

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

MOISÉS PAULO DA SILVA

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CALICREÍNAS
TECIDUAL E PLASMÁTICA PELA LASERTERAPIA EM MODELO
DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM
RATOS**

São Paulo

2009

MOISÉS PAULO DA SILVA

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CALICREÍNAS
TECIDUAL E PLASMÁTICA PELA LASERTERAPIA EM MODELO
DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM
RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Moisés Paulo da.

Redução da expressão gênica de calicreínas tecidual e plasmática pela laserterapia em modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos. / Moisés Paulo da Silva. 2009. 88 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2009.

Orientador (a): Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

1. Calicreína plasmática. 2. Calicreína tecidual. 3. Laserterapia de baixa potência. 4. Expressão gênica.

CDU 615.8

**REDUÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CALICREÍNAS
TECIDUAL E PLASMÁTICA PELA LASERTERAPIA EM MODELO
DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM
RATOS**

POR

MOISÉS PAULO DA SILVA

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Reabilitação.

Presidente: Prof. José Antônio Silva Júnior, Dr. – Orientador - Uninove

Membro: Profa. Ana Maria do Espírito Santo, Dra – Universidade Vale do
Paraíba

Membro: Profa. Manoela Domingues Martins, Dra – Uninove

São Paulo, 10 de dezembro de 2009.

À minha esposa Fátima...

Companheira de todas as horas, que sempre acreditou no meu trabalho, apoiando e incentivando as minhas constantes buscas pelo conhecimento. Agradeço a Deus por tê-la posto em meu caminho... sempre quero que ande ao meu lado, compartilhando as nossas vitórias.

Aos meus filhos Arthur e Sophia, que são a fonte de minha inspiração, de onde eu tiro forças para caminhar. Tudo que faço é por vocês e para vocês.

Aos meus pais José Paulo (in memoriam) e Maria de Lourdes, que sempre acreditaram nos meus sonhos, ofertando dentro de suas condições o melhor possível, que se somaram ao longo do tempo e contribuiu para minha formação.

Aos meus sogros Antônio e Antônia, que me acolheram como muito carinho, tratando-me como seu próprio filho, sempre me apoiando incentivando das mais variadas formas. Saibam que sempre serei grato a vocês.

A minha cunhada Débora pelo apoio logístico, que foi fundamental em todo o tempo que dediquei a esse projeto.

"Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações".

(Vincent Van Gogh)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Antônio Silva Junior. . .

Pelo acolhimento, paciência e orientação científica e mesmo percebendo as minhas dificuldades sempre me incentivou para que o nosso projeto fosse concluído nesse trabalho. Aprendi muito com os seus ensinamentos e pode ter certeza que sempre o terei como exemplo.

A Profa. Dra. Manoela, pela pessoa humana, pela excelente educadora e pesquisadora de altíssimo gabarito demonstrando ser antes de tudo uma grande amiga, que colaborou significativamente na sua disciplina de Redação do Trabalho Científico.

Ao Prof. Dr. Jorge que sempre se mostrou solícito e profundo conhecedor na disciplina ministrada, dedicando se intensivamente aos alunos pacientemente.

A Prof. Dra. Carla Malagutti, que muito colaborou com as importantes aulas de Metodologia da Pesquisa, que foram fundamentais na elaboração desse trabalho.

A todos os Professores envolvidos no Programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Uninove, profissionais de altíssimos gabaritos que muito colaboram para a pesquisa científica, formando excelentes profissionais.

Ao Grande Amigo e parceiro de profissão, Prof. Marcelo de Paula, que sempre esteve lado a lado, participando das constantes discussões, fazendo sugestões que contribuíram para realização desse trabalho. Apesar de conhecê-lo a pouco tempo, esse rapaz conseguiu conquistar o meu respeito e minha admiração. . . , obrigado irmão, sempre conte comigo.

Aos colegas da iniciação científica, Fernanda Carvalho, Gabriela Fernanda, Marcio Gomes, Natália Aruelo, Marcio Parente, Regina Guimarães, Rhaisa, Rodrigo Fock, Thiago Araujo e Tabata Oliveira, componentes do nosso grupo de estudo, que sempre participaram das discussões científicas que engrandeceram a elaboração desse trabalho.

A Uninove pelo apoio financeiro, na concessão de bolsa que foi fundamental para o termino e finalização desse trabalho.

A Deus. . . , ser supremo, que permitiu que tudo fosse possível. . .

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

Ct – Ciclo limiar

cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar

KLK1 – Gene da pré - calicreína tecidual

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

PAR-4 – Prostate apoptosis response-4

PCR – Reação de polimerização em cadeia

pH – Potencial hidrogeniônico

PPK – Gene da pré – calicreína plasmática

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

RT - Transcrição reversa

RT-PCR - Reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

ÍNDICE

1. RESUMO_____	14
2. ABSTRACT_____	16
3. CONTEXTUALIZAÇÃO_____	18
4. OBJETIVO_____	24
5. ESTUDO_____	26
5.1 Artigo_____	27
6. DISCUSSÃO_____	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS_____	54
8. CONCLUSÃO_____	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS_____	58
10. ANEXOS_____	66

1. RESUMO

A laserterapia tem sido usada para o tratamento de processos inflamatórios diversos, onde a calicreína tecidual e plasmática têm participação ativa. A pré-calicreína plasmática (PPK) é sintetizada pelos hepatócitos e secretada na corrente sanguínea, onde participa da ativação da coagulação, fibrinólise, geração de cininas e inflamação. A pré-calicreína tecidual está associada com importantes doenças (incluindo câncer, inflamação e neurodegeneração) e tem sido utilizada ou sugerida clinicamente como importante biomarcador ou alvo terapêutico. Objetivo: Avaliar se a laserterapia altera a expressão gênica da pré-calicreína tecidual e plasmática no modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina. Métodos: Quarenta ratos foram separados em 4 grupos experimentais: A₁ (controle), A₂ (carragenina apenas), A₃ (laser 660nm apenas) e A₄ (Carragenina + laser 660nm). O edema foi medido por um pletismômetro. O tecido subplantar foi coletado para a quantificação de RNA mensageiro (RNAm) de pré-calicreína tecidual e plasmática por PCR em tempo real. Resultados: Uma diminuição significativa no volume de edema foi observada após irradiação com laser a 660nm. A expressão de RNAm de pré-calicreína tecidual e plasmática aumentou após a inoculação de carragenina, entretanto, a expressão gênica das pré-calicreínas diminuiu significativamente após laserterapia em 660nm. Conclusão: Os resultados sugerem que a expressão de RNAm das pré-calicreínas tecidual e plasmática é modulada pela laserterapia, podendo ser alvo terapêutico para tratamento de processos inflamatórios.

Palavras-chaves: calicreína plasmática, calicreína tecidual, laserterapia de baixa potência, expressão gênica, inflamação.

2. *ABSTRACT*

Background: Low level laser therapy (LLLT) has been used clinically, in order to treat inflammatory processes, where tissue and plasma prekallikrein have pivotal importance. Plasma prekallikrein (PPK) is synthesized in hepatocytes and secreted into the blood, where it participates in the surface-dependent activation of blood coagulation, fibrinolysis, kinin generation and inflammation. Tissue prekallikrein is associated with important diseased states (including cancer, inflammation, and neurodegeneration) and has been utilized or proposed as clinically important biomarker or therapeutic target of interest. Recently we demonstrated that both kinin receptors expression was altered after LLLT. Objective: To evaluate if LLLT modulates tissue and plasma prekallikreins mRNA expression in the carrageenan-induced rat paw edema. Methods: Experimental groups were designed as followed: A₁ (Control-saline), A₂ (Carrageenan-only), A₃ (laser 660nm only) and A₄ (Carrageenan + laser 660nm). Edema was measured by a plethysmometer. Subplantar tissue was collected for the quantification of prekallikreins mRNA by Real time-PCR. Results: A significantly decrease in the edema was observed after laser irradiation. Expression of prekallikreins is increased after carrageenan injection; however tissue and plasma prekallikrein mRNA expression significantly decreased after LLLT's 660nm wavelength. Conclusion: Our results suggest that expression of tissue and plasma prekallikreins is modulated by LLLT, possibly contributing to its anti-inflammatory effect.

Key words: plasma kallikrein, tissue kallikrein, low-level laser therapy, gene expression, inflammation.

No ano de 1917, Albert Einstein sugeriu o primeiro esboço dos princípios básicos que guiaram para o desenvolvimento e produção do laser. A palavra laser é um acrônimo da frase em inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que pode ser traduzida como luz amplificada pela emissão de radiação estimulada, tendo como principal característica a capacidade de levar energia aos tecidos^{1;2;3}.

O laser pode também ser definido como radiação eletromagnética que se manifesta como luz monocromática, portando ondas no mesmo comprimento e nas mesmas fases ondulatórias somando energia. Difere da luz comum (solar, lâmpada elétrica, etc.), pois esta é formada por ondas de vários comprimentos (luz policromática), divergentes (o foco central é a fonte luminosa), em diferentes fases ondulatórias, ora somando, ora subtraindo energia³.

Em 1960 Theodoro, H.M. construiu o primeiro laser de rubi com comprimento de onda de 694,3 nm situado dentro de espectro de luz vermelha⁴. Após essa descoberta surgiram os primeiros lasers médicos, desenvolvidos nas décadas de 1960 e 1970 que foram utilizados para a destruição tecidual e coagulação, tendo como principal função a fotocoagulação, com descargas de alto poder energético que, em impulsos muito curtos, conseguiam efeitos térmicos locais capazes de vaporizar os tecidos, oferecendo um campo cirúrgico sem sangramento e com certo grau de esterilização, sendo a cirurgia oftalmológica a primeira a adaptá-lo para a destruição de tumores muito localizados⁵.

A partir deste momento foram incrementadas as experiências cirúrgicas e começaram-se a observar os efeitos benéficos do laser de baixa energia

como, por exemplo, no aumento da cicatrização e epitelização nos locais de aplicação, o que levou ao uso terapêutico de lasers de baixa intensidade⁶.

Clinicamente, os lasers foram classificados em dois tipos: O de alta intensidade com características térmica utilizados para vaporizar e coagular tecidos biológicos (cirúrgico) e os lasers de baixa densidade de energia utilizados na biomodulação com potências inferiores a 1 Watts (não-cirúrgico)⁷.

Os lasers podem ser também classificados de acordo com seu funcionamento, em contínuo ou pulsátil, e ainda com a natureza do seu meio ativo em sólidos, gasosos, ou semicondutores. Como exemplo de meio ativo sólido cita-se o laser rubi; de meio gasoso, o CO₂ e o He-Ne; meio líquido (laser com corante ou *dye laser*), o rodamina e o cumarina; semi-sólidos, o YAG e os de neodímio. Os lasers semicondutores são os de arseneto de gálio (AsGa), arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) e fosfeto arseneto de gálio-índio (InGaAsP). Os lasers mais comuns são variações do gálio: arseneto de gálio-alumínio ou alumínio-arsênio (AsGaAl), que emite um espectro na faixa do infravermelho, ou o fosfeto arseneto de gálio-índio (InGaAsP), que emite espectro visível de luz vermelha ($\lambda=600-680$ nm) com potência entre 10 e 50 mW⁸.

Os lasers usados terapeuticamente nos mais variados tipos de tecidos ocorre dentro de um espectro limitado da luz de comprimentos de onda de 600 a 900 nm, os quais possuem níveis de energia e absorção relevantes. No espectro entre 500 e 1200 nm, não há uma molécula específica que absorva toda a energia do laser, como, por exemplo, a hemoglobina e melanina interagem com comprimentos de onda de 500 nm do laser de argônio. Toda energia é absorvida por esses pigmentos e a luz não atinge outras áreas do

tecido. Esse intervalo de 500 a 1200 nm é chamado de “janela óptica” dos tecidos, por não haver moléculas de absorção específica para esses comprimentos de onda, o tecido permite a livre passagem e espalhamento dos raios vermelhos e infravermelhos dos lasers em baixa potência até que cheguem aos citocromos das mitocôndrias^{9;10;3}.

Atualmente os lasers que estão dentro de espectro de luz vermelha demonstram melhor eficácia na cicatrização e o próximo ao infravermelho nas analgesias¹¹, no entanto são amplamente utilizados por fisioterapeutas, dermatologistas e cirurgiões no tratamento terapêutico das mais diversas patologias, que estão associadas ao tratamento de redução da dor, diminuição de edema, dermatite e úlceras^{4;5}.

Vários são os mecanismos propostos da ação do laser, porém um deles, é que através da aplicação do laser ocorre uma biomodulação onde há absorção da luz por moléculas do tecido alvo as quais são chamadas de cromóforos localizadas no compartimento intracelular, essas moléculas receptoras do laser desencadearão uma série de reações bioquímicas no interior das células⁴.

Estudos têm demonstrado que a irradiação da terapia Laser absorvida pelos tecidos pode atuar de duas formas: primeiro, por meio de efeitos bioquímicos, modulando a liberação de substâncias, como, por exemplo, histamina, serotonina, bradicinina e heparina; segundo, modificando reações enzimáticas normais, tanto no sentido de excitação quanto de inibição (biomodulação). A literatura também apresenta trabalhos nos quais se observa uma estimulação seletiva das mitocôndrias, resultando em aumento de ATP intracelular, o que origina um aumento na velocidade das mitoses celulares¹¹.

Tais processos agem diretamente na célula, produzindo um efeito primário ou imediato, aumentando o metabolismo celular¹². Além disso, promovem ainda o aumento da síntese de endorfinas e a diminuição da liberação de transmissores nociceptivos, como a bradicinina e a serotonina¹³.

Sendo os efeitos terapêuticos do laser fundamentados na sua ação vasodilatadora atuando no capilar melhorando a circulação e aumentando a oxigenação no tecido irradiado¹⁴, além de ativar o nível de prostaglandina, aumenta a ação de macrófagos promovendo a proliferação de fibroblastos, facilita síntese de colágeno, estimula a imunidade, e até mesmo acelera o processo de reparação tecidual¹⁵.

Assim, os efeitos clínicos observados na laserterapia são: a estimulação de uma ação antiinflamatória, aceleração da regeneração dos tecidos danificados, melhoria da circulação sanguínea nos tecidos, dentre outros efeitos que podem estar associados com o crescimento da atividade de determinadas células, como leucócitos e fagócitos. O conteúdo aumentado de íons cálcio no citoplasma dessas células estimula o aumento da divisão celular e crescimento celular³ ativação da síntese de proteínas e citocinas, e a melhoria da circulação do sangue devido ao relaxamento das paredes dos vasos (vasodilatação)^{16; 17}.

O processo inflamatório é um mecanismo fisiopatológico de resposta à invasão por agentes infecciosos ou apenas reação a uma lesão de natureza variada (térmica, química e mecânica), sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Este mecanismo é composto por vários fenômenos complexos que desencadeiam uma reação em cascata, que envolve uma complexa interação de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos,

monócitos/macrófagos) e das células vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa)¹⁸.

Vários modelos experimentais utilizando-se de animais têm sido sugeridos para avaliar o processo inflamatório agudo, dentre eles podemos citar a indução através da carragenina^{19;20;21}, que é um polissacarídeo extraído de algas *Chondrus Crispus* que tem origem em Carraghen (Waterford – Irlanda), onde cresce abundantemente²⁰, tendo como principais função a indução e liberação de diferentes mediadores inflamatórios como a histamina, bradicinina, prostaglandina²². Winter (1962) introduziu o uso da carragenina como um agente irritante para produzir edema na pata de rato, sendo o primeiro e mais popular método para avaliar as novas terapias antiinflamatórias através da mensuração por hidropletismômetro do volume da pata inflamada²³.

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da laserterapia na expressão gênica de calicreínas tecidual e plasmática em processo inflamatório agudo induzido por carragenina, visando uma melhor compreensão da ação antiinflamatória da laserterapia.

5.1 Artigo – Redução da expressão gênica de calicreínas tecidual e plasmática pela laserterapia em modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos (**Anexo 1**).

INHIBITION OF CARRAGEENAN-INDUCED EXPRESSION OF TISSUE AND PLASMA PREKALLIKREINS MRNA BY LOW LEVEL LASER THERAPY IN RAT PAW EDEMA

Moisés Paulo da Silva¹, Flávia Bortone¹, Marcelo de Paula Silva¹, Thiago Rodrigues de Araújo¹, Maricília Silva Costa², José Antônio Silva Júnior¹.

INTRODUÇÃO

O sistema de calicreína-cininas é uma cascata metabólica endógena, cuja ativação resulta na liberação de cininas vasoativas (peptídeos relacionados à bradicinina). Esse complexo sistema inclui os precursores de cininas, conhecidos como cininogênios e pré-calicreínas, principalmente tecidual e plasmática¹. As calicreínas são uma família de enzimas proteolíticas com diversas funções fisiológicas representadas por famílias de múltiplos genes em várias espécies, especialmente estudadas em ratos e camundongos. Os membros dessa família estão associados a várias doenças (incluindo o câncer, inflamação e doenças neurodegenerativas), e têm sido usados ou propostos clinicamente como importantes biomarcadores ou alvos terapêuticos². Todas as calicreínas são sintetizadas como formas pré-pro que são proteoliticamente processadas em forma pró- pela remoção de um peptídeo sinal de secreção na região amino-terminal. As pró-calicreínas

inativas são então ativadas no compartimento extracelular tornando-se peptidases por meio de liberação proteolítica específica de seu domínio amino-terminal^{3,4}.

As calicreínas teciduais são proteases de serina, codificadas por aglomerados altamente conservados de famílias de múltiplos genes em roedores e humanos. O *loci* da calcreína tecidual KLK1 de rato e do camundongo contém 10 e 25 genes funcionais, respectivamente, enquanto o locus da KLK1 em humano encontra-se no cromossomo 19q 13.4 e contém 15 genes⁵. A organização estrutural e o tamanho desses genes são similares entre as espécies; todos os genes contém 5 éxons codificantes, que codificam a enzima pré-pro. Embora os ativadores fisiológicos desses zimogênios não tenham sido descritos, estudos bioquímicos *in vitro* mostraram que algumas calicreínas podem se auto-ativar e também podem ativar umas às outras, sugerindo que elas possam fazer parte de uma cascata enzimática similar à cascata da coagulação. Esses genes são expressos em uma grande variedade de tecidos, sugerindo um envolvimento funcional em vários processos fisiológicos e patofisiológicos. Esses incluem participação na descamação normal da pele e lesões psoríticas, desenvolvimento dental, plasticidade neural e doença de Alzheimer. É relevante o papel de muitas calicreínas no câncer de próstata, ovário e mama, onde emergem como importantes indicadores prognósticos de progressão da doença⁶. Outros processos inflamatórios, como artrite e inflamação aguda das articulações, também dependem da ativação de calicreína via receptor-4 ativado por proteinase (PAR-4)^{7,8}.

A pré-calicreína plasmática (PPK) é sintetizada nos hepatócitos e secretada na corrente sanguínea, onde participa da ativação de contato da

coagulação sanguínea, fibrinólise, geração de cininas e inflamação. O gene PPK humano é transcrito não apenas no fígado, mas também em vários outros tecidos humanos não hepáticos⁹.

O uso da carragenina faz parte de um modelo amplamente utilizado para induzir a resposta inflamatória aguda em animais de experimentos, pois induz a liberação de diferentes mediadores inflamatórios, como histamina, bradicinina, prostaglandinas e ânions superóxidos¹⁰. Winter e colaboradores¹¹ descreveram o uso da carragenina como um agente irritante para induzir o edema de pata de rato, sendo um método útil para testar novas terapias antiinflamatórias^{12,13}.

A associação de administração de carragenina e laserterapia está se tornando uma importante ferramenta para verificar a melhora de estados inflamatórios em modelos experimentais. Geralmente associada a efeitos antiinflamatórios, alívio da dor e aceleração da regeneração em danos teciduais^{14,15}, a laserterapia, usando irradiação próximo ao infravermelha (600-1,000nm), tem sido usada no tratamento de pacientes com processos inflamatórios¹⁶.

O presente trabalho investigou os efeitos da laserterapia na expressão gênica de caliceínas tecidual e plasmática em processo inflamatório agudo induzido por carragenina, visando uma melhor compreensão da ação antiinflamatória da laserterapia. Para estudar os mecanismos antiinflamatórios da laserterapia, determinamos a expressão de RNAm das pré-caliceínas tecidual e plasmática por meio de reações de PCR em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os experimentos foram realizados usando ratos *Wistar* machos (150-200g), alimentados com comida e água “*ad libitum*”, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 1 o C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, fornecidos pela UNIVAP (Universidade do Vale do Paraíba). Todos os experimentos neste estudo seguem os princípios éticos de experimentação com animais, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), e em consonância com as regras da UNIVAP. Todos os ratos foram alocados em caixa comum e divididos aleatoriamente em grupos de 8 (n=8).

Grupos experimentais

Quarenta ratos foram separados em 4 grupos experimentais: A₁ (controle- salina), A₂ (carragenina apenas), A₃ (laser 660nm apenas) e A₄ (Carragenina + laser 660nm). Os animais do grupo A₄ foram irradiados após uma hora da indução do edema pela carragenina.

Indução do edema

Foi realizada uma única injeção subplantar (0,1ml) de carragenina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), em uma concentração de 1% (salina 0,85%) na pata esquerda traseira do rato, após anestesia com halotano¹⁷.

Volume do edema

O volume do edema de pata (ml) foi medido em cada animal por um pletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália), com precisão de duas casas decimais. O volume do edema de pata foi determinado antes e uma, duas, três e quatro horas após injeção de carragenina. Um aumento no volume da pata foi determinado pela subtração do volume basal do volume final da pata inflamada de cada animal¹⁸.

Irradiação do laser

Foi usado laser diodo com potência de 30mW e comprimento de onda de 660nm (modelo: unidade laser, Kondortech), no modo pontual, por contato, emissão contínua com densidade de energia de 7.9J/cm² e tempo total de 28s. A potência ótica foi calibrada por meio de um espectrômetro ótico multifuncional Newport (modelo 1835C). A estabilidade do laser durante a irradiação foi medida através da coleta de luz com reflexo parcial (4%).

Procedimento experimental (biologia molecular)

A presença de edema, rubor e calor – sinais cardinais da inflamação – após a injeção de carragenina caracterizou o processo inflamatório. Os animais foram sacrificados por decapitação quatro horas após início do tratamento, e os músculos subplantares foram rapidamente dissecados, imediatamente

congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C , até a extração do RNA.

Extração total do RNA

O RNA total foi extraído dos tecidos coletados e homogeneizado em 1ml do reagente TRIzol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen GENERATOR, Fisher Scientific, Alemanha). O isolamento do RNA total foi realizado de acordo com as orientações do fabricante.

Após homogeneização, 200 μl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 s. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram centrifugadas por 15 min, 12000 x g a 4°C .

A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril, e foram adicionados 500 μl de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 min, e foram novamente centrifugadas (12000 xg/ 4°C /10 min).

Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000 xg/ 4°C /5 min), e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 30 μl de água DEPC.

Os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro (Eppendorf) com leitura em filtro de 260 nm. A integridade dos RNAs foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Amostras

que apresentaram integridade das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal foram consideradas íntegras e utilizadas nos experimentos de quantificação de expressão gênica.

Reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (RT-PCR)

Para a quantificação da expressão do RNAm das pré-caliceínas foram utilizados os RNAs totais extraídos dos músculos subplantares. Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1 µg de RNA total foi incubado com 1 unidade de *DNase I/RNase Free* (Invitrogen, EUA), 0,5 unidade de *RNase OUT* (Invitrogen, EUA), 0,5 µl de MgCl₂ (50 mM) e água DEPC, em uma reação de 13,5 µl. As amostras foram incubadas a 37°C por 15 min, e a 95°C por 5 min, para inativação da DNaseI.

Transcrição reversa (TR)

Logo após o tratamento acima descrito, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT), para síntese do cDNA. Ao RNA tratado foram adicionados 2,0 µl de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl₂ 2,5 mM), 1,0 unidade de transcriptase reversa MULV-RT (Invitrogen, EUA), 0,5 unidade de *RNase-OUT* (Invitrogen, EUA), 1,0 µl de dideoxynucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (DNTPs, 10 mM, Amersham Biosciences, EUA), 50 ng de uma mistura de iniciadores (*Random Hexamer Primer*, RH, Amersham Biosciences, EUA) e 1,0 µl de ditioneitol (DTT, 10 mM,

LGC Biotecnologia, Brasil) em uma reação de 200 μ l. As amostras foram então submetidas às seguintes incubações: 20°C por 10 min, 42°C por 45 min, 95°C por 5 min. Após reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C.

Para garantir a efetividade do tratamento com DNaseI, foram realizadas reações de RT sem a transcriptase reversa, como controle negativo, de RNAs tratados como acima descrito. Todas as amostras foram submetidas a este controle.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real (Real-Time PCR)

A reação de polimerização em cadeia em tempo real (Real-Time PCR) combina a amplificação da PCR com detecção fluorescente automatizada, realizada como auxílio do aparelho de detecção de seqüência ABI 7000 (*Applied Biosystems*, EUA). O sistema de detecção utilizado para quantificação da expressão de RNAm das pré-caliceínas foi o SYBR Green (*Applied Biosystems*, EUA). Neste sistema, a molécula de SYBR Green interage com a fita dupla de DNA amplificada pela PCR, e emite uma fluorescência quando excitada por lâmpada de tungstênio-halogênio, e esta fluorescência é captada pelo aparelho de detecção. Este processo de excitação-captação de fluorescência é realizado em cada ciclo de amplificação da PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das seqüências dos genes-alvo.

A reação de PCR em tempo real foi realizada da seguinte maneira: a 1,0 μ l de cDNA, foram adicionados 0,5 μ l de oligonucleotídeo iniciador sense (10 μ M), 0,5 μ l de oligonucleotídeo iniciador anti-sense (10 μ M), 7,5 μ l de

Master Mix 2X (*Applied Biosystems*, EUA) e água suficiente para 15 µl de reação. As amostras foram então incubadas a 95°C por 10 min, e passaram por 40 ciclos de incubações a 95°C por 15 s, e a 60°C por 1 min.

Os oligonucleotídeos utilizados (*Applied Biosystems*, Brasil) para a PCR foram:

KLK1 -calicreína tecidual (acesso nº NM_001005382, *GenBank*TM)

- oligonucleotídeo sense: 5' - TGTCATCAACAGATACCTCTG – 3'

- oligonucleotídeo anti-sense 5' - GCATGATCTGTCACCATCTGT – 3'

PPK -calicreína plasmática (acesso nº NM AH003184, *GenBank*TM)

- oligonucleotídeo sense: 5' - CTGTATTGACAGGTCAAACA – 3'

- oligonucleotídeo anti-sense 5' - AGTCTTCACATGAAGCTAGT – 3'

β-actina:

- oligonucleotídeo sense: 5'- AAGTCCCTCACCTCCCAAAG -3' (NM J00691 *GenBank*TM)

- oligonucleotídeo anti-sense: 5'- GCCCCACGGCCATCA -3' (V01217 *GenBank*TM)

A detecção de fluorescência se dá automaticamente pelos filtros do aparelho, e é imediatamente transferida para o software de análise. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Como controles de especificidade de reação foram utilizados dois parâmetros: presença de apenas um pico de fluorescência no protocolo de dissociação; e ausência de qualquer tipo de amplificação nas reações com os controles negativos de transcrição reversa.

Quantificação de expressão do RNAm das pré-caliceínas

A quantificação de RNAm das pré-caliceínas plasmática e tecidual foi feita como um valor relativo a uma referência interna, o RNAm de β -actina (beta-actina), cuja expressão pode ser considerada inalterada nas condições experimentais.

Os valores quantitativos de expressão do RNAm das pré-caliceínas e β -actina foram obtidos de um limiar arbitrário de fluorescência, analisado na fase exponencial da curva de amplificação, sendo o ciclo limiar (Ct) calculado. Foram calculados os Cts de cada amostra, em cada reação, para os dois genes. Foi calculado o Ct médio de cada amostra, e o cálculo de expressão relativa foi feito através da subtração deste Ct médio do gene de cada pré-caliceína do Ct médio do gene β -actina, obtendo-se o Δ Ct. Como não é usual a utilização da expressão relativa de um determinado gene em valores de Δ Ct, devido às suas características logarítmicas, foi utilizado o parâmetro $2^{-\Delta$ Ct para análise de expressão relativa do RNAm das pré-caliceínas plasmática e tecidual.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa InStat (GraphPad Software), e examinados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey e Kramer para determinar diferenças entre os grupos. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tempo de formação do edema

O edema induzido pela carragenina na região subplantar da pata do rato foi usado para determinar relações temporais entre a formação do edema e a expressão das pré-caliceínas no local da inflamação periférica. Foi verificado um aumento significativo da pata rapidamente após a injeção de carragenina, com aumento de volume após 1 hora, de 0,03 (grupos A1 e A3) até 1,15ml (grupo A2), pela medição do pletismômetro.

O aumento atingiu seu máximo em 2 horas (2,75ml) e permaneceu elevado, até ser medido pela última vez, após 4 horas (Tabela 1). Após três e quatro horas da inoculação da carragenina, o edema de pata dos animais do grupo A2 foi de $1,47 \pm 0,11$ e $0,99 \pm 0,29$ ml, respectivamente. Em animais sem o tratamento com a carragenina, não foi observada formação de edema. O edema formado em animais do grupo A4 atingiu seu volume máximo de $0,76 \pm 0,03$ ml após 2 horas (Tabela 1). Na primeira, terceira e quarta hora, os volumes observados nos animais do grupo A4 foram de $0,51 \pm 0,08$; $0,37 \pm 0,12$ e $0,22 \pm 0,05$, respectivamente.

Tabela 1: Volume de edema de pata de rato induzido pela administração de carragenina em função do tempo medido após 1 ou 2 horas.

Grupos de animais	Volume do edema (ml)
A1(salina) 2 horas	0,03 ± 0,01
A2 [§] (carragenina) 1 hora	1,15 ± 0,09
A2 [¶] (carragenina) 2 horas	2,75± 0,17
A3 (laser 660nm) 2 horas	0,03 ± 0,01
A4 (laser 660nm + carragenina) 2 horas	0,76 ± 0,03*

Médias ± e.p.m. * $p < 0,05$.

Efeito da laserterapia de baixa potência na expressão de RNAm de pré-caliceínas plasmática e tecidual em pata de rato inflamada

A expressão das pré-caliceínas plasmática e tecidual foi determinada por PCR em Tempo Real. Os dados foram expressos como a expressão relativa de RNAm, 4 horas após a inflamação induzida por carragenina, e comparados com o grupo controle (salina) e estão demonstrados na figura 1 e 2.

No grupo dos animais que recebeu somente carragenina (A₂), a expressão de RNAm da pré-caliceína tecidual apresentou um aumento marcante (16,2±0,8) quando comparado ao grupo de controle (A₁) (3,6±0,4; $p < 0,05$; Figura 1). Esses dados mostram um aumento na expressão de RNAm

da pré-caliceína tecidual em torno de 4,5 vezes, após inflamação induzida por carragenina.

A laserterapia promoveu uma diminuição expressiva na expressão da pré-caliceína tecidual. Foi observada uma redução na expressão de RNAm da pré-caliceína tecidual com a laserterapia, após seu uso a 660nm ($5,2\pm 0,5$; $p<0,05$).

Com relação à expressão de RNAm da caliceína plasmática, a carragenina induziu sua expressão significativamente (A_2 ; $22,1\pm 0,3$) quando comparada ao grupo de controle A_1 ($4,2\pm 0,2$; $p<0,05$). O conteúdo de RNAm da pré-caliceína plasmática diminuiu após a irradiação com laser ($9,1\pm 0,1$; $p<0,05$; Figura 2). A laserterapia por si (grupo A_3) não foi capaz de modular a expressão de RNAm de pré-caliceínas (Figuras 1 e 2).

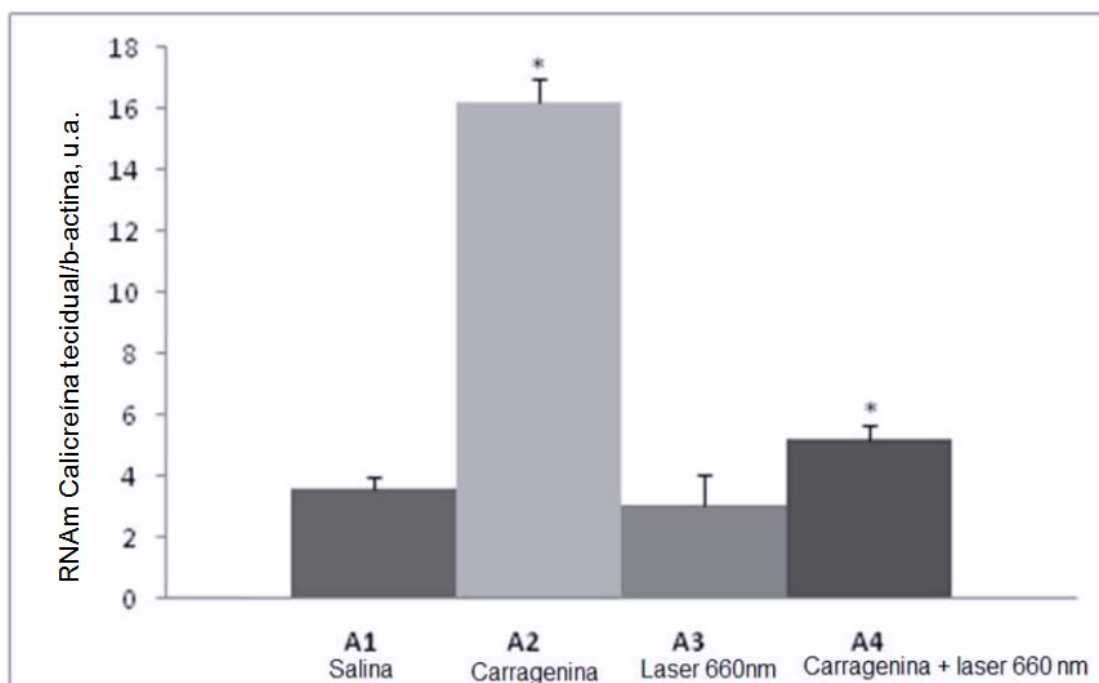


Figura 1: Quantificação do RNAm da pré-caliceína tecidual por PCR em tempo real. Expressão da caliceína tecidual foi normalizada usando β –actina endógena como controle e expresso em unidade arbitrária. Grupos experimentais: A1(somente salina), A2 (somente carragenina), A3 (somente laser), e A4 (irradiação laser + carragenina) *p < 0,05.

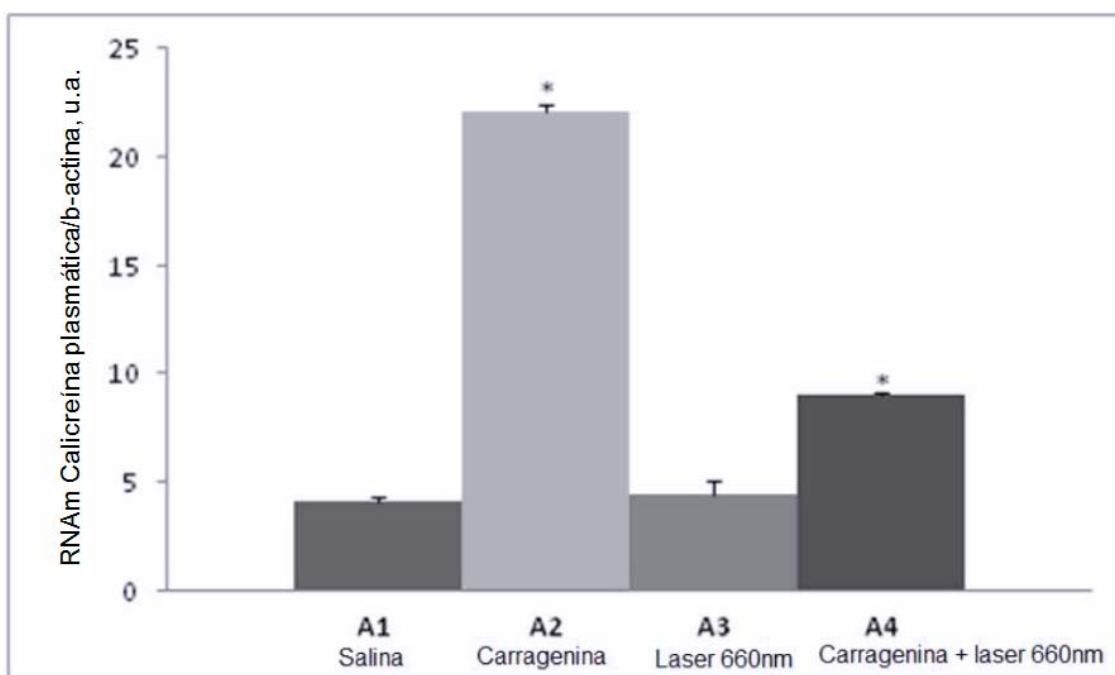


Figura 2: Quantificação do RNAm da pré-caliceína plasmática por PCR em tempo real. Expressão da caliceína plasmática foi normalizada usando β –actina endógena como controle e expresso em unidade arbitrária. Grupos experimentais: A1(somente salina), A2 (somente carragenina), A3 (somente laser), e A4 (irradiação laser + carragenina) *p < 0,05.

DISCUSSÃO

Recentemente, nota-se um aumento no número de pesquisas para buscar entendimento acerca dos mecanismos pelos quais a laserterapia se comporta nos tecidos, bem como para determinar o tamanho de onda mais apropriado, a quantidade de aplicações, o tempo de irradiação e a densidade^{16,17,27}.

Nossos resultados demonstraram um aumento no volume da pata caracterizado como edema, após inflamação induzida por carragenina. Foi relatado que um dos principais fatores responsáveis pelo início de uma inflamação é a presença de células pró-inflamação no local, em razão da interação entre o tecido inflamado e os leucócitos da circulação sanguínea. Após os estímulos inflamatórios, o endotélio vascular começa a expressar moléculas de adesão que facilitam a migração das células inflamatórias para o tecido inflamado^{20,21}. Ademais, os mediadores da inflamação são liberados por células residentes, dentre estes: prostaglandinas (PGE_2), tromboxano (TXA_2), leucotrienos (LTD_4), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) e interleucinas (IL-1 β and IL-6). Esses mediadores modificam o tônus muscular gerando vasodilatação, o que contribui para aumentar a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, aumentar o número de células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) no local da lesão²².

Recentemente, demonstramos que a laserterapia pode alterar a expressão das citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$, IL-1 β e IL-6, e de COX2 em tecido inflamado^{17,23}. Ademais, sugerimos que o efeito antiinflamatório do laser pode ser devido à modulação da resposta inflamatória por meio dos passos relacionados à ativação dos mediadores.

Provavelmente o efeito da laserterapia na expressão de RNAm pode ser devido à inibição não apenas de uma citocina a cada tempo, mas também pela modulação do RNAm de TNF- α que, dessa forma, acarretaria uma diminuição na expressão de RNAm de IL-1 β . Foi relatado que as modificações promovidas pela IL-1 β durante o processo inflamatório diminuíram nos animais tratados tanto com uma droga anti-TNF- α ou com antagonista de seu receptor. Aimbire et al²⁴ demonstraram que a laserterapia reduziu tanto o nível de TNF- α quanto à lesão hemorrágica em um modelo de inflamação aguda de pulmão. Foi relatado que o efeito antiinflamatório da laserterapia está relacionado à ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, que estimula o aumento da expressão de RNAm de TNF- α , IL-1 β e IL-6²⁵.

Componentes do sistema calicreína-cininas, os receptores de cininas B1 e B2 também foram relacionados na ação da laserterapia. Foi observada uma diminuição do RNAm do receptor de cinina B1 após a irradiação do laser, com comprimento de onda tanto de 660 quanto de 684nm. A expressão de RNAm do receptor de cinina B1 é relevante nos modelos de inflamação, pois sua indução é modulada por citocinas, como IL-1 β e TNF- α ²⁶. A expressão de RNAm do receptor de cinina B2 também foi diminuída após a laserterapia²⁷. Ademais, há uma inter-relação entre as citocinas e as cininas no processo inflamatório. As cininas induzem a liberação de citocinas, e essas aumentam os efeitos das cininas. Isso pode levar a um aumento e à continuidade do processo inflamatório²⁸.

Este estudo é pioneiro ao reportar a modulação da expressão de pré-calicreínas pela laserterapia, e reforça o envolvimento do sistema calicreína-cininas na ação antiinflamatória do laser. Várias evidências indicam que as

calicreínas estão envolvidas em diversas condições patológicas^{1,6,9}. Evidências sugerem um papel importante das cininas na geração da dor, inchaço e destruição celular, associados com inflamações das articulações³.

As cininas são consideradas peptídeos pró-inflamatórios por uma série de razões. Elas estimulam as fibras c sinoviais e causam dor e extravasamento de fluido, produzindo o inchaço. As cininas têm a capacidade de liberar neurotransmissores (substância P, acetilcolina) e uma segunda onda de mediadores inflamatórios (interleucina-1, fator de necrose tumoral, interleucina-8, prostaglandinas, leucotrienos)²⁹.

O uso da calicreína como tratamento terapêutico tem aumentado em várias condições, especialmente na restauração de disfunções cardíacas depois de parada cardíaca³⁰ e na promoção de nova vascularização na isquemia dos membros³¹.

Assim, a cascata de calicreína desempenha um papel importante nos eventos moleculares de respostas inflamatórias, visto que ela inicia e mantém as respostas inflamatórias sistêmicas. Um evento relevante é a atração quimiotaxia de neutrófilos, os quais levam a cascata de calicreína-cininas a locais de danos celulares e transformações carcinogênicas celulares³².

O presente estudo fornece evidências do envolvimento da expressão das pré-calicreínas plasmática e tecidual em resposta inflamatória aguda. Ademais, mostra que a expressão de RNAm de ambas pré-calicreínas é modelada pela laserterapia de baixa potência. Juntos, esses dados sugerem que a laserterapia é uma terapia alternativa que inibe ações pró-inflamatórias do sistema calicreína-cininas a níveis transcricionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreau M.E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N.J., Marceau F., Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99(1): 6-38.
2. Sharma JN. Hypertension and the bradykinin system. *Curr Hypertens Rep.* 2009; 11(3):178-81.
3. Yousef G.M., and Diamandis E.P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem.* 2003; 36(6): 443-52.
4. Yoon H., Laxmikanthan G., Lee J., Blaber S.I., Rodriguez A., Kogot J.M., Scarisbrick I.A., Blaber M. Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem.* 2007; 282(44): 31852-64.
5. Emami N., Diamandis E.P. Human tissue kallikreins: a road under construction. *Clin Chim Acta.* 2007; 381(1): 78-84.
6. Clements J.A., Willemsen N.M., Myers S.A., Dong Y. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004; 41(3): 265-312.

7. Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N. Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br J Pharmacol*. 2005; 146(5): 670-8.

8. McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, Joubert E, Dixon CM, Vergnolle N. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(3): 728-37.

9. Fink E., Bhoola K.D., Snyman C., Neth P., Figueroa C.D. Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. *Biol Chem*. 2007; 388(9): 957-63.

10. Di Rosa M. Pharmacological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol*. 1972; 24: 89-102.

11. Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.M. Carrageenin-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *PNAS*. 1962; 111: 544-547.

12. Colville-Nash P.R., and Gilroy D.W. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins- a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2000; 62: 33-43.

13. Sulaiman MR, Zakaria ZA, Adilius M, Mohamad AS, Ismail M, Israf DA. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract of

Alpinia conchigera Griff. leaves in various animal models. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009; 31(4): 241-7.

14. Kandolf-Sekulovic L., Kataranovski M., Pavlovic M.D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003; 19(4): 203-12.

15. Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Klebanov G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc).* 2004; 69(1): 81-90.

16. Bjordal J.M., Johnson M.I., Iversen V., Aimbire F., Lopes-Martins R.A.B. Low-Level Laser Therapy In Acute Pain: A Systematic Review Of Possible Mechanisms Of Action And Clinical Effects In Randomized Placebo-Controlled Trials. *Photomed. Laser Surg.* 2006; 24(2): 158-68.

17. Albertini R., Villaverde A.B., Aimbire F.; Silva J.A. Jr; Bjordal J.M., Brugnara Junior A., Mittimann J., Costa M.S. Cytokines mRNA expression is decreased after treatment with Low Level Laser Therapy (LLLT) in the subplantar muscle of paw rat submitted to carrageenan-induced inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26, 19-24.

18. Freidoni M., Ahamadiani A., Semnanian S., Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw oedema. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth* 2000; 43: 11-14.

19. Pilla, Eduardo Sperb et al. Pré-condicionamento isquêmico por oclusão seletiva da artéria pulmonar em ratos. *J. bras. pneumol.* [online]. 2008, vol.34, n.8, pp. 583-589.

20. Madan B., Mandal B.C., Kumar S., Ghosh B. *Canscora decussata* (Roxb.) Schult (Gentianaceae) inhibits LPS-induced expression of ICAM-1 and E-selectin on endothelial cells and carageenan-induced paw-edema in rats. *J Ethnopharmacol.* 2003; 89(2-3): 211-6.

21. Pierce J.W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S.A., Collins T., Gerritsen M.E. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272(34): 21096-103.

22. Schroder A.K., von der Ohe M., Kolling U., Altstaedt J., Uciechowski P., Fleischer D., Dalhoff K., Ju X., Zenke M., Heussen N., Rink L. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology.* 2006; 119(3): 317-27.

23. Albertini R., Aimbire F., Villaverde A.B., Silva J.A. Jr, Costa M.S. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res.* 2007; 56(6): 228-9.

24. Aimbire F., Bjordal J.M., Iversen V.V., Albertini R., Frigo L., Pacheco M.T., Castro-Faria-Neto H.C., Chavantes M.C., Labat R.M., Lopes-Martins R.A. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction *Lasers Surg Med.* 2006; (8): 773-8.

25. Linard C., Marquette C., Mathieu J., Pennequin A., Clarencon D., Mathe D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58(2): 427-34.

26. Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161–76.

27. Bortone F., Santos H.A., Albertini R., Pesquero J.B., Costa M.S., Silva Jr J.A. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol.*, 2008, 8:206-210.

28. Cassim B., Mody G., Bhoola K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther.* 2002; 94(1-2): 1-34.

29. Bhoola K.D., Elson C.J., Dieppe P.A. Kinins--key mediators in inflammatory arthritis? *Br J Rheumatol.* 1992; 31(8): 509-18.

30. Yao YY, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion rescues failing myocardium after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2007; 13(7): 588-96.

31. Smith RS Jr, Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol Chem.* 2008; 389(6): 725-30.

32. Bhoola K.D., Ramsaroop R., Plendl J., Cassim B., Dlamini Z., Naicker S. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem.* 2001; 382(1): 77-89.

Os resultados deste estudo demonstraram um aumento no volume da pata caracterizado como edema, após inflamação induzida por carragenina. Um dos principais fatores responsáveis pelo início de uma inflamação é a presença de células pró-inflamação no local, em razão da interação entre o tecido inflamado e os leucócitos da circulação sanguínea. Após os estímulos inflamatórios, o endotélio vascular começa a expressar moléculas de adesão que facilitam a migração das células inflamatórias para o tecido inflamado^{20,21}. Ademais, os mediadores da inflamação são liberados por células residentes, dentre estes: prostaglandinas (PGE_2), tromboxano (TXA_2), leucotrienos (LTD_4), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral ($TNF-\alpha$) e interleucinas ($IL-1\beta$ e $IL-6$). Esses mediadores modificam o tônus muscular gerando vasodilatação, o que contribui para aumentar a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, aumentar o número de células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) no local da lesão²².

Este estudo é pioneiro ao reportar a modulação da expressão de pré-caliceínas pela laserterapia, e reforça o envolvimento do sistema caliceína-cininas na ação antiinflamatória do laser. Recentemente, demonstramos que a laserterapia pode alterar a expressão das citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$, e de $COX2$ em tecido inflamado^{17,23}. Provavelmente o efeito da laserterapia na expressão de RNAm pode ser devido à inibição não apenas de uma citocina a cada tempo, mas também pela modulação do RNAm de $TNF-\alpha$ que, dessa forma, acarretaria uma diminuição na expressão de RNAm de $IL-1\beta$. Foi relatado que as alterações promovidas pela $IL-1\beta$ durante o processo inflamatório diminuiriam nos animais tratados tanto com uma droga anti- $TNF-\alpha$ ou com antagonista de seu receptor. Aimbire et al²⁴ demonstraram

que a laserterapia reduziu tanto o nível de TNF- α quanto a lesão hemorrágica em um modelo de inflamação aguda de pulmão. Foi relatado que o efeito antiinflamatório da laserterapia está relacionado à ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B, que estimula o aumento da expressão de RNAm de TNF- α , IL-1 β e IL-6²⁵.

Componentes do sistema calicreína-cininas, os receptores de cininas B1 e B2 também foram relacionados na ação da laserterapia. Há uma inter-relação entre as citocinas e as cininas no processo inflamatório. As cininas induzem a liberação de citocinas, e essas aumentam os efeitos das cininas. Isso pode levar a um aumento e à continuidade do processo inflamatório²⁸.

Várias evidências indicam que as calicreínas estão envolvidas em diversas condições patológicas^{1,6,9}. Evidências sugerem um papel importante das cininas na geração da dor, inchaço e destruição celular, associados com inflamações das articulações³.

As cininas são consideradas peptídeos pró-inflamatórios por uma série de razões. Elas estimulam as fibras c sinoviais e causam dor e extravasamento de fluido, produzindo o inchaço. As cininas têm a capacidade de liberar neurotransmissores (substância P, acetilcolina) e uma segunda onda de mediadores inflamatórios (interleucina-1, fator de necrose tumoral, interleucina-8, prostaglandinas, leucotrienos)²⁹.

O uso da calicreína como tratamento terapêutico tem aumentado em várias condições, especialmente na restauração de disfunções cardíacas depois de parada cardíaca³⁰ e na promoção de nova vascularização na isquemia dos membros³¹.

Assim, a cascata de caliceínas desempenha um papel importante nos eventos moleculares de respostas inflamatórias, visto que ela inicia e mantém as respostas inflamatórias sistêmicas. Um evento relevante é a atração quimiotaxia de neutrófilos, os quais levam a cascata de caliceína-cininas a locais de danos celulares e transformações carcinogênicas³².

O presente estudo fornece evidências do envolvimento da expressão das pré-caliceínas plasmática e tecidual em resposta inflamatória aguda. Ademais, mostra que a expressão de RNAm de ambas pré-caliceínas é reduzida pela laserterapia de baixa potência. Juntos, esses dados sugerem que a laserterapia é uma terapia alternativa que inibe ações pró-inflamatórias do sistema caliceína-cininas a níveis transcricionais.

Este trabalho contribui para o melhor entendimento da ação da laserterapia de baixa potência, uma vez que, o laser, atuando a nível transcricional, causou alteração da quantidade de RNA mensageiro das pré-caliceínas tecidual e plasmática em modelo de inflamação aguda em pata de rato. Esta diminuição de RNAm encontrada foi acompanhada de uma ação antiinflamatória, onde observamos uma diminuição do edema de pata de ratos tratados com carragenina e irradiados com laser a 660 nm. Estes dados sugerem que o sistema caliceína-cininas participa do efeito antiinflamatório do laser contribuindo para a elucidação do mecanismo de ação desta terapia.

A laserterapia de baixa potência reduziu a expressão gênica de calicreínas tecidual e plasmática em modelo de inflamação aguda de pata de rato induzido pela administração de carragenina.

1. Tunér J, Hode L. Laser Therapy: Clinical practice and Scientific Background. Sweden: Prima Books. 2002.
2. Pinheiro A. L. B.; Frame J. W. Laser em odontologia. Revista Gaúcha de Odontologia 1992, 5(40), 327-332.
3. Rebello M.L., Lobo P.D.C.,Brugnera J. A., Martins S.N.M.S. Terapia de danos traumáticos em lábios e dentes aplicando laser de baixa potência 2007, 55(3), 7-9.
4. Dallan L. A. O; Oliveira S. A - Cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser de CO2. Rev Bras Cir Cardiovasc 2000; **15** (2), 89-104.
5. Kitchen S, Bazin S. Eletroterapia de Clayton. São Paulo: Manole; 1998, 191-210.
6. Colls J. La terapia laser hoy. Barcelona: Ed. Barcelona; 1987.
7. Brugnera J, A.; Pinheiro, A. L. B. Lasers na Odontologia Moderna. São Paulo: Pancast, 1998, 356.
8. Chagas Júnior, Otacílio Luiz. A intensidade do infiltrado inflamatório agudo após irradiação laser de baixa potência: InGaAIP - 685 nm /2007. 80 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre.

9. Bortone, Flávia. Efeitos da Laserterapia de baixa potência na expressão gênica de receptores de cininas em modelo experimental de inflamação aguda em ratos. / 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade Nove de Julho, São Paulo.
10. Stein E , Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Lezaic V, Wendtlandt G, Watzinger F, Turhani D. Phenothiazine Chloride and Soft Laser Light Have a Biostimulatory Effect on Human Osteoblastic Cells. *Photomedicine and Laser Surgery* 2009, 27(1), 71-77.
11. Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, Melo DA, Oliveira JR. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(7), 500-8.
12. Karu T. I. *Photobiology of low-power laser therapy.* London: Harwood Academic Publishers, 1989.
13. Ataka I. *Lasers in Dentistry.* Amsterdam: Ed. Elsevier, 1989.
14. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg* 2005; 31, 334-340

15. Akyol U, Güngörmüş M. Photomedicine and Laser Surgery. 2009, 1-5.
16. Yu. A. Vladimirov, A. N. Osipov, and G. I. Klebanov. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. Biochemistry (Moscow), 2004, 69(1), 81-90.
17. Albertini R, Aimbire FSC, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira AS, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zângaro RA, Lopes- Martins RAB. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. J Photochem Photobiol: Biology. 2004; 74, 101- 107.
18. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. Circ Res., 2001 88(9), 877-87.
19. Guerino MR, et al. Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis. Appl Surf Sci. 2000; 154, 561-564.
20. Di Rosa M. Pharmacological properties of carrageenan. J Pharm Pharmac. 1972; 24, 89-102.
21. Lunardelli A, Leite CE, Pires MGR, Oliveira JR. Extract of the bristles of *Dirphia* sp. increase nitric oxide in a rat pleurisy model. Inflamm Res. 2006; 55, 129-135

22. Martins RAB, Albertini R, Martins PSLM, Bjordal JM, Faria Neto HCC. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photom Laser Sur.* 2005; 23(4), 377-381.
23. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of rats as an assay method for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1962; 111, 544-547.
24. Pierce J.W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S.A., Collins T., Gerritsen M.E. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272(34), 96-103.
25. Schroder A.K., von der Ohe M., Kolling U., Altstaedt J., Uciechowski P., Fleischer D., Dalhoff K., Ju X., Zenke M., Heussen N., Rink L. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology.* 2006; 119(3), 317-27.
26. Albertini R., Aimbire F., Villaverde A.B., Silva J.A. Jr, Costa M.S. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res.* 2007; 56(6), 228-9.

27. Albertini R., Villaverde A.B., Aimbire F.; Silva J.A. Jr; Bjordal J.M., Brugnera Junior A., Mittimann J., Costa M.S. Cytokines mRNA expression is decreased after treatment with Low Level Laser Therapy (LLLT) in the subplantar muscle of paw rat submitted to carrageenan-induced inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26, 19-24.

28. Aimbire F., Bjordal J.M., Iversen V.V., Albertini R., Frigo L., Pacheco M.T., Castro-Faria-Neto H.C., Chavantes M.C., Labat R.M., Lopes-Martins R.A. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction *Lasers Surg Med.* 2006; (8): 773-8.

29. Linard C., Marquette C., Mathieu J., Pennequin A., Clarencon D., Mathe D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58(2), 427-34.

30. Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429, 161–76.

31. Bhoola K.D., Elson C.J., Dieppe P.A. Kinins--key mediators in inflammatory arthritis? *Br J Rheumatol.* 1992; 31(8), 509-18.

32. Moreau M.E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N.J., Marceau F., Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99(1), 6-38.

33. Clements J.A., Willemsen N.M., Myers S.A., Dong Y. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004; 41(3), 265-312.

34. Fink E., Bhoola K.D., Snyman C., Neth P., Figueroa C.D. Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. *Biol Chem.* 2007; 388(9), 957-63.

35. Yousef G.M., and Diamandis E.P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem.* 2003; 36(6), 443-52.

36. Yao YY, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion rescues failing myocardium after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2007; 13(7), 588-96.

37. Smith RS Jr, Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol Chem.* 2008; 389(6), 725-30.

38. Bhoola K.D., Ramsaroop R., Plendl J., Cassim B., Dlamini Z., Naicker S. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem.* 2001; 382(1), 77-89.

39. Bhoola K.D., Ramsaroop R., Plendl J., Cassim B., Dlamini Z., Naicker S. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem.* 2001; 382(1), 77-89.

ANEXO I - Artigo**INHIBITION OF CARRAGEENAN-INDUCED EXPRESSION OF TISSUE AND PLASMA PREKALLIKREINS MRNA BY LOW LEVEL LASER THERAPY IN RAT PAW EDEMA**

Moisés Paulo da Silva¹, Flávia Bortone¹, Marcelo de Paula Silva¹, Thiago Rodrigues de Araújo¹, Maricília Silva Costa², José Antônio Silva Júnior¹.

¹Ciências da Reabilitação, Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo - SP, Brasil.

²Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento – IP&D. Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, São José dos Campos - SP, Brasil.

(*) Corresponding author: José Antonio Silva Júnior, Departamento de Ciências da Reabilitação, Centro Universitário Nove de Julho, UNINOVE. Rua Vergueiro, 235 Liberdade, CEP 01504001. São Paulo - SP, Brasil. E-mail: josejr@uninove.br

Key words: Plasma kallikrein, tissue kallikrein, low-level laser therapy, gene expression, inflammation.

Abstract

Background: Low level laser therapy (LLLT) has been used clinically, in order to treat inflammatory processes, where tissue and plasma prekallikrein have pivotal importance. Plasma prekallikrein (PPK) is synthesized in hepatocytes and secreted into the blood, where it participates in the surface-dependent activation of blood coagulation, fibrinolysis, kinin generation and inflammation. Tissue prekallikrein is associated with important diseased states (including cancer, inflammation, and neurodegeneration) and has been utilized or proposed as clinically important biomarker or therapeutic target of interest. Recently we demonstrated that both kinin receptors expression was altered after LLLT. Objective: To evaluate if LLLT modulates tissue and plasma prekallikreins mRNA expression in the carrageenan-induced rat paw edema. Methods: Experimental groups were designed as followed: A₁ (Control-saline), A₂ (Carrageenan-only), A₃ (laser 660nm only) and A₄ (Carrageenan + laser 660nm). Edema was measured by a plethysmometer. Subplantar tissue was collected for the quantification of prekallikreins mRNA by Real time-PCR. Results: A significantly decrease in the edema was observed after laser irradiation. Expression of prekallikreins is increased after carrageenan injection; however tissue and plasma prekallikrein mRNA expression significantly decreased after LLLT's 660nm wavelength. Conclusion: Our results suggest that expression of tissue and plasma prekallikreins is modulated by LLLT, possibly contributing to its anti-inflammatory effect.

Introduction

The kallikrein-kinin system is an endogenous metabolic cascade, triggering of which results in the release of vasoactive kinins (bradykinin-related peptides). This complex system includes the precursors of kinins known as kininogens and mainly tissue and plasma prekallikreins¹. Kallikreins are a family of serine proteases with diverse physiologic functions represented by multigene families in many animal species, especially in rat and mouse. Members of this family are associated with important diseased states (including cancer, inflammation, and neurodegeneration) and have been utilized or proposed as clinically important biomarkers or therapeutic targets of interest². All KLKs are synthesized as prepro-forms that are proteolytically processed to secreted pro-forms via the removal of an amino-terminal secretion signal peptide. The secreted inactive pro-KLKs are then activated in extracellular compartment to mature peptidases by specific proteolytic release of their amino-terminal propeptide^{3,4}.

The tissue kallikreins are serine proteases that are encoded by highly conserved multi-gene family clusters in rodents and humans. The rat and mouse loci contain 10 and 25 functional genes, respectively, while the human locus at 19q 13.4 contains 15 genes⁵. The structural organization and size of these genes are similar across species; all genes have 5 coding exons that encode a prepro-enzyme. Although the physiological activators of these zymogens have not been described, in vitro biochemical studies show that some kallikreins can auto-activate and others can activate each other, suggesting that the kallikreins may participate in an enzymatic cascade similar to that of the coagulation cascade. These genes are expressed, to varying degrees, in a wide range of tissues suggesting a functional involvement in a

diverse range of physiological and pathophysiological processes. These include roles in normal skin desquamation and psoriatic lesions, tooth development, neural plasticity, and Alzheimer's disease (AD). Of particular interest is the expression of many kallikreins in prostate, ovarian, and breast cancers where they are emerging as useful prognostic indicators of disease progression⁶. Inflammatory processes such as arthritis and acute joint inflammation also are dependent of kallikrein activation via proteinase-activated receptor 4 (PAR-4)^{7,8}.

Plasma prekallikrein (PPK) is synthesised in hepatocytes and secreted into the blood, where it participates in the surface-dependent activation of blood coagulation, fibrinolysis, kinin generation and inflammation. Human PPK gene is transcribed not only in the liver, but also in various non-hepatic human tissues at significant levels⁹.

Carrageenan injection is a widely model used to induce acute inflammatory response in experimental animals, since; it induces the release of different inflammatory mediators, such as, histamine, bradykinin, prostaglandins and superoxide anions¹⁰. Winter and colleagues¹¹ described the use of carrageenan as an irritant agent to induce rodents paw edema, and is a popular method for testing new anti-inflammatory therapies^{12,13}.

The association of carrageenan administration and low level laser therapy is becoming one important tool for healing or ameliorate inflammatory conditions. Generally associated with anti-inflammatory effects, pain relief and accelerate the regeneration in the damage tissue^{14,15}, low level laser therapy (LLLT) using near infrared irradiation (600-1,000nm) has been used to treat patients with inflammation processes. Clinical use of LLLT in the conventional medicine has been recently suggested¹⁶.

The present work was designed to investigate the anti-inflammatory effects of LLLT, applied at 660nm, on the carrageenan-induced acute inflammation in paw rat. In order to study the anti-inflammatory mechanisms by LLLT we determined the mRNA expression of tissue and plasma prekallikreins.

Material and Methods

Animals

Experiments were performed using male Wistar rats (150-200g), with food and water "*ad libitum*" provided by Central Animal House of the Research and Development Department of Vale do Paraíba University (UNIVAP). All experiments were carried out in accordance with the guidelines of Vale do Paraíba University for animal care (protocol number: A034/2006/CEP). All rats were placed in a common box and randomly divided into groups of eight.

Induction of the edema

A single subplantar injection (0,1ml) of carrageenan (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), using a stock concentration of 1% (Saline 0.85%) was administered in the rat left hind paw under brief anesthesia with halothane¹⁷.

Laser irradiation

Diode laser with an output power of 30mW and wavelength of 660nm (model: laser unit, Kondortech) was used with energy density of 7.9J/cm². Optical power was calibrated using a Newport Multifunction Optical Meter

(model 1835C). Stability of laser during laser irradiation was measured collecting light with a partial reflect (4%).

Experimental groups

Forty rats divided into four groups [A₁ (Control-saline), A₂ (Carrageenan only), A₃ (laser 660nm only), A₄ (Carrageenan + laser 660nm)] were used. Animals from A₄ group were irradiated at 1st hour after edema induction by carrageenan administration.

Volume edema

Volume of the paw edema (ml) was measured in each animal using a plethysmometer (plethysmometer 7150, Ugo Basile, Italy) with a precision of two decimal places. Volume of paw edema was determined immediately before, and 1, 2, 3 and 4 hours after carrageenan administration. An increase in paw volume (ml) was calculated by subtracting the basal volume from the final volume in each animal¹⁸.

Experimental procedure

A considerable increase in the paw volume after carrageenan administration characterized the inflammatory process. Animals were sacrificed by decapitation on 4 hours after different treatments and subplantar muscles were quickly dissected, immediately frozen in liquid nitrogen and stocked at -80°C, until RNA isolation.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted from thawed tissues homogenized in 1ml of TRIzol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), accordingly to the manufacturer's instructions.

Quantitative Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

One microgram of total RNA was used for cDNA synthesis and RT-PCR gene expression analysis. Initially, contaminating DNA was removed using DNase I (Invitrogen) at a concentration of 1unit/ μ g RNA in the presence of 20mM Tris-HCl (pH 8.4), containing 2 mM $MgCl_2$ for 15 min at 37°C, followed by incubation at 95°C for 5 min for enzyme inactivation. The reverse transcription (RT) was carried out in a 200 μ l reaction in the presence of 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 3mM $MgCl_2$, 10mM dithiothreitol, 0.5mM dNTPs and 50ng of random primers with 200 units of Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Invitrogen). The reaction conditions were: 20°C for 10 min, 42°C for 45 min and 95°C for 5 min.

The reaction product was amplified by real time PCR on a 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA) using the SYBRGreen core reaction kit (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were: 50°C for 2 min, then 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Experiments were performed in triplicates for each data point. Tissue and plasma prekallikreins mRNA abundance were quantified as a relative value compared with an internal reference, β -actin, whose abundance was believed not to change between the varying experimental conditions. Primers used for real time PCR were as follows: rat KLK1 (tissue kallikrein) forward primer (GenBankTM accession number

NM_001005382) 5'- TGTCATCAACAGATACCTCTG -3' and reverse primer 5'- GCATGATCTGTCACCATCTGT-3'; rat PPK (plasma kallikrein) forward primer (GenBank™ accession number AH003184) 5'- CTGTATTGACAGGTCAAACA -3' and reverse primer 5'- AGTCTTCACATGAAGCTAGT -3'; and rat β -actin forward primer (GenBank™ accession number J00691) 5'- AAGTCCCTCACCTCCCAAAG -3' and reverse primer (GenBank™ accession number V01217) 5'- AAGCAATGCTGTCACCTTCCC -3'. One microliter of RT reaction was used for Real-Time PCR.

Quantitative values for the tissue and plasma prekallikreins and β -actin mRNA transcription were obtained from the threshold cycle number, where the increase in the signal associated with an exponential growth of PCR products begins to be detected. Melting curves were generated at the end of every run to ensure product uniformity. The relative target gene expression level was normalized on the basis of β -actin expression as an endogenous RNA control. ΔC_t values of the samples were determined by subtracting the average C_t value of tissue and plasma prekallikreins mRNA from the average C_t value of the internal control β -actin. As it is uncommon to use ΔC_t as a relative data due to this logarithmic characteristic, the $2^{-\Delta C_t}$ parameter was used to express the relative expression data.

Statistic analysis

Data obtained were analyzed statistically using the program InStat (GraphPad Software). Data were examined by analysis of variance (ANOVA) followed by the Student t-test *post hoc* to determine differences between groups. The results were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Time Course of Edema Formation

Carrageenan-induced edema in the subplantar region of rat paw was used as a model to determine temporal relationships between edema formation and expression of prekallikreins at the site of peripheral inflammation. Under the conditions used for carrageenan-induced inflammation, swelling of the paw occurred rapidly after carrageenan injection with an increase in volume at 1 hour from 0.03 (A₁ and A₃ groups) to 1.15 ml (A₂ group) by plethysmometer measurement. Swelling reached a maximum at 2 hours (2.75 ml) and remained elevated until the last measurement at 4 hours (Table 1). In animals without treatment with carrageenan, edema formation was not observed.

Effect of LLLT on Edema formation induced by Carrageenan

At 1 hour after induction of inflammation with carrageenan, rat paw was irradiated with LLLT with wavelength of 660nm, with energy density of 7.9J/cm². A significantly decrease in the edema evolution was observed at 2 hours after laser irradiation of 660nm (Table 1). A decrease in the edema evolution was maintained 3 hours after laser irradiation in the A₄ (0.76 ml), when compared to A₂ group (2.75 ml). No significant difference was observed between A₁ and A₃ groups (Table 1).

Effect of LLLT on mRNA Expression of the Tissue and Plasma Prekallikreins in Inflamed Paw

Expression of tissue and plasma prekallikreins was determined by RT-PCR. Data were expressed as the relative expression of mRNA at time 4 hours after carrageenan-induced inflammation and compared with saline group. In the animal group receiving only carrageenan (A_2), tissue prekallikreins mRNA expression presented a pronounced increase (16.2 ± 0.8) when compared to control group (A_1) (3.6 ± 0.4 ; $p < 0.05$; Figure 1). These data show an increase in tissue prekallikrein mRNA expression around 4.5 times, after carrageenan-induced inflammation. LLLT promoted a marked decrease in the tissue prekallikrein expression. A potent reduction in the tissue prekallikrein mRNA expression by LLLT using laser of 660nm was observed (5.2 ± 0.5 ; $p < 0.05$).

Concerning to plasma kallikrein mRNA expression, carrageenan induced its expression significantly (A_2 ; 22.1 ± 0.3) when compared to control group A_1 (4.2 ± 0.2 ; $p < 0.05$). Plasma prekallikrein mRNA amount was diminished after LLLT (9.1 ± 0.1 ; $p < 0.05$; Figure 2). LLLT only (A_3 group) was unable to modulate prekallikreins mRNA expression (Figures 1 and 2).

Discussion

Recently, the search for understanding the mechanisms by which LLLT behave on the tissues, as well as the determination of the most appropriate wavelength, number of applications, period of irradiation and energy density has been increased¹⁶.

Our results demonstrated an increase of paw volume characterized as edema, after carrageenan-induced inflammation. It has been reported that one

of the principal factors responsible by start the inflammation event is the presence of inflammatory cells into the damage site, due to the interaction between tissue inflamed and the leukocytes from blood circulation. After inflammatory stimuli, vascular endothelium starts to express adhesion molecules that gone facilitate the migration of inflammatory cell into the inflamed tissue^{19,20}. In addition, inflammatory mediators are released by resident cells, such as prostaglandins (PGE₂), tromboxane (TXA₂), leukotrienes (LTD₄) nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukins (IL-1 β and IL-6). These mediators modified the vascular tonus through of vasodilatation what contribute to increase of vascular permeability and, consequently, increase the inflammatory cells (monocytes and neutrophils) in the site of lesion²¹.

Recently, we demonstrated that LLLT can alter pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 and COX mRNA expression in inflamed tissue^{17,22}. Thus, we suggest that the anti-inflammatory effect of LLLT can be due the modulation of the inflammatory response through steps related to mediator's activation. Probably, the effect of LLLT on mRNA expression can be due to inhibition of not just one cytokine in each time, but modulating the TNF- α mRNA and, consequently, reducing the IL-1 β mRNA expression. It has been reported that the alterations promoted by IL-1 β during the inflammatory process are diminished in the animals treated with either a drug anti-TNF- α or antagonist of his receptor. Aimbire and co-workers²³ have demonstrated that LLLT reduced both the TNF- α level and the hemorrhagic lesion in acute lung inflammation model. It has been reported that the anti-inflammatory effect of LLLT is related to activation of transcription factors, such as, NF- κ B. This

transcription factor stimulates the increase of mRNA expression to TNF- α , IL-1 β and IL-6²⁴.

Components of kallikrein-kinin system such as kinin B1 and B2 receptors were also related to LLLT action. A decrease in kinin B1 receptor mRNA amount after LLLT was observed using laser with wavelength of either 660 or 684nm. Kinin B1 receptor mRNA expression is relevant in inflammation models, since its induction is modulate by cytokines such as IL-1 β and TNF- α ²⁵. Kinin B2 receptor mRNA expression was also diminished after LLLT²⁶. In addition, there appears to be an inter-relationship between cytokines and kinins in the inflammatory process. Kinins induce the release of cytokines, and cytokines have been shown to augment the effects of kinins. This may lead to an enhancement and perpetuation of the inflammatory process²⁷.

This study is the first report of modulation of prekallikrein expression by LLLT and reinforces the involvement of kallikrein-kinin system in the anti-inflammatory action of LLLT. Accumulating evidence indicates that prekallikreins are involved in many pathologic conditions. Evidences suggest an important role for kinins in the generation of pain, swelling and the cellular damage associated with inflammatory joint disease³.

Kinins are considered to be pro-inflammatory peptides for a variety of reasons. They stimulate c fibers in the synovium to cause pain and increase extravasation of fluid to produce swelling. Kinins possess the capacity to release neurotransmitters (substance P, acetylcholine) and a second wave of mediators (interleukin-1, tumour necrosis factor, interleukin-8, prostaglandins, leukotrienes)²⁸.

The use of kallikrein as therapeutic treatment is increasing in many conditions, especially restoring impaired cardiac function after postinfarction heart failure²⁹ and promoting neovascularization in the limb ischemia³⁰.

In summary, kallikrein cascade plays a significant role in the molecular events of the inflammatory response, since it is considered to initiate and maintain systemic inflammatory responses and immune-modulated disorders. A primary event is the chemotactic attraction of neutrophils which deliver the kallikrein-kinin cascade to sites of cellular injury and carcinogenic transformation of cells³¹.

The present study establishes the involvement of the tissue and plasma prekallikreins expression in acute inflammatory response. Moreover, it shows that tissue and plasma prekallikreins mRNA expression is modulated by irradiation using low level laser therapy. Together, these data suggest that LLLT is an alternative therapy that inhibits the pro-inflammatory actions of kallikrein-kinin system at transcriptional levels.

References

1. Moreau M.E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N.J., Marceau F., Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99(1): 6-38.
2. Sharma JN. Hypertension and the bradykinin system. *Curr Hypertens Rep.* 2009; 11(3):178-81.

3. Yousef G.M., and Diamandis E.P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem.* 2003; 36(6): 443-52.

4. Yoon H., Laxmikanthan G., Lee J., Blaber S.I., Rodriguez A., Kogot J.M., Scarisbrick I.A., Blaber M. Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *J Biol Chem.* 2007; 282(44): 31852-64.

5. Emami N., Diamandis E.P. Human tissue kallikreins: a road under construction. *Clin Chim Acta.* 2007; 381(1): 78-84.

6. Clements J.A., Willemsen N.M., Myers S.A., Dong Y. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004; 41(3): 265-312.

7. Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N. Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *Br J Pharmacol.* 2005; 146(5): 670-8.

8. McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, Joubert E, Dixon CM, Vergnolle N. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(3): 728-37.

9. Fink E., Bhoola K.D., Snyman C., Neth P., Figueroa C.D. Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. *Biol Chem.* 2007; 388(9): 957-63.

10. Di Rosa M. Pharmacological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 1972; 24: 89-102.

11. Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.M. Carrageenin-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *PNAS.* 1962; 111: 544-547.

12. Colville-Nash P.R., and Gilroy D.W. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins- a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2000; 62: 33-43.

13. Sulaiman MR, Zakaria ZA, Adilius M, Mohamad AS, Ismail M, Israf DA. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Alpinia conchigera* Griff. leaves in various animal models. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009; 31(4): 241-7.

14. Kandolf-Sekulovic L.,Kataranovski M.,Pavlovic M.D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003; 19(4): 203-12.

15. Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Klebanov G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004; 69(1): 81-90.

16. Bjordal J.M., Johnson M.I., Iversen V., Aimbire F., Lopes-Martins R.A.B. Low-Level Laser Therapy In Acute Pain: A Systematic Review Of Possible Mechanisms Of Action And Clinical Effects In Randomized Placebo-Controlled Trials. *Photomed. Laser Surg*. 2006; 24(2): 158-68.

17. Albertini R., Villaverde A.B., Aimbire F.; Silva J.A. Jr; Bjordal J.M., Brugnara Junior A., Mittimann J., Costa M.S. Cytokines mRNA expression is decreased after treatment with Low Level Laser Therapy (LLLT) in the subplantar muscle of paw rat submitted to carrageenan-induced inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26, 19-24.

18. Freidoni M., Ahamadiani A., Semnanian S., Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw oedema. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth* 2000; 43: 11-14.

19. Madan B., Mandal B.C., Kumar S., Ghosh B. *Canscora decussata* (Roxb.) Schult (Gentianaceae) inhibits LPS-induced expression of ICAM-1 and E-selectin on endothelial cells and carageenan-induced paw-edema in rats. *J Ethnopharmacol*. 2003; 89(2-3): 211-6.

20. Pierce J.W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S.A., Collins T., Gerritsen M.E. Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272(34): 21096-103.

21. Schroder A.K., von der Ohe M., Kolling U., Altstaedt J., Uciechowski P., Fleischer D., Dalhoff K., Ju X., Zenke M., Heussen N., Rink L. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology.* 2006; 119(3): 317-27.

22. Albertini R., Aimbire F., Villaverde A.B., Silva J.A. Jr, Costa M.S. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res.* 2007; 56(6): 228-9.

23. Aimbire F., Bjordal J.M., Iversen V.V., Albertini R., Frigo L., Pacheco M.T., Castro-Faria-Neto H.C., Chavantes M.C., Labat R.M., Lopes-Martins R.A. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction *Lasers Surg Med.* 2006; (8): 773-8.

24. Linard C., Marquette C., Mathieu J., Pennequin A., Clarencon D., Mathe D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-

irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58(2): 427-34.

25. Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161–76.

26. Bortone F., Santos H.A., Albertini R., Pesquero J.B., Costa M.S., Silva Jr J.A. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *Int Immunopharmacol.*, 2008, 8:206-210.

27. Cassim B., Mody G., Bhoola K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther.* 2002; 94(1-2): 1-34.

28. Bhoola K.D., Elson C.J., Dieppe P.A. Kinins--key mediators in inflammatory arthritis? *Br J Rheumatol.* 1992; 31(8): 509-18.

29. Yao YY, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion rescues failing myocardium after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2007; 13(7): 588-96.

30. Smith RS Jr, Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol Chem.* 2008; 389(6): 725-30.

31. Bhoola K.D., Ramsaroop R., Plendl J., Cassim B., Dlamini Z., Naicker S. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem.* 2001; 382(1): 77-89.

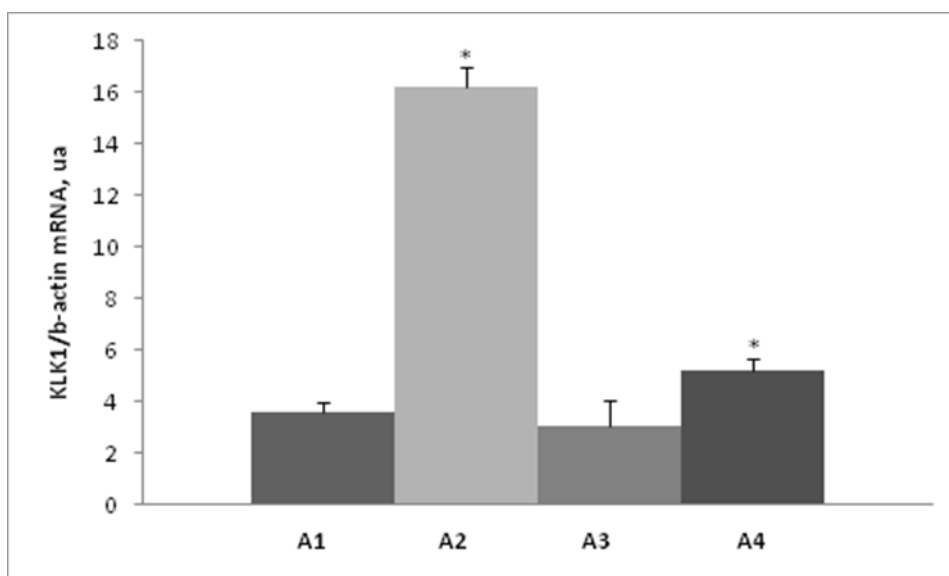


Figure 1. Quantification of tissue prekallikrein mRNA by Real time PCR. Tissue prekallikrein expression was normalised using β -actin as endogenous control and expressed as arbitrary unity. Experimental groups: A1 (saline only), A2 (carrageenan only), A3 (laser only) and A4 (carrageenan + laser irradiation). Tissue prekallikrein expression was induced after carrageenan injection. Low level laser therapy was able to decrease tissue prekallikrein mRNA expression. * $p < 0,05$.

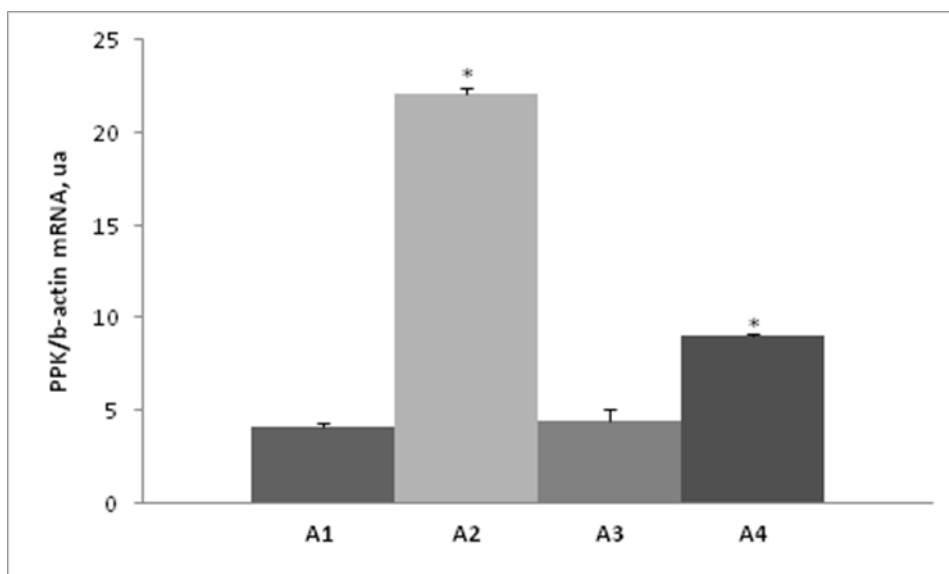


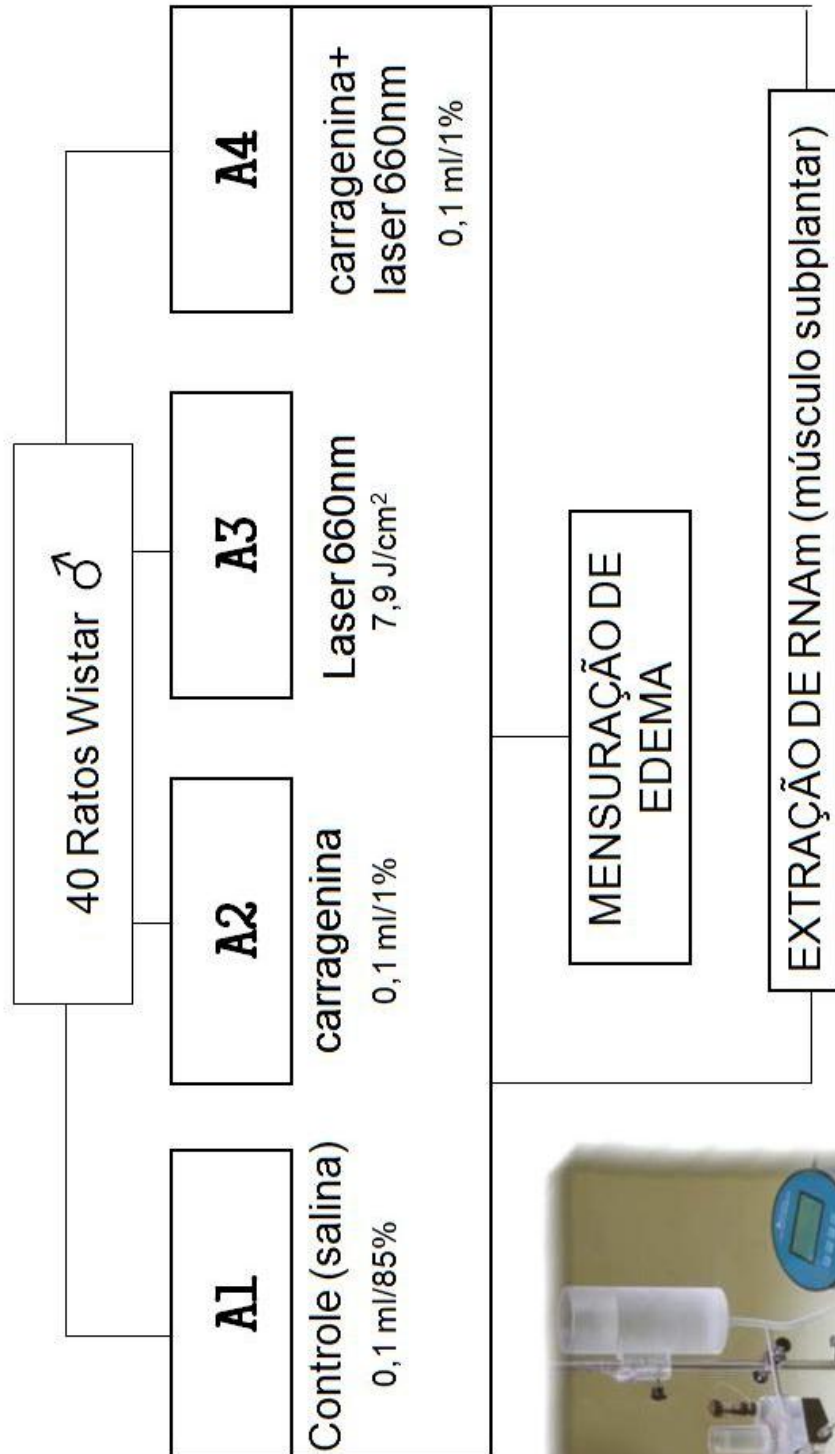
Figure 2. Quantification of plasma prekallikrein mRNA by Real time PCR. Tissue prekallikrein expression was normalised using β -actin as endogenous control and expressed as arbitrary unity. Experimental groups: A1 (saline only), A2 (carrageenan only), A3 (laser only) and A4 (carrageenan + laser irradiation). Plasma prekallikrein expression was induced after carrageenan injection. Low level laser therapy was able to decrease plasma prekallikrein mRNA expression. * $p < 0,05$.

Table 1. Edema volume determined by plethysmometry in inflamed rat paw.

Animal Groups	Edema volume (ml)
A1	0.03 \pm 0.01
A2 [§]	1.15 \pm 0.09
A2 [¥]	2.75 \pm 0.17
A3	0.03 \pm 0.01
A4	0.76 \pm 0.03*

Experimental groups: A1 (saline only), A2 (carrageenan only), A3 (laser only) and A4 (carrageenan + laser irradiation). Edema volume evolution was accompanied after 1 hour[§] and 2 to 4 hours[¥] after carrageenan inoculation. Data are mean \pm SE (n=10). A statistical analysis by Student's t-test indicated that $p < 0.05$ (*).

DESENHO EXPERIMENTAL



ANÁLISE EXPRESSÃO GÊNICA (PCR em tempo real)

