

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

FERNANDO PEREIRA CARLOS

**ESTUDO DA FOTOTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NO
MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA NO JOELHO
DE RATOS**

São Paulo, SP
2011

FERNANDO PEREIRA CARLOS

**ESTUDO DA FOTOTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NO
MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA NO JOELHO
DE RATOS**

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

Orientador Prof^a. Dr^a. Stella Regina Zamuner

São Paulo, SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Carlos, Fernando Pereira

Estudo da Fototerapia de baixa potência no modelo de inflamação aguda induzida no joelho de ratos./ Fernando Pereira Carlos. 2011. 48 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE - Ciências da Reabilitação, São Paulo, 2011.

Orientador (a): Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

1. Inflamação. 2. Artrite. 3. Laser de baixa potência. 4. Tecido. 5. (LBT). 6. LED. 7. Ratos. 8. Osteoartrite.

I. Zamuner, Stella Regina

CDU 615.8

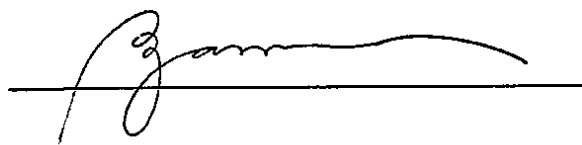
São Paulo, 15 de dezembro de 2011.

TERMO DE APROVAÇÃO

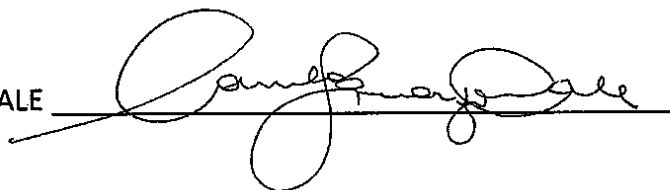
Aluno: FERNANDO PEREIRA CARLOS

Título da Dissertação: "ESTUDO DA FOTOTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NO MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA NO JOELHO DE RATOS"

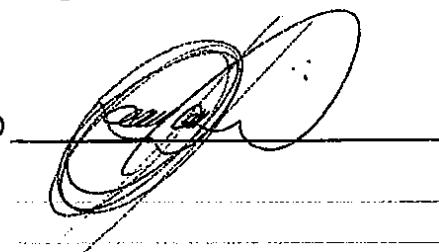
Presidente PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. CAMILA SQUARZONI DALE



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



AGRADECIMENTOS

Várias pessoas contribuíram para esse trabalho. A todas elas deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Os meus pais **Antonio Pereira Carlos** e **Waldeth Silva Pereira** por todo amor, e por me ensinar o valor da educação, e não desistir mediante as dificuldades.

Aos meus irmãos **Elza Pereira Carlos**, **Elizabeth Machado**, e **Flávio Silva Pereira** por sempre acreditar em mim.

A minha noiva **Priscila Carvalho Corrêa** pelo carinho, amor, incentivo pela sua paciência, e compreensão nos dias difíceis.

À minha irmã do coração **Renata Olivo** pela amizade sincera, pelo incentivo nos momentos difíceis, pela disposição em me ajudar sempre, muito obrigada.

À minha orientadora **Profa. Dra. Stella Regina Zamuner**, que sempre esteve presente em todas as etapas da minha vida profissional e a quem devo minha trajetória até aqui, sempre foi e será um exemplo pra mim de competência, capacidade, e paciência.

À **Profa. Cristiane França**, por me ensinar a técnica de H&E importante para este trabalho.

À **Profa. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari**, por me ensinar a quantificar os géis de zimografia.

Aos **Prof(s). Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho** e **Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior** pelas críticas construtivas e suas correções sempre pertinentes que contribuíram muito para esse trabalho.

À **Profa. Dra. Maricilia Costa Silva** pela doação de anticorpos para dosagem de interleucinas que propiciaram este estudo.

A todos os **professores** do programa de Mestrado em Ciências da Reabilitação que de uma maneira ou outra contribuíram para este trabalho com seus ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica, **Eliadina Lemos e Tales de Queiros** que colaboram de maneira fundamental para a realização de todos os experimentos.

A todos os funcionários da Uninove, principalmente à **Kátia Maria, Tábata Oliveira, Ramiro, Felipe** auxiliou nas atividades laboratoriais.

Principalmente a Deus por encontrar na meditação de suas palavra luz e força para os meus caminhos.

RESUMO

A artrite aguda do joelho é a desordem da articulação comum, e sua prevalência aumenta em paralelo com o aumento da idade, é uma das mais freqüentes causas de dor, perda da função e afastamento das atividades laborativas em adultos. Muitos tratamentos são utilizados no tratamento da dor associada à artrite reumatóide. Drogas anti-inflamatórias não esteróideais (NSAIDs), drogas anti-reumatóides entre outros, causam efeitos adversos, quando usadas por períodos prolongados, e não são efetivos em vários pacientes. Por esse motivo, é incessante a busca de novas terapias para o tratamento da mesma. A terapia não invasiva e fisiológica, como a terapia laser de baixa potência (LBP), pode ser importante na manutenção da inflamação e dor articular a longo termo.

O tratamento com o LBP tem sido introduzido na prática clínica para tratar afecções inflamatórias. No entanto, o mecanismo de ação do efeito do LBP em processos inflamatórios não está totalmente elucidado.

Dessa maneira, a proposta deste trabalho foi estudar os efeitos do tratamento fototerapêutico na artrite aguda induzida por zymosan, em joelhos de ratos, no que diz respeito à ação do laser e LED na migração de células inflamatórias para a cavidade articular, na liberação de mediadores pró-inflamatórios e metaloproteinases. O tratamento com laser (660 nm), imediatamente, 1ª e 2ªh após indução inflamatória inibiu significativamente a o influxo de leucócitos para a cavidade articular, a liberação das citocinas IL-1 e IL-6 e também a expressão de metaloproteinases-2 e 9. Sendo que o tratamento com LED (640 nm) diminuiu o influxo de leucócitos, a expressão de metaloproteinase, mas não a liberação das citocinas inflamatórias. Estes resultados demonstraram que os laser 685nm e LED têm um efeito anti-inflamatório em artrite induzida por zymosan, no entanto o LED não apresentou redução de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: Inflamação; artrite; laser de baixa potência; LED.

ABSTRACT

The acute arthritis of the knee is a common joint disorder, and its prevalence increases in parallel with increasing age, is one of the most frequent causes of pain, loss of function and removal of work activities in adults. Many treatments are used to treat pain associated with rheumatoid arthritis. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), anti-rheumatic drugs among others, cause adverse effects when used for prolonged periods, and are not effective in many patients. For this reason, it is the incessant search for new therapies to treat the arthritis. The physiological and noninvasive therapy, such as low level laser therapy (LLL), may be important in maintaining the inflammation and joint pain long term.

Treatment with LLL has been introduced in clinical practice to treat inflammatory conditions. However, the mechanism of the effect of LLL in inflammatory processes is not fully elucidated.

Thus, the aim was to study the effects of phototherapeutic treatment in acute arthritis induced by zymosan in the rat knee, looking to migration of inflammatory cells into the joint cavity, the release of proinflammatory mediators and metalloproteinase. Treatment with laser (660 nm) immediately, 1st and 2h after induction of inflammation significantly inhibited the influx of leukocytes into the joint cavity, the release of IL-1 and IL-6 and also the expression of matrix metalloproteinase-2 and 9. The treatment with LED (640 nm) decreased the influx of leukocytes, the expression of metalloproteinase but had no effect on the release of inflammatory cytokines. These results showed that the 685nm laser and LED have an anti-inflammatory effect in arthritis induced by zymosan, however the LED is not effective in reducing pro-inflammatory cytokines.

Keywords: inflammation, arthritis, low level laser, LED.

SUMÁRIO

Lista de figuras	VIII
Lista de quadros	IX
Lista de abreviaturas	X
Contextualização	
1.1- Inflamação articular aguda	1
1.2- Considerações gerais sobre a inflamação articular e terapia medicamentosa.	1
2- Interleucina-1 β (IL-1 β)	2
2.1- Interleucina-6 (IL-6)	3
3- Metaloproteinases	3
4- Laser de baixa potência	4
4.1- Light Emitting Diode (LED)	5
5- Inflamação articular aguda e terapia de baixa potência (TBP)	6
6- Objetivo	8
7- Materiais e Métodos	9
7.1- Animais	9
7.2- Protocolo experimental	9
7.3- Dexametasona	9
7.4- Terapia com Laser e LED	9
7.5- Protocolo de eutanásia	10

7.6-	Indução da reação inflamatória na cavidade articular	10
7.7-	Coleta e contagem de leucócito	10
7.8-	Quantificação das concentrações de interleucina IL-1B β e IL-6	11
7.9-	Determinação da atividade das metaloproteinases matriciais MMP-2 e MMP-9	12
7.10-	Histopatologia da sinóvia	12
7.11-	Análise estatística	13
8	Resultados do artigo	15
8.1-	Efeito da aplicação do laser 660 nm e LED 640 nm sobre o influxo de leucócitos na inflamação articular aguda induzida por Zy.	15
8.2-	Efeito da aplicação do laser 660 nm e LED 640 nm sobre o influxo de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) na inflamação articular aguda induzida por Zy.	15
8.3-	Efeito do tratamento laser e LED de baixa potência sobre a liberação de IL-6 na inflamação articular aguda induzida por zymosan.	18
8.4-	8.4- Efeito do tratamento laser e LED de baixa potência sobre a liberação de IL-1 β na inflamação articular aguda induzida por zymosan.	19
8.5-	Análise histopatológica das sinóvias.	20
8.5.1-	Representação histológica de sinóvia 6 h após injeção i.a. de salina ou zymosan.	20
8.5.2-	Representação histopatológica do efeito do tratamento laser e LED de baixa potência 6 horas após indução da inflamação.	21
8.5.3-	Representação histopatológica do efeito do tratamento laser e LED de baixa potência 12 horas após indução da inflamação.	22
8.6-	Atividade de gelatinase no sobrenadante de lavado articular	23
8.6.1-	Atividade de MMP-9 após a indução da inflamação e tratamentos com Laser ou LED.	23
8.6.2-	Atividade de MMP-2 após a indução da inflamação e tratamentos com Laser ou LED.	25

9-	Discussão	27
10-	Conclusão	31
11-	Referências Bibliográficas	32
12-	Apêndice	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Delineamento do protocolo de experimentos	14
Figura 2-	Efeito do laser 660 nm, LED 640 nm e dexametasona na redução do Influxo de leucócitos para a cavidade articular de ratos induzido pela injeção de zymosan.	17
Figura 3-	Efeito do tratamento laser e LED de baixa potência sobre a liberação de IL-6 na inflamação articular induzida por zymosan.	18
Figura 4-	Efeito do tratamento laser e LED de baixa potência sobre a liberação de IL-1 β na inflamação articular induzida por zymosan.	19
Figura 5-	Demonstração histopatológica da sinóvia de ratos	20
Figura 6-	Corte histológico de sinóvia de 6 h após a injeção de zymosan e tratamento com laser ou LED.	21
Figura 7-	Corte histológico de sinóvia de 12 h após a injeção de zymosan e tratamento com laser ou LED.	22
Figura 8-	Efeito do laser, LED sobre a concentração de proteinase (gelatinase) MMP-9 coletada do lavado articular após inflamação induzida zymosan.	24
Figura 9-	Efeito do laser, LED sobre a concentração de proteinase (gelatinase) MMP-2 coletada do lavado articular após inflamação induzida zymosan.	26

LISTA DE TABELAS

7.4-	Terapia com Laser e LED:	9
-------------	---------------------------------	----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
AINH	Antiinflamatório não hormonal
AR	Artrite Reumatóide
Azy	Artrite induzida por Zymosan
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FAP	Fator ativador de plaquetas
HILT	Laser de alta intensidade
i.a	Intraarticular
i.p	Intraperitoneal
ICAMs	Moléculas de adesão intercelular
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFN-γ	Interferon gama
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolissacaridio
Laser	Amplificação de Luz por emissão estimulada da radiação
LBP	Laser de baixa potencia
LED	Diodo emissor de luz

LLLT	Low Level Laser
LPA	Laser de alta potência
MMP	Metaloproteinase
µL	Micro litros
NSAIDs	Drogas antiinflamatórias não esteróides
NO	Óxido nítrico síntese
PGE₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
PDGF	Fator de crescimento derivado de Plaqueta
PAF	Fator de agregação de plaquetas
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TBP	Terapia de baixa potência
Zy	Zymosan

1. Contextualização

1.1- Inflamação articular aguda

Os distúrbios músculo-esqueléticos como a artrite, atingem a maior parte população, e representam um problema de ordem mundial ¹. Os maiores sintomas são edema limitação da amplitude de movimentos e dor ².

As causas desta patologia são desconhecidas, sendo assim denominada com multifatorial, dentre alguns fatores que podem influenciar seu aparecimento destaca-se:

- a) Idade (quanto maior a idade maior é a incidência);
- b) Sobrecarga articular por sobrepeso;
- c) Dano ou instabilidade na articulação provocada por exercício exagerado;
- d) Pós-cirúrgico articular

1.2- CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO ARTICULAR E TERAPIA MEDICAMENTOSA

A articulação é constituída por duas superfícies ósseas, recobertas pela cartilagem articular, ligamentos e membrana sinovial (cápsula fibrosa), a qual delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. A membrana sinovial é constituída por sinoviócitos do tipo A (macrófagos sinoviais) e do tipo B (fibroblastos sinoviais), além de vasos sanguíneos e nervos sensoriais. A cartilagem articular é composta, predominantemente, pela matriz extracelular (colágenos, proteoglicanos e ácido hialurônico) e pelos condrócitos ³.

Em modelos experimentais de inflamação articular, verificou-se que o tecido sinovial inflamado apresenta intenso infiltrado celular, caracterizado principalmente por células polimorfonucleares, como neutrófilos, na fase aguda, e por linfócitos e macrófagos células mononucleares que se apresentam principalmente em uma fase crônica ^{4, 5}. A mobilização destas células é mediada principalmente por citocinas como (IL-1, -2, -6), fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ , (INF- γ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de transformação de crescimento- α (TGF- α) e o óxido nítrico (NO) ^{6; 7; 8}, ainda tem sido demonstrado correlação destas citocinas com as metaloproteinases (MMPs) cujo o papel central e a degradação do tecido colágeno presente na capsula articular e na cartilagem

articular ⁹.

Anti-inflamatórios não hormonais (AINEs) tem sido usados, de várias formas. A cada ano, cerca de 129 bilhões de comprimidos de aspirina são consumidos no mundo e, em pessoas idosas, contribui para 100.000 admissões hospitalares e 16.500 mortes por ano, devido a complicações relacionadas com o trato gastrointestinal. Por outro lado a literatura salienta ainda que, em processos articulares crônicos, o laser é capaz de reduzir a dor.

2- INTERLEUCINA-1 (IL-1)

A interleucina-1 (IL-1) foi inicialmente descrita como um pirogênio endógeno. Esta citocina possui duas formas moleculares: IL-1 α e IL-1 β , ambas com peso molecular próximo de 17KDa e apresentam cerca de 30% de homologia estrutural entre si. Embora as duas formas de IL-1 sejam produtos de genes distintos, ligam-se aos mesmos receptores de superfície celular (IL-1R tipo I e tipo II) e são produzidos em resposta a vários estímulos, que incluem o LPS e outros produtos bacterianos além de citocinas como o TNF e o INF- γ para revisão vide ^{10, 11, 12}.

A IL-1 é sintetizada por fibroblastos, queratinócitos, células de Langerhans, linfócitos T e B, células “natural killer” ¹³, células endoteliais e leucócitos. As ações biológicas da IL-1 são múltiplas e diversificadas. O principal efeito biológico desta citocina é mediar o processo inflamatório. A IL-1 induz febre por sua ação direta sobre o centro termorregulador do hipotálamo, mediada pelo aumento de síntese e liberação de PGE₂. Ainda, aumenta a síntese e secreção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e promove acúmulo de granulócitos, particularmente de neutrófilos, nos sítios de inflamação, através do aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. A IL-1 causa edema e induz a produção de quimiocinas como a IL-8 e de outras citocinas como o TNF- α e a IL-6 para revisão vide ^{10, 11, 12, 14, 15}.

2.1- INTERLEUCINA-6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6) é uma glicoproteína de peso molecular de 26 kDa e, historicamente, recebeu várias designações, como interferon beta 2, fator de crescimento de hibridoma, fator de crescimento de plástocitoma, fator estimulador de células B-2 e fator estimulador de hepatócitos, os quais refletem o amplo espectro de atividades biológicas a ela relacionadas ^{14, 16}.

Esta citocina é produzida por vários tipos celulares como leucócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células tumorais. A IL-6 participa de diferentes mecanismos de defesa como a resposta imune, reações de fase aguda e hematopoiese. Portanto, as principais atividades biológicas desta citocina envolvem a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e conseqüente produção de imunoglobulinas (IgM, IgG e IgA), ativação de linfócitos T, indução da produção de IL-2 e do receptor da IL-2 por estas células, proliferação de células progenitoras hematopoiéticas e síntese de proteínas de fase aguda (para revisão vide ¹⁵).

A IL-6 não é sintetizada pelas células em condições basais, mas a sua expressão é rapidamente induzida em processos inflamatórios. Algumas citocinas como a IL-1 e TNF- α induzem a produção da IL-6 ^{16, 17}. Além disso, a IL-6 desempenha papel na indução e propagação da resposta inflamatória, pois está relacionada à atividade pirogênica e ao aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 em células endoteliais. Por outro lado, a IL-6 contribui também para a resolução dos processos inflamatórios, modulando negativamente a produção de IL-1 e TNF- α , para revisão vide ^{16, 18}.

3. METALOPROTEINASE

As MMPs (*matrix metalloproteinases*) são um grupo de enzimas dependentes de zinco ¹⁹ sintetizadas pela sinóvia traumatizada e pelos condrócitos na cartilagem articular na doença degenerativa ²⁰. Este grupo de enzimas pode ser dividido em estromelisina, collagenases e gelatinases ^{19, 20}; as quais as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) quebram a triplahélice de colágeno intersticial; as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) que atuam degradando o colágeno e as estromelisinases degradam as proteoglicanas ²⁰.

A síntese de estromelisina (MMP-3) e collagenase (MMP-1) pelos condrócitos e

sinoviócitos é estimulada por mediadores inflamatórios como a interleucina-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α)²¹ enquanto inibidores teciduais de MMP (TIMPs) controlam a destruição de tecido conectivo por bloqueio da ação de enzimas ativadas e por prevenir ativação de proenzimas¹⁹.

As enzimas têm papel de homeostase do tecido conectivo. Na doença articular, elas podem ser responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular da cartilagem como o colágeno e as proteoglicanas¹⁹.

4- LASER DE BAIXA POTÊNCIA

A palavra LASER é um acrônimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, a qual não é ionizante. As características que diferenciam a luz laser das outras fontes luminosas são monocromaticidade, colimação, coerência espacial e temporal. A monocromaticidade significa que a luz laser emitida apresenta apenas um único comprimento de onda, o qual é definido pelo meio ativo e pela refletividade dos espelhos do laser. A maioria dos lasers apresenta feixes colimados, isto é, com um mínimo ângulo de divergência. A coerência é a sincronicidade das ondas de luz, onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo.^{22, 23, 24}.

Os lasers são divididos em: Lasers de Baixa Potência (LBP) (Lasers não-cirúrgicos ou LLLT - Low Level Laser) e Lasers de Alta Potência (LAP) (Lasers cirúrgicos ou HILT – High Intensity Laser)²⁵.

O princípio básico da laserterapia é a capacidade de alterar o comportamento celular, na ausência de aquecimento²⁶. A radiação com o LBP promove modificações ou efeitos na zona irradiada ou zona circundante. Esta radiação faz com que a energia possa provocar mudanças nas moléculas, que por sua vez, promoveriam respostas biológicas²⁷.

Estudos mostram, que a forma de energia utilizada pelas células é o ATP; as células absorvem os fótons e transformam sua energia em ATP, que é então utilizado para gerar processos metabólicos, sintetizar DNA, RNA, proteínas, enzimas e outros produtos necessários para reparar ou regenerar os componentes celulares e restaurar a homeostase. Ainda, a irradiação laser exerce um estímulo sobre as mitocôndreas celulares provocando um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP) no interior das células e consequente aceleração da mitose. Assim,

ocorrerá um aumento do consumo de oxigênio e ativação da respiração celular, eliminando as atividades anaeróbicas ocorridas em um processo inflamatório^{28, 29, 30} núbia. O incremento de ATP, favorece também, o aporte energético para funções importantes como o transporte da membrana, síntese de proteínas e contração muscular²⁹.

Pesquisas têm demonstrado que as radiações laser de baixa potência apresentam efeitos antiinflamatórios^{31, 32, 33, 34, 35} e efeitos analgésicos^{36, 37, 38, 39} e que o maior potencial clínico de aplicação para o LBP é o tratamento de uma variedade de doenças autoimunes e inflamatórias, tais como, artrite reumatóide, gota, pelurisia e peritonite⁴⁰. Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos do LBP sobre as células, vale ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação do laser sobre os tecidos biológicos, ainda não são conclusivas, portanto estudos adicionais são necessários.

4.1- LIGHT EMITTING DIODE (LED)

O LED (Light Emitting Diode) é um diodo emissor de luz, que quando energizado emite luz não coerente. É uma luz que permite a sua utilização sem que haja a necessidade de filtros ópticos coletores. São dispositivos semicondutores, apresentam grande eficiência de conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência. Tem como característica principal, conduzir a corrente elétrica em um único sentido⁴¹.

A terapia com LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a terapia LBP (Laser de Baixa Potência). O aumento da atividade celular, tanto em divisão como em síntese, têm sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz. Este deve possuir uma energia suficiente para produzir reações moleculares. A fotobiomodulação tem como característica a possibilidade de aplicação em vários métodos terapêuticos empregando diferentes fontes emissoras de luz⁴².

Atualmente os LEDs estão sendo investigados na área biológica como uma alternativa para as terapias que utilizam laser de baixa potência (LBP), tendo em vista o seu baixo custo, praticidade e baixo consumo de energia⁴³.

Ainda que vários estudos atestem o efeito benéfico da terapia com LED, somente o nosso estudo sobre artrite em joelho, tratada com LED, foi publicado até

o momento ⁴⁴. O desenvolvimento desta terapia poderia contribuir nos sistemas de saúde públicos e particulares, otimizando o processo de reabilitação de pacientes através de uma terapia de baixo custo.

5- INFLAMAÇÃO ARTICULAR AGUDA E TERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA (TBP)

Muitos tratamentos são utilizados no tratamento da dor associada à artrite. Drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAIDs), drogas anti-reumatóides entre outros, mas os efeitos adversos quando usadas por períodos prolongados não são efetivos em vários pacientes ^{45, 46}. No entanto, a terapia não invasiva e fisiológica, como a TBP, pode ser importante na manutenção da dor a longo termo.

Os mecanismos que envolvem a efetividade do TBP para a melhora da dor na artrite inflamatória não está clara. Um efeito direto supressivo da radiação de 830 nm na condução neural *in vitro* foi observado e pode contribuir para o alívio da dor pela TBP ⁴⁷. Um estudo *in vitro* demonstrou que a radiação de 830 nm inibiu a produção de PGE₂, o maior mediador inflamatório, por fibroblastos da gengiva, sugerindo que o mesmo efeito pode ocorrer em sinoviócitos ⁴⁸. Além disso, um estudo *in vivo*, usando modelo de artrite em ratos, mostrou que usando a radiação de 810 nm reduziu o edema da junta, correlacionando com a redução dos níveis de PGE₂ ⁴⁹. Ademais, foi demonstrado que a TBP diminui os níveis de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β em inflamação aguda ⁵⁰.

Poucos trabalhos na literatura mostram os mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório do laser e do LED. Campana⁵¹ estudaram o processo inflamatório através do modelo de artrite reumatóide, e observaram que a TBP normalizou os níveis plasmáticos de fibrinogênio e PGE₂ e através do estudo histológico induziu a involução granulomatosa.

Nosso laboratório, estudando a Inflamação articular no joelhos de rato induzida por zymosan mostrou que o laser foi efetivo na reversão da hiperalgesia e capaz de reduzir significativamente o aumento da permeabilidade vascular, o edema, e a migração de células para a cavidade articular. O LED na mesma dosagem do laser causou uma diminuição do influxo leucocitário para o foco de lesão ⁴⁴.

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados na área de inflamação, os mecanismos de ação da TBP nos diversos tecidos e nas diversas patologias, bem como na inflamação articular, ainda não estão esclarecidos ²², justificando estudos

adicionais.

Assim sendo, com este projeto de pesquisa, desenvolver-se-á procedimentos para o estudo dos mecanismos da TBP sobre a inflamação articular, em joelhos de ratos, induzidos por zymosan (zy).

6. Objetivo:

6.1- Geral: O objetivo geral deste estudo visa compreender e comparar os efeitos do laser e do LED de baixa potência sobre suas ações na inflamação aguda de joelho.

6.2- Específico:

Investigar os efeitos do Laser e LED de baixa potência, na artrite de joelho, no que se refere:

- Migração de leucócitos para a cavidade articular;
- a liberação de citocinas IL-1 β e IL-6;
- liberação das metaloproteinases matriciais MMP-2 e MMP-9 no lavado articular.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1- Animais:

Para este experimento utilizamos 100 ratos da raça Wistar, com aproximadamente 250 – 270 g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de 370×260×170 mm com três a quatro ratos por cada, abastecidas com ração e água *ad libidum* e mantidos em ciclo de claro escuro por 12 h.

7.2- Protocolo experimental:

Os ratos foram divididos em 5 grupos com 5 animais por grupo:

Grupo 1: controle;

Grupo 2: zymosan;

Grupo 3: Zymosan + laser 680 nm;

Grupo 4: zymosan + LED 635 nm;

Grupo 5: Dexametasona.

7.3- Dexametasona:

A dexametasona foi utilizada como droga antiinflamatória, a qual foi administrada na dose de 4 mg/kg^{52, 53}, via i.p., na primeira hora antes indução da reação inflamatória, no grupo 05.

7.4- Terapia com Laser e LED:

O tratamento foi realizado com a utilização do laser de baixa potência, semiconductor (modelo Twin laser® MMOptis, São Carlos, S.P. Brazil) e LED (laboratório de instrumentação biomedica, unicastelo).

Tabela 1 – Protocolo de irradiação laser e LED

Parâmetros	Valores do Laser	Valores do LED
Comprimento de onda	660 nm	640 nm
Densidade de energia (DE)	2,5 J/cm ²	2,5 J/cm ²
E	0,1	2,0
Potência	10 mW	96 mW
Tempo	10 "	21 "
Área Irradiada	0,04 cm ²	0,8 cm ²
Aplicação	Ponto único	Ponto único

O aparelho laser e LEDs foram cedido gentilmente pelo professor Dr. Carlos José de Lima do laboratório de Instrumentação Optobiomédica do Universidade UNICASTELO. A irradiação laser e LEDs foram realizadas, imediatamente, primeira e terceira hora após a administração do zymosan ou salina (controle). As dose foram escolhidas com base em estudos prévios do nosso laboratório que mostraram um efeito benéfico da terapia de baixa potência, como antiinflamatório, na artrite induzida por zymosan⁴⁴.

7.5- Protocolo de eutanásia:

Os animais foram mortos em atmosfera de CO₂.

7.6- Indução da reação inflamatória na cavidade articular:

Os animais foram submetidos à anestesia com Ketamina (30mg/Kg) associada à Xilazina (5 mg/Kg) por via intraperitoneal. Após tricotomia, foi realizada a dissecação dos joelhos dos animais até o plano subcutâneo, para a administração intra-articular (i.a.) de 50 µL de solução fisiológica apirogênica ou zymosan (1 mg em 50 µL de salina), o grupo controle recebeu injeção de salina apirogênica no mesmo volume. Após determinados intervalos de tempo, o lavado articular foi coletado após duas injeções de 400 µL de tampão fosfato-salina, pH 7,2 (PBS), contendo 5 UI/mL de heparina. A seguir, o lavado articular foi centrifugado a 800 rpm por 6 minutos. O precipitado celular e o sobrenadante foram separados e guardados em freezer -80 até o momento de uso. Todos os procedimentos cirúrgicos foram conduzidos de acordo com o The guide for the care and use of laboratorial animals (DHEW Publication, Bethesda, MD, EUA, 1980). Todos os esforços foram empregados para minimizar o sofrimento dos animais e limitar o seu número necessário às investigações.

7.7- Coleta e contagem de leucócitos:

Os leucócitos recrutados para a cavidade articular, foram quantificados após a indução da reação inflamatória, como descrito no item 7.6. Após 6 horas da injeção do zymosan ou salina, os animais foram sacrificados. Foi realizada a dissecação dos joelhos com a retirada do ligamento patelo-tibial para a exposição da superfície externa da membrana sinovial. O lavado articular foi coletado da cavidade da articulação do joelho após duas injeções totalizando 400 µL de tampão fosfato-

salina, pH 7,2 (PBS), contendo 5 UI/mL de heparina. A seguir, o lavado articular foi centrifugado a 800 rpm por 6 minutos. Depois disso, o precipitado celular foi ressuspenso em PBS para determinação das células totais em hemocítmetro de Neubauer, em microscópio de luz, após diluição em líquido de Turk. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em lâminas feitas em citocentrífuga e coradas com Instant-Prov. Foram contadas pelo menos 100 células, classificadas como polimorfonucleares ou mononucleares, com base em critérios de morfologia convencional.

7.8- Quantificação das concentrações de interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β :

Os lavados articulares foram coletados 1, 3 e 6 horas após a injeção do zymosan ou solução fisiológica apirogênica, para a determinação de IL-6 e IL-1 β . Após a centrifugação do lavado articular, a 1000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis de IL-6 e IL-1 β , conforme descrito por ⁵⁴. Em resumo, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ L do anticorpo de captura (anti- IL-1 β ou anti-IL-6), diluídos em PBS, e incubadas por 2 horas, a 37°C. Após esse período, os sítios livres foram bloqueados com 200 μ L de tampão de bloqueio, contendo gelatina 3% em PBS e as placas incubadas por 18 horas, a 4°C. Após lavagem da placa com PBS/Tween20 0,05%, 50 μ L de amostras ou padrões (recombinantes) foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 1 hora, a 37°C. A placa foi lavada com de PBS/Tween20 0,05% e a ligação à IL-6 ou IL-1 β foi detectada pela adição do anticorpo de captura biotinilado, diluído em PBS-gelatina 1% (5 μ g/mL, 50 μ L/poço), seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Após lavagem da placa, 50 μ L de avidina-fosfatase alcalina, na diluição de 1:15000 em PBS-gelatina 1%, foram adicionados e incubados por 1 hora à temperatura ambiente, lavando-se em seguida. Para a revelação, foi utilizado o substrato cromógeno p-nitrofenil fosfato (200 μ L/mL), diluído em 1:5 em TRIS-HCl ph 9,8 1 M e salina 0,5 M. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan) a 405 nm e os resultados confrontados a uma curva padrão efetuada com IL-6 ou IL-1 β recombinante para a determinação da concentração de cada citocina, representada em ng/mL.

7.9- Determinação da atividade das metaloproteinases matriciais MMP-2 e MMP-9:

Para a realização da zimografia de proteínas, alíquotas com 3µl de soro foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100V a 40°C) em gel de poliacrilamida a 8%, contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5%, duas vezes por 15 minutos. Posteriormente, os géis foram novamente lavados duas vezes com o tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por cinco minutos, sendo em seguida incubados por 14 horas a 37°C no mesmo tampão contendo 5Mm de cloreto de cálcio e 1µM de cloreto de zinco. Após a incubação, os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue 0,25%, possibilitando a visualização da atividade gelatinolítica das MMP -2 e -9. As bandas de proteínas obtidas na zimografia foram digitalizadas, convertidas em bandas escuras sobre um fundo claro e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica das bandas das metaloproteinases -2 e -9. As imagens dos géis foram digitalizadas e analisadas pelo *software* de domínio público Image J.

7.10- Histopatologia das sinóvias

Após a coleta do lavado articular sinovial, a sinóvia foi coletada e fixada em formol a 10% seguindo-se do processamento por método de rotina até a inclusão em blocos de parafina. A desidratação e outras etapas do tratamento tiveram como objetivo a extração da água dos tecidos pela submersão dos mesmos em banhos com concentração crescente de etanol a 70% até absoluto. Este solvente foi então submetido por xilol, substância miscível com o meio de inclusão. Desta forma, os tecidos tornaram-se translúcidos, razão porque esta etapa foi denominada diafanização ou clareamento. Por último, foi realizada inclusão dos fragmentos mergulhados em parafina. Os cortes teciduais foram colocados em moldes retangulares formando blocos que foram subsequentemente seccionados por navalhas de aço de micrótomo de 4µm visando coloração por hematoxilina-eosina (H&E) e picrosirius red.

7.11- Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos por meio da estatística descritiva média \pm E. P. M. (erro padrão médio). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, vista a normalidade dos mesmos, submeteram-se análise de Variância (*ANOVA*) para médias independentes. Para análise de Variância significativa, aplicamos o pós teste de contraste entre médias de Tukey. Em ambos os testes o nível crítico de significância aceito foi de menor ou igual 0,05.

8. Resultados do Artigo

Resultados publicados na Revista Terapia Manual, v. 9, p. 773-778, 2011.

8.1- Efeito da aplicação do laser ou LED sobre o influxo de leucócitos na inflamação articular aguda induzida por zymosan.

O infiltrado leucocitário na cavidade articular foi avaliado no tempo de 6 h após a injeção de 1 mg/kg de zymosan. O tratamento com o laser na dose de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a e 2^a hora após induzida a artrite inibiu, de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos medido na 6^a hora de artrite, sendo que o influxo causado pelo zymosan foi de $2.156 \pm 504 \times 10^3/\text{mL}$ e o laser de $685 \text{ nm } 451 \pm 131 \times 10^3/\text{mL}$ (Fig. 2A), sendo 79% menor em relação ao grupo não tratado.

A aplicação do LED 640 nm na mesma dose usada para o laser inibiu significativamente ($p < 0,05$), o influxo de leucócitos sendo de $615 \pm 116 \times 10^3/\text{mL}$ na artrite induzida por zymosan (Fig. 2A) sendo 71% menor em relação ao grupo não tratado.

A administração da dexametasona na dose de 4 mg/kg, via i.p., na primeira hora antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo de leucócitos, medido na 6^a hora de inflamação articular, sendo de $513 \pm 80 \times 10^3/\text{mL}$, (Fig. 2A), sendo 76% mais eficaz em relação ao grupo não tratado.

8.2- Efeito da aplicação do laser ou LED sobre o influxo de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) na inflamação articular aguda induzida por zymosan.

Quanto à contagem diferencial de leucócitos observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de células PMN com o tratamento do laser na dose de 2,5J/cm², imediatamente, primeira e segunda hora após induzida a artrite, sendo de $564 \pm 245 \times 10^3/\text{mL}$ (61% mais eficaz que o grupo zymosan), enquanto o grupo zymosan apresentou $1.457 \pm 347 \times 10^3/\text{mL}$. Houve uma diminuição das células MN de $178 \pm 73 \times 10^3/\text{mL}$ (70% mais eficaz que o grupo zymosan) comparado ao grupo zymosan $598 \pm 150 \times 10^3/\text{mL}$ (Fig. 2B).

A aplicação do LED na mesma dose usada para o laser inibiu significativamente ($p < 0,05$), as células PMN ($337,9 \pm 80 \times 10^3/\text{mL}$) e as células MN ($263,7 \pm 44 \times 10^3/\text{mL}$) na inflamação articular induzida por zymosan (Fig. 2C), sendo 77% e 56% mais eficaz em relação ao grupo zymosan.

A administração da dexametasona na dose de 4 mg/ Kg, via i.p., na primeira hora antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$), o influxo de células e PMN ($412 \pm 115 \times 10^3/\text{mL}$) e MN ($126,6 \pm 24 \times 10^3/\text{mL}$) sendo 71% e 79% mais eficazes em relação ao grupo zymosan (Fig. 2C).

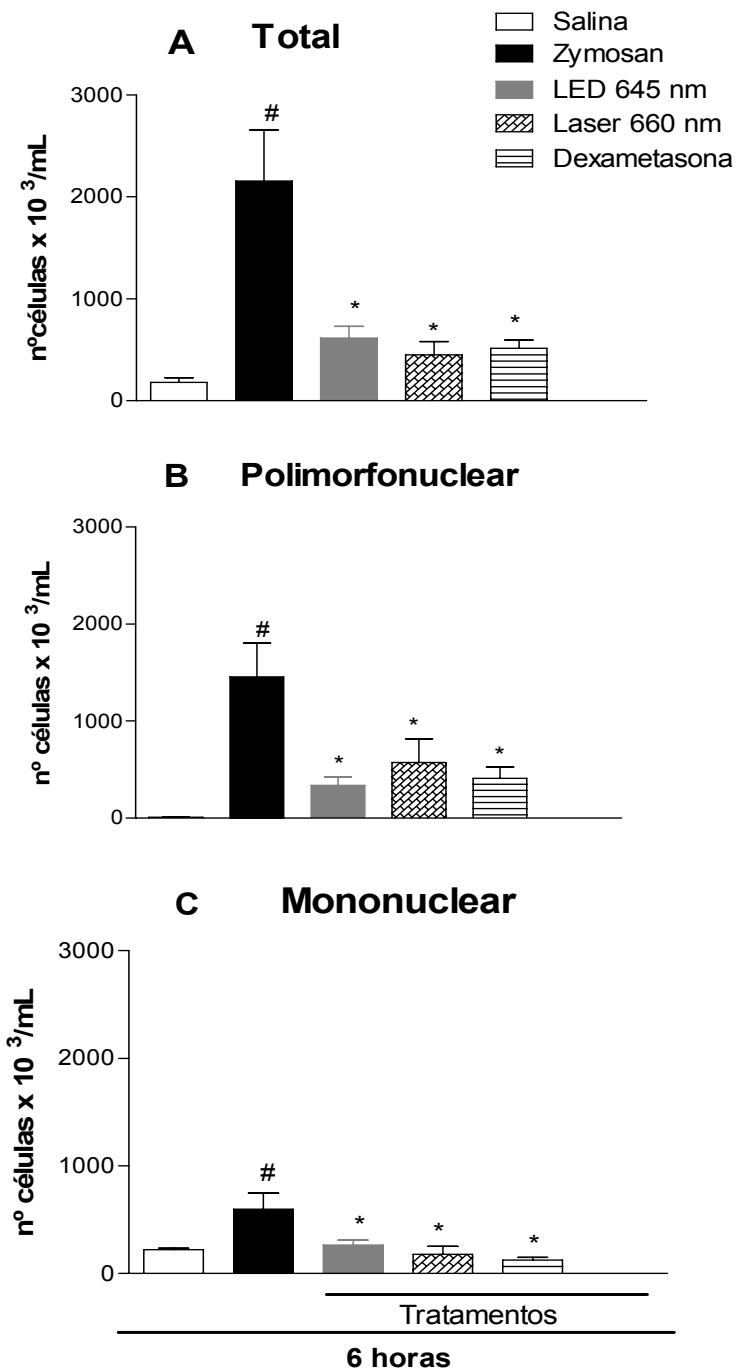


Figura 2- Efeito do laser 660 nm, LED 640 nm e dexametasona na redução do Influxo de leucócitos para a cavidade articular de ratos induzido pela injeção de Zy. Os animais receberam injeção i.p. de 1 mg/kg de zymosan. A dexametasona foi utilizada como controle antiinflamatório. **(A)** leucócitos totais, **(B)** polimorfonucleares (PMN) e **(C)**

mononucleares (MN). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. # $p < 0,05$ em relação a salina e * $p < 0,05$ em relação ao grupo zymosan (ANOVA).

8.3- Efeito do tratamento laser ou LED de baixa potência sobre a liberação de IL-6 na inflamação articular aguda induzida por zymosan.

As concentrações de IL-6 foram avaliadas no exsudato articular livre de células, 3 horas após a injeção i.a. de zymosan ou salina estéril (controle). O tratamento com laser diminuiu a liberação de IL-6, apresentando o mesmo efeito da Dexametasona (Fig. 3). O tratamento com o LED não foi eficiente para causar uma diminuição da produção de IL-6 no exsudato articular, coletado após a injeção de zymosan nos período estudado com a mesma densidade de energia empregada do laser (Fig. 3).

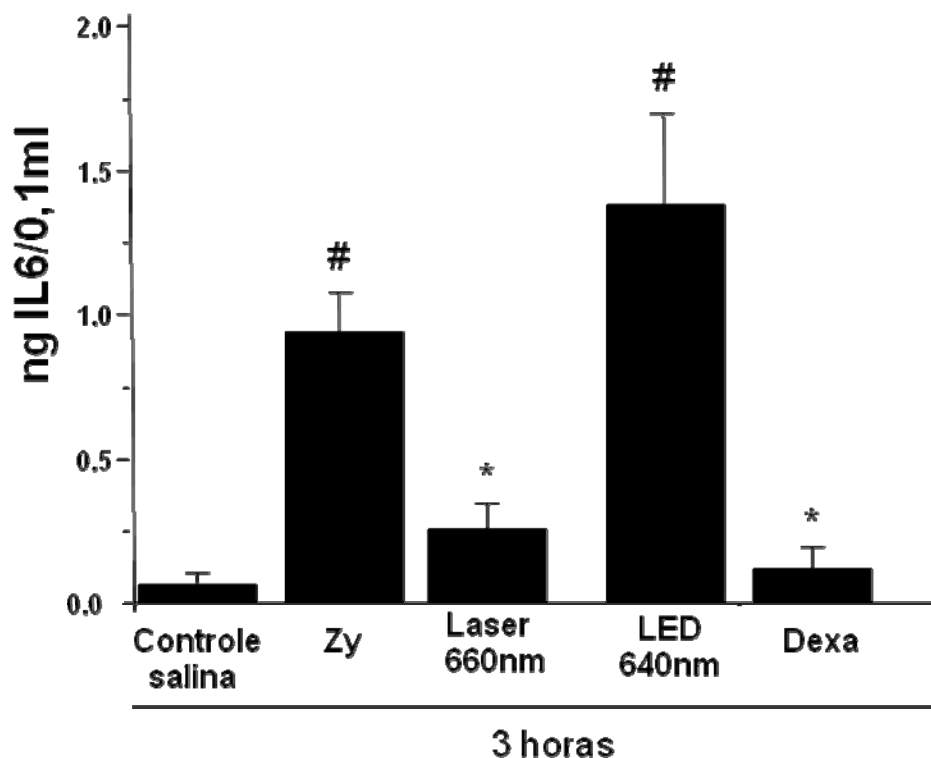


Figura 3- Efeito do tratamento laser e LED de baixa potência sobre a liberação de IL-6 na inflamação articular induzida por zymosan. Os animais foram injetados i.a. com os zymosan (1 mg/kg) ou salina (controle). As concentrações de IL-6 foram avaliadas por EIA em sobrenadante de lavado articular coletado 3 h após a injeção de zymosan. O tratamento com laser ou LED foi na dose de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a hora e 2^a hora, após a injeção de zymosan. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo zymosan, # comparado com o controle (ANOVA).

8.4- Efeito do tratamento laser ou LED de baixa potência sobre a liberação de IL-1 β na inflamação articular aguda induzida por zymosan.

Da mesma maneira, as concentrações de IL-1 β foram avaliadas no exsudato articular livre de células 3 horas após a injeção i.a. de zymosan ou salina estéril (controle). O tratamento com laser diminuiu a liberação de IL-1 β , apresentando o mesmo efeito da Dexametasona (Fig. 4). O tratamento com o LED não foi efetivo para causar uma diminuição da produção de IL-1 β no exsudato articular, coletado após a injeção de zymosan nos período estudado com a mesma densidade de energia empregada no laser. (Fig. 4).

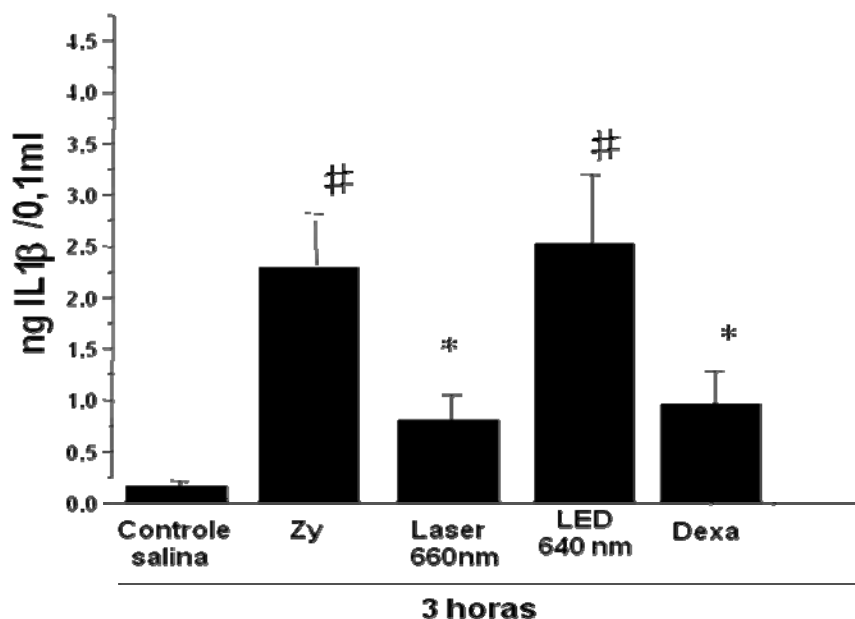


Figura 4- Efeito do tratamento laser e LED de baixa potência sobre a liberação de IL-1 β na inflamação articular induzida por zymosan. Os animais foram injetados i.a. com os zymosan (1 mg/kg) ou salina (controle). As concentrações de IL-1 β foram avaliadas por EIA em sobrenadante de lavado articular coletado 3 h, o tratamento com laser ou LED foi na densidade e energia de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a hora e 2^a hora, após a injeção de

zymosan. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo zymosan, # $p < 0,05$ comparado com o controle (ANOVA).

8.5- Análise histopatológica das sinóvias

8.5.1 Representação histológica de sinóvia 6 h após injeção i.a. de salina ou zymosan:

As Figuras 5A e B mostram o corte histológico da sinóvia de animal injetado apenas com salina, em que se observam células com aspecto normal. As Figuras 4B e C mostram o corte histológico de animal que recebeu injeção de zymosan no qual as visualizações das lâminas apresentaram um intenso influxo leucocitário para a sinóvia e alteração da fibra colágena. Uma diferença marcante é observada na sinóvia de ratos que foram tratados com zymosan, em que se observam fibras separadas e irregulares (Fig. 5D).

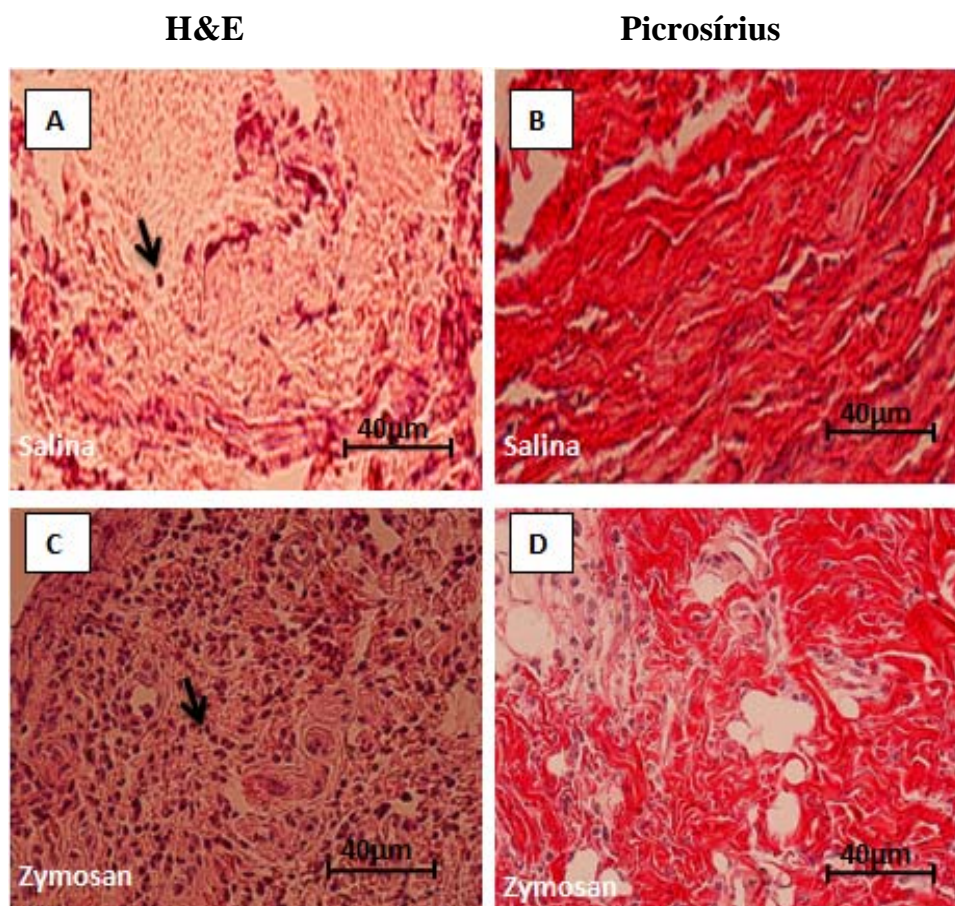


Figura 5– Demonstração histológica da sinóvia de ratos. (A e B) Sinóvia de animal injetado com solução salina apirogênica e corados com H&E ou Picrosírius, apresentado aspecto normal **(C e D)** Sinóvia de animal injetado com zymosan, mostrando influxo de células inflamatórias (seta) e alteração nas fibras colágenas (A e C corados com H&E), (B e D corados com Picrosírius). Aumento 40x.

8.5.2 Representação histológica do tratamento laser ou LED de baixa potência, 6 horas após a indução da inflamação:

A análise histológica das sinóvias, 6 horas após a injeção de zymosan e o tratamento com laser ou LED revela que houve uma diminuição de células inflamatórias (Fig. 6A, C e E). As fibras colágenas apresentam-se com aspecto íntegro, embora um pouco separadas (Fig. 6B, D e F). Os resultados obtidos com o tratamento laser e LED foram semelhantes entre si e foi similar ao tratamento com a dexametasona.

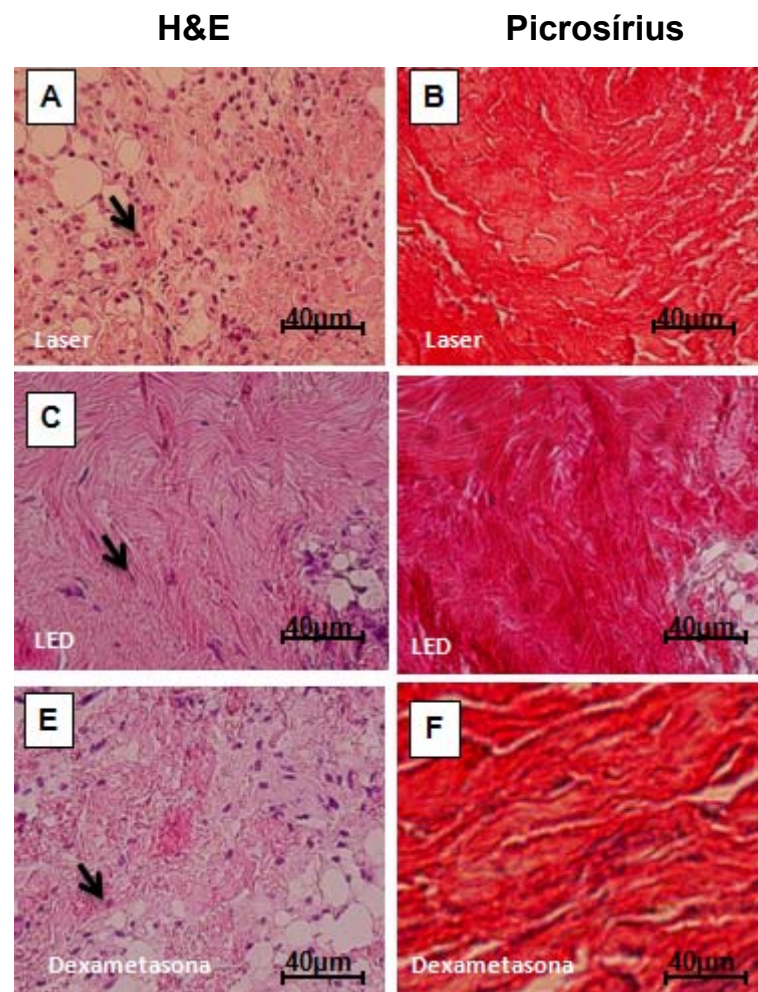


Figura 6- Corte histológico de sinóvia de 6 h após a injeção de zymosan e tratamento com laser ou LED. (A e B) Sinóvia de animal tratado com laser; (C e D) Sinóvia de animal tratado com LED; (E e F) Sinóvia de animal tratado com dexametasona. Nota-se que houve uma diminuição da migração de células inflamatórias para a sinóvia (setas). As fibras colágenas estão com aparência íntegra, embora ainda tenha desorganização das fibras. (A, C e E corados com H&E), (B, D e F corados com Picrosírius). Aumento 40x.

8.5.3 Representação histológica do tratamento laser ou LED de baixa potência, 12 horas após indução da inflamação:

A análise histológica das sinóvias, 12 horas após a injeção de zymosan e o tratamento com laser ou LED revela que ainda apresenta células inflamatórias no local de injeção do zymosan, no entanto em menor quantidade quando comparada com o grupo 6 h (Fig. 7A, C e E). As fibras colágenas apresentam-se com aspecto íntegro, embora um pouco separadas evidenciando a formação de edema (Fig. 7B, D e F). Os resultados obtidos com o tratamento laser e LED foram semelhantes entre si e foi similar ao tratamento com a dexametasona.

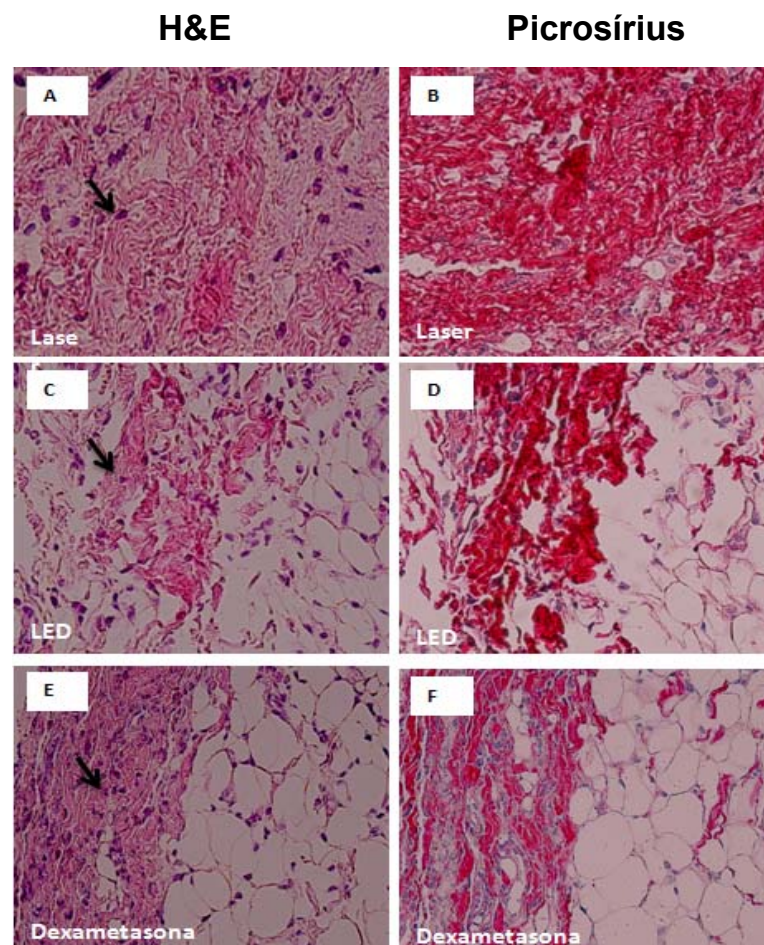


Figura 7- Corte histológico de sinóvia de 12 h após a injeção de zymosan e tratamento com laser ou LED. (A e B) Sinóvia de animal tratado com laser. **(C e D)** Sinóvia de animal tratado com LED. **(E e F)** Sinóvia de animal tratado com dexametasona. Nota-se que houve uma diminuição da migração de células inflamatórias para a sinóvia (setas). As fibras colágenas estão com aparência íntegra, embora ainda tenha desorganização das fibras. (A, C e E corados com H&E), (B, D e F corados com Picrosírius). Aumento 40x.

8.6- Atividade de gelatinase no sobrenadante de lavado articular

Foi realizada a atividade gelatinolítica presente nos sobrenadantes do lavado articular em diferentes tempos de tratamento (3, 6 e 12 horas), de todos os grupos experimentais estudados, cada faixa representa um conjunto de oito amostras dos diferentes grupos. As massas moleculares que proporcionaram hidrólise da gelatina foram de aproximadamente 66 kDa sugerindo a forma ativa da MMP-2, e 86 kDa, indicando a forma ativa da MMP-9.

A análise de densitometria dos géis para MMP-9 e MMP-2 foi determinada somando-se a densidade óptica integrada obtida (expressos em unidades arbitrárias) pelas três bandas (pró-enzima, intermediária e forma ativa).

8.6.1 – Atividade de MMP-9 após a indução da inflamação e tratamentos com Laser ou LED.

O sobrenadante coletado de animais injetados com salina apirrogênica e tratados ou não com o laser, LED ou dexametasona, não apresentaram banda característica de MMP-9 nos tempos estudados (Fig. 8A).

Observamos que no período de 3 h houve uma liberação de MMP-9 no lavado articular, significativamente diferente do controle, no entanto, os diferentes tratamentos utilizados neste estudo não inibiram essa liberação (Fig. 8B).

O sobrenadante coletado 12 h após a injeção do zymosan, apresentou banda mais intensa do que aquelas de sobrenadante coletados 6 h após a indução da inflamação (Fig. 8A e B). O tratamento com o laser ou LED apresentaram uma diminuição significativa da liberação de MMP-9, tanto no período de 6 quanto no de 12 h após a injeção de zymosan. Não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos utilizados no estudo.

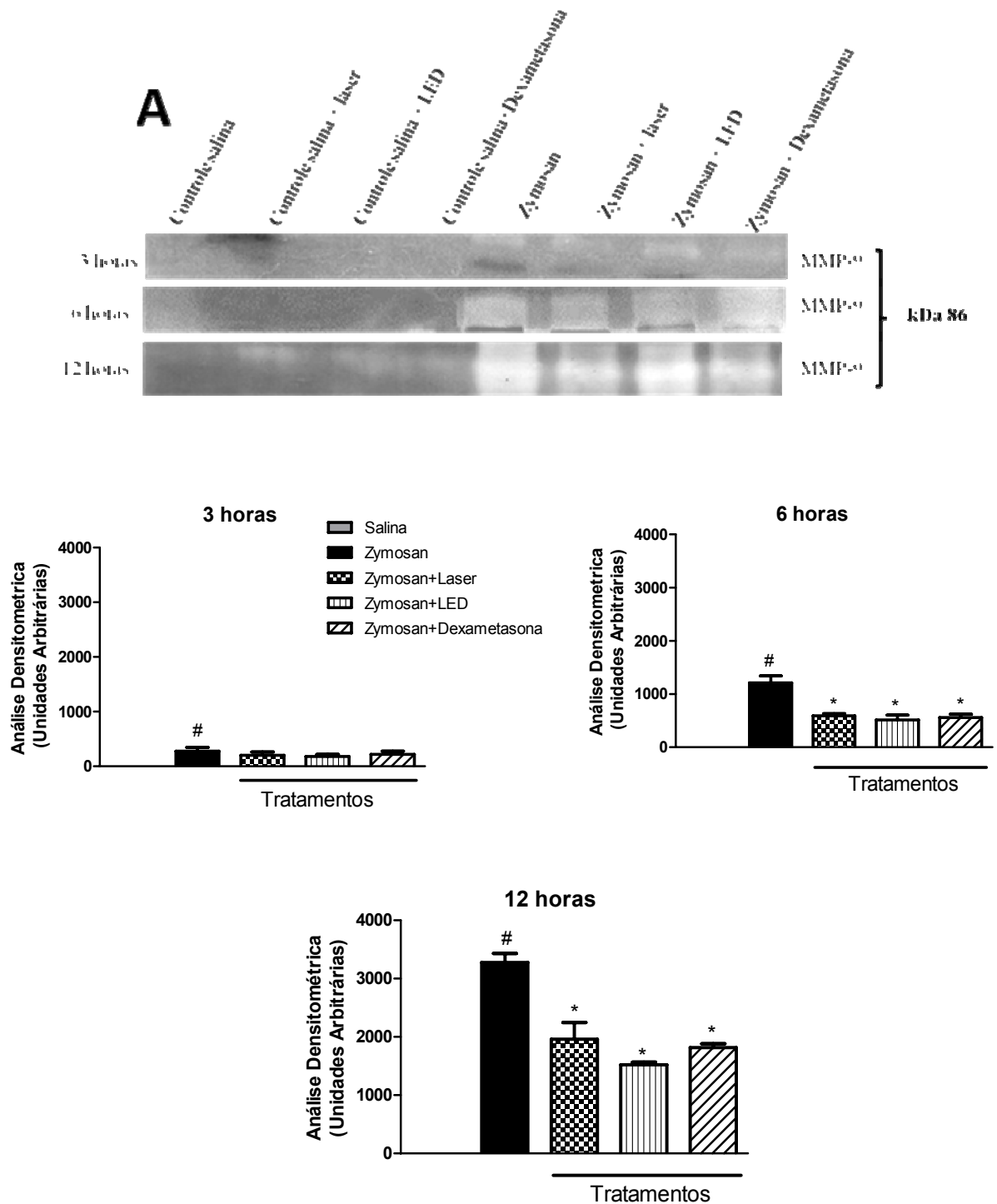


Figura 8– Efeito do laser, LED sobre a concentração de proteinase (gelatinase) MMP-9 coletada do lavado articular após inflamação induzida zymosan. O lavado articular foi coletado 3, 6 e 12 h após a indução da inflamação e dos tratamentos com laser, LED ou dexametasona, conforme material e métodos. **(A)** Eletroforese representativa (n=3) de amostras de lavado articular. **(B)** Intensidade das bandas de MMP-9, quantificadas por densitometria das bandas. #p< 0,05 em relação a salina e *p< 0,05 em relação ao grupo zymosan, (ANOVA seguido de teste de Tukey).

8.6.2 – Atividade de MMP-2 após a indução da inflamação e tratamentos com Laser ou LED.

Da mesma forma que a MMP-9, o sobrenadante coletado de animais injetados com salina apirogênica e tratados ou não com o laser, LED ou dexametasona, não apresentaram banda característica de MMP-2 nos tempos estudados (Fig. 9A). A atividade gelatinolítica de MMP-2 para o tratamento 3 horas não apresentou resultados significantes (dados não mostrados).

A figura 8B demonstra que o tratamento com laser e LED aplicado após a injeção de zymosan reduziu significativamente o nível de atividade da protease MMP-2 da mesma forma que a dexametasona ($p \leq 0,05$) nos tempos 6 e 12 horas (fig. 9B).

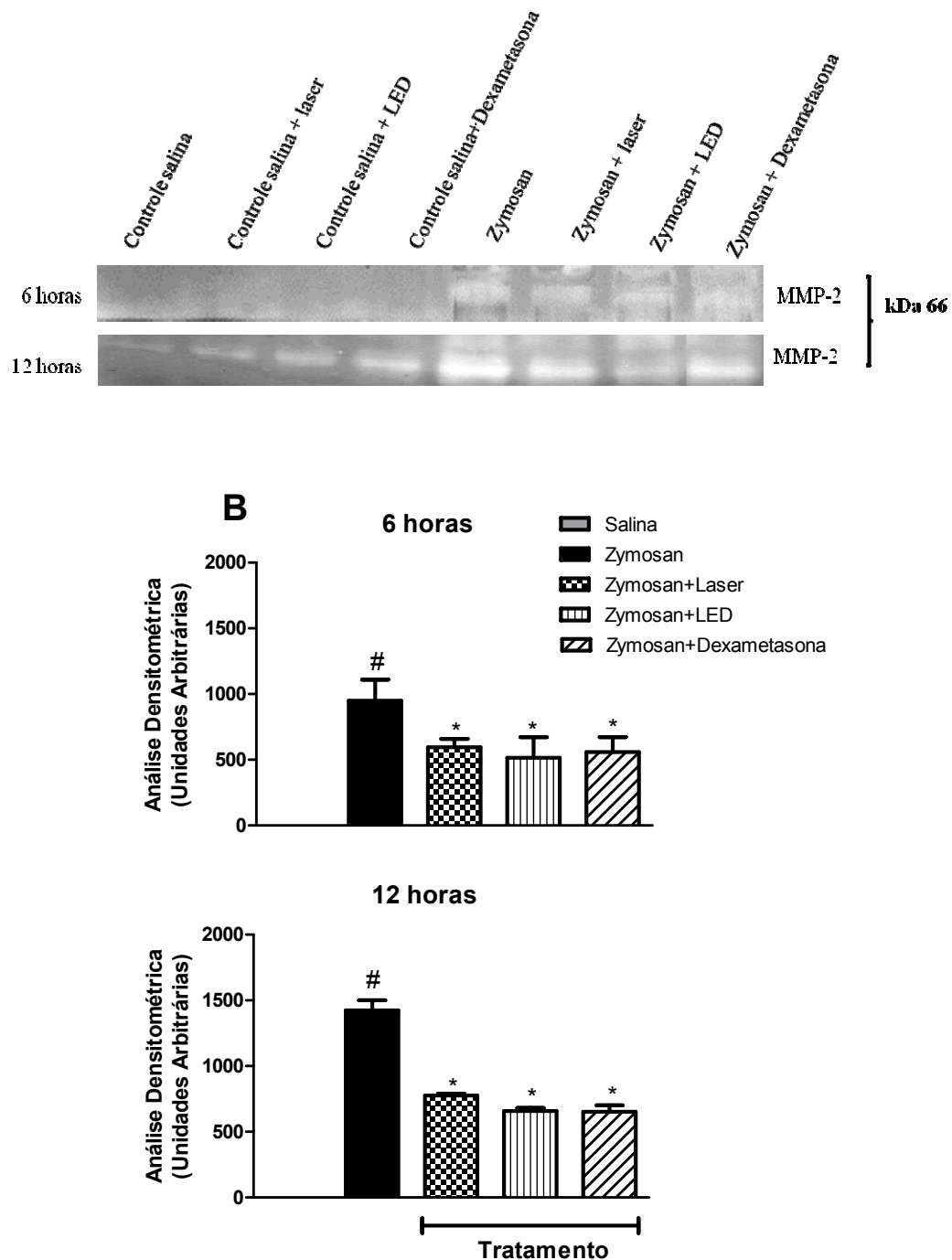


Figura 9– Efeito do laser, LED e dexametasona sobre a concentração de proteinase (gelatinase) MMP-2 coletada do lavado articular após inflamação induzida zymosan. O lavado articular foi coletado 3, 6 e 12 h após a indução da inflamação e dos tratamentos com laser, LED ou dexametasona, conforme material e métodos. **(A)** Eletroforese representativa (n=3) de amostras de lavado articular. **(B)** Intensidade das bandas de MMP-9, quantificadas por densitometria das bandas. #p < 0,05 em relação a salina e *p < 0,05 em relação ao grupo zymosan, (ANOVA seguido de teste de Tukey).

9- DISCUSSÃO

A artrite é uma doença inflamatória e degenerativa das articulações, sendo a principal causa de afastamento das atividades laborativas e piora na qualidade de vida, nas populações ocidentais ⁵⁵.

O processo inflamatório que ocorre na artrite pode ser melhorado quando os principais eventos que o desencadeiam como, por exemplo, migração, proliferação celular e produção de citocinas, dentre outros, são modulados. O tratamento normalmente utilizado na artrite são drogas anti-inflamatória não esteróideais (NSAIDs), drogas anti-reumatóides entre outros, que não apresentavam eficácia no tratamento da artrite de joelho a médio e longo prazo, sendo seu efeito analgésico restrito aos dias iniciais do tratamento, e causando efeitos adversos ^{56, 46}.

Diversos estudos ^{47, 57, 13, 58, 59} evidenciaram que intervenções terapêuticas utilizando a laser terapia de baixa potência (TBP) apresentam-se como importante alternativa para a modulação do processo inflamatório, cicatrização e controle da dor, na artrite de joelho com ação prolongada, devido ao incremento da revascularização, da energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) às células de reparo, à proliferação de fibroblastos e à inibição de mediadores químicos da inflamação.

No presente trabalho, e diante dos principais fatores envolvidos no processo inflamatório agudo de joelho e dentre os vários modelos experimentais existentes, foi escolhido o modelo de indução de inflamação aguda por zymosan que é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, que segundo Rocha et al.⁶⁰ o zymosan promove sinovite erosiva grave em uma fase aguda, e aumento de permeabilidade vascular e migração celular. Ainda, Cassin et al.,⁶¹ também mostra em estudo, que o zymosan é capaz de causar incapacitação.

A terapia a laser foi introduzida como uma alternativa de tratamento não invasivo para o tratamento da artrite cerca de 20 anos atrás, mas a sua eficácia ainda é controversa. Ademais, os mecanismos envolvidos no efeito antiinflamatório induzido pela terapia laser não estão estabelecidos. Neste estudo, investigamos o uso da terapia a laser e LED de baixa potência para o tratamento da artrite inflamatória induzida por zymosan, em ratos, enfocando aspectos da fase aguda.

Um evento importante da resposta inflamatória é a migração de leucócitos para o foco inflamatório. Leucócitos circulantes – neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos – migram, seletivamente e em número significativo, para o tecido inflamado ^{62, 63}. Nos estágios iniciais de uma resposta inflamatória aguda, há acúmulo predominantemente de neutrófilos ⁶⁴. Estas células representam a primeira linha de defesa do organismo e apresentam uma alta capacidade fagocitária e microbicida para a eliminação e/ou neutralização do agente agressor. Os leucócitos mononucleares são observados na fase mais tardia dessa resposta e em processos crônicos ⁶⁵. A infiltração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) em tecidos inflamados é um sinal da reação inflamatória aguda e também reflete uma resposta imunológica primária a invasão de patógenos ⁶⁶.

Os efeitos do Laser e LED de baixa potência foram avaliados quanto à migração celular para a articulação do joelho do rato. Vale ressaltar que, a maioria dos estudos avalia o influxo celular na sinóvia, ao passo que nós o fizemos no lavado articular. Ademais, as células presentes na sinóvia da artrite induzida por zymosan são predominantemente linfomononucleares, enquanto que os polimorfonucleares predominam no lavado articular ⁶⁷.

Para verificar se o laser e o LED eram capazes de reduzir a migração de leucócitos para a cavidade articular, avaliamos esse efeito no tempo de 6 h após a injeção de zymosan, período em que ocorre o pico de influxo de neutrófilos para a cavidade articular ⁶⁷. Nossos resultados demonstraram claramente, que a radiação laser e LED na mesma dosagem diminuem a migração de leucócitos na sexta hora de inflamação, quando aplicados imediatamente, 1ª e 2ª hora após a indução da artrite inflamatória, em joelho de ratos. Em outro modelo experimental, também foi observado uma redução do influxo leucocitário na fase inicial de pleurisia induzida por carragenina em ratos após três aplicações do LLLT-660nm, com dose de 2,1J/cm² mais eficaz que as doses 0,9 e 4,2J/cm² ⁶⁸. Resultados semelhantes foram descritos na literatura ⁶⁹. Entretanto no mesmo estudo foi observado um discreto aumento em relação às células mononucleares quando tratadas com radiação Laser. Quanto as células mononucleares, o nosso estudo utilizou comprimento de ondas e densidade de energia menores que o trabalho realizado por Rodney et al. ⁶⁹; no presente estudo, o comprimento de ondas e densidade de energia utilizadas agiu de forma inibitória em relação a estas células inflamatórias, e a substâncias utilizadas para indução da artrite também são diferentes podendo propiciar

comportamentos diferentes. A influência da dosimetria, ou seja, dos parâmetros de irradiação como potência, intensidade, densidade de energia e tempo de irradiação tem sido bastante discutidos na literatura e a dosagem ideal ainda não esta esclarecida^{49, 70, 71, 72}.

A migração/influxo de células inflamatórias são fatores que determinam o curso da artrite. Além disso, é observada a produção de citocinas inflamatórias como IL 1- β que são substâncias responsáveis pela progressão da doença e cronificação do processo. A literatura afirma que estas citocinas podem modular a expressão de metaloproteinases as quais tem o papel de regular o equilíbrio entre célula e matriz; quanto ocorre um desequilíbrio da expressão destas enzimas conseqüentemente temos destruição da cartilagem articular. Diversos autores^{73, 74}, relatam que a IL-6, envolvidas na fisiopatologia da artrite também potencializa a osteoclastogênese.

No modelo experimental empregado nesse estudo, para o grupo de 3 horas, utilizando o LASER com dose 2,5 J/cm², obtivemos diminuição da expressão de IL-6, apresentando o mesmo efeito da dexametasona. A redução desta citocina pode sugerir diminuição de atividade de osteoclastos provocando menos destruição óssea. No entanto, o tratamento com o LED utilizando a mesma dose (2,5 J/cm²), não foi efetivo para causar uma diminuição da produção de IL-6 no exsudato articular. Xavier⁷⁵ utilizando o LED com dose de 7,5 J relatou diminuição da expressão de IL-6. Esta observação nos leva a formular a hipótese de que a baixa dose de energia utilizada na radiação LED, não influenciou nos níveis de IL-6 locais.

Do mesmo modo, dosamos os níveis de concentração da citocina IL-1 β no exsudato articular 3 horas após a indução da artrite e dos tratamentos. O tratamento com Laser utilizando dose 2,5 J/cm², inibiu a expressão de IL-1 β , demonstrando efeitos iguais do tratamento com dexametasona. A literatura⁶⁹ também menciona os resultados inibitórios para a liberação de IL-1, porém utilizando dose de energia de 1J, menor que a empregada no presente estudo. O tratamento com o LED não foi efetivo para causar uma diminuição da produção de IL-1 β no exsudato articular. O fato do LED não ter causado a diminuição da liberação das citocinas IL-6 e IL-1 β não descarta a possibilidade do LED com dosagem diferente da que utilizamos pode ser efetiva. Uma hipótese que deve ser testada em estudos futuros.

No estudo histológico, observamos que houve uma diminuição das células inflamatórias para a sinóvia dos animais, no período de 6 e 12 horas após a indução da artrite, o que confirma os achados dos ensaios de migração celular coletados no

lavado sinovial. Ainda, observamos uma melhora na organização das fibras colágenas. Dados semelhantes foram encontrados por Amano et al.³³ que trataram 14 pacientes com OA de joelho utilizando laser (780 nm; 10 mW de potência; 80 s por ponto irradiado em 6 pontos do joelho, uma vez ao dia, durante 6 dias). Ao analisarem a membrana sinovial histologicamente, observaram diminuição do infiltrado inflamatório.

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de enzimas responsável pela degradação da matriz e sua reorganização. São produzidas na forma inativa (proenzima), sendo posteriormente ativadas sob a ação da plasmina. Têm a seu cargo a destruição articular (osso e cartilagem)⁷⁶. As ações de metaloproteinases e de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) são responsáveis pelos sinais inflamatórios que ocorrem e pela degradação da cartilagem.

As MMPs degradam várias proteínas da matriz extracelular quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas e são expressas em vários tipos celulares e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa, endotélio, fibroblastos e células inflamatórias⁷⁷. Por terem propriedades potencialmente destrutivas, as MMPs são sintetizadas como pró-formas, enzimaticamente inativas e denominada de zimogênios⁷⁸.

As evidências indicam que as MMPs participam da destruição articular através da degradação de proteínas da matriz extracelular da cartilagem articular, destruindo o tecido conectivo. Esta destruição está associada à formação e proliferação do “pannus” articular, constituído por macrófagos e fibroblastos sinoviais ativados, que liberam metaloproteinases matriciais, principalmente collagenases, gelatinases e estromelisinases⁷⁹. As metaloproteinases exibem diferentes especificidades pelos substratos da matriz extracelular. Assim, a MMP-2 e MMP-9 processam principalmente, os colágenos do tipo IV e V e do tipo I fibrilar denaturado (gelatina)⁸⁰. A MMP-9 pode também aumentar a liberação de TNF- α pela célula, influenciando no aumento da inflamação, conduzindo ao enfraquecimento das fibras de colágeno aumentando as chances de ruptura dessas fibras⁸¹. Neste sentido, a inibição da MMP-9 poderia ser uma boa opção para reduzir a degradação da matriz extracelular em casos de artrite.

Neste estudo avaliamos o efeito do laser e LED na produção de MMP-2 e 9 no lavado articular, e observamos que houve uma diminuição significativa dessas metaloproteinases no período de 6 e 12 horas após os tratamentos. Além disso,

verificamos que todos os tratamentos utilizados neste estudo inibiram de forma semelhante a produção de MMP-2 e 9. Essa diminuição da produção de MMP-2 e 9 deve estar relacionada com a diminuição do processo inflamatório observado neste estudo.

Neste trabalho, mostramos alguns efeitos da irradiação laser e LED no processo inflamatório do joelho de ratos, induzido por zymosan. Dentre ele, uma diminuição da migração de leucócitos para a cavidade sinovial, demonstrada tanto no líquido sinovial quanto na sínovia. A irradiação laser foi semelhante a irradiação LED para reduzir o processo inflamatório, com exceção da inibição da liberação das citoxinas IL-1 β e IL-6.

Considerando os resultados obtidos através deste estudo, podemos considerar o laser e o LED como uma ferramenta para ser usada no tratamento de processos inflamatórios, como a inflamação aguda de joelho.

Porém, é necessário analisar novas investigações, visando, estudo com várias doses de irradiação, diferentes comprimentos de onda para que seja possível o emprego desse tipo de terapia em aplicações clínicas.

10. Conclusão

- ❖ A radiação laser 660, e LED 640 nm (ambos operando com $2,5\text{J}/\text{cm}^2$), foram eficiente em reduzir o influxo leucocitário para a zona de lesão, e inibir ativação de proteases (gelatinase) sugerindo menor degradação do tecido colágeno.
- ❖ A radiação laser 660 nm (operando com $2,5\text{ J}/\text{cm}^2$) administrados imediatamente, na primeira e segunda hora após a indução da inflamação por zymosan no joelho de ratos, foi eficiente em reduzir a produção das citocinas IL-6 e IL-1 β , na a cavidade articular.
- ❖ A radiação LED operado com a mesma densidade de energia que o laser, não foi eficaz em reduzir a produção das citocinas IL-6 e IL-1 β , para a cavidade articular.

11. Referências Bibliográficas

1. Kidd BL. Osteoarthritis and joint pain. *Pain*. 2006;123(1-2):6.
2. Reabilitação SBdMFe, Reabilitação ABdMd, Lianza S. *Medicina de reabilitação*: Guanabara Koogan; 2001.
3. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Research and Therapy*. 2003;5(2):94-103.
4. Harris Jr E. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: its relevance to therapy in the'90s. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 1991;102:260.
5. Yanni G, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1994;53(1):39-44.
6. Ed H. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*. 1990;322:1277-89.
7. Farrell AJ, Blake DR, Palmer R, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 1992;51(11):1219.
8. Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs Jr JB, Hoidal JR, Huecksteadt TP, Griffiths MM. Nitric oxide production during adjuvant induced and collagen induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1996;39(10):1677-84.
9. Evans CH, Robbins PD. Pathways to gene therapy in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*. 1996;8(3):230.
10. CA ID. Biology of interleukin-1. *FASEB J*. 1988;2:108-15.
11. Dinarello CA. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;163(6):1177.
12. Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1998;30(10):1075-9.
13. Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2004;22(3):241-7.

14. Mizel SB. The interleukins. The FASEB Journal. 1989;3(12):2379.
15. Taga T, Kishimoto T. Cytokine receptors and signal transduction. The FASEB Journal. 1992;6(15):3387.
16. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). The FASEB Journal. 1990;4(11):2860.
17. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. Annual review of immunology. 1990;8(1):253-78.
18. Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators* 1. Immunology today. 1997;18(9):428-32.
19. Jouglin M, Robert C, Valette JP, Gavard F, Quintin-Colonna F, Denoix JM. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. Veterinary research. 2000;31(5):507-15.
20. Boom R, HARST M, Brommer H, Brama P, Barneveld A, WEEREN P, et al. Relationship between synovial fluid levels of glycosaminoglycans, hydroxyproline and general MMP activity and the presence and severity of articular cartilage change on the proximal articular surface of P1. Equine veterinary journal. 2005;37(1):19-25.
21. Fehr JE, Trotter GW, Oxford JT, Hart DA. Comparison of Northern blot hybridization and a reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for measurement of mRNA expression of metalloproteinases and matrix components in articular cartilage and synovial membrane from horses with osteoarthritis. American Journal of Veterinary Research. 2000;61(8):900-5.
22. Kitchen S, Partridge C. A review of low intensity laser therapy: Parts I and II: Background, physiological effects and harzard. Physiotherapy. 1991;77:161-8.
23. Lowe AS, Walker MD, O'Byrne M, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation impaired, wound healing model in murine skin. Lasers in Surgery and Medicine. 1998;23(5):291-8.
24. Tunér J, Hode L, Rochkind S. Low Level Laser Therapy: Clinical Practice and Scientific Background: a Guide for Research Scientists, Doctors, Dentists, Veterinarians, and Other Interested Parties Within the Medical Field: Prima Books; 1999.

25. Lopes L, BRUGNERA A. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. BRUGNERA, A J; PINHEIRO, ALB Laseres na odontologia moderna São Paulo: pancast. 1998:100-20.
26. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research. 2000;48(5):312.
27. Nascimento DG, Molena-Fernandes CA, Sartoretto JL, Bruschi LC, Cuman RKN, Silva FP. Efeitos da irradiação com o laser HeNe 632.8 nm sobre a cicatrização de feridas em ratos. Ciência, Cuidado e Saúde. 2008;5(2):229-35.
28. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He---Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology. 1995;27(3):219-23.
29. Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano I, et al. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. FEBS letters. 1984;175(1):95-9.
30. Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery. 1998;16(3):159-65.
31. England S, Farrell A, Coppock J, Struthers G, Bacon P. Low power laser therapy of shoulder tendonitis. Scandinavian journal of rheumatology. 1989;18(6):427-31.
32. Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga Al As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. Lasers in Surgery and Medicine. 1992;12(4):441-9.
33. Amano A, Miyagi K, Azuma T, Ishihara Y, Katsube S, Aoyama I, et al. Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. Lasers in Surgery and Medicine. 1994;15(3):290-4.
34. Campana V, Moya M, Gavotto A, Juri H, Palma J. Effects of diclofenac sodium and He: Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery. 1998;16(6):317-20.

35. Campana V, Moya M, Gavotto A, Simes J, Spitale L, Soriano F, et al. He-Ne laser on microcrystalline arthropathies. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 2003;21(2):99-103.
36. Walker J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neuroscience letters*. 1983;43(2-3):339-44.
37. Honmura A, Ishii A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Analgesic effect of Ga Al As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin induced inflammation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1993;13(4):463-9.
38. Krashennnikoff M, Ellitsgaard N, Rogvi-Hansen B, Zeuthen A, Harder K, Larsen R, et al. No Effect of Low Power Laser in Lateral Epicondylrtis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1994;23(5):260-3.
39. Barberis G, Gamron S, Acevedo G, Cadile I, Juri H, Campana V, et al. In vitro release of prostaglandin E2 after helium-neon laser radiation from synovial tissue in osteoarthritis. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*. 1995;13(4):263-5.
40. Morgan MC, Rashid RM. The effect of phototherapy on neutrophils. *International immunopharmacology*. 2009;9(4):383-8.
41. Medeiros IS. Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais. Comparação com outras fontes de luz. São Carlos. 2001.
42. Karu TI, Pyatibrat LV, Ryabykh TP. Melatonin modulates the action of near infrared radiation on cell adhesion. *Journal of pineal research*. 2003;34(3):167-72.
43. ANDRADE MF, Rastelli A, Saadi R, SAAD J. Avaliação da capacidade de polimerização de um novo dispositivo à base de LED à bateria. *J Am Dent Ass*. 2001;4(1):373-7.
44. Rodrigues de Moraes NC, Barbosa AM, Vale ML, Villaverde AB, de Lima CJ, Cogo JC, et al. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010;28(2):227-32.
45. Manadan AM, Block JA. Rheumatoid Arthritis: Beyond Tumor Necrosis Factor-[alpha] Antagonists, B Cell Depletion, and T Cell Blockade. *American journal of therapeutics*. 2008;15(1):53.

46. Bjordal JM, Ljunggren AE, Klovning A, Slørdal L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including cyclo-oxygenase-2 inhibitors, in osteoarthritic knee pain: meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *bmj*. 2004;329(7478):1317.
47. Jimbo K, Noda K, Suzuki K, Yoda K. Suppressive effects of low-power laser irradiation on bradykinin evoked action potentials in cultured murine dorsal root ganglion cells. *Neuroscience letters*. 1998;240(2):93-6.
48. Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low level laser irradiation on LPS stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 in human gingival fibroblasts. *European journal of oral sciences*. 2000;108(1):29-34.
49. Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, et al. Low level laser therapy for zymosan induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2007;39(6):543-50.
50. Aimbire F, Ligeiro de Oliveira A, Albertini R, Correa J, Ladeira de Campos C, Lyon J, et al. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1 levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation*. 2008;31(3):189-97.
51. Campana V, Moya M, Gavotto A, Soriano F, Juri H, Spitale L, et al. The relative effects of HeNe laser and meloxicam on experimentally induced inflammation. *Laser therapy*. 1999;11(2):36-48.
52. Olson N, Brown T, Anderson D. Dexamethasone and indomethacin modify endotoxin-induced respiratory failure in pigs. *Journal of Applied Physiology*. 1985;58(1):274.
53. Rogers D, Jeffery P. Inhibition of cigarette smoke-induced airway secretory cell hyperplasia by indomethacin, dexamethasone, prednisolone, or hydrocortisone in the rat. *Experimental lung research*. 1986;10(3):285-98.
54. Schumacher J, O'garra A, Shrader B, Van Kimmenade A, Bond M, Mosmann T, et al. The characterization of four monoclonal antibodies specific for mouse IL-5 and development of mouse and human IL-5 enzyme-linked immunosorbent. *The Journal of Immunology*. 1988;141(5):1576.

55. Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, Cohen R, Smotrich M, Kochevar IE. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009;41(4):282-90.
56. Mahajan A, Tandon V, Verma S, Sharma S. Osteoarthritis and menopause. *J Indian Rheumatol Assoc*. 2005;13:21-5.
57. Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Harkness LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomedicine and Laser Therapy*. 2004;22(4):323-9.
58. Houreld N, Abrahamse H. Irradiation with a 632.8 nm helium-neon laser with 5 J/cm² stimulates proliferation and expression of interleukin-6 in diabetic wounded fibroblast cells. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2007;9(5):451-9.
59. Albertini R, Villaverde A, Aimbire F, Salgado M, Bjordal J, Alves L, et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*. 2007;89(1):50-5.
60. Rocha F, Aragão Jr A, Oliveira R, Pompeu M, Vale M, Ribeiro R. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation Research*. 1999;48(9):485-90.
61. Cassin M. Diagnosis and Treatment of Lyme chapter. *Infectious diseases*. 2004:265.
62. Yan HC, Delisser HM, Pilewski JM, Barone KM, Szklut PJ, Chang XJ, et al. Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF-alpha is dependent on E-selectin. *The Journal of Immunology*. 1994;152(6):3053.
63. Albelda SM, Smith CW, Ward P. Adhesion molecules and inflammatory injury. *The FASEB Journal*. 1994;8(8):504.

64. Issekutz A, Movat H. The in vivo quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1980;42(3):310.
65. Issekutz T, Issekutz A, Movat H. The in vivo quantitation and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. *The American Journal of Pathology*. 1981;103(1):47.
66. Souza V, Bezerra FC, Passos LFS, Ribeiro SLE. Síndrome de Felty: Relato de caso e Revisão da terapêutica. *Rev Bras Reumatol*. 2007;47(4):303-8.
67. Rocha FAC, Rocha JCS, Peixoto MEB, Jancar S, Cunha FQ, Ribeiro RA. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos; Effect of nitric oxide synthase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats. *Rev bras reumatol*. 2003;43(4):206-17.
68. Emshoff R, Bösch R, Pümpel E, Schöning H, Strobl H. Low-level laser therapy for treatment of temporomandibular joint pain: a double-blind and placebo-controlled trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2008;105(4):452-6.
69. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior ECP, Teixeira S, Marcos RL, et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers in Medical Science*. 2011:1-8.
70. Enwemeka CS. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009;27(3):387-93.
71. Houreld N, Abrahamse H. In vitro exposure of wounded diabetic fibroblast cells to a helium-neon laser at 5 and 16 J/cm². *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007;25(2):78-84.

72. Hawkins D, Abrahamse H. How long after laser irradiation should cellular responses be measured to determine the laser effect? *Journal of Laser Applications*. 2007;19:74.
73. Sato K. Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation. *Allergol Int*. 2008;57(2):109-14.
74. Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(10):2936-48.
75. Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, et al. Anti inflammatory effects of low level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2010;42(6):553-8.
76. MÜLLER□Ladner U, Kriegsmann J, Tschopp J, Gay RE, Gay S. Demonstration of granzyme A and perforin messenger RNA in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1995;38(4):477-84.
77. Raffetto JD, Ross RL, Khalil RA. Matrix metalloproteinase 2-induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K⁺ channels: relevance to varicose vein formation. *Journal of vascular surgery*. 2007;45(2):373-80.
78. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21491.
- 79- Choy EHS. & PANAYI GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med*. 2001; 344(12): 907-916.
- 80-Nguyen Q. Murphy G. Hughes CE. Mort JS. Roughley PJ. Matrix metalloproteinases cleave at two distinct sites on human cartilage link protein. *Biochem. J.*, 1993; 295: 595-598.
- 81- Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(6):1375-81.

12. Apêndice



Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA – UNINOVE
Av. Francisco Matarazzo, 612 – Prédio C – Térreo
ceua@uninove.br

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº 0025/2011 reapresentado 3 vezes.

Título do Projeto: **Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade antiinflamatória da terapia fotodinâmica na artrite induzida por zymosan**

Orientador(a): **Profª. Drª. Stella Regina Zamuner**

Aluno: **Fernando Pereira Carlos**

Objetivos:

Gerais: Compreender e comparar os efeitos do laser e do LED de baixa potência sobre suas ações em células inflamatórias, com ênfase ao sinoviócito, células de maior fonte de mediadores inflamatórios que contribuem para a inflamação e dor na artrite reumatóide.

Específicos: Investigar os efeitos do Laser e LED de baixa potência, na artrite de joelho, no que se refere: Expressão gênica da citocina TNF- α ; liberação de citocinas IL-1 β e IL-6 e, liberação das metaloproteinases matriciais MMP-2 e MMP-9 no lavado articular.

Métodos: Protocolo experimental

Dois dos objetivos específicos foram eliminados do projeto (análise da produção de NO e a determinação da expressão protéica de iNOS), acatando a sugestão proposta pelo comitê.

Quanto ao item 5.2 (**Protocolo experimental**) a nova proposta determina: “Os ratos serão divididos em 5 grupos com 5 animais por grupo: **Grupo 1:** controle; **Grupo 2:** zymosan; **Grupo 3:** Zymosan + laser 680 nm; **Grupo 4:** zymosan + LED 635 nm; **Grupo 5:** Dexametasona. Num total de **25 animais** para cada protocolo experimental. Serão realizados **3 protocolos** experimentais diferentes:

- Dosagem de IL-1 e IL-6 em 3 tempos experimentais diferentes (3, 6 e 12 hs), serão necessários **75 animais** (25 para cada tempo experimental)”. “- Expressão gênica do fator de necrose tumoral e determinação das metaloproteinases matriciais, em 3 tempos diferentes (3, 6 e 12 h), serão necessários **75 animais** (25 para cada grupo experimental).”

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Procedência: Biotério da Uninove.

Raça/linhagem: ratos da raça Wistar

Número de animais: 150

Na proposta anterior os tempos de análise da dosagem de IL-1 e IL-6 eram 1, 3 e 6 horas e na proposta atual de 3, 6 e 12 horas. Sugiro dois tempos, como 3 e 12 horas, evitando o sacrifício de 25 animais a mais. A proposta anterior para determinação gênica e de metaloproteínas determinava 4 tempos (1, 3, 6 e 12 horas). Na proposta atual, um dos tempos (de 1 hora) foi retirado. Portanto, o projeto poderia ser executado com a redução de 25 animais (devido às múltiplas análises) para 125 animais no total.

Justificado em carta anexada ao processo.

Peso: 250 – 270 g

Sexo: Macho.

Condições de alojamento e nutrição: Os animais serão mantidos em gaiolas coletivas de 370×260×170mm com três a quatro ratos por cada, abastecidas com ração e água *ad libitum* e mantidos em ciclo de claro escuro por 12 h.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: Os animais não precisam ficar em jejum.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração): Os animais serão submetidos à anestesia com Ketamina (30 mg/Kg) associada à Xilazina (5 mg/Kg) por via intraperitoneal.

Descrever a concentração de cada droga de acordo com o fabricante e marca. Esclarecer como a droga será ministrada numa diluição final associada em mg/Kg. Descrever quanto tempo leva o procedimento invasivo, pois as doses aplicadas são para curta duração.

No projeto é descrito “Após tricotomia, será realizada a dissecação dos joelhos dos animais até o plano subcutâneo, para a administração intra-articular”.

Justificado em carta anexada ao processo.

No formulário em PDF consta como procedimento NÃO INVASIVO (corrigir). No mesmo documento é citado como anestésico Hidrato de cloral e no projeto a anestesia é a associação de cloridrato de xilazina e quetamina (esclarecer essa inconformidade).

Alterado no formulário.

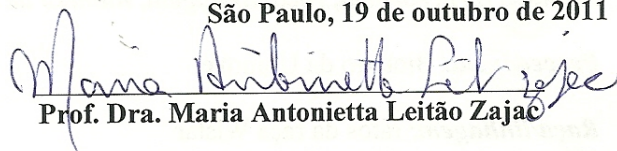
Eutanásia: Item 5.5. Protocolo de eutanásia: Os animais serão mortos em atmosfera de CO₂. O proponente atendeu as exigências do comitê.

Pertinência e valor científico do estudo proposto: A pesquisa proposta é pertinente para a compreensão do mecanismo de ação inflamatória.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

- (X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.
- () Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
- () Não-Aprovado

São Paulo, 19 de outubro de 2011



Prof. Dra. Maria Antonietta Leitão Zajac

Presidente da Comissão de Ética no Uso de
Animais da Universidade Nove de Julho

REVISTA Terapia Manual

Fisioterapia Manipulativa

Andreoli



Volume 8 n° 37 Maio/Jun de 2010 • Brasil R\$ 40,00 • Portugal € 16,00

QUALIS CAPES
B2

"Terapia Manual is indexed
in the CINAHL database"

Wahl
FISIOTERAPIA MANIPULATIVA

"Terapia Manual is indexed in
the Sport Discus database"

SportDiscus

Artigo Original

- Análise qualitativa segundo a perspectiva de profissionais fisioterapeutas das características biomecânicas e estratégias de movimento adotadas por hemiplégicos durante o teste Timed "Up and Go".
- Efeito agudo de três técnicas de alongamento muscular sobre o torque flexor do joelho.
- Avaliação do risco de quedas de idosos ativos submetidos a treinamento de equilíbrio com haste vibratória.
- Interferência da prática de atividade física habitual na postura de jovens.
- Correlação de um protocolo fotogramétrico de avaliação postural com os sintomas algicos da coluna vertebral auto-relatados por estagiários de fisioterapia.
- Confiabilidade dos testes especiais para diagnóstico de tendinopatia do supra-espinhoso.
- Efeito da terapia LED (Light Emitting Diode) na mionecrose e edema induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, no músculo gastrocnêmio.
- Relação entre pressão inspiratória nasal e pressão inspiratória máxima em pacientes com distrofia miotônica.
- Aplicação da bola terapêutica na evolução do equilíbrio em pacientes hemiparéticos.
- Validação do teste de flexibilidade da coluna lombar proposto por Adrichem e Korst.

Comunicação Breve

- Artropatia de Charcot – Atualização.

Artigo Original

Efeito da terapia LED (*Light Emitting Diode*) na mionecrose e edema induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, no músculo gastrocnêmio.

Effect of LED (Light Emission Diode) therapy on edema formation and myonecrosis induced by *Bothrops jararaca* snake venom, on gastrocnemius muscle.

Daniel Bulgarelli⁽¹⁾, Ana Maria Barbosa⁽¹⁾, Fernando Pereira Carlos⁽²⁾, Sílvia Fernanda Zamuner⁽³⁾, Carlos José de Lima⁽⁴⁾, Stella Regina Zamuner⁽²⁾.

Resumo

Introdução: O envenenamento causado pela serpente *Bothrops jararaca* induz, de modo geral, um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais imediatas, com hemorragia, mionecrose, edema e dor, que não é revertido pelo tratamento com o antiveneno. **Objetivo:** Neste trabalho avaliou-se a capacidade da terapia LED (*Light Emission Diode*) para diminuir o edema e a mionecrose causada pelo veneno de *B. jararaca*. **Método:** Foram utilizados camundongos Swiss machos injetados com veneno de *B. jararaca* (2 mg/kg) no músculo gastrocnêmio. O edema foi avaliado nos tempos 3 e 24 h após a injeção do veneno ou salina. O aumento do edema foi expresso como a diferença do volume do peso úmido e peso seco, dos músculos tratados com o veneno, comparado com o volume do músculo contralateral (controle). A mionecrose foi avaliada através da quantificação da enzima creatino quinase no tempo de 3 h e da análise histológica dos músculos 3 e 24 h após a injeção do veneno. Os animais foram tratados com os LEDs (LED infravermelho, potência de 120 mW, λ 945 nm, densidade de energia de 4 J/cm², tempo de irradiação de 38 s e área de 1,2 cm²; LED vermelho potência de 110 mW, λ 635 nm, densidade de energia de 4 J/cm², tempo de irradiação de 41 s e área de 1,2 cm²) nos tempos: imediatamente e 2 horas após a injeção do veneno. **Resultados:** O edema muscular causado pelo veneno de *B. jararaca* foi significativamente reduzido pelos dois tratamentos utilizados: LED vermelho 20 e 11% e LED infravermelho: 29 e 19%, às 3 e 24 h respectivamente, quando comparado com os animais tratados com o veneno. O tratamento com o LED não modificou a mionecrose causada pelo veneno. **Conclusões:** A terapia LED foi eficaz em reduzir o edema muscular, no entanto, a mionecrose não foi afetada pelo tratamento com os LEDs. Desta maneira, a terapia com o LED pode contribuir, ao menos em parte, como uma alternativa ao tratamento atual, adicionado a terapia disponível com antivenenos, não efetiva contra os efeitos locais.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*, mionecrose, edema, terapia LED.

Abstract

Introduction: Envenoming caused by *Bothrops jararaca* venom induces, in general, a physiopathologic reaction characterized by immediate local reactions, with hemorrhage, myonecrosis, edema and pain, which are not reverted by the treatment with antivenom. **Objective:** In this work, it was evaluated the capacity of LED (*Light Emission Diode*) ther-

* Artigo recebido em 12 de maio de 2010 e aceito em 02 de junho de 2010.

1 Universidade Vale do Paraíba – UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brasil.

2 Programa de pós-graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo, SP, Brasil.

3 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brasil.

4 Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO, São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Prof. Dra. Stella Regina Zamuner. Avenida Francisco Matarazzo, 612 – Água Branca. CEP 05001-100. São Paulo, SP, Brasil. Tel: 11 3665 9325. E-mail: stella.rz@uninove.br.

apy to diminish the edema formation and mionecrosis, caused by *Bothrops jararaca* venom. **Methods:** Swiss mice had been injected with *B. jararaca* venom (2 mg/kg) in the gastrocnemius muscle. Edema was evaluated at 3 and 24 h after the injection of the venom or saline. The increase on edema formation was expressed as the difference between the humid and dry weight, of the muscles injected with the poison, compared with the volume of the contralateral muscle (control). Mionecrosis was evaluated through the quantification of the creatine kinase enzyme at 3 h and by histologic analysis of the muscle, 3 and 24 h after the injection of the venom. The animals had been treated with the LED (infra-red: power of 120 mW, λ 945 nm, density of energy of 4 J/cm², time of irradiation of 38 s and area of 1,2 cm²; Red LED: power of 110 mW, λ 635 nm, density of energy of 4 J/cm², time of irradiation of 41 s and area of 1,2 cm²) applied: immediately and 2 h after the venom injection. **Results:** Muscular edema caused by the *B. jararaca* venom was significantly reduced by the two treatments: Red LED: 20 and 11% and infrared LED: 29 and 19%, to 3 and 24 h respectively, when compared with the animals treated with venom. The treatment with the LED did not modify the mionecrosis caused by the venom. **Conclusion:** LED therapy was efficient in reducing muscular edema, however, mionecrosis was not affected by these treatment. In this way, the LED therapy can contribute, at least in part, as an alternative added to the available therapy with antivenoms, which are not effective against the local effect.

Keywords: *Bothrops jararaca*, myonecrosis, edema, LED therapy.

INTRODUÇÃO

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas constituem importante problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo. No Brasil, a morbidade anual é cerca de 15 por 100.000 habitantes e aproximadamente 80% desses acidentes estão associados ao envenenamento pela espécie *Bothrops*^(1,2,3).

Kamiguti et al., 1986 A.S. Kamiguti, S. Matsunaga, M. Spir, I.S. Sano-Martins and L. Nahas, Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **19** (2) (1986), pp. 199-204. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (17)

Os acidentes ofídicos de maior ocorrência no Brasil são causados por serpentes *Bothrops jararaca*⁽³⁾. O veneno dessas serpentes induz, de modo geral, um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais imediatas, com hemorragia, mionecrose, edema e dor^(4,5), além de efeitos sistêmicos, com alterações da coagulação sanguínea, do sistema cardiovascular, levando ao choque hipovolêmico, bem como à insuficiência renal aguda em casos mais graves⁽⁶⁾. A necrose muscular é um sério problema causado por acidentes com

serpentes Botrópicas e pode resultar em perda da função do tecido do membro afetado⁽⁷⁾. A mionecrose causada por venenos botrópicos pode ocorrer pela ação indireta, como consequência da degradação de vasos sanguíneos e isquemia causada por metaloproteínas, ou por um efeito direto de miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂ na membrana plasmática do músculo esquelético⁽⁸⁾.

O tratamento utilizado no acidente por serpentes do gênero *Bothrops* é a soroterapia com antiveneno botrópico polisspecífico. Apesar de este tratamento ser efetivo contra os efeitos sistêmicos, podendo prevenir a morte, a administração do antiveneno não neutraliza o efeito local causado por esses venenos^(9,10,11). Algumas alternativas estão sendo investigadas com o propósito de diminuir a reação local do envenenamento botrópico, como o uso de plantas medicinais^(12,13), algumas substâncias como heparina e poliânions^(14,15), bem como a terapia a laser de baixa potência (TLBP)^(16,17,18). A TLBP tem sido usada na clínica para promover efeitos antiinflamatórios, alívio da dor e acelerar a regeneração de tecidos lesados⁽¹⁹⁾.

Devido ao elevado custo dos dispositivos emissores de laser, estão sendo investigados os efeitos

de fotobiomoduladores alternativos, como a luz LED (diodo emissor de luz), que diferencia do laser de baixa potência através da coerência do feixe de luz emitido. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da terapia LED em dois comprimentos de onda (vermelho e infravermelho) na mionecrose e edema muscular, induzidos pelo veneno total da serpente *Bothrops jararaca*, no músculo gastrocnêmio de camundongos, através de ensaios *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 22-25 g, provenientes do Biotério da Anilab (Animais de Laboratório) Paulínia, São Paulo. Os animais foram pré-tratados com antiparasitários e mantidos com água e alimentação *ad libitum*, mantidos em sala com temperatura e umidade constante (24°C - 60%), com ciclo claro/escuro (12/12 horas).

Protocolo de Ética

A condução científica desta pesquisa seguiu as normas e registros da resolução CNS 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e foi realizada sob aprovação pelo Comitê de Ética

em Pesquisa (CEP) da UNIVAP n.º. A23/CEP/2008.

Veneno

O veneno total liofilizado de *Bothrops jararaca* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Carlos Cogo do Serpentário do CEN (Centro de Estudos da Natureza) da UNIVAP. O veneno, liofilizado, foi mantido a 10°C e preparado (p/v) em solução estéril de NaCl 0,9%, no momento do uso.

Protocolo de eutanásia

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de Xilazina (Virbaxyl 2% injetável; 0,1 mg/kg i.p.) + 100 mg/kg de Ketamina (Dopalen Injetável; 1 ml/Kg i.p.). Em seguida, sob o efeito do anestésico, foi administrado over dose de Cloreto de Potássio a 10% (intracardíaco).

Procedimento experimental

Foram utilizados 60 camundongos, divididos aleatoriamente. Foi feita anti-sepsia local e tricotomia para exposição do músculo gastrocnêmio. Os animais receberam inoculação intramuscular (i.m.) de veneno total de *Bothrops jararaca*, na dose de 2 mg/kg, na saliência média do músculo gastrocnêmio direito e o músculo esquerdo (controle) recebeu o mesmo volume de solução salina apirrogênica, em volume constante de 50 µL. Os animais foram sacrificados nos tempos de 3 e 24 horas após a injeção do veneno ou salina.

Terapia com LED vermelho e infravermelho

Os animais foram posicionados em uma mesa em decúbito ventral e a perna traseira foi imobilizada manualmente onde o feixe de luz do LED foi aplicado perpendicularmente (90°) a uma distância de 1 cm do local da injeção do veneno ou salina, na pele tricotomizada da saliência média do músculo

gastrocnêmio. Os animais foram divididos em 3 grupos, onde o primeiro grupo recebeu a inoculação do veneno sozinho; o segundo grupo a terapia com o LED infravermelho e o terceiro grupo foi tratado com o LED vermelho. A aplicação do LED foi feita imediatamente e 2 horas após a injeção do veneno. As doses do LED (figura 1) foram escolhidas com bases em estudos prévios mostrando o efeito benéfico da fototerapia de baixa potência⁽¹⁷⁾. O grupo controle recebeu o mesmo tratamento, porém com o aparelho desligado. Os aparelhos LEDs (SANSEN Tecnologia, SP Brasil) foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Carlos José de Lima do laboratório de Instrumentação Optobiomédica da UNICASTELO.

Quantificação do edema muscular

Para determinar o edema muscular, o veneno de *B. jararaca* (2 mg/kg dissolvido em 50 µl) foi injetado no músculo gastrocnêmio direito do camundongo, ao mesmo tempo, o músculo contralateral foi injetado com o mesmo volume de salina apirrogênica. Após 3 e 24 h da injeção do veneno ou salina, o músculo foi retirado. Ambos os músculos foram pesados e o edema foi expresso como a porcentagem do aumento no peso do músculo injetado com o veneno comparado com o músculo contralateral⁽²⁰⁾.

Determinação da atividade miotóxica

Para a determinação da quantificação da mionecrose plasmática, grupos de camundongos foram injetados via intramuscular, no músculo gastrocnêmio, com salina ou 2 mg/kg de veneno de *B. jararaca* dissolvidos em 50 µl de solução salina. Os camundongos foram anestesiados e o sangue foi coletado pela via caudal 3 horas após a injeção do veneno, em tubos heparinizados. Esse tempo foi esco-

lhido, pois é quando os níveis de creatino quinase (CK) são máximos no sangue dos animais injetados o veneno de diversas espécies de *Bothrops*. A atividade creatinoquinase foi determinada através do Kit diagnóstico (LABTEST CK-NAC). A leitura foi feita através de espectrofotômetro (Spectra MAX (λ 190, 340 nm). A atividade CK foi expressa em unidades por litro (U/L), no qual uma unidade é definida como a quantidade de enzima que produz 1 nmol de NADH por minuto nas condições do experimento⁽²⁰⁾.

Análise histológica

Para avaliar o índice de mionecrose induzido pelo veneno, foi utilizado o exame histológico do tecido muscular. Três e 24 horas após a injeção do veneno ou solução salina, os músculos foram retirados para processamento histológico. De modo resumido, após serem enxaguadas com PBS (solução tampão fosfato), as amostras foram fixadas em solução formalina 10% por 24 horas, desidratadas em séries de álcool, embebida em parafina, fracionada em 5 µm e corada com Hematoxilina e Eosina (H&E).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (E.P.M.). Foi empregada a análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05 (p ≤ 0,05).

RESULTADOS

Efeito da aplicação do LED vermelho e infravermelho no edema muscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca*

O efeito do tratamento com o LED vermelho e infravermelho sobre o edema induzido pelo veneno *B. jararaca* foi avaliado no período de 3 e 24 horas após sua injeção. Os resultados demonstram

que os LEDs reduzem significativamente o edema muscular nos dois períodos de tempo estudados (figura 1A). No tempo de 3 horas houve uma redução do edema na ordem de 29% e 20% para o LED infravermelho e vermelho, respectivamente (figura 1A). No tempo de 24 horas a redução do edema ficou em torno de 19% para o LED infravermelho e 11% para o LED vermelho (figura 1B). O tratamento com o LED infravermelho causou uma melhor eficácia sobre a formação de edema quando comparado com o LED vermelho.

Efeito da aplicação do LED vermelho e infravermelho na quantificação de mionecrose induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca*

O tratamento com a terapia LED não modificou a liberação de CK induzida pelo veneno de *B. jararaca* no tempo de 3 horas (figura 2A). No entanto, uma pronunciada atividade hemorrágica foi observada às 3 horas, evidenciada pela presença de massas de eritrócitos (Figura 3B), a hemorragia teve um começo rápido ocorrido com apenas alguns minutos, a julgar pela observação macroscópica. A extensão da mionecrose aumentou nas amostras coletadas 24 h. A micrografia do músculo controle apresenta células com estrutura normal, como fibras regulares, definida pelos fascículos musculares e membrana intacta (figura 3A). As alterações locais agudas induzidas pelo veneno de *B. Jararaca*, no tempo de 24 h, são mostradas na figura 3C. A fase degenerativa inclui a aparência de áreas necróticas do tecido muscular que ocorre já às 3 horas de injeção do veneno (dados não mostrados). A figura 3C mostra consideráveis alterações nas fibras do músculo gastrocnêmio 24 horas após a injeção i.m. do veneno de *B. jararaca*. As mudanças incluem congestão vascular, hemorragia, edema e perda

da definição do fascículo muscular. Pode ser observado na figura 3D que o tratamento com o LED, novamente, não foi efetivo para diminuir a mionecrose induzida pelo veneno. No entanto, a hemorragia esta diminuída no músculo tratado com o LED.

DISCUSSÃO

Os acidentes ofídicos de maior ocorrência no Brasil são causados por serpentes *Bothrops jararaca*, representando 90% das ocorrências e é a representante mais importante do ponto de vista da gravidade e incidência de acidentes em humanos⁽⁴⁾.

O veneno de *B. jararaca* causa efeitos locais e sistêmicos. As principais alterações induzidas pelo veneno de *B. jararaca* em camundongos são a hemorragia e edema⁽²⁰⁾. Esse veneno contém potentes metaloproteases hemorrágicas^(21,22), as quais são responsáveis pela hemorragia local, mionecrose⁽²³⁾ e inflamação⁽²⁴⁾. No presente trabalho, o veneno de *B. jararaca* causou edema muscular evidenciado não apenas pelo edema, mas também pela intensa hemorragia, o que corrobora dados de Teixeira *et al.*⁽²⁰⁾, que observaram a formação de edema muscular que durou por vários dias. Estudos experimentais demonstraram que o edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* tem origem inflamatória, mediado principalmente por metabólitos do ácido aracdônico^(25,26) e que metaloproteases contribuem para esse efeito⁽²⁷⁾.

Em contraste com o grande efeito edematogênico observado, o veneno de *B. jararaca* não induziu uma atividade miotóxica, refletida pela falta de aumento de CK plasmático, quando comparado com outras espécies botrópicas⁽²⁸⁾. O veneno de *B. jararaca* contém pouca quantidade de miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂, que são abundantes e constituem o principal componente miotóxico de venenos de outras espécies botrópicas⁽²⁸⁾. A literatura demonstra que o veneno de *B. jararaca* induz miotoxicidade devido à ação de metaloproteases hemorrágicas, provavelmente pela isquemia gerada como consequência da degradação de microvasos⁽²⁰⁾.

A terapia a laser de baixa potência (TLBP) tem sido usada como uma alternativa no tratamento de inflamações, dores e processos de regeneração de tecidos^(29,30). Além disso, vários estudos têm demonstrado que a TLBP também pode ser uma alternativa para o tratamento do envenenamento por serpentes botrópicas^(16,17). Assim, neste trabalho avaliamos a capacidade do LED vermelho e infravermelho em reduzir o edema e a mionecrose causada pelo veneno de *B. jararaca*.

O tratamento com os LEDs foi eficiente em reduzir o edema muscular induzido pelo veneno de *B. jararaca*. Dados semelhantes foram encontrados por Barbosa *et al.*⁽¹⁷⁾, que demonstraram a redução significativa do efeito edematogênico induzido pelo veneno de *B. jararacussu* e tratados com a TLBP. Esses

Tabela 1 - Protocolo de irradiação LED.

Parâmetros	LED vermelho	LED Infravermelho
	Valores	Valores
Comprimento de onda	635 nm	945 nm
Densidade de energia (DE)	4 J/cm ²	4 J/cm ²
Potência	110 mW	120 mW
Tempo	41 "	38 "
Área Irradiada	1,2 cm ²	1,2 cm ²

autores sugerem que a inibição do efeito edematogênico é devido à inibição da PGE_2 via redução de ciclooxigenase-2. Não existem dados na literatura demonstrando o efeito

do LED em processos edematogênicos. É possível que, no nosso modelo experimental, o LED tenha uma ação pelo mesmo mecanismo que o laser de baixa potência redu-

zindo os níveis de PGE_2 , uma hipótese que precisa ser verificada em estudos futuros.

Em contraste com o que foi descrito em músculo injetado com o veneno de *B. moojeni*⁽¹⁴⁾ ou com o veneno de *B. jararacussu*⁽¹⁷⁾, no qual a TLBP foi eficaz em reduzir o efeito mionecrótico, o LED não foi eficaz em reduzir a mionecrose causada pelo veneno de *B. jararaca*. Essa diferença pode estar associada a componentes distintos presentes nos venenos estudados, uma vez que os venenos de *B. moojeni* e *B. jararacussu* apresentam mais componentes mionecróticos, como as fosfolipases A_2 , já o veneno de *B. jararaca* possui mais componentes hemorrágicos, como as metaloproteases. Neste sentido, estudos de Teixeira et al.⁽²⁰⁾ demonstraram que a regeneração muscular após a injeção do veneno de *B. jararaca* é prejudicado devido a um inadequado suplemento sanguíneo pelo drástico dano na microvasculatura, sugerindo que uma melhora na regeneração muscular depende de uma bem sucedida revascularização. É possível que o LED seja eficaz na regeneração do músculo injetado pelo veneno de *B. jararaca* em períodos mais tardios do que os estudados neste trabalho, hipótese que precisa ser tratada em estudos futuros.

Em conclusão, o veneno de *B. jararaca* induz alterações locais caracterizadas por proeminente hemorragia, edema e mionecrose moderada em áreas no qual a microvasculatura foi drasticamente afetada. O tratamento com o LED foi eficaz em reduzir o edema muscular, no entanto, a mionecrose não foi afetada pelo tratamento com o LED. Desta maneira, a terapia com o LED pode contribuir, ao menos em parte, com a melhoria do tratamento atual, adicionado a terapia disponível com antivenenos, não efetiva contra os efeitos locais.

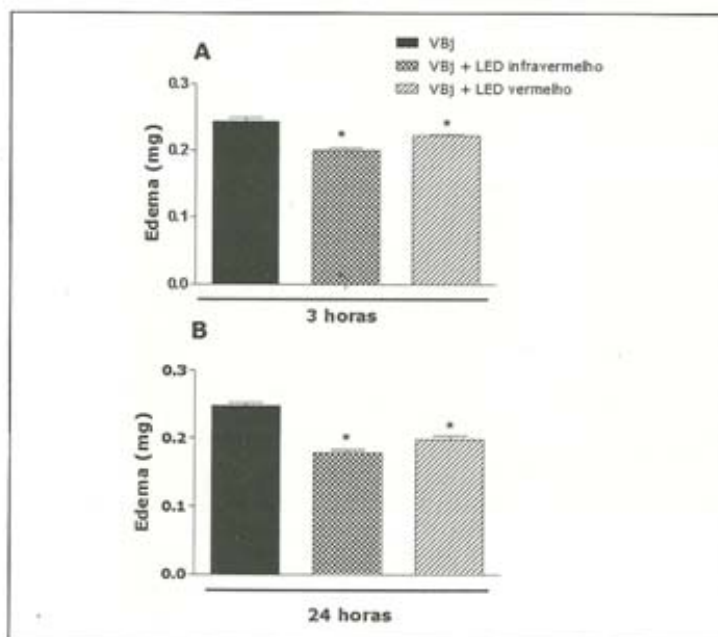


Figura 1 - Efeito da terapia LED no edema muscular induzido pelo veneno de *B. jararaca*. Os camundongos foram injetados i.m. no músculo gastrocnêmio direito com 2 mg/kg de veneno de *B. jararaca* (VBj), dissolvido em 50 µl de solução salina. Os animais receberam irradiação com o LED vermelho e infravermelho imediatamente e 2 horas e o edema muscular foi avaliado 3 horas (A) e 24 horas (B) após a injeção do veneno. *P<0,05 comparado com o grupo veneno.

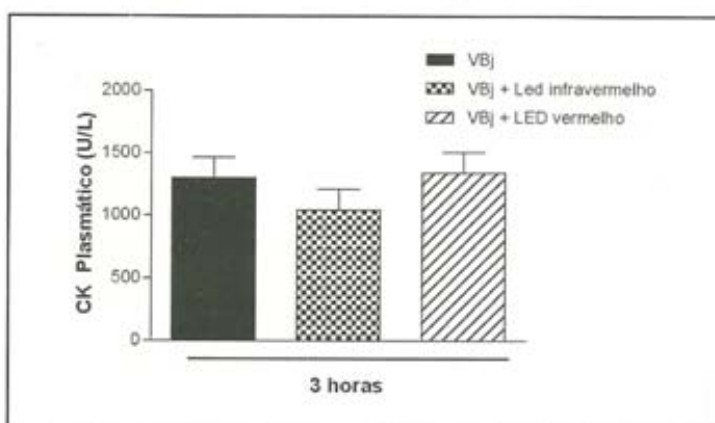


Figura 2 - Efeito da terapia LED na quantificação da mionecrose induzida pelo veneno de *B. jararaca*. Os camundongos foram injetados i.m. no músculo gastrocnêmio direito com 2 mg/kg de veneno de *B. jararaca* (VBj), dissolvido em 50 µl de solução salina. Os animais receberam irradiação com o LED vermelho e infravermelho imediatamente e 2 horas após a injeção do veneno ou salina. Após 3 horas o sangue foi coletado e atividade CK foi determinada. Cada ponto representa a média S.E.M. de 5 animais. As diferenças entre o grupo veneno e o tratamento com a terapia LED não foram significativas (p>0,05).

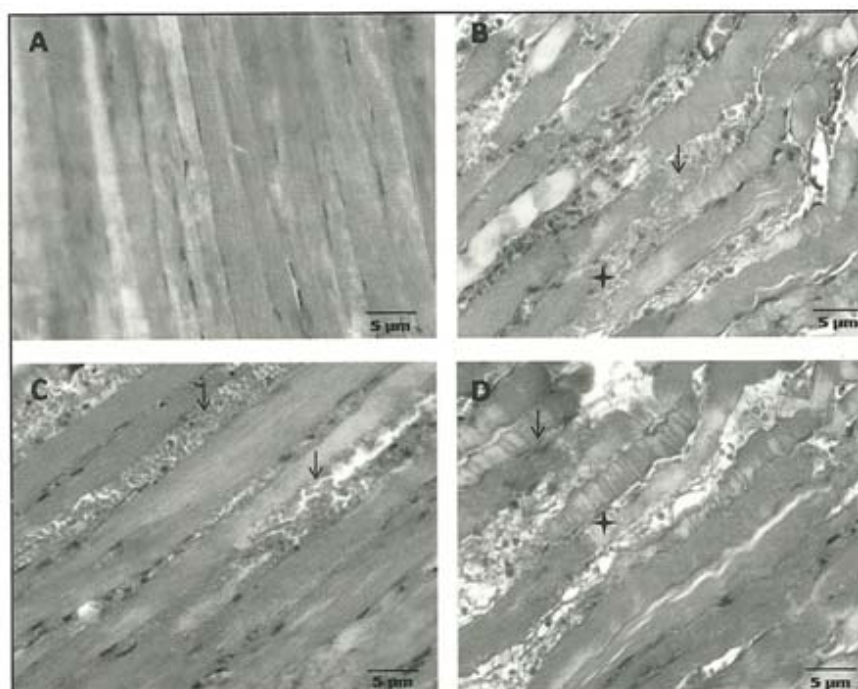


Figura 3 – Aparência histológica do músculo gastrocnêmio 3 e 24 h após a injeção do veneno de *B. jararaca* e terapia com o LED. **(A)** controle salina apresentando fibras normais; **(B)** músculo 3 h após a injeção do veneno de *B. jararaca* (2 mg/kg), apresentando hemorragia intensa; **(C)** músculo 24 h após a injeção do veneno e **(D)** músculo injetado veneno de *B. jararaca* e tratado com o LED. Hemorragia (seta), necrose (estrela). Bar= 40 μm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kamiguti AS, Matsunaga S, Spir M, Sano-Martins IS, Nahas L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Braz J Med Biol Res.* 1986; 19, 2: 199-204.
2. Jorge MT, Ribeiro LA. Accidents caused by poisonous snakes from Brazil AMB Rev Assoc Med Bras. 1990; 36, 2: 66-77. Review.
3. Chippaux, JP. Bulletin of the World Health Organization, 1998, 76 (5): 515-524.
4. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Burchiel, W., Uckley, E.E. (Eds.). *Venomous Animals and Their Venoms*, Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 1971; 345-403.
5. Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscara MN, Teixeira AS, Teixeira CFP. Bothrops asper and othrops jararaca snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon.* 2001; 39: 1505-1513.
6. Amaral CFS, Da Silva AO, Godoy P, Miranda, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon.* 1985; 23: 877-85, 1985.
7. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* 2003; 42: 885-901.
8. Gutiérrez JM, Rucavado A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie.* 2000; 82: 841-845.
9. Gutiérrez JM, Rojas G, Lomonte B, Gené JA, Chaves F, Alvarado J, Rojas E. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. *Toxicon.* 1990; 28(10):1127-9.
10. Milani Jr. R, Jorge MT, De Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, Ribeiro LA, Fan HW, França FO, Sano-Martins IS, Cardoso D, Ide Fernandez C, Fernandes JC, Aldred VL, Sandoval MP, Puerto G, Theakston RD, Warrell DA. Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 cases in São Paulo State, Brazil. *QJM.* 1997; 90(5):323-334.
11. Zamuner SR, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon.* 2004; 44 (3):259-271.

12. Biondo R, Pereira AMS, Marcussi S, Pereira PS, França SC, Soares AM. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Bioquímica*. 2003; 85 (10):1017-1025.
13. Pereira IC, Barbosa AM, Salvador MJ, Soares AM, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BthTX-I and II. *J. Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2009;15: 3 527-545.
14. Melo PA, Homs-Brandeburgo MI, Giglio JR, Suarez-Kurtz G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothrops toxin by polyanions. *Toxicon*. 1993; 31:285-291.
15. Lomonte B, Moreno E, Tarkowski LA, Hanson L, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom: identification of a heparinbinding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem*. 1994; 269: 29867-29873.
16. Dourado DM, Favero S, Baranauskas V, Cruz-Hofling MA. Effects of the GaAs laser irradiation on myonecrosis caused by *Bothrops moojeni* snake venom. *Lasers Surg. Med*. 2003; 33: 352-357.
17. Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. 2008; 51(7):1236-44.
18. Barbosa AM, Villaverde AB, Sousa LG, Munin E, Fernandez CM, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the myonecrosis induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(4):591-7.
19. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004; 69(1):81-90.
20. Teixeira CFP, Chaves F, Zamuner SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Gutiérrez JM. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int. J. Exp. Pathol*. 2005; 86:107-115.
21. Mandelbaum FR, Reichl AP, Assakura MT. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factor in the venom of *Bothrops jararaca*. In: Ohsaka A, Hayashi K, Sawai Y. (Eds.), *Animal, Plant, and Microbial Toxins*, vol. 1. Plenum Press, New York, 1976; 111-121.
22. Paine MJ, Desmond HP, Theakston RDG, Crampton JM. Purification, cloning, and molecular characterization of a high-molecularweight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom – insights into the disintegrin gene family. *J. Biol. Chem*. 1992; 267:22869-22876.
23. Queiróz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984; 22:339-346.
24. Costa EP, Clissa, PB, Teixeira CF, Moura-da-Silva AM. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. *Inflammation*. 2002; 26:13-17.
25. Trebien HA, Calixto JB. Pharmacological evolution of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions*. 1989; 26:292-300.
26. Olivo RdoA, Teixeira CFP, Wallace JL, Gutiérrez JM, Zamuner SR. Role of cyclooxygenases in oedemaforming activity of bothropic venoms. *Toxicon*. 2007; 49:(5), 670-677.
27. Moura-da-Silva AM, Butera D, Tanjoni I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(28):2893-905. Review.
28. Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie*. 2000; 82(8):755-63.
29. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 2007; 89: 50-55.
30. Holden PK, Li C, Da Costa V, Sun CH, Bryant SV, Gardiner DM, Wong BJ. The effects of laser irradiation of cartilage on chondrocyte gene expression and the collagen matrix. *Lasers Surg Med*. 2009; 41(7):487-91.