)

O modelo de sepse foi obtido por meio da técnica de ligadura e perfusão cecal (CLP) associada com perfuração com agulha, como descrito inicialmente por Wichterman *et al.* (1980). Os animais foram pesados e anestesiados, via intraperitoneal, com a associação de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (40 mg/kg). Após a anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia mediana, com extensão de 2 a 3 cm e, em seguida, foi identificado o ceco. Utilizando-se a manobra digital, foi realizado o preenchimento do conteúdo do ceco, em sentido proximal. A ligadura total oclusiva do ceco foi feita na região central da porção do ceco entre a junção ileocecal e a porção apical. Para a localização exata da ligadura, foi utilizado um paquímetro. Após a ligadura, duas punções foram feitas na superfície antimesentérica do ceco ligado com uma agulha de calibre de 22G, permitindo a passagem de algum material fecal na cavidade abdominal por meio de leve compressão local (Figura 1). Previamente à reintrodução do ceco na cavidade abdominal, o conteúdo exposto foi umedecido com soro fisiológico aquecido a 30°C. A incisão foi suturada e foi feita a limpeza local. Durante o período pós-operatório, os animais foram mantidos em analgesia de horário (morfina 4/4 horas; 5mg/kg) e em ambiente aquecido a fim de evitar hipotermia. Cabe salientar que este é um modelo experimental de sepse leve/moderado.

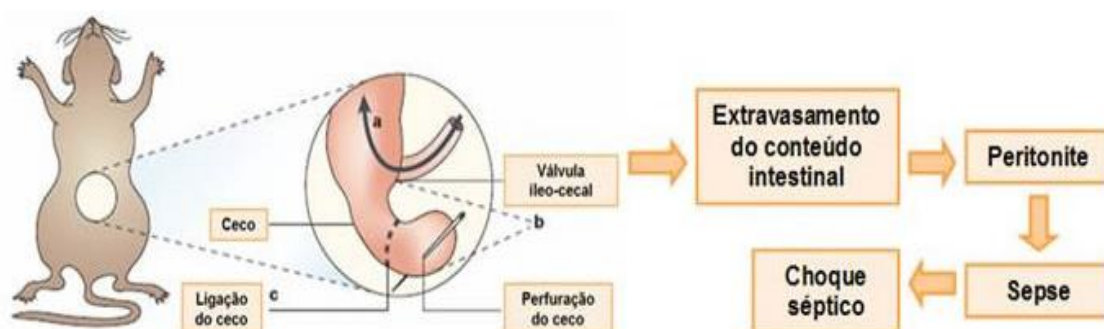


Figura 1– Esquema representativo do modelo experimental de sepse por ligadura e perfusão cecal (CLP)

4.5. Protocolo da fotobiomodulação através de LED

Para os grupos irradiados, foi utilizado o aparelho portátil de LED (Ibramed, Amaparo, SP, Brasil). Foi utilizado o comprimento de onda de 630 nm, emissão contínua, potência de saída nominal de 200 mW, área do feixe de 0,5 cm², dose de 8 J/cm², energia de irradiação pontual de 4 J e tempo de irradiação de 20 segundos. A irradiação foi realizada pela técnica pontual com contato, 1 e 24 horas após a cirurgia, em 3 pontos: região anterior da traqueia e nas regiões ventrais do tórax, bilateralmente (figura 2), logo abaixo das costelas, totalizando 2 sessões.



Figura 2 – Esquema representativo da aplicação do protocolo de LED.

4.6. Processamento das amostras e eutanásia dos animais

Ao término do período experimental (2 dias após a indução da sepse), os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de anestésico (três vezes o valor de anestésicos previamente estipulados para a anestesia do animal). Para constatar a morte de cada animal foi realizada a verificação do batimento cardíaco e da frequência respiratória, e constatou-se a ausência destes em cada animal. Em seguida, os pulmões foram retirados em monobloco, sendo a cânula traqueal mantida e conectada à traqueia para realização do processamento histológico.

4.7. Análises

4.7.1. Análise Morfológica

Após a coleta, as peças permaneceram em soluções de formaldeído a 10% para a fixação durante 24 horas. Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas. Na sequência, passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70%, 90% e 100% (1 hora). Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro, também por 1 hora cada banho. Logo depois, as peças foram incluídas em parafina e cortadas por meio de um micrótomo rotativo (Leica SP 1600).

Foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes de 3 µm de espessura. Essas lâminas foram coradas com corante Hematoxilina e Eosina (HE, Merck) para avaliação da inflamação pulmonar. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (*Axiostar plus, Zeiss, Alemanha*) com objetiva de 20X. As avaliações foram realizadas de acordo com estudo de Zhai et al. (2015), por dois pesquisadores treinados, e a identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita adesiva com o intuito de não haver um conhecimento prévio do avaliador sobre qual grupo estava sendo avaliado, evitando-se, assim, qualquer possibilidade de indução nos resultados obtidos. Ao término da análise, a fita foi retirada e o resultado anotado no respectivo grupo.

4.7.2. Análise da lesão pulmonar

A análise histológica de lesão pulmonar foi realizada a partir do sistema de graduação histopatológico para tecido pulmonar proposto pela Sociedade Americana Torácica (MATUTE-BELLO et al., 2011). Esse sistema avalia o grau (através de score) que corresponde à gravidade da lesão pulmonar, ou seja, quanto maior a pontuação, maior o dano pulmonar. Para a avaliação utiliza-se uma escala de 0 a 2 pontos para cada critério:

A) Neutrófilo do espaço alveolar; B) Neutrófilo do espaço intersticial; C) Presença de membrana hialina; D) presença de débris proteicos no espaço alveolar; E) espessamento do septo alveolar. Ao final, calcula-se o escore de lesão pulmonar através da seguinte fórmula: $\text{Escore} = [(20 \times A) + (14 \times B) + (7 \times C) + (7 \times D) + (2 \times E)] / (\text{número de campos} \times 100)$. Para essa análise, foram utilizadas lâminas coradas com HE e a mesma foi realizada por 2 avaliadores cegos treinados. Os cortes histológicos foram avaliados por toda sua extensão em um microscópio de luz (Axiostar plus, Zeiss, Alemanha) com um aumento de 400X.

4.7.3. Análise do número de células inflamatórias

O número de células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no infiltrado inflamatório no espaço peribronquiolar foi quantificada utilizando-se um microscópio ótico comum (*Axiostar plus, Zeiss, Alemanha*), em aumento de 400X, utilizando o *software* Image J. Foram mensurados 3 campos de cada corte, totalizando 30 avaliações por grupo.

4.7.4. Análise da expressão proteica por imunistoquímica

Com a finalidade de analisar os efeitos dos tratamentos propostos sobre a expressão proteica de iNOs e IL-10 do tecido pulmonar, a análise de imunistoquímica foi realizada. Dessa forma, lâminas com cortes de 5 µm foram utilizadas, desparafinizadas e hidratadas. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em que as lâminas foram incubadas em solução a 30% de peróxido de hidrogênio. Após este período, foram utilizados anticorpos primários de iNOS e IL-10 por 60 min, diluição 1:100 (*polyclonal rabbit anti-rat, Sta Cruz biotechnology, California, USA*). Após lavagem em PBS, o anticorpo secundário na diluição 1:50 por 30 minutos foi utilizado. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em PBS e corados com diaminobenzidina (DAB) por 30 min e, em seguida, corados com Hematoxilina de Harris.

Por fim, foi realizada a coloração por hematoxilina e feita a montagem das lâminas. Para o controle negativo, os anticorpos primários foram omitidos. Uma vez realizada a marcação, foram avaliados 3 campos de cada corte, em aumento de 200X, por meio de microscopia de luz (Axiolab Zeiss). Todas as lâminas foram avaliadas por 2 observadores e os resultados foram avaliados de acordo com a porcentagem de células positivas em campos selecionados aleatoriamente de cada corte, de acordo com a escala de pontuação de 1 à 4 (1 = ausente marcação; 2 = marcação fraca; 3 = marcação moderada e 4 = intensa marcação).

4.8. Análise estatística dos resultados

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk's foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da amostra, as comparações foram feitas utilizando-se teste t de Student. Nos casos não paramétricos, o teste de Mann-Whitney foi adotado. As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism, versão 6.01. Para as conclusões das análises estatísticas, foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Observação geral dos animais experimentais

Dos 20 animais disponíveis para este estudo, dois animais morreram após a cirurgia de CLP. Os 18 animais restantes se recuperaram sem intercorrências do protocolo de indução de CLP e LED. Não foram observados sinais macroscópicos adversos durante o período experimental.

5.2. Análise histológica descritiva

Na figura 3, estão apresentadas imagens representativas dos cortes de tecido pulmonar. A análise histopatológica revelou que, 2 dias após a cirurgia, o grupo CS demonstrou modificações morfológicas severas, caracterizadas por edema na área intersticial, espessamento do septo alveolar e infiltrado inflamatório celular maciço. Para o grupo SRL, também foram observadas modificações morfológicas similares, porém com menor espessamento do septo alveolar e recrutamento de células inflamatórias no pulmão em relação ao grupo CS.

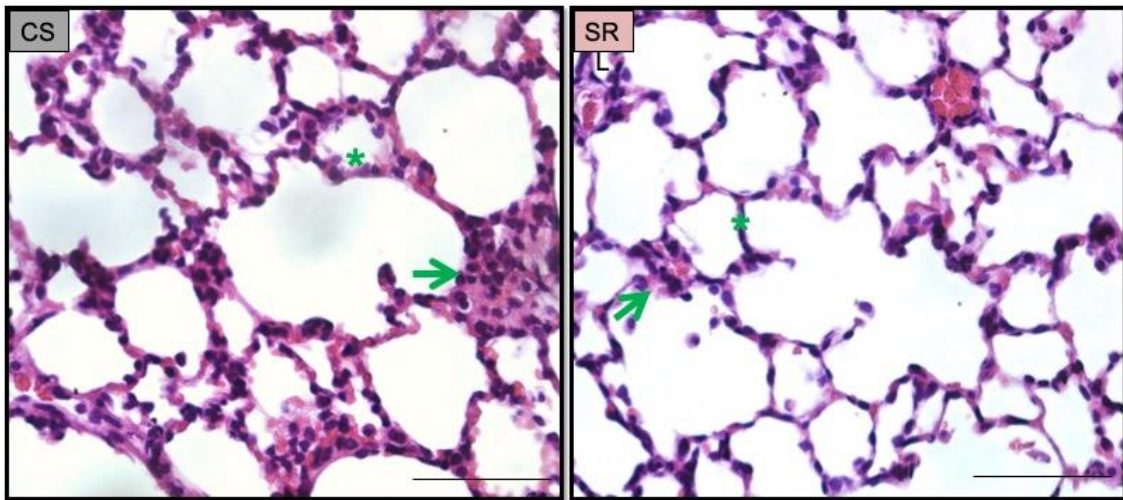


Figura 3: Fotomicrografias representativas da análise morfológica das secções transversais da lesão pulmonar aguda. Septo alveolar (asteriscos); presença de processo inflamatório (seta). Grupo Controle Sepsis (CS); Grupo Sepsis tratado com LED (SRL). (HE; 20 μ m).

5.3. Pontuação de lesão pulmonar

A figura 4 ilustra os valores do escore de lesão pulmonar. Foi possível observar um escore significativamente menor no grupo SRL ($p = 0,0077$) em comparação com a CS.

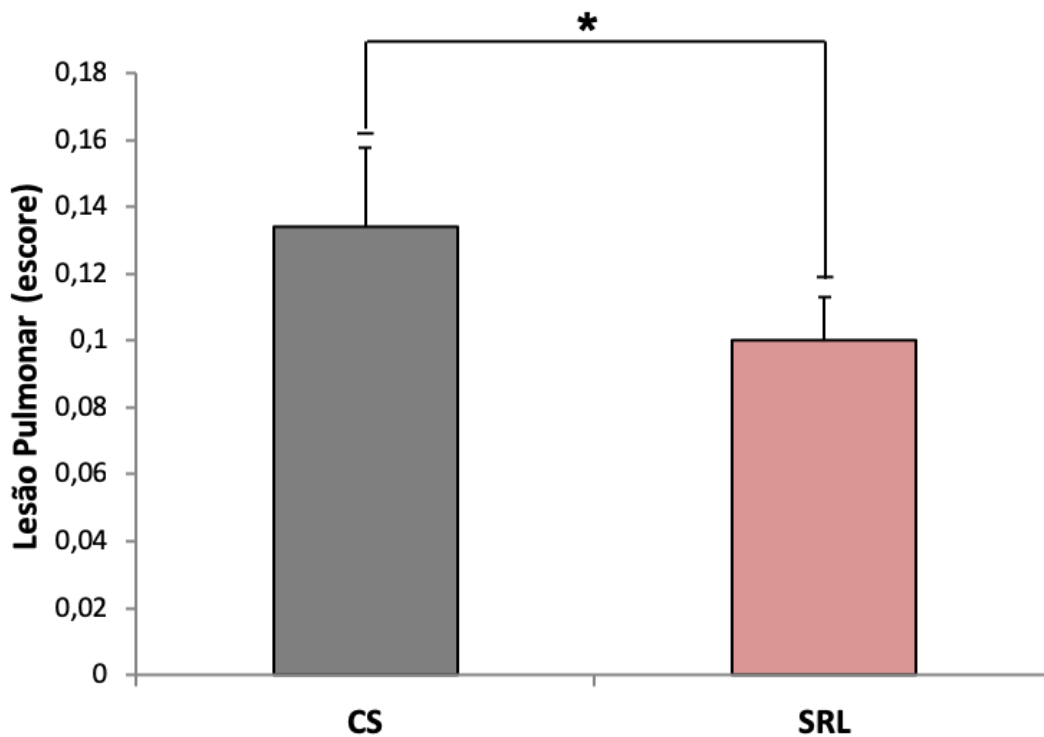


Figura 4: Análise do sistema de pontuação de lesão pulmonar. Grupo Controle Sepse (CS); Grupo Sepse tratado com LED (SRL). (* $p = 0,0077$).

5.4. Número de células inflamatórias

A Figura 5 mostra a avaliação morfológica do número de células inflamatórias. A porcentagem de células inflamatórias foi significativamente maior no CS em comparação com o SLR (* $p = 0,0022$).

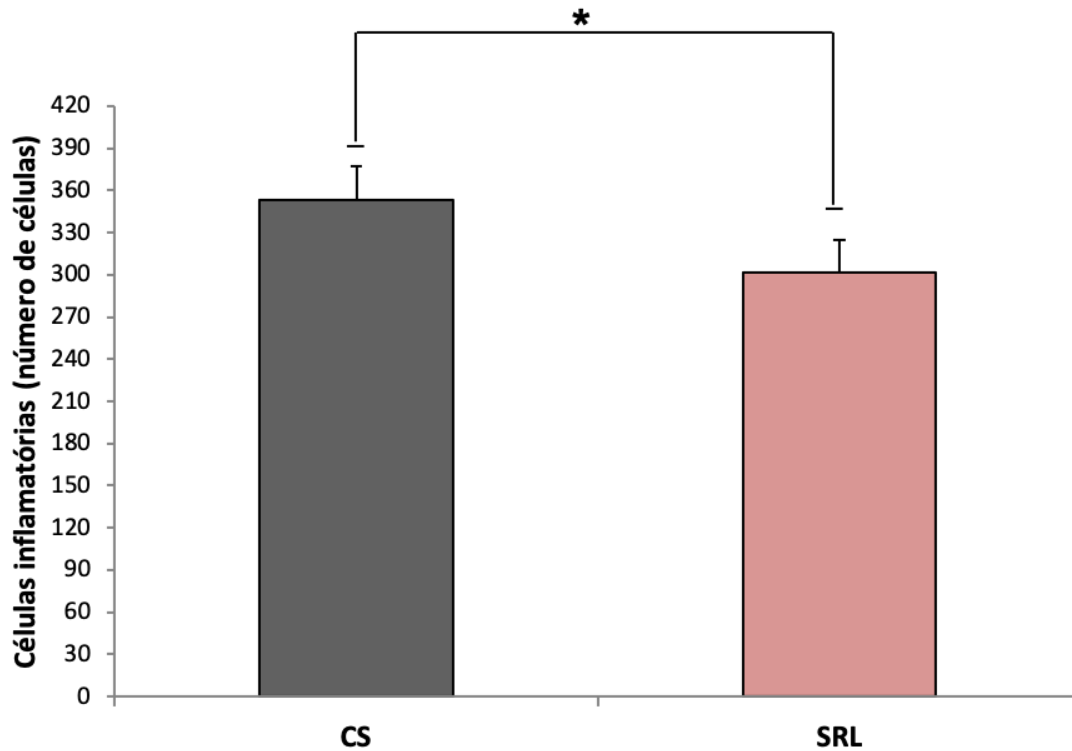


Figura 5: Análise morfométrica do número de células inflamatórias. Grupo Controle Sepse (CS); Grupo Sepse tratado com LED (SRL). (* $p = 0,0022$).

5.5. Análise imunoistoquímica

5.5.1. Expressão iNOS

Os resultados imunoistoquímicos revelaram coloração positiva de expressão proteica de iNOS nas células inflamatórias em todos os grupos (Figura 6A). No entanto, a análise semiquantitativa não demonstrou diferença na imunoexpressão da iNOS entre os grupos experimentais (Figura 6B).

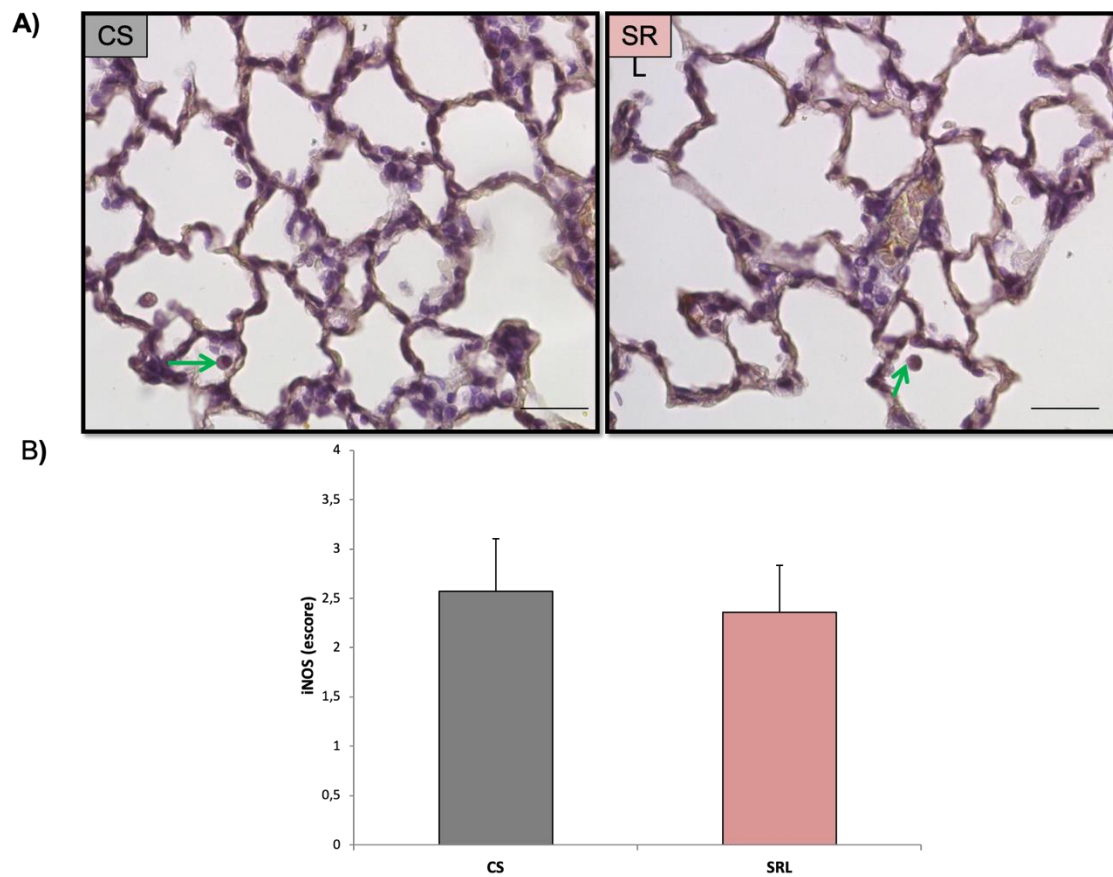


Figura 6: A) Seções representativas da imunistoquímica da iNOS. Células inflamatórias imunomarcadas (seta); B) A análise semiquantitativa na imunexpressão da iNOS. Grupo Controle Sepsis (CS); Grupo Sepsis tratado com LED (SRL). Barra de escala: 20 μ m.

5.5.2. Expressão de IL-10

A avaliação imunistoquímica demonstrou que a expressão proteica de IL-10 foi observada principalmente nas células inflamatórias para todos os grupos (Figura 7A). Além disso, a análise semiquantitativa exibiu maior expressão de IL-10 em SRL em comparação com CS ($p = 0,0036$; Figura 6B).

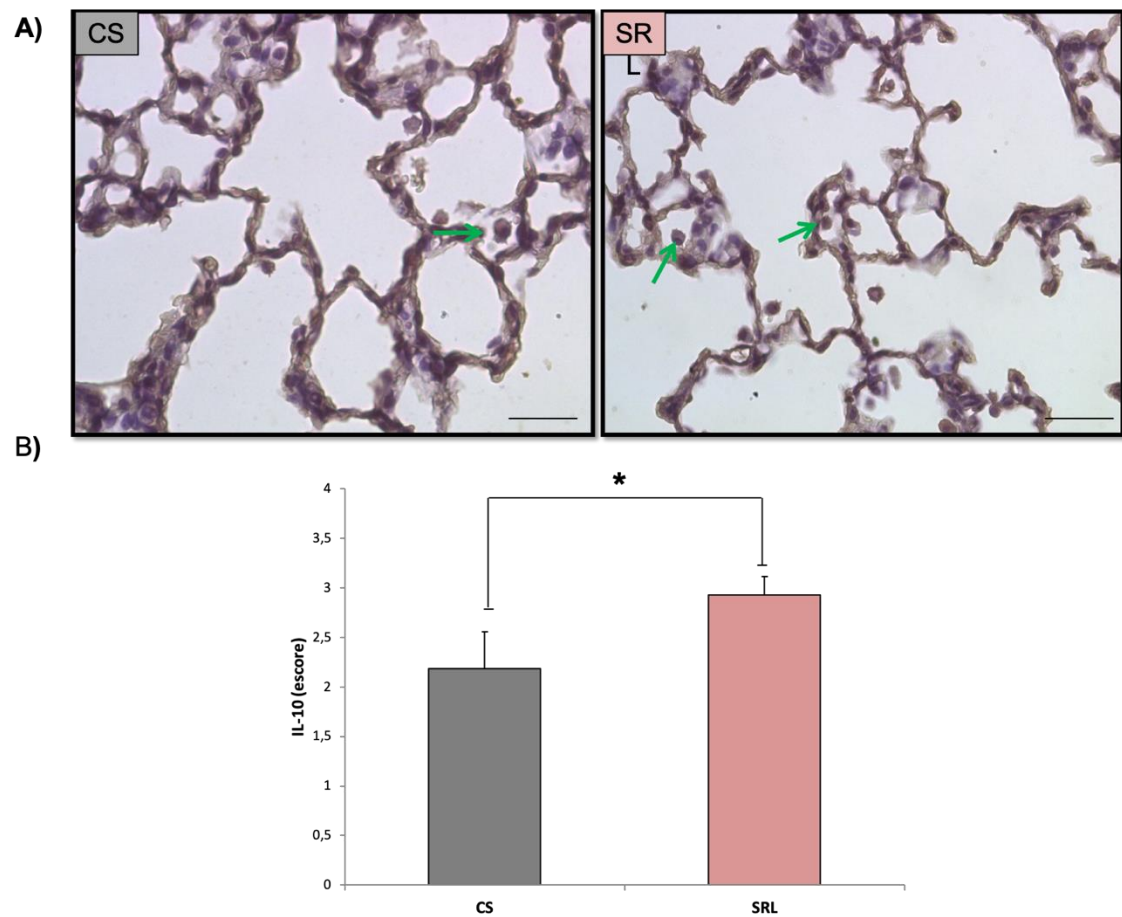


Figura 7: A) Secções representativas da imunohistoquímica de IL-10. Células inflamatórias marcadas imunomarcadas (seta). B) Resultados da análise semiquantitativa da expressão de IL-10. Grupo Controle Sepsis (CS); Grupo Sepsis tratado com LED (SRL). (* $p = 0,0036$). Barra de escala: 20 μm .

6. DISCUSSÃO

Este estudo objetivou avaliar a resposta *in vivo* da fotobiomodulação através do LED vermelho (630nm) sobre o tecido pulmonar em um modelo experimental de sepse em ratos. Os resultados histológicos demonstraram que a terapia LED produziu modulação do processo inflamatório pulmonar, menor espessamento do septo alveolar e redução do número de células inflamatórias. Além disso, o grupo que recebeu o LED produziu uma redução significativa do grau de lesão pulmonar e maior expressão IL-10 quando comparada com o grupo controle sepse.

Como descrito anteriormente, a sepse é uma complicação potencialmente fatal de uma infecção que leva à deficiência nas funções de diversos sistemas, colocando uma série de órgãos em risco, dentre eles destaca-se o fígado, os rins e os pulmões (PIERRAKOS et al., 2010; YINK et al., 2000).

Dentro deste contexto, o LED tem sido considerado uma alternativa promissora para tratar muitas doenças de caráter inflamatório em função de seus efeitos positivos na resposta inflamatória e no processo de reparação tecidual (COSTA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2017). Os resultados histológicos do presente estudo estão de acordo com as afirmações supracitadas visto que o tratamento com LED induziu uma modulação do processo inflamatório do parênquima pulmonar. Além disso, a avaliação morfométrica demonstrou que os animais irradiados com LED vermelho (630nm) apresentaram menor grau de lesão pulmonar quando comparado aos animais não tratados. Siqueira et al. (2017) também observaram que o LED vermelho (660 nm) diminuiu o infiltrado inflamatório pulmonar em um modelo experimental de asma. Além disso, estudos anteriores de nosso grupo, usando terapia por fotobiomodulação em modelo de inflamação pulmonar induzido por CLP, evidenciaram efeitos similares da luz na redução do número de células inflamatórias do pulmão (BUBLITZ et al., 2015). Pode-se sugerir que a energia oferecida

ao tecido pulmonar do presente estudo, foi capaz de induzir uma resposta tecidual adequada capaz de modular o processo inflamatório existente. Portanto, a atenuação do recrutamento de células inflamatórias comprovada no presente estudo, provavelmente está associada com a diminuição de danos no parênquima pulmonar, e, conseqüentemente, redução de lesões pulmonares que ocorrem durante a sepse.

Adicionalmente, estudos mostraram que a sepse está associada ao aumento da expressão da isoforma óxido nítrico sintase induzida (iNOS) ativada por vários fatores pró-inflamatórios. É conhecido que a ativação de iNOS gera um aumento significativo da síntese de óxido nítrico (NO), contribuindo assim para a gravidade da sepse. No estudo de Costa Carvalho et al. (2016) demonstraram que a terapia por fotobiomodulação no comprimento de onda de 660 nm foi capaz de reduzir a expressão de iNOS (RNAm), bem como a atividade NO durante a inflamação pulmonar alérgica. Interessantemente, no presente estudo, não foi possível observar alterações na expressão desse imunomarcador após o tratamento de LED. Possivelmente, os parâmetros de LED usados não foram capazes de oferecer energia suficiente para modular a expressão iNOS no período experimental estudado.

Além disso, foi observado no presente trabalho que o tratamento com LED vermelho favoreceu o aumento da expressão de IL-10. É conhecido que a IL-10 é uma importante citocina reguladora e que está envolvida com um grande número de atividades celulares benéficas durante a sepse (HOTCHKISS et al., 2016). Há evidência indicando que IL-10 é um potente mediador anti-inflamatório e pode desempenhar um papel crucial na limitação da imunopatologia da hospedeira durante a sepse ao controlar a ativação de linfócitos T (LEECH et al., 2017). Contudo, é demonstrado que o estresse oxidativo prolongado é responsável pela redução dos níveis desta citocina, resultando em uma amplificação da resposta inflamatória pulmonar (HOTCHKISS et al., 2016). No presente

estudo, o LED vermelho foi capaz de aumentar a expressão dessa citocina em comparação ao grupo de controle. Recentemente, o LED mostrou ser um recurso promissor em modular os fatores de crescimento e a expressão de citocinas relacionadas a lesões pulmonares (SIQUEIRA et al., 2017). Siqueira et al. (2017) demonstraram que o LED vermelho (660nm) foi capaz de atenuar a inflamação pulmonar alérgica devido ao aumento da imunexpressão de IL-10 em modelo experimental de asma. Utilizando o mesmo modelo experimental de sepse do presente estudo, Assis et al., (2015) evidenciou que a terapia por fotobiomodulação foi eficiente em aumentar a atividade de IL-10 em fases iniciais do processo de sepse (48 horas após indução de sepse). Assim, a expressão aumentada de IL-10 após o tratamento com LED vermelho (630nm) do presente estudo, pode promover efeitos anti-inflamatórios, reestabelecimento da homeostasia tecidual e aumento dos mecanismos de defesa, contribuindo assim para otimizar a recuperação da lesão pulmonar.

Em suma, os resultados do presente estudo demonstraram que a terapia por fotobiomodulação através do LED vermelho (630nm) foi capaz de atenuar a lesão pulmonar induzida pela sepse em ratos, visto que o tratamento foi eficiente em reduzir a inflamação e o recrutamento de células inflamatórias para o tecido pulmonar, assim como, foi capaz de aumentar a produção de citocinas anti-inflamatória.

Desta forma, este estudo fornece importantes informações sobre o efeito do LED vermelho (630nm) sobre o tecido pulmonar durante a sepse. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre a interação entre o LED e tecido pulmonar, além de outros tecidos acometidos durante a sepse, o que produzirá evidências para sustentar seu uso como uma alternativa terapêutica eficiente no cenário clínico de sepse.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento com a terapia por fotobiomodulação através de LED vermelho (630) demonstrou efeitos positivos sobre o tecido pulmonar durante a sepse, visto que o mesmo foi capaz de reduzir a lesão pulmonar, diminuir a inflamação e o recrutamento de células inflamatórias, assim como foi eficiente em aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimbire, F. et al. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers in medical science**. 2005;20(1):11-20. Epub 2005/06/21.

Aimbire, F. et al. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. **Inflammation**. 2008;31(3):189-97. Epub 2008/04/19.

Alberti, C. et al. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients. **Am J Respir Crit Care Med**. 2003;168(1):77–84. Epub 2003/04/17.

Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, de Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther**. 2013;15(5):R116. Epub 2013.

Assis L, Manis C, Fernandes KR, Cabral D, Magri A, Veronez S, Renno AC. Investigation of the Comparative Effects of Red and Infrared Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. **Am J Phys Med Rehabil**. 2016;95(7):525-34. Epub 2016/01/29.

Assis L, Moretti AI, Abrahao TB, Cury V, Souza HP, Hamblin MR, et al. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers in Surgery and Medicine**. 2012;44(9):726-35. Epub 2012/09/25.

Assis L, Renno AC, Bublitz C, Hirai AH, Harada G, Kido H et al. Laser therapy modulates systemic inflammatory processes and muscle atrophy in an experimental model of sepsis in rats. *Photon Lasers Med*. 2015; 4(3): 241–251.

Atabai K, Matthay MA. The pulmonary physician in critical care c 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. **Thorax**. 2002;57:452-458. Epub 2002/05.

Azevedo LC, Park M, Slluh JI, Rea-Neto A, Souza-Dantas VC, Varaschin P, et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: a multicenter, prospective, cohort study. **Crit Care**. 2013; 17(2):R63. Epub 2013/04/04.

Bublitz C, Assis L, Rennó AC, Cury V, Harada G, Hirai AH, et al. Laser therapy, used in a specific dose, modulates pulmonary inflammatory processes in an experimental model of sepsis in rats. *Fisioterapia e Pesquisa*; 2015; 22(4), 420-425.

BRENT, A. J. Sepsis. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 649–653, 2017.

Brown KA, Brown GA, Lewis SM, Beale R, Treacher DF. Targeting cytokines as a treatment for patients with sepsis: A lost cause or a strategy still worthy of pursuit? **Int Immunopharmacol**. 2016;36:291-9. Epub 2016/05/19.

COELHO, F. R.; MARTINS, J. O. Diagnostic methods in sepsis: the need of speed. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 4, p. 498–504, 2012.

Costa Carvalho JL, de Brito AA, de Oliveira AP, de Castro Faria Neto HC, Pereira TM, de Carvalho RA, et al. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J Biophotonics*. 2016;9(11-12):1208-1221.

Costa SG, Barioni ÉD, Ignácio A, Albuquerque J, Câmara NOS, Pavani C, et al. Beneficial effects of Red Light-Emitting Diode treatment in experimental model of acute lung injury induced by sepsis. *Sci Rep*. 2017;7(1):12670.

Cury V, de Lima TM, Prado CM, Pinheiro N, Ariga SK, Barbeiro DF, Moretti AI, Souza HP. Low level laser therapy reduces acute lung inflammation without impairing lung function. **J Biophotonics**. 2015. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26381933.

Dejager L, et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends In Microbiology**. 2011;19(4):198-208. Epub 2011/04.

de Lima FM, Villaverde AB, Albertini R, Correa JC, Carvalho RL, Munin E, 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 in Surgery and Medicine**. 2011;43(5):410-20. Epub 2011/06/16.

de Lima FM, Naves KT, Machado AH, Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F. Lung inflammation and endotelial cell damage are decreased after treatment with phototherapy (PhT) in a model of acute lung injury induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in the rat. **Cell Biol Int**. 2009;33(12):1212-21. Epub 2009/05/18.

de Lima FM, Villaverde AB, Salgado MA, Castro-Faria-Neto HC, Munin E, Albertini R, et al. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from Escherichia coli in rat. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**. 2010;101(3):271-8. Epub 2010/07/27.

de Lima FM, Albertini R, Dantas Y, Maia-Filho AL, Santana CeL, Castro-Faria-Neto HC, et al. Low-level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. **Photochem Photobiol**. 2013;89(1):179-88. Epub 2012/11/19.

Dellinger, RP. et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Med**. 2013;39(2):165-228. Epub 2013/01/30.

dos Santos SA, Alves AC, Leal-Junior EC, Albertini R, Vieira RP, Ligeiro AP, Junior JA, de Carvalho P de T. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Lasers Med Sci**. 2014;29(3):1051-8. Epub 2013/10/31.

Fan SL, Miller NS, Lee J, Remick DG. Diagnosing sepsis - The role of laboratory medicine. **Clin Chim Acta**. 2016;460:203-10. Epub 2016/07/04.

FLEISCHMANN, C. et al. Fallzahlen und sterblichkeitsraten von sepsis-patienten im krankenhaus. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 113, n. 10, p. 159–166, 2016.

Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. **Lasers Med Sci**. 2013 Sep;28(5):1305-13. Epub 2012/11/24.

Goldie AS, Fearon KC, Ross JA, Barclay GR, Jackson RE, Grant IS, Ramsay G, Blyth AS, Howie JC. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group. **JAMA**. 1995;274(2):172-7. Epub 1995/07/12.

Hamblin MR. Introduction to experimental and clinical studies using low-level laser (light) therapy (LLLT). **Lasers Surg Med**. 2010;42(6):447–449. Epub 2010/08.

Haslerud S, Lopes-Martins RA, Frigo L, Bjordal JM, Marcos RL, Naterstad IF, Magnussen LH, Joensen J. Low-Level Laser Therapy and Cryotherapy as Mono- and Adjunctive Therapies for Achilles Tendinopathy in Rats. **Photomed Laser Surg**. 2016. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27627685.

Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16045.

Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-response: a publication of International Hormesis Society**. 2009;7(4):358-83. Epub 2009/12/17.

Instituto Latino Americano da Sepse. 2014 Disponível em: <http://www.sepsisnet.org/index.php>.

JORDAN A. KEMPKER. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. **HHS Public Access**, v. 37, n. 2, p. 165–179, 2017.

Karu TI, Kolyakov SF. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**. 2005; 23(4):355-361. Epub 2005.

Kaza, AK. et al. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. **Circulation**. 2002;106(12):I120-4. Epub 2002/09/24.

Leech JM, Lacey KA, Mulcahy ME, Medina E, McLoughlin RM. IL-10 Plays Opposing Roles during Staphylococcus aureus Systemic and Localized Infections. *J Immunol*. 2017;198(6):2352-2365.

MARIANSDATTER, S. E. et al. Differences in reported sepsis incidence according to study design: a literature review. **BMC Medical Research Methodology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2016.

Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(5):725-38.

Moss, M. Epidemiology of sepsis: race, sex and chronic alcohol abuse. **Clinical Infectious Diseases**. 2005;41(7):490-7.

PALOMBA, H. et al. Comparative analysis of survival between elderly and non-elderly severe sepsis and septic shock resuscitated patients. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 357–363, 2015.

Parry SM, Puthuchery ZA. The impact of extended bed rest on the musculoskeletal system in the critical care environment. **Extrem Physiol Med**. 2015. eCollection 2015. Epub 2015/10/09.

Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010;14(1):R15.

Renno AC, Iwama AM, Shima P, Fernandes KR, Carvalho JG, De Oliveira P, et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second-degree skin burns in rats. **J Cosmet Laser Ther**. 2011; 13 (5):237-42.

Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **The New England Journal of Medicine**. 2005;353(16):1685-93. Epub 2005/10/21.

SHANKAR-HARI, M. et al. Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: A systematic review of epidemiologic studies. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2016.

Singh G, Gladdy G, Chandy T. Incidence and outcome of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the surgical intensive care unit. **Indian Journal of Critical Care Medicine**. 2014;18(10):659-665. Epub 2014/10.

Siqueira VPC, Evangelista MIS, Dos Santos A, Marcos RL, Ligeiro-de-Oliveira AP, Pavani C, Damazo AS, Lino-Dos-Santos-Franco A. Light-Emitting Diode treatment ameliorates allergic lung inflammation in experimental model of asthma induced by ovalbumin. **J Biophotonics**. 2017, 10(12):1683-1693.

Vinck E, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiations. **Laser Med Sci**. 2003, 18(2): 95-99.

Vinck E, Coorevits P, Cagnie BJ, Martine M, Vanderstraeten G, Cambier DC. Evidence of changes in sural nerve conduction mediated by light emitting diode irradiation. **Lasers in Med Sci**. 2005, 20(1):35-40.

Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**. 2007;369(9572):1553-64. Epub 2007/05/08.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **The Journal of Surgical Research**. 1980;29(2):189-201. Epub 1980/08/01.

Yin K, Wilmanski J, Wang C, Qiu G, Tahamont M. Lung compartmentalization of inflammatory cells in sepsis. *Inflammation*. 2000;24(6): 547-57.

YEALY, D. M. et al. Recognizing and managing sepsis: What needs to be done? **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2015.

Yoshimura TM, Sabino CP, Ribeiro MS. Photobiomodulation reduces abdominal adipose tissue inflammatory infiltrate of diet-induced obese and hyperglycemic mice. **J Biophotonics**. 2016. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27635634.

Zhai Y, Zhou X, Dai Q, Fan Y, Huang X. Hydrogen-rich saline ameliorates lung injury associated with cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats. *Exp Mol Pathol*. 2015;98(2):268-76