

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

**FLÁVIA BORTONE**

**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DE RECEPTORES DE CININAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
INFLAMAÇÃO AGUDA EM RATOS.**

**São Paulo**

**2008**

**FLÁVIA BORTONE**

**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DE RECEPTORES DE CININAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
INFLAMAÇÃO AGUDA EM RATOS.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

**São Paulo**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bortone, Flávia

Efeitos da Laserterapia de baixa potência na expressão gênica de receptores de cininas em modelo experimental de inflamação aguda em ratos. / Flávia Bortone. São Paulo : 2008.

52 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho, 2008.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior

1. Inflamação aguda. 2. Laserterapia de baixa potência 3. Receptores de cininas. I. Silva Júnior, Antônio.

CDU 616

**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA NA EXPRESSÃO  
GÊNICA DE RECEPTORES DE CININAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
INFLAMAÇÃO AGUDA EM RATOS.**

**FLÁVIA BORTONE**

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

---

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

---

Membro: Prof. Maricilia Silva Costa, Dra. – Univap

---

Membro: Prof<sup>a</sup>. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari, Dra. – Uninove

São Paulo, 03 de Dezembro de 2008

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Maria e Michele, pelo esforço e dedicação para proporcionar-me uma boa formação, que ao longo de minha vida, trilhou os caminhos para eu chegar até aqui.

À minha irmã Alessandra, pelo exemplo de seriedade com que conduz sua profissão, por me presentear com minhas duas sobrinhas, Viviane e Gabriela, que tanto me ensinam, pelo simples fato de existirem.

Perspicácia, companheirismo, paciência, enfim, são muitas as razões para especialmente dedicar este trabalho ao Gleyson, seu amor torna os meus dias mais felizes, você é o melhor marido do mundo.

A Deus, pois sem Ele nada é possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antonio Silva Júnior, serei eternamente grata por seu acolhimento no momento em que pensei em desistir e pela dedicação na orientação deste trabalho, orgulho-me de ter convivido e aprendido muito com alguém tão importante dentro da pesquisa científica deste país, que se destaca não somente por sua inteligência, mas também pela humildade com que compartilha seu conhecimento.

À Prof. Dra. Maricilia Costa, pelo auxílio na manipulação dos animais e coleta dos tecidos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero, por permitir o uso do aparelho de Real Time PCR, em seu laboratório na UNIFESP.

À Prof. Dra. Carla Malaguti, seus ensinamentos foram fundamentais para a estruturação metodológica deste trabalho.

Aos professores do mestrado, pelas brilhantes aulas administradas ao longo do curso.

Aos colegas Marcelo e Andrea (UNIFESP), pela disponibilidade em ensinar-me as técnicas de biologia molecular, essenciais para minha pesquisa.

Ao Bruno, técnico do laboratório de pesquisa, agradeço a gentileza que sempre me atendeu.

Aos alunos de iniciação científica, Sérgio, Henrique, Thomaz e Caio, pela ajuda fundamental na etapa prática deste trabalho.

À minha amiga Alecsandra, por estar ao meu lado nos momentos difíceis dessa jornada, compartilhando seus conhecimentos, e pela ajuda indispensável na conclusão deste trabalho.

A todos que estiveram ao meu lado nessa etapa e contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

## RESUMO

A laserterapia de baixa potência tem sido usada clinicamente para tratar processos inflamatórios. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da laserterapia de baixa potência na formação de edema e na modulação da expressão gênica de receptores de cininas. Os animais foram divididos em quatro grupos: A1 (controle – salina), A2 (carragenina), A3 (carragenina + laser 660nm) e A4 (carragenina + laser 684nm). O edema foi medido por um pletismômetro. O tecido subplantar foi coletado para quantificar a expressão de RNAm para cinina por meio PCR em tempo real. A laserterapia de baixa potência com comprimento de onda 660 nm e 684 nm, dose de 7.5 J/cm<sup>2</sup> administrada 1 hora após injeção de carragenina foi capaz para promover a redução do edema induzido pela carragenina. No grupo A2, a expressão do receptor B<sub>1</sub> apresentou aumento significativo quando comparado com grupo controle. A expressão do RNAm para receptores B<sub>1</sub> apresentou diminuição significativa após a aplicação de laserterapia de baixa potência de 660nm e 684nm. A expressão do RNAm dos receptores de B<sub>2</sub> de cininas também diminuiu após aplicação de laserterapia de baixa potência. Não houve diferença significativa entre os diferentes comprimentos de onda. Nossos resultados sugerem que a expressão de ambos receptores de cininas é modulada por laserterapia, contribuindo assim com seus efeitos antiinflamatórios.

**Palavras-chave:** Inflamação Aguda; Laserterapia De Baixa Potência; Receptores De Cininas.

## ABSTRACT

Low level laser therapy (LLLT) has been used clinically in order to treat inflammatory process. The aim this work was evaluated the effects of low level laser therapy in volume edema and modulates kinin receptors mRNA expression. Experimental groups were designed as followed: A1 (control-saline), A2 (carragenina), A3 (carragenina+laser 660nm) e A4 (carragenina+laser 684nm). Edema was measured by a plethysmometer. Subplantar tissue was collected for kinin receptors mRNA quantification by Real time-PCR. LLLT of both 660 and 684 nm wavelengths administrated 1 h after carrageenan injection was able to promote the reduction of edema produced by carrageenan. In the A2 group, B<sub>1</sub> receptor expression presented a significantly increase when LLLTs 660 or 684 nm wavelength. Kinin B<sub>2</sub> receptor mRNA expression also diminished after laser irradiations. Our results suggest that expression of both kinin receptors is modulated by LLLT, possibly contributing to its anti-inflammatory effect.

**Keywords:** Acute Inflammation; Low Level Laser Therapy; Kinin Receptors.

# ÍNDICE

1. Introdução	10
2. Revisão de Literatura	16
2.1 Laser de baixa potência	16
2.2 Laserterapia de baixa potência em modelos de inflamação aguda	18
3. Objetivos	22
4. Resultados	24
5. Perspectivas Futuras	31
6. Referências Bibliográficas	33
7. Anexo	38

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A palavra LASER é um acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, a qual pode ser traduzida por amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. O primeiro laser, construído por Mainman em 1960, foi o de Rubi<sup>1</sup>.

A utilização do laser nas áreas biomédicas surgiu como consequência natural de suas propriedades e se iniciou com o aproveitamento de seus efeitos térmicos. Os lasers de alta potência são capazes de vaporizar e coagular tecidos biológicos, oferecendo um campo cirúrgico sem sangramento e com certo grau de esterilização<sup>2</sup>.

Outro campo de estudo nas áreas biomédicas é o da aplicação dos lasers de baixa intensidade. O princípio básico da laserterapia é que a irradiação com comprimentos de onda específicos tem a capacidade de alterar o comportamento celular na ausência de aquecimento. O laser estimula processos biológicos e, por isso, esse fenômeno foi inicialmente chamado de bioestimulação<sup>3</sup>. A bioestimulação é um termo genérico para qualquer estímulo, agente ou ação que produzam resposta fisiológica com aumento da atividade funcional<sup>4</sup>. Como foi comprovado que doses altas de laser podem inibir atividades celulares, este termo – bioestimulação – não tem sido utilizado. Hoje, o tratamento com laser em baixa intensidade é nomeado por uma gama variada de palavras como terapia laser, terapia com laser em baixa intensidade, laser em baixa intensidade, lasers “frios”, nomes que fazem menção às suas propriedades fotoquímicas<sup>5</sup>.

Os efeitos terapêuticos da laserterapia de baixa intensidade têm sido estudados desde 1960<sup>6</sup>. Um dos pioneiros na pesquisa com laser em baixa intensidade foi Endre Mester em Budapeste, Hungria, que publicou o primeiro trabalho em 1967, no qual mostrou efeitos benéficos deste recurso na pele de camundongos<sup>2</sup>. Depois disso outros estudos mostraram que laserterapia afeta a cicatrização tecidual, possuindo ações antiinflamatórias e analgésicas. Entretanto, diferentes estudos têm mostrado a eficácia desse tratamento, particularmente na dor da inflamação, o mecanismo o qual a irradiação produz analgesia e efeitos antiinflamatórios permanece incerto.

Estudos anteriores a 1980 sugeriram que a radiação por laser poderia promover alívio nos neurotransmissores, assim como a serotonina ou  $\beta$ -endorfina. Mais tarde, foi proposto que radiação por laser poderia produzir biomodulação das atividades enzimáticas, fotoquímicas e fotofisiológicas. Esses estudos nos forneceram a base da teoria para o desenvolvimento de muitos outros que concluíram que a radiação por laser produzia alguns efeitos analgésicos e antiinflamatórios<sup>6</sup>.

A laserterapia de baixa intensidade é uma nova terapia que inclui a aplicação de baixa potência monocromática e luz coerente para lesões<sup>7</sup>. Ela tem sido usada clinicamente desde 1981 no tratamento de pacientes com patologias inflamatórias, e administrada com diferentes comprimentos de onda do espectro visível e próximo ao infravermelho, incluindo HeNe (632,8 nm), GaAIs (650, 805 ou 820 nm) e GaAs (904 nm)<sup>8</sup>.

Essa terapia é também usada para tratar dor muscular, embora os mecanismos biológicos dos resultados benéficos observados permaneçam incertos<sup>9</sup>. A capacidade da laserterapia de baixa intensidade para reduzir a duração da inflamação aguda<sup>10</sup> e acelerar a reparação de tecido em tendões e músculo lesionados foi proposta por Aimbire e colaboradores<sup>11</sup>. Lubart e colaboradores sugerem que a laserterapia de baixa intensidade pode promover mudanças no estado de redução celular, que tem papel fundamental na sustentação da atividade celular, promovendo processos fotobioestimulativos<sup>9</sup>.

A inflamação é uma resposta inespecífica do corpo a várias lesões, e é essencialmente uma resposta protetora que inicia o processo de reparação tecidual. A reação inflamatória envolve interações complexas entre as células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e monócitos/macrófagos) e células vasculares (células endoteliais e células da musculatura lisa)<sup>9</sup>.

Segundo Phillips e colaboradores a resposta inflamatória ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, no plasma, nas células circulantes, nos vasos sanguíneos e nos componentes extravasculares do tecido conjuntivo, manifestando pelos sinais clínicos, de dor, calor, rubor e edema. Kumar e colaboradores relataram que o edema inflamatório é a marca registrada da

inflamação aguda; este fenômeno associado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação, resulta em uma acentuada perda de líquidos e a um acúmulo no tecido intersticial, o que caracteriza o edema. Ainda, conforme Garcia-Leme e colaboradores, o processo inflamatório é desenvolvido e mantido graças à liberação de mediadores químicos solúveis (aminas vasoativas, citocinas, fator de ativação plaquetária, radicais superóxidos e derivados do ácido araquidônico)<sup>12</sup>.

A resposta fisiológica que ocorre imediatamente após um estímulo agressivo é tida como a fase precoce (0-1h) em oposição ao que ocorre entre as 5-6h após a lesão, na qual as células inflamatórias se acumulam no local. Existem evidências para um número de diferentes fatores que tem papel importante na modulação da resposta inflamatória e também na fase da inflamação aguda. Na fase precoce, moduladores como histamina, 5-hidroxitamina e bradicinina modulam a resposta inflamatória. Durante a fase tardia, prostaglandinas, COX-2 e neutrófilos contribuem para a resposta inflamatória<sup>12</sup>. O processo inflamatório induz o aumento da sensibilização dos nociceptores mecânicos, térmicos e estimuladores químicos, o qual manifesta a inflamação e a dor<sup>6</sup>.

A bradicinina é nonapeptídeo que exerce suas ações, em concentração nanomolar, após interagir com receptores específicos da membrana plasmática de células-alvo. Sua meia-vida no plasma é inferior a um minuto, sendo rapidamente inativada por cininases teciduais. Descoberta em 1948, em meio a experimentos com o veneno de *Bothrops jararaca*, esse agente gerado no plasma mostrou importante ação hipotensora arterial. Em 1977, Regoli iniciou o estudo de receptores específicos da bradicinina e, em 1980, em conjunto com Barabé, propôs a “hipótese dos dois receptores”, sugerindo que as ações da bradicinina são mediadas por dois receptores distintos, denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub><sup>13</sup>.

A bradicinina é constituinte do sistema calicreína-cinina, do qual também participam procalicreínas, calicreínas teciduais e plasmática, cininogênios, cininases e enzimas conversoras de cininas. Em resumo, procalicreínas dão origem às calicreínas que, por sua vez, agem sobre

cininogênios liberando cininas; aminopeptidases convertem precursores de bradicinina em bradicinina; cininases degradam tanto a bradicinina quanto seus precursores<sup>13</sup>.

Apesar das cininas participarem da regulação de sistemas fisiológicos, são mais conhecidas suas ações na doença: choque, asma, dor e muitas formas de inflamação envolvem a mediação desses peptídeos. Cininas podem evocar os sinais cardinais da inflamação (dor, edema, rubor e calor) e estão próximas do topo da cascata de mediadores envolvidos no processo inflamatório. Na doença, a bradicinina é produzida quando lesão vascular expõe polissacarídeos sulfatados carregados negativamente, ativando o sistema de contato da coagulação. A bradicinina é liberada também quando há oxigenação tecidual inadequada em decorrência de perfusão tecidual deficiente. Na lesão tecidual ou infecção, acúmulo, aderência e ativação de neutrófilos, soma outros mediadores ao local de inflamação, potencializando a ação das cininas<sup>14</sup>.

Quando o estímulo provoca a lesão tecidual, há o desencadeamento de processo inflamatório seguido de reparação. As células lesadas liberam enzimas de seu interior, que no ambiente extracelular degradam ácidos graxos de cadeia longa e atuam sobre os cininogênios, dando origem à formação de cininas. A calicreína é uma enzima proteolítica que é ativada pela inflamação e outros efeitos químicos ou físicos sobre o sangue ou os tecidos. Ao ser ativada, a calicreína atua imediatamente sobre o cininogênio, liberando a cinina denominada calidina, que é, assim, convertida em bradicinina por enzimas teciduais. Uma vez formada, a bradicinina provoca intensa dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória<sup>14</sup>.

Receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas possuem papel central na patofisiologia da inflamação<sup>7,15,16</sup>. O receptor B<sub>2</sub> de cininas é expresso de forma constitutiva, enquanto receptor B<sub>1</sub> de cininas é fracamente expresso na maioria dos tecidos sob condições basais, mas fortemente expresso na inflamação. O receptor B<sub>2</sub> de cininas parece estar envolvido

preferencialmente na fase precoce e o receptor B<sub>1</sub> induzível nas fases tardias da inflamação<sup>17,18</sup>.

De nosso conhecimento, há poucos, se algum, trabalhos investigando se a laserterapia afeta a expressão de cininas *in vivo*. Dentro deste contexto, o presente estudo foi então desenhado para avaliar o envolvimento das cininas nas propriedades antiinflamatórias da laserterapia de baixa intensidade aplicada em diferentes comprimentos de onda (660 nm e 684 nm) no edema de pata induzido pela carragenina, um modelo clássico de resposta inflamatória aguda.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

A terapia com laser de baixa potência utiliza porções do espectro visível e infravermelho de luz. As primeiras pesquisas foram feitas com lasers de rubi, argônio e hélio-neônio que estão no espectro visível<sup>4,19,20</sup>. Mais recentemente, os lasers de diodo semicondutor de arseneto de gálio (GaAs) e arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) no espectro infravermelho tem se tornado mais populares. Inicialmente eram utilizados lasers com potência de até 1 mW, mas com o desenvolvimento da tecnologia os aparelhos passaram a ter potências entre 10 a 90 mW, o que diminui o tempo de aplicação<sup>21,22</sup>.

O laser de hélio-neônio (He-Ne) é o mais antigo dos lasers e surgiu na década de 70. Emite ondas de luz no espectro visível, geralmente em torno de 630 nm. Trabalha em modo contínuo, mas pode ser utilizado também no modo pulsado. Sua potência é de 1 a 10 mW e pode ser aplicado diretamente ou através de fibras ópticas. A profundidade de penetração é de 6 a 10 mm, dependendo de sua potência<sup>23</sup>.

O diodo semicondutor de arseneto de gálio (GaAs) surgiu na década de 80. Possui comprimento de onda de 904 nm no espectro infravermelho e usualmente trabalha no modo pulsado, este modo penetra mais profundamente nos tecidos chegando a alcançar 30 a 50 mm<sup>23</sup>.

O diodo semicondutor de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) tem comprimentos de onda de 780 a 870 nm, sua luz é invisível e está no espectro infravermelho. Alguns GaAlAs possuem comprimento de onda no espectro vermelho. O modo de operação é contínuo na maioria dos aparelhos, sua profundidade de penetração é de 20 a 30 mm, tornou-se popular por ser um aparelho pequeno, leve e com custo razoável<sup>23</sup>.

Esses lasers semicondutores possuem o mecanismo de funcionamento um pouco diferente da maioria dos lasers, pois trabalham com pólos positivo e negativo, sendo a radiação emitida pelas laterais, como se fosse um "sanduíche"<sup>21</sup>.

Para que se obtenha a resposta biológica adequada é necessário atingir a dose ótima de radiação, o comprimento de onda correto e o número de aplicações suficientes para produzir efeito. Os seguintes parâmetros devem ser observados: escolha do comprimento de onda, densidade de energia (dose) e densidade de potência (intensidade). A potência do laser é o valor dado pelo fabricante em watts (W). A densidade de potência é a potência de saída de luz por unidade de área medida em watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ). A densidade de energia, também chamada de dose, é a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido, expressa em joules por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ )<sup>2</sup>.

Das propriedades da luz laser, a colimação não parece ser crucial para causar os efeitos do laser visto que é rapidamente degradada ao passar pelos tecidos (efeito de espalhamento). A monocromaticidade parece ser vital, pois os efeitos nas células são causados por comprimentos de onda de uma estreita faixa do espectro da luz. Os lasers em baixa potência estão numa faixa do espectro que não é absorvida por muitos componentes do organismo e, por isso, possuem maior profundidade de penetração. Comprimentos de onda mais longos são mais resistentes ao espalhamento e penetram mais nos tecidos. A luz vermelha do laser de He-Ne penetra 0,5 a 1 mm antes de perder 37% de sua intensidade, enquanto que a luz infravermelha do laser de GaAlAs penetra mais de 2 mm antes de perder a mesma quantidade de energia. A terapia a laser envolve usualmente exposições de  $4 J/cm^2$ , o que significa uma penetração de 0,5 a 2,5 cm podendo atingir nervos, músculos e articulações<sup>5</sup>.

Os mecanismos biomoleculares da ação do laser de baixa potência são bem diferentes dos mecanismos térmicos do laser de alta potência. O evento inicial que ocorre é a absorção da luz por moléculas do tecido alvo as quais são chamadas de cromóforos. Outras moléculas fotossensíveis são a clorofila na fotossíntese e a rodopsina na visão. Os citocromos, enzimas da cadeia respiratória presentes nas mitocôndrias das células, responsáveis por converter ADP em ATP e fornecer energia para a célula e dirige o seu metabolismo (síntese de proteínas, replicação, motilidade celular, manutenção do potencial da membrana), são fotossensíveis. Assim, a

energia do laser é absorvida e convertida em energia para a célula (ATP)<sup>15,24,25</sup>.

A ação dos lasers em baixa potência nos tecidos ocorre dentro de um espectro limitado da luz de comprimentos de onda de 600 a 900 nm, os quais possuem níveis de energia e absorção relevantes. No espectro entre 500 e 1200 nm, não há uma molécula específica que absorva toda a energia do laser, como, por exemplo, a hemoglobina e melanina interagem com comprimentos de onda de 500 nm do laser de argônio. Toda energia é absorvida por esses pigmentos e a luz não atinge outras áreas do tecido. Esse intervalo de 500 a 1200 nm é chamado de “janela óptica” dos tecidos, por não haver moléculas de absorção específica para esses comprimentos de onda, o tecido permite a livre passagem e espalhamento dos raios vermelhos e infravermelhos dos lasers em baixa potência até que cheguem aos citocromos das mitocôndrias<sup>1,15,24,25</sup>.

Nenhum efeito colateral foi observado com o uso de lasers no espectro vermelho e infravermelho, pois seus fótons são de baixa energia e não causam ionização, causam somente excitação e calor<sup>23</sup>.

## 2.2 LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA

Albertini e colaboradores, usando o modelo de inflamação induzido por carragenina, demonstraram pelo uso de laserterapia de baixa potência, uma diminuição na evolução do edema quatro horas após a injeção de carragenina no músculo subplantar. Esses autores mostraram que a irradiação com laser falhou na inibição do edema em animais adrenalectomizados, indicando que a laserterapia de baixa potência possivelmente exerce seus efeitos antiinflamatórios estimulando a liberação de hormônios adrenocorticosteróides<sup>8</sup>.

A carragenina é um polissacarídeo amplamente utilizado para induzir resposta inflamatória aguda em animais experimentais, uma vez que induz a liberação de diferentes mediadores inflamatórios como a histamina,

bradicinina, prostaglandina e ânions superóxidos<sup>16</sup>. O uso da carragenina como agente irritante para induzir inflamação em pata de rato foi introduzido por Winter e colaboradores, tornando-se um dos métodos mais populares para o teste de drogas e avaliação de novas terapias antiinflamatórias<sup>17,18</sup>.

Recentemente, nosso grupo demonstrou uma diminuição na quantidade de RNAm para COX-2 em músculo subplantar retirado de ratos tratados com carragenina seguido de irradiação de laser de baixa potência uma hora após a injeção de carragenina<sup>7</sup>. Nesses animais, a expressão de COX-2 e o volume do edema foram reduzidos pela laserterapia de baixa potência 4h após a injeção de carragenina. Além disto, Albertini e colaboradores demonstraram a redução (de 30 - 40%) no conteúdo de RNAm das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 3 h após a irradiação com laser em músculo subplantar coletado de rato tratado com carragenina. Este efeito diminutivo da expressão do RNAm destas moléculas foi observado usando tanto laser de comprimento de onda de 660nm ou 684nm quatro horas após a indução da inflamação aguda. Estes resultados demonstraram que laserterapia de baixa potência apresenta uma ação antiinflamatória que possivelmente modula fatores de transcrição ligados à expressão de RNAm de COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias<sup>15</sup>.

Lopes-Martins e colaboradores sugeriram que laserterapia de baixa potência administrada 1-3 horas após a indução da inflamação em um modelo de pleurite aguda induzida por carragenina, reduz significativamente a migração das células inflamatórias<sup>6</sup>.

Aimbire e colaboradores administraram laserterapia de baixa potência em modelos de pleurite induzidas por *Rabbit antiserum ovalbumin* (BSA) mostraram a redução da expressão dos níveis de TNF- $\alpha$  no lavado broncoalveolar após a irradiação<sup>11</sup>.

Ferreira e colaboradores analisaram os efeitos analgésicos da laserterapia de baixa potência com o laser de He-Ne no processo inflamatório agudo induzido por carragenina, e mostraram que a irradiação com dose de 2.5 J/cm<sup>2</sup> produz analgesia e diminui o volume do edema quando aplicado 1, 2 e 3 horas após a injeção de carragenina, inibindo a

sensibilização dos nociceptores no processo inflamatório, conseqüentemente diminuindo a dor<sup>26</sup>.

Os receptores de cininas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> desempenham papel importante na patofisiologia da inflamação<sup>7,15,16</sup>. O receptor de cininas B<sub>2</sub> é amplamente e constitutivamente expresso, enquanto o receptor B<sub>1</sub> é pouco expresso na maioria dos tecidos em condições basais, porém tem a sua expressão fortemente aumentada durante processos inflamatórios. Os receptores B<sub>2</sub> constitutivos são conhecidos por estarem preferencialmente envolvidos na fase inicial da inflamação e o receptor B<sub>1</sub> induzível na fase mais tardia<sup>17,18</sup>.

O envolvimento do receptor B<sub>1</sub> no modelo inflamatório induzido por carragenina tem sido demonstrado. Costa e colaboradores demonstraram os efeitos antiinflamatórios de um antagonista seletivo não peptídico para receptor de cininas B<sub>1</sub>, SSR240612 na inflamação pleural induzida por carragenina em camundongos, reduzindo a contagem de células totais e neutrófilos<sup>27</sup>.

A relação entre a inflamação induzida por carragenina e o receptor de cininas B<sub>2</sub> também foi também sugerida. As propriedades antinociceptivas e de inibição de edema do antagonista não peptídico do receptor de cininas B<sub>2</sub>, NPC18884, na hiperalgesia induzida pela carragenina foram demonstradas<sup>28</sup>. Usando o modelo de inflamação pleural induzida por carragenina, Saleh e colaboradores demonstraram a inibição dose-dependente da exsudação e do conteúdo celular total e diferencial causado pela injeção intrapleural de carragenina<sup>29</sup>.

## OBJETIVO

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da laserterapia de baixa potência na formação do edema e na expressão gênica dos receptores de B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de cininas em modelo experimental de inflamação aguda em ratos.

## RESULTADOS

#### 4. RESULTADOS

Artigo publicado em: *International Immunopharmacology*, 2008

F Bortone, HA Santos, R Albertini, JB Pesquero, MS Costa, JA Silva Jr. Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. *International Immunopharmacology*, v 8, p 206-210, 2008.



# Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation

F. Bortone<sup>a</sup>, H.A. Santos<sup>b</sup>, R. Albertini<sup>c</sup>, J.B. Pesquero<sup>d</sup>,  
M.S. Costa<sup>c</sup>, J.A. Silva Jr.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências da Reabilitação, Centro Universitário Nove de Julho, UNINOVE. Rua Vergueiro, 235 Liberdade, CEP 01504001. São Paulo—SP, Brazil

<sup>b</sup> Saúde, Centro Universitário Nove de Julho, UNINOVE. Rua Vergueiro, 235 Liberdade, CEP 01504001. São Paulo—SP, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento—IP&D. Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP. Av. Shishima Hifumi, 2911, CEP: 12244-000. São José dos Campos—SP, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP. Rua Botucatu, 862 7 andar, CEP 04039001. São Paulo—SP, Brazil

Received 30 June 2007; received in revised form 31 August 2007; accepted 6 September 2007

## KEYWORDS

Kinins;  
B1 and B2 receptors;  
Low level laser therapy

## Abstract

Low level laser therapy (LLLT) has been used clinically in order to treat inflammatory processes. In this work, we evaluated if LLLT alters kinin receptors mRNA expression in the carrageenan-induced rat paw edema. Experimental groups were designed as followed: A<sub>1</sub> (Control-saline), A<sub>2</sub> (Carrageenan-only), A<sub>3</sub> (Carrageenan + laser 660 nm) and A<sub>4</sub> (Carrageenan + laser 684 nm). Edema was measured by a plethysmometer. Subplantar tissue was collected for kinin receptors mRNA quantification by Real time-PCR. LLLT of both 660 and 684 nm wavelengths administrated 1 h after carrageenan injection was able to promote the reduction of edema produced by carrageenan. In the A<sub>2</sub> group, B1 receptor expression presented a significantly increase when compared to control group. Kinin B1 receptor mRNA expression significantly decreased after LLLT's 660 or 684 nm wavelength. Kinin B2 receptor mRNA expression also diminished after both laser irradiations. Our results suggest that expression of both kinin receptors is modulated by LLLT, possibly contributing to its anti-inflammatory effect.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Low level laser therapy (LLLT) is a novel therapy involving the application of low power monochromatic and coherent light to injuries and lesions [1]. LLLT has been used to treat muscular pain, although the biological mechanisms of the beneficial results observed in clinical trials remain unclear

\* Corresponding author. Tel.: +55 11 3385 9222.  
E-mail address: josejr@uninove.br (J.A. Silva).

[2]. The ability of LLLT to reduce the duration of acute inflammation [3] and accelerate tissue repair in tendon and muscle injuries was proposed [4]. Lubart et al. suggested that LLLT may promote changes in the cellular redox state, playing a pivotal role in sustaining cellular activities, and promoting photobiostimulative processes [5]. For many years it has been proposed that low level laser therapy (LLLT) is able to ameliorate the pain, swelling, and inflammation associated with various forms of arthritis. Recently, Castano et al. demonstrated that LLLT was highly effective in treating inflammatory arthritis in rats that had zymosan injected into their knee joints in order to induce inflammatory arthritis [6]. The mechanisms behind the observed clinical pain relief after LLLT are poorly understood, and may involve an anti-inflammatory action [7,8]. Bjordal and colleagues demonstrated that LLLT is able to modulate inflammatory processes in a dose-dependent manner and can be used to significantly reduce acute inflammatory pain in clinical settings [8].

Carrageenan is a polysaccharide widely used to induce acute inflammation response in experimental animals, since it induces the release of different inflammatory mediators, such as histamine, bradykinin, prostaglandin, and superoxide anions [9]. The use of carrageenan as an irritant agent to induce rat paw inflammation was introduced by Winter and colleagues, becoming one of the most popular methods for drug testing and evaluation of new anti-inflammatory therapies [10,11].

Albertini et al. using the carrageenan-induced inflammation model, demonstrated the decrease in edema evolution at 4 h after the injection of carrageenan in subplantar muscle by LLLT [12]. These authors have shown that laser irradiation failed to inhibit the edema in adrenalectomized animals, indicating that LLLT possibly exerts its anti-inflammatory effects by stimulating the release of adrenal corticosteroid hormones.

Recently, we demonstrated a diminished COX-2 mRNA expression in subplantar tissue taken from rats treated with carrageenan followed by LLLT 1 h after carrageenan injection [13]. In these animals, COX-2 mRNA expression and edema volume were reduced by LLLT at 4 h after the injection of carrageenan. Moreover, Albertini et al. demonstrated the reduction (30–40%) in the mRNA content of cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 3 h after laser irradiation in paw muscle treated with carrageenan. This diminished effect in mRNA expression was observed using either LLLT's 660 nm or 684 nm red wavelengths 4 h after acute inflammation induction [14]. These results demonstrate that LLLT present an anti-inflammatory action which possibly modulates transcription factors linked to COX-2 and pro-inflammatory cytokines mRNA expression.

Kinin B1 and B2 receptors play a central role in the pathophysiology of inflammation [15–17]. Kinin B2 receptor is broadly and constitutively expressed, whereas B1 receptor is weakly expressed in most tissues under basal conditions but strongly upregulated following inflammation. Constitutive B2 receptor is thought to be preferentially involved in the early phase and the inducible B1 receptor in later phases of inflammation [18,19].

The involvement of B1 receptor on the carrageenan-induced inflammation model has been demonstrated. Costa and colleagues demonstrated the anti-inflammatory effects of the novel selective non-peptide kinin B(1)

receptor antagonist, SSR240612 on the carrageenan-induced mouse pleurisy, reducing total cell and neutrophil counts [20].

The relation between carrageenan-induced inflammation and kinin B2 receptor was also suggested. The antinociceptive and the edema inhibition properties of the non-peptide kinin B2 receptor antagonist, NPC 18884, on the carrageenan-induced hyperalgesia has been shown [21]. Using the mouse pleurisy model induced by carrageenan, Saleh et al. demonstrated the dose-dependent inhibition of the exudation and total and differential cell content caused by intrapleural injection of carrageenan [22].

To our knowledge there are few, if any, studies investigating whether LLLT affects kinin receptors expression *in vivo*. Within this context, the present study was therefore designed to evaluate the kinin involvement in the anti-inflammatory properties of LLLT applied at different wavelengths (660 and 684 nm) on the carrageenan-induced rat paw edema, a classical model for acute inflammatory response. In order to study the anti-inflammatory mechanisms by LLLT, we determined the volume edema and the kinin receptors mRNA expression.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

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

### 2.2. Laser irradiation

Diode lasers with mean output power of 30 mW and wavelengths of either 660 nm (model: laser unit, Kondortech) or 684 nm (model: Theralase) were used. Spectroscopic measurements carried out on both lasers showed no thermal drift for the 660 nm laser. The 684 nm laser showed a 0.4 nm wavelength drift from the cold to warm operation conditions. Stabilization at the 684 nm was achieved in a time period shorter than 30 s after turning on with the diode laser device at room temperature. The optical power was calibrated by using a Newport Multifunction Optical Meter (model 1835C). The laser beam illuminated an area of 0.785 cm<sup>2</sup> resulting in an energy dosage of 7.5 J/cm<sup>2</sup>.

### 2.3. Experimental groups

Experimental group consisted of 32 male Wistar rats divided into 4 groups: A1 (Control-saline), A2 (Carrageenan alone), A3 (Carrageenan+laser 660 nm) and A4 (Carrageenan+laser 684 nm). Rats were given a subplantar injection (0,5 mg/paw) of either carrageenan (Sigma) or saline in the subplantar region from left paw, under anesthesia with halothane. The animals from A3 and A4 groups were irradiated at 1 h after the inflammation induced by carrageenan.

### 2.4. Experimental procedure

The animals were sacrificed by decapitation 4 h after each treatment and the subplantar muscles were quickly dissected,

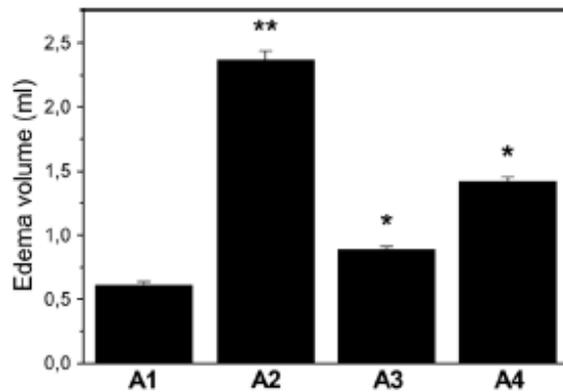


Figure 1 Edema volume determined 4 h after carrageenan-induced inflammation in rat paw. The experimental conditions are described under Materials and methods. The data are mean $\pm$ SE ( $n=8$ ). A statistical analysis indicated that  $p<0.05$ , comparing A1 with A2 groups (\*\*) and comparing A3 and A4 with A2 groups (\*).

immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction.

## 2.5. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from subplantar muscles by TRIzol reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), according to the manufacturer's protocol. RNA was subjected to DNase I digestion, followed by reverse transcription to cDNA, as previously described [19]. PCR was performed in a 7000 Sequence Detection System (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA) using the SYBRGreen core reaction kit (Applied Biosystems). Primers used for kinin B1 receptor mRNA quantification were: B1 forward 5'-CCAGGGTTCGTCATCAC TATCTG-3' and reverse primer 5'-GCAAAGGAAGAAGGACAAGACTAA-3' (GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_030851); and primers for kinin B2 mRNA quantification were: B2 forward 5'-CCCTTCCTCTGGGTCCTCTT-3' and reverse primer 5'-CAGAACACGCTGAGGACAAAGA-3' (GenBank<sup>TM</sup> accession number NM\_173100.1).  $\beta$ -actin primers forward (GenBank<sup>TM</sup> accession number J00691) 5'-AAGTCCCTCACCCTCCCAAAG-3' and reverse (GenBank<sup>TM</sup> accession number V01217) 5'-AAGCAATGCTGTACCTTCC-3' were also used. Rat beta2-microglobulin was used as a second internal standard for gene quantification (GenBank<sup>TM</sup> accession number AF072097): primers 5'-TGCTTTTCAAGGACTGG-3' and 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'.

Quantitative values for kinin B1 and B2 receptors,  $\beta$ -actin and beta2-microglobulin mRNA transcription were obtained from the threshold cycle number, where the increase in the signal associated with an exponential growth of PCR products begins to be detected. Melting curves were generated at the end of every run to ensure product uniformity. The relative target gene expression level was normalized on the basis of  $\beta$ -actin or  $\beta$ 2-microglobulin expression as endogenous RNA control.  $\Delta C_t$  values of the samples were determined by subtracting the average  $C_t$  value of kinin B1 and B2 mRNA from the average  $C_t$  value of the internal control  $\beta$ -actin or beta2-microglobulin. As it is uncommon to use  $\Delta C_t$  as a relative data due to this logarithmic characteristic, the  $2^{-\Delta C_t}$  parameter was used to express the relative expression data [23]. Results are expressed as a ratio relative to the sum of  $\beta$ -actin and  $\beta$ 2-microglobulin transcript levels as internal control.

## 2.6. Statistic analysis

Data were examined by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test *post hoc* to determine

differences between groups. The results were considered significant when  $p<0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Effect of LLLT on carrageenan-induced edema

In order to study the effect of LLLT on the paw swelling, initially we investigated the edema volume four hours after carrageenan injection, according to Albertini et al. [13]. A pronounced swelling of the rat paw in the animals receiving carrageenan was observed when compared with the control group (Fig. 1). Laser irradiation administered 1 h after carrageenan injection was able to promote the edema reduction induced by carrageenan administration ( $p<0.05$ ). This effect was similarly successful using wavelengths of both 660 and 684 nm.

### 3.2. Effect of LLLT on the kinin receptors expression in the rat paw

Kinin B1 receptor mRNA expression presented a significantly increase in the edematous rat paw ( $A_2$ :  $1.8\pm 0.2$ ,  $p<0.001$ ) when compared to control group ( $A_1$ :  $0.3\pm 0.1$ ) (Fig. 2). Inflamed rat paw irradiated with laser of either 660 nm ( $A_3$ ) or 684 nm ( $A_4$ ) wavelength presented lower kinin B1 receptor mRNA expression ( $0.3\pm 0.2$  and  $0.5\pm 0.3$ , respectively,  $p<0.05$ ) compared with carrageenan-only treated animals. Using a second housekeeping gene ( $\beta$ 2-microglobulin), kinin B1 mRNA expression was similar to data obtained after  $\beta$ -actin mRNA normalization. Kinin B1 receptor mRNA expression is relevant in inflammation models, since its induction is modulate by cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  [24]. Interestingly, kinin B<sub>1</sub> receptors expression seem to be upregulated under the same conditions described for the inducible pro-inflammatory enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and the inducible nitric oxide synthase (iNOS). In this way, the stimuli (and also the cellular signalling pathways) shown to be capable of increasing the expression of B<sub>1</sub> receptors are the same as those recognized for stimulating the upregulation of COX-2 and iNOS (for

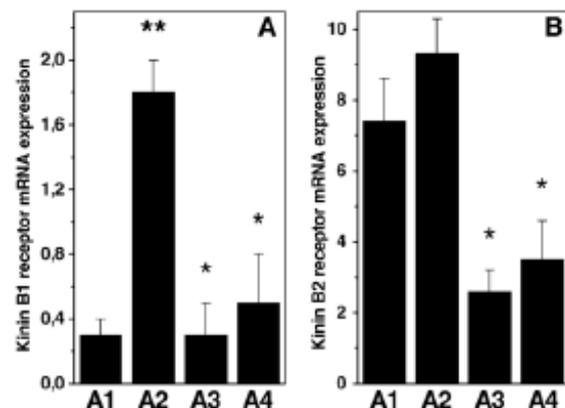


Figure 2 Effect of LLLT on kinin B1 (A) and B2 (B) receptors mRNA expression. The experimental conditions are described under Materials and methods. The analysis was performed by RT-PCR. Groups: A<sub>1</sub> (Control-saline), A<sub>2</sub> (Carrageenan-only), A<sub>3</sub> (Carrageenan+laser 660 nm) and A<sub>4</sub> (Carrageenan+laser 684 nm). The relative data are expressed as mean $\pm$ SE ( $n=8$ ). A statistical analysis indicated that  $p<0.05$ , comparing A1 with A2 groups (\*\*) and comparing A3 and A4 with A2 groups (\*).

review of kinin B1 receptor role in inflammatory and painful processes, see Calixto et al. [25]). Indeed, we recently showed that COX-2 mRNA expression was also diminished after LLLT at the same time course of kinin receptors expression presented here [13]. Further pharmacological evidence suggests that upregulation of B<sub>1</sub> receptor-mediated rat paw edema following intradermal injection of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  involves the activation of protein kinase C, tyrosine kinase or MAP-kinases and the transcriptional factor NF- $\kappa$ B [26]. It has been demonstrated that specific NF- $\kappa$ B blockers are able to prevent B<sub>1</sub> receptor upregulation both *in vitro* [27,28] and *in vivo* [26,29].

No significant difference was observed between control (A<sub>1</sub>: 7.4 $\pm$ 1.2) and A<sub>2</sub> (9.3 $\pm$ 1.0;  $p$ <0.13) concerning to kinin B2 expression (Fig. 2). However, kinin B2 receptor mRNA expression also diminished in A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub> groups (2.6 $\pm$ 0.6 and 3.5 $\pm$ 1.1, respectively,  $p$ <0.05) in different experiments using either  $\beta$ -actin or  $\beta$ 2-microglulin as internal standard. The relation between carrageenan-induced inflammation and kinin B2 receptor is also suggested. The antinociceptive and the edema inhibition properties of the non-peptide kinin B2 receptor antagonist, NPC 18884, on the carrageenan-induced hyperalgesia has been shown [21]. Using the mouse pleurisy model induced by carrageenan, Saleh et al. demonstrated the dose-dependent inhibition of the exudation and total and differential cell content caused by intrapleural injection of carrageenan [22].

Surprisingly, after carrageenan and laser treatment, kinin B2 receptor mRNA expression still presented lower expression levels than A1 group (control), suggesting a possible involvement of a transcriptional modulator. This data was validated using  $\beta$ -actin or  $\beta$ 2-microglobulin as a housekeeping control gene. Despite kinin B2 receptor is constitutively expressed in a large number of cells, the gene expression is regulated during development in the kidney, cardiovascular system, and later in some pathological states such as diabetes and cardiac hypertrophy by substances such as cAMP, glucose, glucocorticoids, and estrogen, among others, which modulate the mRNA expression, protein levels, and cell surface kinin B2 receptors in tissues. Baptista et al. suggest that the classical silencer element present in the regulatory region of the kinin B2 promoter could be one of the mechanisms by which the gene is downregulated at the transcriptional level either in pathophysiological or physiological conditions [30]. Further investigations need to be performed in order to clarify the acquired data.

This is the first report showing a reduction of kinin receptors mRNA expression after LLLT, using a traditional inflammation model. Taken together, these results suggest that expression of kinin B1 and B2 receptors mRNA expression is modulated by LLLT, possibly contributing to its anti-inflammatory effect. Therefore, LLLT may be a new alternative therapy in the treatment of inflammatory disorders.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge FAPESP (Brazil) for the grants (04/10539-5 and 05/54145-3) and UNINOVE, which funded this research.

## References

- [1] Hawkins D, Hourelid N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1056:486–93.

- [2] Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med* 2005;37:46–52.
- [3] Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg* 2004;22:199–204.
- [4] Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anat Rec* 1993;235:374–80.
- [5] Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005;23:3–9.
- [6] Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, Hamblin MR. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: importance of illumination time. *Lasers Surg Med* 2007;39(6):543–50.
- [7] Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RAB. Low-level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg* 2006;24:158–68.
- [8] Kandolf-Sekulovic L, Kataranovski M, Pavlovic MD. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003;4:203–12.
- [9] Di Rosa M. Pharmacological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol* 1972;24:89–102.
- [10] Winter CA, Risley EA, Nuss GM. Carrageenan-induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol* 1962;111:544–7.
- [11] Colville-Nash PR, Gilroy DW. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins—a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;62:33–43.
- [12] Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zangaro RA, Lopes-Martins RA. Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J Photochem Photobiol B Biol* 2004;74:101–7.
- [13] Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva Jr JA, Costa MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res* 2007;56(6):228–9.
- [14] Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Bjordal JM, Brugnera A Jr, Mittmann J, Silva JA Jr, Costa MS. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy (LLLT). *Photomedicine and Laser Surgery*, in press.
- [15] Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980;32:1–46.
- [16] Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1–80.
- [17] Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005;99:6–38.
- [18] Campos MM, Calixto JB. Involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol* 1995;114:1005–13.
- [19] Cayla C, Todiras M, Iliescu R, Saul VV, Gross V, Pilz B, et al. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 2007;21(8):1689–98.
- [20] Costa R, Fernandes ES, Menezes-de-Lima Jr O, Campos MM, Calixto JB. Effect of novel selective non-peptide kinin B(1) receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 2006;27(11):2967–75.

- [21] de Campos RO, Alves RV, Ferreira J, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Calixto JB. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;360(3):278–86.
- [22] Saleh TS, Vianna RM, Creczynski-Pasa TB, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Kyle DJ, Calixto JB. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1998;363(2–3):179–87.
- [23] Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999;14(5–6):143–9.
- [24] Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001;429:161–76.
- [25] Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 2004;143:803–18.
- [26] Campos MM, Souza GE, Calixto JB. *In vivo* B<sub>1</sub> kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol* 1999;127:1851–9.
- [27] Sardi SP, Errasti AE, Rey-Ares V, Rogines-Velo MP, Rothlin RP. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor in isolated human umbilical vein an experimental model of the *in vitro* up-regulation. *Acta Pharmacol Sinica* 2000;21:105–10.
- [28] Medeiros R, Cabrini DA, Calixto JB. The *in vivo* and *ex vivo* roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor- $\kappa$ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B<sub>1</sub> receptor mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul Pept* 2001;97:121–30.
- [29] Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, Araújo JG, Pesquero JL, Avellar MC, Teixeira MM, Calixto JB. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B<sub>1</sub> receptors in the rat paw. *Br J Pharmacol* 2003;139:973–81.
- [30] Baptista HA, Avellar MC, Araújo RC, Pesquero JL, Schanstra JP, Bascands JL, et al. Transcriptional regulation of the rat bradykinin B<sub>2</sub> receptor gene: identification of a silencer element. *Mol Pharmacol* 2002;62(6):1344–55.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

## **5. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Analisar a influência da laserterapia de baixa potência na modulação da expressão de outros componentes do Sistema Caliceína-Cininas, como as caliceínas plasmática e tecidual e o cininogênio, bem como de efetores do Sistema Renina-Angiotensina em modelo de inflamação aguda induzido pela carragenina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miserendino LJ, Pick R. Lasers in dentistry. Hanover Park, IL, Quintessence Publishing, first edition, 1995.
2. Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. [Aust Endod J](#). 2004; 30(3): 93-8.
3. Ponnudurai RN, Zbuzek VK, Niu HL, Wu WH. Laser photobiostimulation-induced hypoalgesia in rats is not naloxone reversible. *Acupunct Electrother Res*. 1988; 13(2-3): 109-17.
4. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg*. 1981; 116: 293-96.
5. Basford, JR. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med*. 1995; 16: 331-42.
6. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Leonardo PSLM, Bjordal JM, Castro-Faria-Neto HC. Spontaneous effects of low level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomedicine and Laser Sur*. 2005; 23 (4): 377-81.
7. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva Jr JA, Costa MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res* 2007, 56 (6): 228-29.
8. Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zangaro Ra, Lopes-Martins RA. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2004; 74: 101-107.
9. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 3-9.

10. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1056: 486-93.
11. Aimbire F, Albertini R, Pacheco MTT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PSLM, Iversen VV, Lopes-Martins RAB, Bjordal JM. Low level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF- $\alpha$  level in acute inflammation. *Photomedicine and Laser Surg* 2006; 24 (1): 33-37.
12. Lana AC, Paulino CA, Gonçalves ID. Efeitos dos exercícios físicos sobre o edema inflamatório agudo em ratos wistar. *Rev Bras Med Esporte* 2008; 14 (1):33-37.
13. Loureiro-Silva MR, Molina HM, Borges DR. Substâncias vasoativas e a modulação microvascular hepático. *Rev Ass Med Brasil* 1999; 45 (3): 206-16.
14. Morais FV, Molina HM, Borges DR, Kouyoumdjian. Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado *ex-vivo*. *Rev Ass Med Brasil* 1999; 45(1): 19-23.
15. Albertini R, Villaverde AB, Aimbere F, Bjordal JM, Brugnera AJR, Mittmann J, Silva Jr JA, Costa MS. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan induced inflammation after low level therapy (LLLT). *Photomedicine and Laser Surgery* 2008; 26(1): 19-24.
16. Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32:1-46.
17. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44:1-80.
18. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The Kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 6-38.
19. Tuner J, Hode L. Laser therapy in dentistry and medicine. Edsbruk, Prima Books, first edition, 1996.

20. Ohshiro T, Calderhead RG. Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J Clin Laser Med Surg*. 1991; 9(4): 267-75.
21. Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, Rettmer RL. Laser Photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers Surg Med* 1990; 10: 201-07.
22. Wilden L, Kerthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg* 1998; 16(3): 159-65.
23. Di Rosa M. Pharmacological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol* 1972; 24: 89-102.
24. Winter paw of CA, Risley EA, Nuss GM. Carrageenan induced edema in the hind the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol* 1962; 111:544-47.
25. Colville-Nash PR, Gilroy DW. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins – a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000; 62: 33-43.
26. Ferreira DM, Zangaro RA, Villaverde AB, Cury Y, Frigo L, Picolo G, Longo I, Barbosa DG. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low level laser therapy on acute inflammatory pain 2005; 23 (2):177-181.
27. Costa R, Fernandes ES, Menezes-de-Lima Jr O, Campos MM, Calixto JB. Effect of novel selective non-peptide kinin B<sub>1</sub> receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 2006; 27 (11): 2967-75.
28. de Campos RO, Alves RV, Ferreira J, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Calixto JB. Oral antinociception and edema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360(3): 278-86.
29. Saleh TS, Vianna RM, Creczynski-Pasa TB, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Kyle DJ, Calixto JB. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a

novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. Eur J Pharmacol 1998; 363 (2-3): 179-87.

ANEXO

## LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA MODULA A EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DE CININAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM RATOS

Bortone F<sup>1</sup>; Santos HA<sup>2</sup>; Albertini R<sup>3</sup>; Pesquero JB<sup>4</sup>; Costa MS<sup>3</sup>; Silva JA Jr<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências da Reabilitação e <sup>2</sup> Saúde, Centro Universitário Nove de Julho, UNINOVE, Rua Vergueiro, 235 Liberdade, CEP 01504001. São Paulo – SP, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento – IP&D. Universidade Vale do Paraíba, UNIVAP. Av. Shishima Hifumi, 2911, CEP 1244000. São José dos Campos – SP, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP. Rua Botucatu, 682 7º andar, CEP 04039001. São Paulo – SP, Brasil.

### RESUMO

A laserterapia de baixa potência tem sido usada clinicamente no tratamento de processos inflamatórios. Neste trabalho, avaliamos se a laserterapia de baixa potência altera a expressão do RNA mensageiros dos receptores de cininas na inflamação induzida por carragenina em edema em pata de ratos. Grupos experimentais foram separados como segue: A1 (Controle salina), A2 (carragenina somente), A3 (carragenina + laser 660nm) e A4 (carragenina + laser 684 nm). O edema foi medido por meio de um pletismômetro. O tecido subplantar foi coletado para a quantificação do mRNA de receptores de cininas feita por Real Time-PCR. A laserterapia de 660 e 684 nm foi administrada 1h após a injeção de carragenina e mostrou-se capaz de promover a redução do edema produzido pela carragenina. No grupo A2, a expressão do receptor B<sub>1</sub> apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle. A expressão RNAm do receptor B<sub>1</sub> de cininas diminuiu significativamente após a irradiação com laserterapia de baixa potência com comprimento de onda de 660 ou 684 nm. A expressão de RNAm do receptor B<sub>2</sub> de cininas também diminuiu após a duas irradiações. Nossos resultados sugerem que a expressão gênica dos receptores de cininas é modulada pela laserterapia de baixa potência, o que possivelmente contribui para seu efeito antiinflamatório.

## 1. INTRODUÇÃO

A laserterapia de baixa potência (LLLT) é uma nova terapia que envolve a aplicação de luz de baixa potência monocromática e mesma amplitude em ferimentos e lesões [1]. A LLLT tem sido utilizada em tratamentos de dores musculares e apesar dos resultados benéficos observados, o mecanismo biológico permanece desconhecido [2]. A capacidade da LLLT em reduzir a duração da fase aguda da inflamação [3] e acelerar a reparação tecidual nos tendões e lesões musculares foi proposta [4]. Lubart e colaboradores sugeriram que a LLLT pode promover mudanças no estado de redução-oxidação celular, desempenhando papel essencial na sustentação das atividades celulares, e promovendo o processo fotobioestimulativo [5]. Durante muitos anos, tem sido proposto que a laserterapia de baixa potência (LLLT) pode amenizar a dor, o inchaço e a inflamação associada a várias formas de artrite. Recentemente, Castano e colaboradores demonstraram que a LLLT foi altamente eficaz no tratamento da artrite inflamatória em ratos, que tiveram injeção de zymosan nas juntas dos joelhos com a finalidade de induzir artrite inflamatória. Os mecanismos por trás do alívio da dor clínica observada após a LLLT são pouco claros e pode envolver uma ação antiinflamatória [7,8].

Bjordal e colaboradores demonstraram que a LLLT é capaz de modular o processo inflamatório de maneira dependente da dor e pode ser usada para reduzir significativamente a dor inflamatória aguda em abordagens clínicas [8].

A carragenina é um polissacarídeo amplamente utilizado para induzir resposta inflamatória aguda em animais experimentais, uma vez que induz a liberação de diferentes mediadores inflamatórios como a histamina, bradicinina, prostaglandina e anions superóxidos [9]. O uso da carragenina como um agente irritante para induzir inflamação em pata de rato foi introduzido por Winter e colaboradores, tornando-se um dos métodos mais populares para o teste de drogas e avaliação de novas terapias antiinflamatórias [10, 11].

Albertini e colaboradores usando o modelo de inflamação induzido por carragenina demonstraram pelo uso de LLLT uma diminuição na evolução do edema quatro horas após a injeção de carragenina no músculo subplantar. Esses autores mostraram que a irradiação com laser falhou na inibição do edema em animais adrenalectomizados, indicando que a LLLT possivelmente exerce seus efeitos antiinflamatórios estimulando a liberação de hormônios adrenocorticosteróides.

Recentemente, nosso grupo demonstrou uma diminuição na quantidade de RNA mensageiro (RNAm) para COX-2 em músculo subplantar retirado de ratos tratados com carragenina seguido de LLLT uma hora após a injeção de carragenina [13]. Nesses animais, a expressão de COX-2 e o volume do edema foram reduzidos pela LLLT 4h após a injeção de carragenina. Além disto, Albertini e colaboradores demonstraram a redução (de 30 - 40%) no conteúdo de RNAm das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 3 h após a irradiação com laser em músculo subplantar coletado de rato tratado com carragenina. Este efeito diminutivo da expressão do RNAm destas moléculas foi observado usando tanto LLLT de comprimento de onda de 660nm ou 684nm quatro horas após a indução da inflamação aguda [14]. Estes resultados demonstraram que LLLT apresenta uma ação antiinflamatória que possivelmente modula fatores de transcrição ligados à expressão de RNAm de COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias.

Os receptores de cininas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> desempenham papel importante na patofisiologia da inflamação. O receptor de cininas B<sub>2</sub> é amplamente e constitutivamente expresso, enquanto o receptor B<sub>1</sub> é pouco expresso na maioria dos tecidos em condições basais, porém tem a sua expressão fortemente aumentada durante processos inflamatórios. Os receptores B<sub>2</sub> constitutivos são conhecidos por estarem preferencialmente envolvidos na fase inicial da inflamação e o receptor B<sub>1</sub> induzível na fase mais tardia [18, 19].

O envolvimento do receptor B<sub>1</sub> no modelo inflamatório induzido por carragenina tem sido demonstrado. Costa e colaboradores demonstraram os

efeitos antiinflamatórios de um antagonista seletivo não peptídico para receptor de cininas B<sub>1</sub>, SSR240612 na inflamação pleural induzida por carragenina em camundongos, reduzindo as contagens de células totais e neutrófilos [20].

A relação entre a inflamação induzida por carragenina e o receptor de cininas B<sub>2</sub> também foi sugerida. As propriedades antinociceptivas e de inibição de edema do antagonista não peptídico do receptor de cininas B<sub>2</sub>, NPC18884, na hiperalgesia induzida pela carragenina foram demonstradas [21]. Usando o modelo de inflamação pleural induzida por carragenina, Saleh e colaboradores demonstraram a inibição dose-dependente da exsudação e do conteúdo celular total e diferencial causado pela injeção intrapleural de carragenina [22].

Pelo nosso conhecimento há poucos, se algum, estudo investigando se a LLLT afeta a expressão de receptores de cininas *in vivo*. Neste contexto o presente estudo foi desenvolvido para avaliar o envolvimento das cininas nas propriedades antiinflamatórias da aplicação de LLLT em diferentes comprimentos de onda (660 e 684nm) no edema de pata de rato induzido por carragenina, um modelo clássico para resposta de inflamação aguda. A fim de estudar os mecanismos antiinflamatórios pela LLLT, nós determinamos o volume de edema e a expressão de RNAm de receptores de cininas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da Universidade do Vale do Paraíba para o cuidado animal (protocolo nº A034/2006/CEP). Os experimentos foram realizados usando 32 ratos Wistar machos (150-200g) com comida e água *ad libitum* proveniente da Casa Central do Animal do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da

Universidade Vale do Paraíba. Todos os ratos foram colocados em gaiolas comuns divididos randomicamente em grupos de oito.

### Irradiação a Laser

Laser de diodo com potência de 30mW e comprimento de onda tanto de 660nm (modelo: Laser unit, Kondortech) ou 684nm (modelo Theralase) foram usados. As medidas espectroscópicas executadas em ambos os lasers não mostraram alteração térmica para o laser de 660nm. O laser de 684nm mostrou uma alteração de 0.4 nm no comprimento de onda na condição de operação de frio para quente. O poder óptico foi calibrado utilizando-se Newport Multifunction Optical Meter (modelo 1835C). O raio de luz iluminou uma área de  $0.785\text{cm}^2$  resultando em uma dosagem de energia de  $7.5\text{ J/cm}^2$ .

### Grupos Experimentais

O grupo experimental consistiu de 32 ratos Wistar machos divididos em quatro grupos: A1 (Controle - salina), A2 (carragenina), A3 (Carragenina + laser 660nm) e A4 (Carragenina + laser 684nm). Os ratos receberam uma injeção subplantar (0,5mg/pata) de carragenina (Sigma) ou salina (animais controle) na região subplantar da pata esquerda sob anestesia com halotano. Os animais dos grupos A3 e A4 foram irradiados uma hora após a inflamação induzida por carragenina.

### Procedimentos Experimentais

Os animais foram sacrificados por decapitação quatro horas após cada tratamento e os músculos subplatares foram rapidamente dissecados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  até a extração do RNA.

### PCR Quantitativo em tempo Real

O RNA total foi isolado dos músculos subplantares por auxílio do reagente TRIzol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), de acordo com protocolo do fabricante. O RNA foi submetido à digestão com DNase I, seguido de transcrição reversa para cDNA, como previamente descrito [19]. A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizado em Sistema de Detecção de Seqüência 7000 (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA) usando *kit* de reação SYBRGreen (Applied Biosystems). Os iniciadores (*primers*) utilizados para a quantificação de RNAm para receptor de cininas B<sub>1</sub> foram: iniciadores para B<sub>1</sub> senso 5'-CCAGGGTTCGTCATCACTATCTG-3' e antisenso 5'-GCAAAAGGAAGAAGGACAAGACTAA-3' (Gen-Bank™ número de acesso NM\_030851) e iniciadores para quantificação de RNAm para o receptor B<sub>2</sub> de cininas senso 5'-CCCTTCCTCTGGGTCCTCTT-3' e antisenso 5'-CAGAACACGCTGAGGACAAAGA-3' (Gen-Bank™ número de acesso NM\_173100.1). Iniciadores para  $\alpha$ -actina senso (GenBank™ número de acesso J00691) 5'-AAGTCCCTCACCTCCCAAAG-3' e antisenso (GenBank™ número de acesso V01217) 5'-AAGCAATGCTGTACCTTCCC-3' foram também usados. O gene da  $\beta$ 2-microglobulina de rato foi usado como um segundo padrão interno para quantificação gênica (GenBank™ número de acesso AF072097): iniciadores senso 5'-TGCTTTTCAGCAAGGACTGG-3' e antisenso 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'.

Valores quantitativos da transcrição dos receptores de cininas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>,  $\beta$ -actina e  $\beta$ 2-microglobulina foram obtidos do número limiar de ciclos ( $C_t$ ), onde o aumento do sinal associado com o crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado. Curvas de acompanhamento foram geradas ao final de cada corrida para assegurar a uniformidade do produto. O nível relativo da expressão do alvo gênico foi normalizado com base na expressão de RNAm de  $\beta$ -actina ou  $\beta$ 2-microglobulina como controles endógenos. Valores de  $\Delta C_t$  foram determinados subtraindo a média do valor de  $C_t$  das amostras da média de  $C_t$  do controle interno  $\beta$ -actina e  $\beta$ 2-microglobulina. Como é incomum o uso de  $\Delta C_t$  devido a esta

característica logarítmica, o parâmetro  $2^{-\Delta Ct}$  foi utilizado para expressar os dados da expressão relativa [23]. Os resultados foram expressos como razão relativa da soma dos níveis de transcrição  $\beta$ -actina e  $\beta 2$ -microglobulina como controles internos.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram examinados pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer *post hoc* para determinar diferenças entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 4. RESULTADOS

#### Efeito da LLLT no edema induzido pela carragenina.

A fim de estudar o efeito da LLLT no edema da pata, inicialmente analisamos o volume do edema quatro horas após a injeção de carragenina, de acordo com Albertini e colaboradores [13]. Um inchaço pronunciado da pata de rato em animais que receberam carragenina foi observado quando comparados com o grupo controle (Figura1). A irradiação com laser administrada uma hora após a injeção de carragenina foi capaz de promover uma redução do edema induzido pela administração da carragenina ( $p < 0,05$ ). Este efeito foi similar utilizando comprimentos de onda de 660 e 684nm.

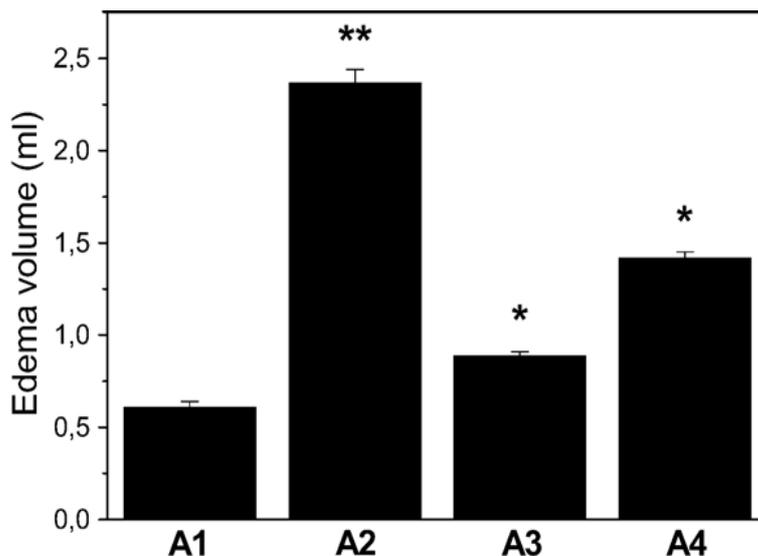


Figura 1: Volume do edema determinado quatro horas após a inflamação induzida por carragenina em pata de rato. As condições experimentais foram descritas em materiais e métodos. Os dados são mostrados como média $\pm$  desvio padrão (n=8). A análise estatística mostrou valor de  $p$  menor que 0,05 comparando grupos A1 e A2( \*\*) e comparando A3 e A4 com grupo A2 (\*).

#### Efeito da LLLT na expressão de receptores de cininas em pata de rato

A expressão de RNAm de receptor  $B_1$  de cininas apresentou um aumento significativo na pata de rato edematosa (A2:  $1.8\pm 0.2$ ,  $p < 0.001$ ) quando comparada ao grupo controle (A1:  $0.3\pm 0.1$ ). (Figura2). Patas de ratos inflamadas irradiadas com laser tanto de comprimento de onda de 660nm (A3) ou 684nm (A4) apresentaram uma menor expressão do RNAm para receptor  $B_1$  de cininas ( $0.3\pm 0.2$  e  $0.5\pm 0.3$ , respectivamente,  $p < 0.05$ ) comparados com animais tratados somente com carragenina. Usando um segundo controle endógeno ( $\beta 2$ -microglobulina), a expressão de RNAm para cininas  $B_1$  foi similar aos dados obtidos após normalização de RNAm para  $\beta$ -actina (dado não mostrado). A expressão de RNAm para receptor  $B_1$  de cininas é relevante em modelos de inflamação, uma vez que sua indução é modulada por citocinas como  $IL-1\beta$  e  $TNF-\alpha$ . De maneira interessante, a expressão de receptores  $B_1$  de cininas parece estar aumentada nas mesmas condições descritas para as enzimas pró-inflamatórias ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Desta forma, os estímulos (e também as vias de sinalização celular) que mostram a capacidade de

aumentar a expressão de receptores B<sub>1</sub> foram os mesmos reconhecidos para estimulação do aumento da expressão de COX2 e iNOS (para revisão da importância do receptor B<sub>1</sub> de cininas em processos inflamatórios e dolorosos, veja Calixto e colaboradores [25]). Além disso, nós recentemente mostramos que a expressão de RNAm para COX2 foi também diminuída após LLLT concomitantemente com a expressão de receptores de cininas observada aqui [13]. Outras evidências farmacológicas sugerem que o aumento da expressão de receptores B<sub>1</sub> no edema em pata de rato seguido da injeção intradérmica de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  envolve a ativação da proteína quinase C, tirosina quinase ou MAP-quinases e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B [26]. Foi demonstrado ainda que bloqueadores específicos para NF- $\kappa$ B são capazes de prevenir o aumento da expressão de receptor B<sub>1</sub> tanto *in vitro* [27, 28] quanto *in vivo* [26, 29].

Nenhuma diferença significativa foi observada entre o controle (A1:7.4 $\pm$ 1.2) e A2 (9.3 $\pm$ 1.0; p<0.13), com relação à expressão de receptores de cininas B<sub>2</sub>, entretanto a expressão de RNAm para receptores B<sub>2</sub> de cininas também diminuiu nos grupos A3 e A4 (2.6 $\pm$ 0.6 e 3.5 $\pm$ 1.1, respectivamente, p<0.05) em diferentes experimentos usando tanto  $\beta$ -actina ou  $\beta$ 2-microglobulina como padrão interno. A relação entre a inflamação induzida por carragenina e o receptor de B<sub>2</sub> é também sugerida. As propriedades antinoceptivas e inibidoras de edema do antagonista não peptídico de receptor B<sub>2</sub> de cininas, NPC 18884, na hiperalgesia induzida por carragenina foi demonstrada [21]. Usando o modelo de inflamação pleural induzida por carragenina em camundongos, Saleh et al. demonstrou a inibição dose-dependente da exsudação e o conteúdo celular total e diferencial causado pela injeção intrapleural de carragenina.

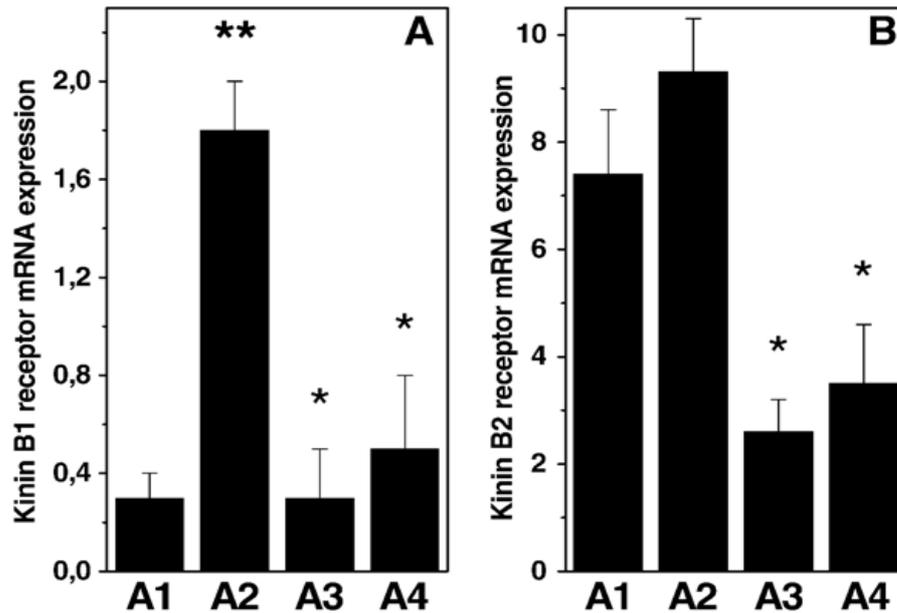


Figura 2: Efeito da LLLT na expressão gênica dos receptores de cininas B1 e B2. As condições experimentais foram descritas em materiais e métodos. A análise foi realizada por Real Time PCR. Grupos A1 (Controle salina), A2 (Somente carragenina), A3 (Carragenina e laser 660nm) e A4 (Carragenina e laser 684nm). Os dados relacionados foram expressos como média $\pm$  desvio padrão (n=8). A análise estatística mostrou valor de  $p$  menor que 0,05 comparando grupos A1 e A2(\*\*) e comparando A3 e A4 com grupo A2 (\*)

Surpreendentemente após o tratamento com carragenina e laserterapia, a expressão de RNAm de receptor B<sub>2</sub> de cininas ainda apresentava níveis mais baixos de expressão que o grupo A1 (controle), sugerindo um possível envolvimento de um modulador transcricional. Este dado foi validado usando  $\beta$ -actina ou  $\beta$ 2-microglobulina como controle gênico endógeno. Apesar de receptor de cininas B<sub>2</sub> ser expresso constitutivamente em um grande número de células, a expressão gênica é regulada durante o desenvolvimento nos rins e sistema cardiovascular e após nascimento em alguns estados patológicos como o diabetes e hipertrofia cardíaca por substâncias como AMP cíclico, glicose, glicocorticóides, e estrógeno, dentre outros que modulam a expressão de RNA mensageiro, níveis protéicos e receptores membranares B<sub>2</sub> de cininas em tecidos. Baptista e colaboradores sugerem que o elemento silenciador clássico presente na região regulatória do promotor do gene B<sub>2</sub> de cininas poderia ser um dos mecanismos no qual o gene tem sua expressão

diminuída a nível transcricional, tanto em condições patofisiológicas como fisiológicas [30]. No entanto, outras investigações precisam ser realizadas para clarear os dados adquiridos.

Estes são os primeiros dados mostrando a redução da expressão de RNAm de receptores de cininas após LLLT, usando um modelo de inflamação tradicional. Em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão de receptores de cininas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> é modulada pela LLLT, possivelmente contribuindo para seus efeitos antiinflamatórios. Além disto, a LLLT pode ser uma nova terapia alternativa no tratamento de doenças inflamatórias.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1056:486-93.
- [2] Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med* 2005; 37:46-52.
- [3] Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg* 2004; 22:199-204.
- [4] Bibikova A, Oron U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Rec* 1993; 235: 374-80
- [5] Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 2005; 23:3-9.
- [6] Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, Hamblin MR. Low level laser therapy for zymosan induced arthritis in rats: importance of illumination time. *Lasers Surg Med* 2007; 39 (6): 543-50.
- [7] Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RAB. Low level laser therapy in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 158-68.
- [8] Kandolf-Sekulovic L, Kataranovski M, Pavlovic MD. Immunomodulatory effects of low intensity near infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 4:203-12.
- [9] Di Rosa M. Pharmacological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol* 1972; 24:89-102.

- [10] Winter CA, Risley EA, Nuss GM. Carrageenan induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol* 1962; 111:544-47.
- [11] Colville-Nash PR, Gilroy DW. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins – a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000; 62:33-43.
- [12] . Albertini R, Ambiere FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zangaro Ra, Lopes-Martins RA. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. *J photochem Photobiol B Biol* 2004; 74:101-107.
- [13] Albertini R, Aimbere F, Villaverde AB, Silva Jr JA, Costa MS. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm Res* 2007, 56 (6):228-29.
- [14] Albertini R, Villaverde AB, Aimbere F, Bjordal JM, Brugnera AJR, Mittmann J, Silva Jr JA, Costa MS. Cytokines mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan induced inflammation after low level therapy (LLLT). *Photomedicine and Laser Surgery* 2008; 26(1):19-24.
- [15] Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32:1-46.
- [16] Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44:1-80.
- [17] Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The Kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005; 99:6-38.

- [18] Campos MM, Calixto JB. Involvement of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in bradykinin induced rat paw edema. *Br J Pharmacol* 1995; 114:1005-13.
- [19] Cayla C, Todiras M, Iliescu R, Saul VV, Gross V, Pilz B, et al. Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin induced hypotension. *FASEB J* 2007; 21 (8):1689-98.
- [20] Costa R, Fernandes ES, Menezes-de-Lima Jr O, Campos MM, Calixto JB. Effect of novel selective non-peptide kinin B<sub>1</sub> receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 2006; 27 (11):2967-75.
- [21] de Campos RO, Alves RV, Ferreira J, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Calixto JB. Oral antinociception and edema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1999; 360(3):278-86.
- [22] Saleh TS, Vianna RM, Creczynski-Pasa TB, Chakravarty S, Mavunkel BJ, Kyle DJ, Calixto JB. Oral anti-inflammatory action of NPC 18884, a novel bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1998; 363 (2-3):179-87.
- [23] Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 1999; 14 (5-6):143-9.
- [24] Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429:161-76.
- [25] Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful process. *Br J Pharmacol* 2004; 143:803-18.
- [26] Campos MM, Souza GE, Calixto JB. In vivo B<sub>1</sub> kinin receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappa B pathways. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1851-9.
- [27] Sardi SP, Errasti AE, Rey-Ares V, Rogines-Velo MP, Rothlin RP. Bradykinin B<sub>1</sub> receptor in isolated human umbilical vein an experimental model of the in vitro up-regulation. *Acta Pharmacol Sinica* 2000; 21:105-10.

[28] Medeiros R, Cabrini DA, Calixto JB. The in vivo and ex vivo roles of cyclooxygenase-2 nuclear factor-  $\kappa$ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B1 receptor mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul Pept* 2001; 97:121-30.

[29] Fernandes ES, Passos GF, Campos MM, Araújo JG, Pesquero JL, Avellar MC, Teixeira MM, Calixto JB. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. *Br J Pharmacol* 2003; 139:973-81.

[30] Baptista HA, *et al.* Transcriptional regulation of the rat bradykinin B2 receptor gene: identification of a silencer element. *Mol Pharmacol* 2002; 62(6):1344-55.