RODNEY CAPP PALLOTTA

ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER INFRA-VERMELHO (810NM) NO MODELO DE
INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA EM JOELHO DE RATOS

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em Farmacologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biomédicas.

São Paulo
2008

RODNEY CAPP PALLOTTA

ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER INFRA-VERMELHO (810NM) NO MODELO DE
INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA EM JOELHO DE RATOS

Dissertação apresentada ao programa de
pós-graduação em Farmacologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biomédicas

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro
Brandão Lopes-Martins

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pallotta, Rodney Capp.

Estudo dos efeitos do laser infra-vermelho (810nm) no modelo de
inflamação aguda induzida em joelho de ratos / Rodney Capp
Pallotta. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de
concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Laser em medicina /
Terapêutica experimental.

Versão do título para o inglês: Study of the effects of near-red laser
(810nm) on acute inflammation of the knee in rats.

Descritores: 1. Inflamação 2. Artrite 3. Laser de baixa potência
(LBP) 4. Ratos 5. Osteoartrite I. Martins, Rodrigo Álvaro Brandão
Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III.
Título.

ICB/SBIB226/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodney Capp Pallotta.

Título da Dissertação: Estudo dos efeitos do laser infra-vermelho (810nm) no modelo de inflamação aguda induzida em joelho de ratos.

Orientador(a): Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **011** nas fls do livro **53** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, Coordenador(a) da Linha de pesquisa ***"Efeito da terapia com laser de baixa intensidade na inflamação articular induzida por carragenina e caolin em joelho de ratos"*** do qual participou(aram) o(s) alunos ***Luciano Ramos, Rodrigo Iabat Marcos, Rodney Capp Pallota e os pesquisadores Sócrates Calvoso Penna, Lúcio Frigo, Marcelo Nicolás Muscará*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.02.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, Raul Pallotta Filho, Maria José Capp Pallotta, ao meu irmão, Raul Capp Pallotta, que deus ajude a vocês todos no caminho da vida.

Agradecimentos

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Rodrigo Labat Marcos, Luciano Ramos, Daiane Meneguzzo, Simone Teixeira, Rodrigo Martins Porto, Simone Bolonheis e Sócrates Calvoso Penna pelas fantásticas horas de trabalho e ajuda para a conclusão desta dissertação. Ao Dr. Paulo de Carvalho, conselheiro, sócio e amigo nas horas vagas, e Sérgio Eduardo Migliorini, meu amigo e colega de profissão.

Ao Prof Dr. Lúcio Frigo, que me mostrou como é que se faz ciência e sempre me ajudou nos momentos mais difíceis.

Além de Thaís Mariotti, pela sua compaixão, companhia e desabafo nos momentos estressantes. E claro minha filha favorita Jully.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins, meu orientador, que apesar de seus dias, sempre foi de grande ajuda nos momentos mais desesperadores, servindo como um pai que ajuda um filho, MUITO obrigado!

Resumo

INTRODUÇÃO: A Artrite aguda do joelho é o tipo mais comum de artrite, e sua prevalência aumenta em paralelo com o aumento da idade da população. Há muitas evidências de benefícios clínicos do laser para o tratamento da osteoartrite. No entanto, existem poucos estudos abordando os efeitos de 810 nm laser. Aqui nós iremos investigar os efeitos de Laser de Baixa Potencia (infra-vermelho, 810 nm). **MATERIAL E MÉTODOS:** Ratos Wistar machos (230 - 250g) foram anestesiados com halotano antes da injeção de pró-inflamatórios compostos. Carragenina e Kaolin, ambos a 3%, em solução diluída em soro Fisiológico, administrado intra-articular. Os grupos tratados receberam irradiação laser no local. Após 6 horas todos os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical para coleta de cavidade articular e lavado para celulares e análise bioquímica. O tecido articular foi analisado por PCR em tempo real análise, a fim de avaliar a expressão de COX-1 e COX-2. IL-1, TNF-alfa e IL-6 e a mieloperoxidase (MPO) também foi realizada. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A terapia com laser de baixa potência foi capaz de inibir o número total de leucócitos, atividade de mieloperoxidase, o extravasamento vascular, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e Prostaglandina E2.

Palavras chave: Inflamação; Artrite; Laser de baixa potência (LBP); Ratos; Osteoartrite.

Abstract

Introduction. Arthritis of the knee (AK) is the most common type of osteoarthritis, and its prevalence is rising in parallel with the increasing age of the population.. Here we investigate the effects of Low Level Laser Therapy (infra-red, 810 nm) in experimentally induced rat knee osteoarthritis. *Methods.* Male wistar rats (150 – 200g) were anaesthetized with halothane 1% prior the injection of pro-inflammatory compounds. Carrageenan and Kaolin (both 3%) administered intra-articular. After 6 hours all animals were killed by decapitation and articular cavity was washed and collected. Articular Tissue was carefully removed for edema and Real-time PCR analysis in order to evaluate COX-1 and COX-2 expression. Total and differential cell account, mieloperoxidase activity, IL- β , TNF- α , IL-6 was also analysed. *Results.* Low Level laser therapy was able to significantly inhibit the total number of leukocytes as well as the mieloperoxidase activity, polymorphonuclear cells at the inflammatory site, vascular extravasation, IL-1, TNF-alpha, IL-6 and prostaglandin E2. *Conclusions.* Low Level Laser Therapy operating in 810 nm markedly reduced inflammation in carrageenan, kaolin-induced knee osteoarthritis..

Key words: Inflammation; Arthritis; Low Level Laser Therapy (LLLT); Rats; Osteoarthritis.

Sumário

1 Introdução.....	10
1.1 Doenças Músculo-esqueléticas e articulares	10
1.2 Inflamação Articular Aguda	11
1.4 Laserterapia	14
1.5 Física do LASER	16
1.6 Produção de luz no LASER	16
1.7 Características da luz LASER	17
1.8 O Laser e sua ação	18
1.8.1 Terapias Anti-inflamatórias	18
1.9 Hipótese	21
2 Objetivos.....	22
3 Material e Métodos	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Indução de osteoartrite aguda	23
3.3 Grupos de Estudo	23
3.4 Procedimentos	24
3.4.1 Lavado intra-articular.	24
3.4.2 Contagem de leucócitos.....	25
3.4.3 Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO)	25
3.4.4 Análise da permeabilidade vascular pela técnica de extravasamento do corante Azul de Evans.....	26
3.4.5 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR).....	27
3.4.6 Estudos de expressão protéica por Western blot	28
3.4.7 Quantificação de Interleucina-1 β , IL-6 e TNF- α dos lavados articulares pelo método de Elisa.	29
3.4.8 Quantificação de Prostaglandina E2 (PGE ₂) dos lavados articulares.....	30
3.5 Análise Estatística:	31
4 Resultados.....	32
4.1 Contagem de Leucócitos Totais da Cavidade Articular	32
4.2 Análise diferencial de leucócitos nos lavados articulares	34
4.3 Avaliação do extravasamento protéico por Azul de Evans	37
4.4 Análise da Atividade de Mieloperoxidase.....	39
4.5 Avaliação Funcional	41
4.6 Quantificação de Cicloxygenase 1 e 2 por PCR em Tempo Real no Lavado Articular..	42
4.7 Quantificação de Cicloxygenase 1 e 2 Real Time PCR no Tecido Articular.....	43
4.8 Análise de IL-1 nos lavados articulares.....	45
4.9 Análise de IL-6 nos lavados articulares.....	47
4.10 Análise de TNF- α nos lavados articulares.....	49
4.11 Análise de PGE ₂ nos lavados articulares.....	50
5 Discussão	51
6 Conclusões.....	56
7 Referências Bibliográficas.....	57

1 Introdução

1.1 Doenças Músculo-esqueléticas e articulares

As doenças músculo-esqueléticas, especialmente tendinites, osteoartrite e artrite reumatóide, representam algumas das principais causas de co-morbidades e inatividades ao redor do mundo. Uma parcela significativa da população sofre ou sofrerá destes males. Estas doenças podem levar à importantes perdas funcionais e dor crônica.

A osteoartrite por exemplo, é uma das principais causas de debilidade em pessoas com idade acima de 60 anos (1). Acomete cerca de 10% da população norte americana, ou seja, aproximadamente 20 milhões de pessoas, representando cerca de US\$ 60 bilhões/ano gastos com exames complementares para o diagnóstico, afastamentos das atividades etc (2). Destas, aproximadamente 8% apresentam limitações nos movimentos e cerca de 25% das pessoas deste grupo não são capazes de realizar suas atividades de vida diárias. Estima-se que até 2020 a doença atinja aproximadamente 60 milhões de pessoas, causando gastos ainda maiores para o Sistema de Saúde (2).

A gênese desta doença é desconhecida, sendo assim denominada de idiopática ou primária, porém alguns fatores parecem influenciar seu aparecimento, como:

- 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; (3)
- e) histórico familiar; (4)
- f) sexo; prevalência para o sexo feminino (350.000 casos para 100.000 habitantes). O número de homens acometidos por esta doença é

estimado 250.000 casos para 100.000 habitantes, segundo a OMS em 2000. (4)

Estudos mostram que aproximadamente 50% da população apresenta algum sinal de distúrbios da articulação do joelho. Destes, em torno de 2% a 10%, (aproximadamente 10 milhões de pessoas) nos Estados Unidos da América, (5; 6), apresentam sintomas severos, com expressiva queda na qualidade de vida.

1.2 Inflamação Articular Aguda

As doenças degenerativas músculo-esqueléticas representam um importante problema mundial, pois boa parte da população sofre ou sofrerá destes males. (1)

As articulações são estruturas constituídas por duas superfícies ósseas, recobertas pela membrana sinovial, formando a cápsula articular. As células do tecido sinovial (sinoviócitos) produzem um líquido transparente (líquido sinovial) que preenche a cápsula, promovendo a lubrificação da articulação, reduzindo o atrito e facilitando o movimento. A manutenção da cartilagem articular, que é composta predominantemente pela matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico) e por condrócitos, é dependente do equilíbrio entre as atividades catabólicas e anabólicas. Quando ocorre reparo ou crescimento, os processos anabólicos são mais intensos que os catabólicos. Já em alguns tipos de inflamação crônica, observa-se o aumento da atividade catabólica em relação à atividade anabólica (7).

Durante a inflamação articular, ocorrem dois principais processos fisopatológicos: a inflamação e a perda da cartilagem articular. O tecido sinovial inflamado apresenta intenso infiltrado celular, caracterizado principalmente por células polimorfonucleares, como neutrófilos, na fase aguda, e por linfócitos e macrófagos em uma fase crônica (8; 9). A mobilização destas células é mediada principalmente por quimiocinas, C5a e leucotrieno B₄. Em relação às células inflamatórias, tem sido demonstrada correlação entre a presença de macrófagos e lesão cartilaginosa (10). Os macrófagos, presentes principalmente na membrana

sinovial, produzem diferentes mediadores químicos, além de enzimas da família das metaloproteinases (MMP), principalmente MMP-3 (estromelisina) e MMP-13, que podem favorecer a destruição das estruturas articulares (cartilagem e osso) (10). Hiperplasia e hipertrofia sinovial podem ocorrer, com aumento no volume do fluido sinovial. Os sinais clássicos da inflamação estão presentes, incluindo dor (11).

A artrite pode ser induzida por diferentes estímulos, como por exemplo, lesão mecânica ou deposição de cristais, como na osteoartrite (OA) ou ainda, decorrente de processos autoimunes, como na artrite reumatóide (AR). A OA é o tipo mais comum de artrite, sendo caracterizada por fibrose capsular, formação de osteófito e inflamação da membrana sinovial (12) enquanto a artrite reumatóide é uma doença sistêmica articular degenerativa caracterizada pela destruição progressiva da cartilagem e de estruturas ósseas das articulações (13). A OA e AR são caracterizadas principalmente pelo desequilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular da cartilagem articular, ou melhor, a degradação dos complexos de proteoglicanos apresenta-se acelerada nestes pacientes (14, 15, 16). A perda de proteoglicanos é causada pela grande liberação de proteinases, resultante de um desequilíbrio dessas enzimas e seus inibidores (17). As metaloproteinases (MMPs) tem papel central na degradação da cartilagem (18). Quando secretadas na forma inativa pelos condrócitos e por células sinoviais em resposta à presença de mediadores inflamatórios como a IL-1 β , TNF- α e IFN- δ , são armazenadas na matriz e ativadas após clivagem (19; 20; 21). A MMP-3 e as collagenases, as MMPs 1, 8 e 13 se distinguem das outras enzimas por sua habilidade de clivar o colágeno tipo II, o principal componente da matriz extracelular da cartilagem articular (22). A atividade das MMPs é controlada em parte, pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Um desequilíbrio entre estas proteinases e seus inibidores acarretam alteração na proteólise dos componentes da cartilagem articular. Na artrite a cartilagem tem baixa capacidade intrínseca de recuperação e processos contínuos de destruição da cartilagem acarretam a destruição irreversível da fibra do colágeno (23).

Estudos em pacientes com OA e AR, bem como estudos de modelos experimentais de inflamação articular aguda e crônica, vêm contribuindo para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela gênese e progressão destas doenças articulares degenerativas. Neste sentido, os estudos experimentais têm possibilitado a caracterização dos componentes celulares e mediadores químicos da resposta inflamatória presentes nestes processos (24; 25).

A inflamação articular consiste em um processo inflamatório multimediado, havendo interação entre os diversos mediadores químicos. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm indicado que a IL-1 β e TNF- α estão envolvidos na gênese e progressão da destruição da cartilagem articular (24; 25; 26). A contribuição de proteinases para estas alterações induzidas pelas citocinas é sugerida pela demonstração de que IL-1 β e TNF- α que aumentam a produção e secreção de metaloproteinases de matriz e catepsinas em fibroblastos (17; 27; 28; 29). Adicionalmente à ativação de MMPs, citocinas como TNF- α tem função importante no recrutamento leucocitário (30), assim como a IL-6 na patogênese da artrite (28), encontrada em níveis elevados no soro e fluido sinovial de pacientes com AR (26;27;29;30). Além disso, a IL-6 está envolvida na ativação das células imunes e produção de anticorpos, osteoclastogênese, perda óssea e com os sintomas de debilidade física associados à resposta de fase aguda. A IL-15 também tem sido detectada no líquido sinovial de animais susceptíveis a artrite induzida por colágeno tipo II (25) e o aumento da expressão de RNAm para esta interleucina foi demonstrado no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (27).

Adicionalmente as interleucinas, várias evidências têm mostrado o envolvimento de quimiocinas, como IL-8, MIP- α , MCP-1 e ENA-78, e seus receptores, na artrite. As quimiocinas são produzidas pelas células da sinóvia e cartilagem e estimulam a migração leucocitária e a proliferação e produção de metaloproteinases por fibroblastos (28;29).

Dentre os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na patogênese da inflamação articular, cabe ressaltar a participação dos eicosanóides (31; 32). Osteoblastos obtidos de indivíduos com OA produzem quantidades variáveis de

prostaglandinas e leucotrieno B4 (LTB4) (33) e ambos os eicosanóides são detectados no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (31). As prostaglandinas e o LTB4 regulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias e de colágeno e o seu envolvimento nos mecanismos de artrite tem sido demonstrado em modelos experimentais de inflamação articular (30; 31; 32). Em sinóvia obtida de pacientes com artrite, foi observado após o tratamento farmacológico com inibidores de ciclooxigenases, desvio do metabolismo do ácido aracdônico para a via das lipooxigenases, estando estes metabólitos envolvidos no aumento na produção de IL-1 e metaloproteinases, gerando em conjunto com o TNF- α a destruição da cartilagem articular (18; 33).

Os dados em conjunto sugerem que os mediadores inflamatórios têm importante papel na fisiopatologia dos fenômenos da artrite e os tratamentos existentes para o controle desta patologia não são ideais ou totalmente eficazes.

1.3 Terapêutica da Artrite

A terapêutica clínica da artrite é complexa e multisetorial, sendo assim realizada de acordo com os respectivos casos:

Enquanto combinações de adaptações dos locais de trabalho, terapias com exercícios e tratamentos cognitivos parecem surtir bom efeito a longo prazo (34; 35), intervenções farmacológicas como Drogas Anti-inflamatórias Não Esteroidais (DAINES), assim como injeções de drogas esteroidais, tem sido amplamente utilizadas como terapias para o alívio da dor a curto prazo (36; 37; 38). Os efeitos a curto prazo destas drogas tem sido exaustivamente estudados em culturas de células, modelos animais e estudos clínicos em humanos, e seus mecanismos se encontram hoje, razoavelmente bem entendidos. A magnitude de seus efeitos clínicos também é bem conhecida em condições agudas conforme Oxford e League em 2004, mas efeitos a longo prazo tem sido investigados em menor extensão. Dos poucos estudos a longo prazo que tem sido realizados a respeito de tendinopatias e osteoartrite, intervenções farmacológicas parecem não ser totalmente satisfatórias, nem em relação a magnitude do efeito, nem devido ao

fato de serem prejudiciais aos pacientes (39; 40; 41; 42; 43 , 44). Se isto é devido a classificações diagnósticas imprecisas em ombros e cotovelos, ou se intervenções não farmacológicas podem ser otimizadas para efeitos de longo prazo melhores, é ainda incerto.

Recentemente, em importante meta-análise publicada no British Medical Journal, Bjordal e colaboradores analisaram mais de 13.000 pacientes com relação a patologias inflamatórias crônicas e utilização de drogas antiinflamatórias não esteroidais, incluindo drogas de última geração como os coxibs. Neste estudo, os autores demonstraram que em patologias inflamatórias de longa duração, drogas antiinflamatórias apresentaram efeito ligeiramente superior ao placebo, e que este fato não suporta o uso de tais drogas nas referidas patologias, principalmente se levados em conta os efeitos adversos apresentados pelas drogas antiinflamatórias. Este artigo suscitou grande polêmica na comunidade científica e não científica, a respeito de novas terapias que possam ser utilizadas em patologias inflamatórias de longa duração, assim como, a comprovação de sua eficácia terapêutica.

Sendo assim, a investigação de novas terapias para utilização em patologias inflamatórias de longa duração, principalmente aquelas não farmacológicas, assume papel de destaque na área médica, onde a maioria dos fármacos existentes não apresentam evidências científicas que suportem sua eficácia.

1.4 Laserterapia

A palavra **Laser** origina-se do acrônimo (palavra formada pelas iniciais de outras palavras) de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Deriva por analogia de outro acrônimo: **MASER**, ou *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. O maser foi o princípio dos estudos que conduziram os pesquisadores à descoberta do laser (45).

1.5 Física do LASER

A óptica é um campo dentro da física que lida não somente com a propagação da luz mas também com a produção da luz e, principalmente, com seus mecanismos de interação com a matéria. Uma grande parte da aplicabilidade da óptica hoje em dia deve-se à existência do raio laser. O laser consiste em uma fonte de luz de características únicas, que o tornam um excelente instrumento de uso científico e tecnológico.

1.6 Produção de luz no LASER

Até a descoberta do Laser conhecia-se o processo de absorção de um fóton por um sistema atômico, causando a transferência de elétron de um nível de mais baixa energia para um nível de mais alta energia, e um processo de emissão espontânea de um fóton pelo sistema atômico, causando a transferência do elétron para um nível de mais baixa energia.

No entanto, existe, também, um terceiro processo que pode ocorrer no sistema atômico, e fundamental para o entendimento do Laser: a emissão estimulada.

A emissão estimulada consiste no seguinte: um elétron que esteja em um estado excitado apresenta uma forte tendência em ir para o nível de mais baixa energia. Porém, sozinho, esse processo é relativamente demorado para acontecer, podendo, no entanto, ser acelerado por um agente externo. O agente

externo que causa seu salto para um nível energético menor é justamente outro fóton. Assim, um fóton externo estimula o decaimento do elétron excitado e este, ao passar para o estado de mais baixa energia, emite um fóton que emerge do sistema juntamente com aquele que causou a transição. Desse modo, na emissão estimulada, o causador do efeito sai intacto e o fóton gerado é o seu irmão gêmeo. Nesse caso, os dois fótons emergem do sistema juntos, com a mesma energia, propagando-se na mesma direção. Dizemos que eles estão em fase e são fótons praticamente indistinguíveis (46; 47).

Assim, a luz do laser provém justamente da emissão que ocorre quando elétrons decaem de seus níveis energéticos de forma estimulada, produzindo um feixe de luz onde todas as pequenas porções (fótons) comportam-se identicamente. (46). Essa é a máxima quantidade de luz que pode ser extraída desse meio. Uma porção dessa luz emerge do sistema, constituindo o feixe da luz laser

1.7 Características da luz LASER

O decaimento espontâneo de um dos átomos para o estado fundamental começa a provocar a emissão estimulada dos demais átomos e conseqüente produção de luz. Somente a luz que se propaga ao longo do eixo principal do laser é que vai sofrer as várias reflexões no interior da cavidade ressonante, fazendo com que haja emergência de um feixe de luz. As principais características desse feixe emergente são as seguintes:

- A luz laser é monocromática - a energia carregada pelo fóton estimulante e pelo fóton emitido são as mesmas. Portanto, a luz laser é composta de apenas um comprimento de onda, enquanto uma fonte de luz incandescente é formada por vários comprimentos de onda.

- A intensidade do feixe laser pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes de luz convencionais. Sua potência pode atingir ordens de tera watt (10¹² W). Essas grandes intensidades ocorrem em lasers pulsados, onde a energia acumulada em longo tempo é emitida toda em um intervalo de tempo muito pequeno, da ordem de 10⁻¹² s.

- Caráter direcional do feixe laser - o feixe resultante é constituído de ondas caminhando na mesma direção; ou seja, todo feixe propaga-se na mesma direção, havendo um mínimo de dispersão.

- Coerência - a radiação é espacialmente coerente se as ondas sucessivas da radiação estão em fase e temporalmente coerente se os trens de onda têm todos a mesma direção e o mesmo comprimento de onda (46; 47; 48).

1.8 O Laser e sua ação

1.8.1 Terapias Anti-inflamatórias

Embora o uso de laser nas mais diversas áreas da medicina, odontologia, fisioterapia venha crescendo vertiginosamente nas duas últimas décadas, o conhecimento básico de seu funcionamento ainda é muito deficiente pelos profissionais, principalmente aqueles que não foram especificamente treinados.

No Brasil, a introdução da tecnologia do laser foi bastante tardia em comparação com outros países, principalmente Europa e Estados Unidos. Os trabalhos pioneiros nesta área remontam à segunda metade da década de 80.

O efeito de estimulação com Laser de Baixa Potência (LBP) depende do comprimento de onda, da dose e da intensidade da luz utilizada na irradiação (49)

A coerência é uma das propriedades da luz laser, como citada acima, mas ao penetrar no tecido, esta propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido à grande variedade de estruturas celulares que compõe a pele (50). Segundo esses autores, apesar da perda da coerência da radiação do LBP no interior dos tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos (51).

Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: os laser cirúrgicos de alta potência (HILT- **H**igh -**I**ntensity **L**aser **T**reatment) e laser não-cirúrgicos de baixa potência (LILT- **L**ow -**I**ntensity **L**aser **T**reatment).

Em geral até o momento quase todas as aplicações com HILT tomam por base os efeitos fototérmicos e fotoablativos do laser com o tecido assim, os laser

são usados para cortar, destruir tecidos, soldar, remover tatuagens, entre outros efeitos. Em contraste, mais recentemente, nas décadas de 60 e 70 os pesquisadores voltaram-se para as aplicações com Laser de baixa potência (LBP), e essas baseiam-se nas interações atômicas da luz do laser com o tecido, produzindo efeitos de Biomodulação (47; 52).

A terapia com laser de baixa potência, incide sobre as reações não térmicas (atômicas) da luz com o tecido ocasionando efeitos fotoquímicos (48, 53), ou seja, radiações com baixa densidade de potência (DP) $0,01 \text{ w/cm}^2$ a 1 w/cm^2 e também baixa densidade de energia(DE) de 1 a 10 J/cm^2 (40) nesses limites se produz um pequeno e não significativo aumento de temperatura, o qual não ultrapassa 1°Celsius (47).

O efeito fotoquímico ocorre devido a presença de fotorreceptores especialmente sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por biomoléculas intracelulares específicas produz estimulação ou inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas (47).

O LBP age principalmente sobre organelas celulares (mitocôndrias e membranas), gerando aumento da síntese de ATP e modificando o transporte iônico, sendo que esses processos ocorrem por meio dos fotorreceptores celulares, descritos acima. Dessa forma o LBP acelera, a curto prazo a glicólise e a oxidação fosforilativa e a longo prazo a transcrição e a replicação do DNA (47).

A luz laser, ao incidir sobre uma superfície pode refletir, transmitir, espalhar ou ser absorvida. Em particular para terapia com laser de baixa potência, a nossa superfície sempre será o tecido biológico.

O tecido biológico é pouco homogêneo do ponto de vista óptico, assim toda a radiação eletromagnética ao incidir sobre o tecido, se desdobra, uma parte é refletida e a outra absorvida. A reflexão varia com o ângulo de incidência da luz e as propriedades ópticas da superfície do tecido. ANDERSON e colaboradores em 1981 comprovou que a reflexão da pele quando se incide perpendicularmente é de 4-7%, variando para mais com a aplicação de pomadas, líquidos e secreção sebácea. Então, de 93-97% da irradiação incidente na superfície penetra nos substratos subsequentes, na pele e na derme, encontrando substâncias com

índice de refração diferentes. Dessa forma os fótons vão se distribuir de acordo com a absorção de cada estrutura, pois a função fotorreguladora determina qual comprimento de onda que cada estrutura é capaz de absorver e com isso promover transformações na atividade funcional e metabólica da célula.

Há poucos estudos relatando a eficácia do laser de baixa potência em seu efeito anti-inflamatório, e dentre os que são relatados, estes estão em associação com o tratamento analgésico (53; 54; 55).

Acredita-se que a ação do laser de baixa potência sobre o tecido está relacionado a possibilidade dele inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação; de interferir com os efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação (56); inibir a síntese das prostaglandinas (57) além de inibir o esfíncter pré-capilar, através de mediadores químicos. Estudos adicionais sobre o efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência ainda se fazem bastante necessários.

O uso de lasers na prática clínica para o efeito anti-inflamatório em diferentes patologias baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico.

Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle foram realizados, fazendo com que a Terapia Laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças.

Recentemente, vimos acumulando experiência em trabalhos experimentais e clínicos com a aplicação do Laser da Baixa Potência em diferentes situações. (58, 59, 60, 61; 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74). Durante este tempo, fomos capazes de caracterizar o efeito da Terapia com Laser de Baixa Potência na reação inflamatória de edema de pata, pleurisia e dermatite, hiperreatividade de vias aéreas em ratos e camundongos, e tendinite de Tendão de Aquiles em humanos. No entanto, é muito importante ressaltar que muito pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação dos lasers infra-vermelhos. Neste sentido, os estudos experimentais com estes comprimentos de onda assumem grande relevância para o esclarecimento do mecanismo de ação da terapia. Atualmente os lasers de comprimento de onda na faixa do infra-vermelho são os

mais utilizados em doenças inflamatórias articulares e músculo-esqueléticas, sem sombra de dúvida.

Tendo em vista os dados apresentados anteriormente, a importância da utilização de terapias não medicamentosas representa um fator altamente relevante para o Sistema de Saúde, especialmente em países subdesenvolvidos. No entanto, o estabelecimento de parâmetros clínicos para a utilização desta técnica se faz ainda extremamente necessário.

Para estudarmos os possíveis mecanismos de ação da laserterapia no tratamento da inflamação articular, corroborando dados obtidos da clínica médicas, utilizamos neste trabalho um modelo de inflamação aguda articular induzida por duas substâncias: Carragenina e Kaolin (75)

1.9 Hipótese

A hipótese de nosso trabalho é que o Laser de Baixa potência operando na região do infra-vermelho próximo possui ação anti-inflamatória sobre o processo de inflamação articular aguda.

2 Objetivos

Dentro do cenário de novas tecnologias e estratégias terapêuticas utilizadas para o tratamento das doenças articulares, entre elas a artrite aguda, objetivamos estudar os possíveis mecanismos de ação da laserterapia neste modelo, assim como, estabelecer bases para o desenvolvimento de um protocolo experimental e clínico eficaz capaz de ampliar conhecimentos sobre o mecanismo de ação do laser infravermelho (808nm).

-

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 150 e 200g (+/- 60 dias de vida), com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. O presente protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP) (n 11 livro 53).

3.2 Indução de osteoartrite aguda

A indução da inflamação articular aguda ou monoartrite foi realizada de acordo com LAM & FERREL em 1993 (75).

Após anestesia induzida com halotano 1%, por via inalatória, foi realizada tricotomia na região do joelho do lado esquerdo. Cem microlitros de Kaolin 3% (Sigma-aldrich®) associado à 3% de carragenina diluída em solução salina (NaCl) 0,9% foram injetados intrarticularmente com o emprego de uma microseringa (300 µL). O bisel da agulha foi posicionado medialmente ao ligamento patelar, realizando a injeção em direção à superfície articular distal do fêmur.

3.3 Grupos de Estudo

Os animais foram divididos em 6 grupos (n= 5 ou 6) que receberam a injeção intrarticular de Kaolin 3% e carragenina 3% e os seguintes tratamentos:

Grupo I (Basal) – animais hígidos, não receberam nenhum tratamento e injeção intra-articular.

Grupo II (Controle) – receberam apenas Kaolin e Carraginata, sem nenhum tipo de tratamento.

Grupo III (Diclofenaco) - receberam Diclofenaco (Voltaren, 1mg/kg, Intramuscular (IM) (na nádega)) 30 minutos antes da indução da monoartrite.

Grupo IV (1J) – tratados com laser (808nm) com 1J de potência, realizado 1 hora após da indução da monoartrite.

Grupo V (3J) – tratados com laser (808nm) com 3 J de potência, realizado 1 hora após da indução da monoartrite.

Grupo VI (6J) – tratados com laser (808nm) com 6 J de potência, realizado 1 hora após da indução da monoartrite.

Grupo VII (10J) – tratados com laser (808nm) com 10 J de potência, realizado 1 hora após da indução da monoartrite.

O Equipamento Laser utilizado foi do tipo Thera-laser (DMC[®], - Brasil).

3.4 Procedimentos

3.4.1 Lavado intra-articular.

Após 6 horas da indução da monoartrite os animais foram anestesiados com halotano à 1%, e sacrificados pelo método de deslocamento cervical, para a coleta de lavado intra-articular (76).

O lavado foi obtido através da injeção e aspiração de solução PBS+EDTA (4μM), com auxílio de microseringa (Ultrafine 29G, BD); administramos 100 μL, o procedimento foi repetido três vezes, assim obtivemos um volume final de 300 μL (3 X 100 μL). Alíquotas do lavado foram separadas para a dosagem da atividade de Mieloperoxidase e expressão protéica de COX-1 e COX-2. O volume restante foi centrifugado na velocidade de 1500 rpm (centrífuga citospin (FANEN)) por 10 minutos, para a formação do “pellet” de células. O sobrenadante foi então separado para a dosagem de IL-1β, IL-6, TNFα e PGE₂ por ELISA. O “pellet” foi

ressuspenso em 200µl de solução de PBS 4µM + 0,1%BSA e procedeu-se à contagem total e diferencial de leucócitos.

3.4.2 Contagem de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer sob microscopia óptica no aumento de 100X. Para tal, 90µl da suspensão de células do lavado articular foram adicionados a 10µl de solução de Turk.

A contagem diferencial dos leucócitos totais foi realizada sob microscopia óptica utilizando-se o aumento de 400(X); três campos foram analisados. Após a contagem foi calculada a média aritmética dos campos.

As lâminas foram montadas utilizando-se 110µl da suspensão de células do lavado articular, centrifugadas na velocidade de 800rpm por 10 minutos, e para a análise diferencial de leucócitos coramos a lâmina com May Grunwald-Giemsa.

Os resultados das contagens total e diferencial de leucócitos foram expressos em 10^4 células por cavidade.

3.4.3 Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A presença de neutrófilos foi avaliada pela dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), considerada um marcador específico da presença deste tipo celular. Avaliou-se portanto, a atividade esta enzima como um indicador da presença e da quantidade de neutrófilos presente nos lavados articulares dos joelhos 6h após a indução da monoartrite.

O método da medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato *o*-dianisidina na presença de água oxigenada, que é evidenciada pela mudança de absorbância medida por espectrofotometria a 460 nm (77).

Resumidamente, vinte microlitros de lavado foram adicionados a igual volume de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co., EUA),

seguido de homogeneização em vórtex (Heidolph DiAx 900, Alemanha) e ultrasonicação durante 20 segundos. Os tubos foram aquecidos durante 2 h à 60°C em estufa, para inativação da atividade endógena de Catalase (Ohta et al., 2003), e então centrifugados a 12.000g durante 2 min. Dez microlitros do sobrenadante foram pipetados (em duplicata) em microplaca de 96 poços e acrescidos com 200 µL de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH=6) contendo 0,164 mg/mL de dihidrocloreto de *o*-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). A mudança de absorbância a 460 nm foi medida em um leitor de microplacas (Espectra Max plus 384, EUA) durante 10 min., e a atividade de MPO foi calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo. O resultado foi expresso em UMPO/cavidade, sendo que uma unidade de MPO é definida como a quantidade em µmol de H₂O₂ degradado por minuto.

3.4.4 Análise da permeabilidade vascular pela técnica de extravasamento do corante Azul de Evans.

A determinação da permeabilidade vascular nos joelhos dos ratos monoartríticos foi realizada pelo método do extravasamento do corante azul de Evans (78).

Cada animal, sob ação anestésica de Ketamina e Xilazina, recebeu uma injeção intra venosa (veia peniana) de azul de Evans na dose de 25 mg/Kg (0,1 ml a cada 100 g de peso). A solução de 2,5% de azul de Evans (MERCK® artigo 3169) foi preparada em solução fisiológica 0,45%, filtrada em membrana esterilizante de 0,22µm (MILLIPORE®) e conservada em temperatura de 4°C em vidros do tipo âmbar.

A inoculação foi realizada com agulha 13 x 4,5 mm 1 hora antes do sacrifício.

Após o sacrifício dos animais (anestesiados e posteriormente sofrendo o deslocamento cervical), as articulações dos joelhos foram retiradas, pesadas e

colocadas em tubos de vidro contendo formamida (na proporção de 4ml/g de tecido). Os tubos foram mantidos por 24 horas a 37°C. Em seguida, os tubos foram agitados mecanicamente por 15 segundos em agitador (PHOENIX® modelo AT 56) e finalmente 200 µl do corante extraído pela formamida foram transferidos para microplacas de 96 poços para leitura de absorbância em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, EUA) a 620 nm. Solução de formamida foi usada como branco para o teste. As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante (concentrações entre 1000 e 9 µM). As concentrações das amostras foram calculadas em microgramas de azul de Evans por miligrama de tecido articular.

3.4.5 Análise de expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR).

A expressão gênica das enzimas COX-1 e COX-2 foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase reversa (PCR) em tempo real. O material amostral foi: membrana sinovial, ligamento patelar, e patela, os quais foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o processamento. O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Gibco BRL, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foi feita pelo método da transcriptase reversa empregando a enzima SuperScript (Invitrogen) a partir de 2 µg de RNA total e na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. Os experimentos de Real-Time PCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 min a 95°C, e 40 ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento e extensão a 60°C); as sequências dos primers utilizados constam no trabalho de Wang et al., (2004). Os resultados foram interpretados usando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado àquela do gene controle B-actina.

3.4.6 Estudos de expressão protéica por Western blot

A expressão de proteínas contendo resíduos nitrados tirosina ou S-nitrosiladas, assim como das isoformas de NOS, será estudada através de técnica de Western blot.

Em geral, amostras de homogenatos de tecidos serão diluídas com tampão de Laemmli (0.0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e após rápida centrifugação a 10.000 *g* (30 seg), as proteínas das amostras serão separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0.1% de lauril sulfato de sódio (SDS - PAGE; Laemmli, 1970).

A composição do tampão que será utilizado na corrida eletroforética é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0.1%) ajustado para pH 8,3.

Posteriormente, as bandas protéicas serão transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma amperagem de 150-170 mA (voltagem ~50V) durante 2 horas. A composição do tampão que será empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0.1%) e etanol (18%). Para comprovar a eficiência da transferência, os géis serão corados com corante Commassie blue (solução à 0.1% de Commassie brilliant blue em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25% de etanol), e as membranas serão coradas com vermelho de Ponceau (solução à 2% de corante Ponceau em solução aquosa contendo 30% de ácido tricloro acético e 30% de ácido sulfosalicílico). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana serão bloqueados mediante incubação da mesma com

solução a 5% de leite em pó desnatado dissolvido em tampão TBS-t pH 7.4 (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0.1% de Tween-20) sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas serão incubadas durante 15 - 18 horas, a 4°C com anticorpos primários específicos (diluídos em tampão TBS, sem a adição de Tween-20) para resíduos de NT ou S-NO, e após o término da incubação, as membranas serão lavadas (6 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rabanete (HRP) ou fosfatase alcalina (AP) durante 2 horas. Em seguida, as membranas serão submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas serão reveladas mediante um kit de revelação por quimioluminiscência.

O peso molecular das bandas será calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa: 10 a 250 kDa, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra).

A intensidade das bandas (como medida do grau de expressão da proteína), será determinada por análise densitométrica mediante o uso de software ChemImager 5000, e os valores serão expressos em unidades arbitrárias.

3.4.7 Quantificação de Interleucina-1 β , IL-6 e TNF- α dos lavados articulares pelo método de Elisa.

Após coleta do lavado articular, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos para formação de “pellet”, em seguida separava-se o sobrenadante, armazenando-o em freezer, à temperatura de -80°C até sua utilização.

O método de quantificação utilizado foi o de “dual set”, as placas de Elisa foram tratadas para a colocação de anticorpo específico, a técnica consiste em:

1 - Em cada poço da placa foi adicionado 100 μ l de solução contendo 14,4 μ g de anticorpo de captura específico para IL-1 β e IL-6 à temperatura ambiente e 72 μ g para TNF- α à 4°C, durante a noite toda e sob agitação.

2 - No dia seguinte foi colocado 100µl de reagente diluente (Albumina sérica bovina à 1% diluída em solução PBS), por um período de 01 hora sobre o agitador.

3 – Cada poço da placa recebeu 100µl da amostra ou da curva padrão, por 01 hora e 30 minutos sobre o agitador.

4 – Após esse período cada poço recebeu 6,3µg de anticorpo de detecção específico para IL-1β e IL-6 e 1,8 µg para TNF-α por 02 horas sob agitação.

5 – Depois, adicionou-se 100µl de solução de estreptavidina-HRP à cada poço da placa, deixando os poços protegidos da luz e agitação durante 20 minutos.

6 – Colocou-se 100µl a solução de substrato (H₂O₂ e Tetrametilbenzidina em proporções iguais) em cada poço da placa.

7 – A reação foi interrompida pela adição de 50µl de solução de parada.

8 – As leituras das placas foram realizadas em leitor de ELISA (Espectra Max plus 384, EUA) a 450nm e corrigidas a 540nm.

Observação: Os passos 2-7 foram realizados sobre o agitador e à temperatura ambiente.

3.4.8 Quantificação de Prostaglandina E2 (PGE₂) dos lavados articulares.

Os lavados articulares foram centrifugados à 1500 rpm por 10 minutos para separar as células do presentes no líquido sinovial. Em seguida o sobrenadante foi colocado em freezer, e estocado à temperatura de -80°C até sua utilização.

A quantificação de prostaglandina E2 (PGE₂), foi feita através do *kit* - RD System contendo anticorpo anti-PGE₂ aderido à placa, e a reação para quantificar as amostras se davam da seguinte forma:

1. Colocação de 150µl de solução contendo antígeno PGE₂ em diferentes concentrações para a confecção da curva padrão.

2. Adição de 100µl de lavado articular das amostras nos poços da placa de leitura, junto com 50µl do anticorpo primário e 50 µl do conjugado de PGE₂.

3. Incubados por 12 à 16 horas sob agitação
4. Após o período, realizávamos a lavagem com 200µl de solução tampão (wash buffer), por 04 vezes.
5. Colocávamos por 30 minutos em solução de substrato, esta formada pela mistura Solução A com solução B, vindas no *kit*, em proporções iguais.
6. Após o tempo estabelecido na bula do kit, adicionávamos, em cada poço de leitura, 50µl de solução de parada (formada por ácido sulfúrico à 2M).
7. Em seguida foi realizada a leitura com comprimento de onda calibrado para 450nm e corrigido na onda de 540 ou 570nm.

3.5 Análise Estatística:

Os dados foram expressos em média $\pm$ E. P. M. (erro padrão médio). Foi utilizado o teste não pareado t-Student e análise de variância (ANOVA) para mensurações repetidas, considerando um valor significativo $P < 0.05$.

4 Resultados

4.1 Contagem de Leucócitos Totais da Cavidade Articular

Podemos observar, que na vigência do processo inflamatório agudo articular, ocorre o aumento significativo do número total de leucócitos na cavidade articular. No tempo de 6 horas, podemos observar que a Terapia com laser foi capaz de inibir a migração total de células principalmente nas energias de 6 e 10 Joules. O Controle com diclofenaco foi efetivo em inibir a migração celular.

Gráfico 1 - Análise de infiltrado inflamatório dos lavados do joelho no tempo de 6 horas após o estímulo. N = 6 animais/grupo (**p<0,001)

Tabela 1: Contagem do número total de leucócitos na cavidade articular de ratos após a indução da artrite. Os Dados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média;

<u>Grupo</u>	Total de Leucócitos X (10⁴)	EPM
Controle	157	11
Diclo	90*	8
1J	137	17
3J	141	9
6J	84*	8
10J	64*	5

4.2 Análise diferencial de leucócitos nos lavados articulares

Podemos observar uma significativa migração de leucócitos polimorfonucleares na vigência do processo inflamatório agudo induzido por carragenina e kaolin. Interessantemente, nossos resultados demonstraram uma inversão do quadro de migração celular nos animais tratados com diclofenaco ou laser de baixa potência. Isto significa que, a redução do número de polimorfonucleares (Gráfico 2 e tabela 02) foi acompanhada de uma aumento de células mononucleares (Gráfico 3 e tabela 03).

Podemos observar que, no que diz respeito às células polimorfonucleares (Gráfico 2), os tratamentos com diclofenaco ou laser (3J, 6J e 10J) foram capazes de reduzir significativamente a migração celular. ($p < 0,001$).

Gráfico 2 – Análise diferencial de células polimorfonucleados em lavado articular de joelho, 6 horas após a indução da inflamação. N = 6 animais/grupo (***) $p < 0,001$)

Tabela 2: Avaliação da migração de células polimorfonucleadas para a cavidade articular de ratos após a indução da osteoartrite. Os Dados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média;

Grupo	% doTotal de Leucócitos (10⁴)	SEM
Controle	88	4
Diclo	55	8
1J	70	4
3J	55	3
6J	56	2
10J	36	7

Gráfico 3 – Análise Diferencial de Leucócitos Mononucleares em lavado de articulação de Joelho de ratos, 6 horas após estímulo inflamatório (**p<0,001)

Tabela 3: Avaliação da migração de células Mononucleadas para a cavidade articular de ratos após a indução da osteoartrite. Os Dados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média;

Grupo	% do Total de Leucócitos (10 ⁴)	SEM
Controle	11	4
Diclo	44	8
1J	29	4
3J	44	3
6J	43	2
10J	63	7

4.3 Avaliação do extravasamento protéico por Azul de Evans

Um sinal flogístico da artrite é a presença de um exudato inflamatório decorrente do extravasamento protéico. Podemos observar um extravasamento protéico significativo no grupo controle. No entanto, só pudemos observar redução significativa do extravasamento nos grupos tratados com diclofenaco ou Laser de baixa potência na energia de 10 Joules ($p < 0,05$). As demais energias aplicadas (1J, 3J e 6J), não foram efetivas em reduzir o extravasamento plasmático dos animais (Gráfico 3 e tabela 02).

Gráfico 4 – Análise do extravasamento plasmático por Azul de Evans e joelho de ratos, 6 horas após a administração de estímulo inflamatório e indução de osteoartrite (* $p < 0,05$).

Tabela 4: Avaliação do extravasamento plasmático de Azul de Evans na cavidade articular de ratos após a indução da osteoartrite. Os Dados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média;

Grupo	<u>Extravasamento</u>	SEM
Controle	56	7
Diclo	42	4
1J	63	5
3J	60	6
6J	58	3
10J	37	3

4.4 Análise da Atividade de Mieloperoxidase

No gráfico 05, após 6 horas da administração do estímulo inflamatório, podemos observar a redução significativa da atividade da enzima nos grupos tratados com diferentes terapias: diclofenaco ou laserterapia 1J, 3J, 6J e 10J ($p<0,001$).

Gráfico 5 – Análise da atividade de MPO por cavidade em animais tratados com Laserterapia de Baixa potência e diclofenaco, comparados ao grupo controle. N=6 animais/grupo, 6 horas após estímulo inflamatório (** $p<0,001$)

Tabela 5: Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na cavidade articular de ratos após a indução da osteoartrite. Os Dados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média;

Grupo	MPO – U	SEM
Controle	552	64
Diclo	67*	16
1J	283*	20
3J	286*	24
6J	327*	26
10J	276*	43

4.5 Avaliação Funcional

A função principal do joelho é realizar movimentos de flexão e extensão, permitindo o animal deambular normalmente. Neste sentido, o índice funcional é um método de avaliação de deambulação, logo, quanto maior o índice, pior a deambulação, e vice-versa. No Gráfico 6 avaliamos os grupos tratados e não-tratados, e não foi observado diferença significativa entre os grupos.

Gráfico 6 – Gráfico demonstrando o índice funcional em animais como osteoartrite de joelho, tratados com diclofenaco ou Laserterapia de baixa potência. N=6 animais/grupo.

Tabela 6: Avaliação funcional no teste de caminhada após a indução da osteoartrite de joelho em ratos. Os Dados são expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média;

Grupo	SFI	SEM
Controle	69	4
Diclo	80	7
1J	70	8
3J	47	19
6J	67	16
10J	56	15

4.6 Quantificação de Ciclooxygenase 1 e 2 por PCR em Tempo Real no Lavado Articular

Foram realizadas as análises da expressão das enzimas Ciclooxygenase dos tipos 1 e 2 no lavado articular dos animais. Conforme podemos observar no Gráfico 7, a expressão da enzima ciclooxygenase to tipo 01 (COX-1) apresentou aumento significativo no grupo tratado com laserterapia na energia de 3 Joules, quando comparados com os outros grupos. Por outro lado, no Gráfico 08 podemos observar que não houve diferença significativa na expressão da enzima COX-2 dentre todos os grupos.

Gráfico 7 – Gráfico demonstrando a quantidade de Ciclooxygenase-1 no lavado articular(***) $p < 0,01$);

Gráfico 8 – Gráfico demonstrando a quantidade de Ciclooxygenase-2 no lavado articular(**^{***} $p < 0,01$);

4.7 Quantificação de Cicloxigenase 1 e 2 Real Time PCR no Tecido Articular

Foram realizadas as análises da expressão do RNA das enzimas Ciclooxygenase dos tipos 1 e 2 no tecido articular dos animais. Conforme podemos observar nos Gráficos 11 e 12, a expressão do RNA de ambas as isoformas da enzima ciclooxygenase (COX-1 e COX-2) apresentaram aumento nos grupos tratados com Laser, quando comparados aos grupos controle e diclofenaco

Gráfico 9 – Expressão do RNA para a enzima COX-1 por Real Time PCR. N=6 animais/grupo. ** = P<0,01;

Gráfico 10 – Expressão do RNA para a enzima COX-2 por Real Time PCR. N=6 animais/grupo. ** = $P < 0,01$;

4.8 Análise de IL-1 nos lavados articulares

Como podemos observar no Gráfico 11, a terapia com Laser de baixa potência nas energias de 1 e 6 Joules, assim como o tratamento com diclofenaco, foram efetivos em reduzir os níveis de IL-1 no lavado articular de ratos com osteoartrite de joelho.

Gráfico 11 – Quantificação de IL-1 dos lavados articulares de animais com artrite de joelho tratados com Diclofenaco ou Laserterapia da baixa potência N = 6 animais/grupo (**p<0,001)

4.9 Análise de IL-6 nos lavados articulares

Em nosso trabalho pudemos observar que a indução da artrite foi capaz de induzir um significativo aumento de IL-6 no lavado articular.

Interessantemente, tanto o diclofenaco quando a terapia com laser de baixa potência foram capazes de reduzir efetivamente os níveis de IL-6 no lavado (Gráfico 12) ($p < 0,001$).

Gráfico 12 – Quantificação de IL-6 dos lavados articulares de animais com artrite de joelho tratados com Diclofenaco ou Laserterapia da baixa potência N = 6 animais/grupo (** $p < 0,001$)

4.10 Análise de TNF- α nos lavados articulares

Podemos observar no gráfico 13, que quando comparamos os animais com ausência de tratamento (artrite) com os outros grupos, no tempo de 06 horas após a indução da artrite aguda, não observamos diferença estatística, a não ser com o grupo tratado com 10J de energia laser.

Gráfico 13 – Quantificação de TNF- α dos lavados articulares de animais com artrite de joelho tratados com Diclofenaco ou Laserterapia da baixa potência, (* $p < 0,05$)

4.11 Análise de PGE₂ nos lavados articulares

Foi realizada a quantificação dos níveis de prostaglandina E₂ no lavado articular de joelho de ratos com osteoartrite. Como podemos observar no Gráfico 16, tanto o tratamento com diclofenaco quanto a terapia com Laser de baixa potência, foram efetivos em reduzir os níveis de PGE₂ neste modelo experimental, 6 horas após a indução do processo inflamatório.

Gráfico 14 – Quantificação de PGE₂ dos lavados articulares de animais com artrite de joelho, tratados com Diclofenaco ou Laserterapia da baixa potência, (*p<0,05)

5 Discussão

A artrite e osteoartrite são doenças inflamatórias e degenerativas das articulações, sendo as principais causas de debilidade física e piora na qualidade de vida nas nações industrializadas.

Conforme mencionado na introdução, Bjordal e colaboradores (2004) (70) demonstraram que as Drogas anti-inflamatórias não esteroidais não apresentavam eficácia no tratamento da osteoartrite de joelho a médio e longo prazo, sendo seu efeito analgésico restrito aos dias iniciais do tratamento. Em trabalho mais recente, Bjordal e colaboradores (2007) demonstraram que intervenções terapêuticas utilizando agentes físicos como a estimulação elétrica transcutânea e a laserterapia apresentaram-se como importantes alternativas clinicamente efetivas para o controle da dor na osteoartrite de joelho, e ainda, que este efeito se prolongava por aproximadamente 2 meses após o tratamento.

Neste trabalho utilizamos um modelo experimental de artrite aguda induzida por Carragenina e Caolin em joelho de ratos. Avaliamos a hipótese inicial de que a terapia utilizando o Laser de baixa potência seria eficaz no tratamento da inflamação articular. Tentamos ainda, avançar no estudo dos possíveis mecanismos de ação do efeito anti-inflamatório da laserterapia.

Dentre os vários modelos experimentais existentes, foi escolhido o modelo de indução de inflamação aguda articular induzida por carragenina e Caolin, por tratar-se de um modelo onde são avaliados vários aspectos inflamatórios, dentre eles, a formação de edema articular (no joelho acometido pela inflamação), influxo de células inflamatórias, presença de mediadores inflamatórios e imunológicos (citocinas), na sinóvia e no tecido articular etc. (79).

Atualmente, a prospecção por novos medicamentos para o tratamento da artrite visam a descoberta de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo os inibidores de IL-1 β e TNF- α , inibidores de metaloproteinases, bisfosfonados, doxiciclina, calcitonina e glucosamina e inibidores de óxido nítrico sintase. (80).

Ao começarmos a observar os sinais característicos do modelo de inflamação utilizado, como a formação do edema por exemplo, a terapia com laser de baixa potência apresentou efeito inibitório significativo na energia de 10 J. Alguns autores sugerem que o laser pode estar agindo sobre mecanismos que envolvem o aumento do fluxo linfático e consequente redução do edema. No entanto, em artigo recente Mazzon e Cuzzocrea (2007) (81) demonstraram que a alteração de permeabilidade vascular induzida por carragenina em tecido de pulmão é dependente das alterações induzidas pelo TNF- α nas “tight junctions” deste tecido. Neste sentido, Aimbire e colaboradores 2006 e 2007 demonstraram que o Laser de baixa potência é capaz de inibir a produção de TNF- α em diferentes modelos experimentais de vias aéreas e de inflamação induzida por imunocomplexo. Possivelmente os efeitos da laserterapia sobre o edema inflamatório podem estar relacionados a sua capacidade de inibir a produção de TNF- α no processo inflamatório. No entanto, em nosso modelo experimental, ao menos no tempo de 6 horas não foi detectada a produção de TNF- α no lavado articular. Segundo Costa SK (comunicação pessoal), a cinética da produção de TNF- α na artrite induzida por carragenina e caolin encontra seu pico precocemente, aproximadamente duas horas após a indução da inflamação. Este seria o provável motivo de não termos conseguido detectar concentrações significativas deste mediador no lavado articular no tempo de 6 horas.

Quando examinamos o acúmulo total de leucócitos na cavidade articular, observamos que este número sofre significativa redução quando tratados com a laserterapia de 6J e 10J de energia, chegando aos níveis semelhantes ao do grupo tratado com diclofenaco.

A contagem diferencial de leucócitos demonstrou significativa redução do número de neutrófilos nos grupos tratados com radiação laser. Além disso, a dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase, marcadora específica da presença de neutrófilos, também confirma estes achados. Interessantemente, os grupos tratados com Laser de baixa potência apresentaram um aumento significativo do número de células mononucleares presentes no lavado articular. Nossos resultados parecem ir ao encontro da hipótese da resolução do processo

inflamatório, onde, em determinado momento de sua evolução ocorre um aumento do número de células mononucleares que tendem a fagocitar neutrófilos infiltrados, iniciando um processo de finalização da reação inflamatória (82). No entanto esta hipótese requer estudos adicionais.

O líquido sinovial apresenta a produção de algumas quimiocinas e metaloproteinases, responsáveis pela apoptose celular, renovando os tecidos articulares, submetidos a regulação parácrina e autócrina. Quando há um desequilíbrio entre a produção e degradação destas substâncias, ocorre a degradação dos tecidos, dentre eles a cartilagem articular. (80).

A migração/infiltração de células inflamatórias são fatores que determinam o curso da artrite. Além destes, são produzidas também substâncias responsáveis pela progressão da doença e cronificação do processo como a IL1- β e TNF- α . Autores como Berg (83), Krasnukutsky e Goupille (84), afirmam que a IL-1 β é a principal responsável pela destruição da cartilagem articular e produção de metaloproteinases (MMPs)-3 e 13, os quais tem papel de destruição do disco articular. Além disso, a IL-6 parece ser um dos principais mediadores responsáveis pela sinalização e liberação de metaloproteinases que destroem a superfície óssea através da ativação dos osteoclastos.

Em nosso estudo fomos capazes de observar que a laserterapia com energia de 1J conseguiu inibir a produção de IL1- β nos lavados articulares. Este fato assume relevância para o curso da doença, pois sugere uma diminuição da destruição da cartilagem articular, gerando conseqüentemente menos dor e desconforto ao paciente.

Cabe destacar também os resultados observados para a produção de IL-6. Na fase aguda da artrite os níveis não estão elevados tanto quanto com a cronificação ou resolução da doença (24). Em nosso modelo de artrite experimental observamos níveis elevados de IL-6 no grupo artrite. Interessantemente, podemos observar uma importante redução dos níveis desta citocina nos grupos tratados com laserterapia com 3 J e 6 J de energia. Este fato pode sugerir uma diminuição na atividade dos osteoclastos, provocando menos destruição óssea, formação de fissuras ósseas e cistos ósseos, características

radiográficas e clínicas importantes em pacientes portadores de artrite e osteoartrite.

A inflamação ocorrida frente a um estímulo danoso é um evento benéfico que visa à restauração do tecido e a remoção do agente agressor, visando o retorno a um estado de equilíbrio - a homeostase. A remoção do agente agressor depende de sinais do hospedeiro, que geram toda uma cascata de eventos que inclui aumento das moléculas de adesão celular e quimiocinas e acúmulo de infiltrado leucocitário no sítio da lesão. Após a neutralização do agente agressor, ocorre naturalmente a resolução da inflamação.

Os mediadores da inflamação podem ser produzidos pelas vias da ciclooxigenase e lipooxigenase, a partir do metabolismo do ácido araquidônico e outros ácidos graxos. São conhecidas duas isoformas de COX: a COX-1, expressa constitutivamente e capaz de produzir pequenas quantidades de prostaglandinas que visam à manutenção das funções fisiológicas, e a COX-2 que é produzida após um estímulo danoso pró-inflamatório. A COX-2 também pode ser expressa constitutivamente em alguns tecidos, como por exemplo no córtex cerebral e hipocampo. Por outro lado, a COX-2 parece apresentar possíveis efeitos fisiológicos e até mesmo um papel importante na resolução do processo inflamatório. O recente advento dos animais “knock out” para COX-2 constatou que em modelos simples como o edema de pata induzido por carragenina, a ausência do gene da COX-2 impede a resolução da inflamação (85).

A COX converte o ácido araquidônico, liberado a partir das membranas plasmáticas celulares pela ação da fosfolipase A_2 , em prostaglandina G_2 prostaglandina H_2 , originando Prostaglandina E_2 e tromboxano.

Em nosso trabalho, os níveis de PGE_2 estão aumentados nos animais do grupo artrite, não tratados. Quando comparados aos grupos tratados, observamos que os níveis deste eicosanóide se apresentam diminuídos com a laserterapia em energias de 3J, 6J e 10J, o que reforça a ação antiinflamatória desta terapia.

A determinação da expressão gênica de COX-1 e COX-2 foi realizada pela técnica de PCR em tempo real, tanto nos lavados articulares, quanto no tecido articular. Pudemos observar o aumento na expressão gênica de COX-1 nos

grupos tratados com 1, 3 e 10J de energia com relação ao grupo artrite, e ainda, o aumento da expressão gênica de COX-2 em todos os grupos tratados com laser. No entanto, como já mencionado, concomitantemente todos os marcadores inflamatórios avaliados como PGE₂, IL-1, IL-6 apresentaram-se significativamente diminuídos pela ação da terapia com laser de baixa potência. Em outras palavras, em nosso trabalho observamos redução de mediadores inflamatórios clássicos, porém com aumento da expressão das duas isoformas da enzima ciclooxigenase. Este fato parece paradoxal a primeira vista, mas segundo Serhan (82), a aspirina em baixas doses é capaz de acetilar a enzima ciclooxigenase, possibilitando a formação de precursores de substâncias anti-inflamatórias endógenas denominadas resolvinas (85). Estas enzimas chave no processo inflamatório passariam então a agir sobre ácidos graxos poli-insaturados como o ômega 3, levando a formação de resolvinas. Desta maneira podemos encontrar enzima ciclooxigenase ativa, porém, agindo sobre outro substrato, diferente do ácido araquidônico e levando a formação de resolvinas. Neste sentido, nossos resultados apontam para um efeito semelhante aquele observado para aspirina, onde a radiação laser pode estar provocando algum tipo de alteração bioquímica na via enzimática das enzimas ciclooxigenases, que não está resultando na produção de prostaglandina E₂, mas possivelmente, de algum outro mediador bioquímico. No entanto, o resultado final desta alteração parece ser a redução dos sinais de inflamação.

Tomados em conjunto, nossos dados confirmam os efeitos anti-inflamatórios observados na clínica médica, em pacientes com processos inflamatórios articulares.

Além disso, podemos também considerar que a laserterapia possui algumas vantagens com relação à terapia farmacológica como por exemplo, a ausência de efeitos adversos gastrintestinais e consequente redução dos custos com o tratamento destes efeitos. Devemos ainda ressaltar, que a recente retirada de circulação das drogas inibidoras da enzima COX-2 devido a efeitos adversos cardiovasculares graves deixa uma lacuna importante na terapia anti-inflamatória, que pode ser compensada possivelmente pela laserterapia.

6 Conclusões

A Terapia com Laser de Baixa potência foi efetiva em reduzir o processo inflamatório induzido experimentalmente em articulação de joelho de ratos.

A redução do processo inflamatório foi caracterizada pela redução do infiltrado celular leucocitário, redução do edema e inibição de importantes mediadores inflamatórios como prostaglandina E2, Interleucina –1 e Interleucina – 6.

Os efeitos da laserterapia sobre as isoformas da enzima ciclooxigenase ainda necessitam de estudos adicionais.

Referências Bibliográficas

- 1 - Kidd BL. Osteoarthritis and joint pain. *Pain*. 2006 Jul;123(1-2):6-9. Epub 2006 May 22.
- 2 - Ge Z, Hu Y, Heng Bc, Yang Z, Ouyang H, Lee Eh, Cao T. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum*. 2006 Jun 15;55(3):493-500.
- 3 - Stoop R, Buma P, Van Der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Meijers TH, Poole AR, Van Den Berg WB. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001 May;9(4):308-15.
- 4 - Dieppe P. A.; Lohmander, L. S. Pathogenesis and Management of pain in osteoarthritis. *Lancet*. v. 365, p. 965-73, 2005.
- 5 - Allen R T, Tasto J P, Cummings J, Robertson C M, Amiel D. Meniscal debridement with an arthroscopic radiofrequency wand versus an arthroscopic shaver: comparative effects on menisci and underlying articular cartilage. *Arthroscopy*. 2006 Apr;22(4):385-93.
- 6 - Scott C C, Athanasiou K A. Mechanical impact and articular cartilage. *Crit Rev Biomed Eng*. 2006;34(5):347-78.
- 7 - Haupt JL, Frisbie DD, McIlwraith CW, Robbins PD, Ghivizzani S, Evans CH, Nixon AJ. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. *J Orthop Res*. 2005 Jan;23(1):118-26.

- 8 - Harris E D Jr. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: its relevance to therapy in the '90s. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1991;102:260-8; discussion 268-70.
- 9 - Yanni G, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994 Jan;53(1):39-44.
- 10 - Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996 Jan;39(1):115-24.
- 11 - Evans C H, Robbins P D. Pathways to gene therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1996 May;8(3):230-4.
- 12 - Tehranzadeh J, Booya F, Root J. Cartilage metabolism in osteoarthritis and the influence of viscosupplementation and steroid: a review. *Acta Radiol.* 2005 May;46(3):288-96.
- 13 - Firestein G S. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1991 Jun;3(3):398-406.
- 14 - Saxne T, Heinegård D, Wollheim F A. Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease. Relation to systemic treatment. *Arthritis Rheum.* 1987 Sep;30(9):972-9.
- 15 - Bensouyad A, Hollander A P, Dularay B, Bedwell A E, Cooper R A, Hutton C W, Dieppe P A, Elson C J. Concentrations of glycosaminoglycans in synovial fluids and their relation with immunological and inflammatory mediators in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1990 May;49(5):301-7.
- 16 - Poole A R, Ionescu M, Swan A, Dieppe P A. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage

proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. J Clin Invest. 1994 Jul;94(1):25-33.

17 - Schurigt U, Stopfel N, Hückel M, Pfirschke C, Wiederanders B, Bräuer R. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. Arthritis Res Ther. 2005;7(1):R174-88. Epub 2004 Dec 10. E]

18 - Martel-Pelletier J, Pelletier J P. Neutral proteases in human osteoarthritic synovium: quantification and characterization. J Rheumatol. 1987 May;14 Spec No:38-40.

19 - Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem. 1997 Mar-Apr;378(3-4):151-60.

20 - Murrell Ga, Jang D, Williams R J. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Jan 5;206(1):15-21.

21 - Palmer R M, Rees D D, Ashton D S, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Jun 30;153(3):1251-6.

22 - Mitchell P G, Magna H A, Reeves L M, Lopresti-Morrow L L, Yocum S A, Rosner P J, Geoghegan K F, Hambor J E. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest. 1996 Feb 1;97(3):761-8.

23 - Baker E A, Stephenson T J, Reed M W, Brown N J. Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. Mol Pathol. 2002 Oct;55(5):300-4.

- 24 - Goldring M B. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther.* 2001 Sep;1(5):817-29.
- 25 - Pelletier J P, Martel-Pelletier J, Altman R D, Ghandur-Mnaymneh L, Howell D S, Woessner J F Jr. Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1983 Jul;26(7):866-74.
- 26 - Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier J P, M'barek K N, Christgau S, Shipkolye F, Moldovan F. Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. *Arthritis Rheum.* 2003 Oct;48(10):2855-64.
- 27 - Dayer J M. Mechanisms of articular destruction in rheumatoid arthritis *Rev Med Brux.* 1985 Apr;6(4):311-3.
- 28 - Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B, Flipo R M. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol.* 1997 Jul;36(7):735-43.
- 29 - Vincenti M P, Brinckerhoff C E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4(3):157-64. Epub 2001 Nov 23.
- 30 - Bombini G, Canetti C, Rocha F A, Cunha F Q. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2004 Aug 2;496(1-3):197-204.

- 31 - Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005 Jun;19(3):255-61.
- 32 - Rocha F A, Andrade L E, Russo M, Jancar S. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1997 May;16(1):1-10.
- 33 - Marcouiller P, Pelletier J P, Guévremont M, Martel-Pelletier J, Ranger P, Laufer S, Reboul P. Leukotriene and prostaglandin synthesis pathways in osteoarthritic synovial membranes: regulating factors for interleukin 1beta synthesis. *J Rheumatol*. 2005 Apr;32(4):704-12.
- 34 - Brox J I, Gjengedal E, Uppheim G, Bøhmer A S, Brevik J I, Ljunggren A E, Staff P H. Arthroscopic surgery versus supervised exercises in patients with rotator cuff disease (stage II impingement syndrome): a prospective, randomized, controlled study in 125 patients with a 2 1/2-year follow-up. *J Shoulder Elbow Surg*. 1999 Mar-Apr;8(2):102-11.
- 35 - Morley S, Eccleston C, Williams A. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of cognitive behaviour therapy and behaviour therapy for chronic pain in adults, excluding headache. *Pain*. 1999 Mar;80(1-2):1-13.
- 36 - Van Der Windt D A, Van Der Heijden G J, Scholten R J, Koes B W, Bouter L M. The efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for shoulder complaints. A systematic review. *J Clin Epidemiol*. 1995 May;48(5):691-704.
- 37 - Pilgian G, Herbert R, Hearn M, Dropkin J, Landsbergis P, Cherniack M. Evaluation and management of chronic work-related musculoskeletal disorders of the distal upper extremity. *Am J Ind Med*. 2000 Jan;37(1):75-93.
- 38 - Assendelft W, Green S, Buchbinder R, Struijs P, Smidt N. Tennis elbow. *BMJ*. 2003 Aug 9;327(7410):329.

- 39 - Brox J I, Brevik J I, Ljunggren A E, Staff P H. Influence of anthropometric and psychological variables pain and disability on isometric endurance of shoulder abduction in patients with rotator tendinosis of the shoulder. *Scand J Rehabil Med*. 1996 Dec;28(4):193-200.
- 40 - Sangdee C, Teekachunhatean S, Sananpanich K, Sugandhavesa N, Chiewchantanakit, Pojchamarnwiputh S, Jayasvasti S. Electroacupuncture versus diclofenac in symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med*. 2002 Mar 21;2:3.
- 41 - Smidt N, Van Der Windt D A, Assendelft W J, Devillé W L, Korthals-De Bos I B, Stergioulas A, Stergioula M, Aarskog R, Lopes-Martins R A, Bjordal J M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2008 May;36(5):881-7. Epub 2008 Feb 13.
- 42 - Buchbinder R, Green S, Youd J M. Corticosteroid injections for shoulder pain. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(1).
- 43 - 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 Dec 4;329(7478):1317. Epub 2004 Nov 23. Review.
- 44 - Slørdal L, Spigset O, Helland A, Rygnestad T. Nonopioid analgesics in acute pain: What has the best effect? *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2004 Aug 26;124(16):2098-9.
- 45 - Bertolotti R L. Alternative casting alloys for today's crown and bridge restorations. Part II: metal-ceramic restorations. *CDA J*. 1983 Sep;11(9):63-9.

- 46 - De Castro E Silva Júnior O, Zucoloto S, Menegazzo L A, Granato R G, Arcassa L G, Bagnato V S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg Med*. 2001;29(1):73-7.
- 47- Karu T I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser irradiation *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1986;291(5):1245-9.
- 48 - Schaffer M, Bonel H, Sroka R, Schaffer P M, Busch M, Reiser M, Dühmke E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photochem Photobiol B*. 2000 Jan;54(1):55-60.
- 49 - Kiyozumi T. Low level diode laser treatment for hematomas under grafted skin and its photobiological mechanisms. *Keio J Med*. 1988 Dec;37(4):415-28.
- 50 - Hazeki O, Tamura M. Near infrared quadruple wavelength spectrophotometry of the rat head. *Adv Exp Med Biol*. 1989;248:63-9.
- 51 - Svaasand LO. Biostimulation with low-intensity lasers--physics or metaphysics? *Nord Med*. 1990;105(3):72-5. *Inst for fysikalsk elektronikk, Norges Tekniske Høgskole, Universiteti Trondheim*.
- 52 - Basford J R, Sheffield C G, Cieslak K R. Laser therapy: a randomized, controlled trial of the effects of low intensity Nd:YAG laser irradiation on lateral epicondylitis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2000 Nov;81(11):1504-10.
- 53 - 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 Surg Med*. 1993;13(4):463-9.

- 54 - Bliddal H, Hellesen C, Ditlevsen P, Asselberghs J, Lyager L. Soft-laser therapy of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 1987;16(4):225-8.
- 55 - Brosseau L, Welch V, Wells G, Tugwell P, de Bie R, Gam A, Harman K, Shea B, Morin M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol*. 2000 Aug;27(8):1961-9.
- 56 - Campana V, Moya M, Gavotto A, Juri H, Palma J A. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. *J Clin Laser Med Surg*. 1998 Dec;16(6):317-20.
- 57 - Mizutani K, Musya Y, Wakae K, Kobayashi T, Tobe M, Taira K, Harada T. A clinical study on serum prostaglandin E2 with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2004 Dec;22(6):537-9.
- 58 - Santos JJ, Amiranoff F, Baton SD, Gremillet L, Koenig M, Martinolli E, Rabec Le Gloahec M, Rousseaux C, Batani D, Bernardinello A, Greison G, Hall T. Fast electron transport in ultraintense laser pulse interaction with solid targets by rear-side self-radiation diagnostics. *Phys Rev Lett*. 2002 Jul 8;89(2):025001. Epub 2002 Jun 24.
- 59 - Albertini R, Aimbire F S, Correa F I, Ribeiro W, Cogo J C, Antunes E, Teixeira S A, De Nucci G, Castro-Faria-Neto H C, Zângaro R A, Lopes-Martins R A. 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*. 2004 May 27;74(2-3):101-7.
- 60 - Lopes-Martins R A, Albertini R, Martins P S, Bjordal J M, Faria Neto H C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory

mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed Laser Surg.* 2005 Aug;23(4):377-81.

61 - Lopes-Martins R A, Albertini R, Martins P S, Bjordal J M, Faria Neto H C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed Laser Surg.* 2005 Aug;23(4):377-81.

62 - Aimbire F, Albertine R, De Magalhães R G, Lopes-Martins R A, Castro-Faria-Neto H C, Zângaro R A, Chavantes M C, PACHECO MT. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. *Lasers Med Sci.* 2005;20(1):11-20.

63 - Aimbire F, Albertini R, Pacheco M T, Castro-Faria-Neto H C, Leonardo P S, Iversen V V, Lopes-Martins R A, Bjordal J M. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNFalpha levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Feb;24(1):33-7.

64 - Aimbire F, Lopes-Martins R A, Albertini R, Pacheco M T, Castro-Faria-Neto H C, Martins P S, Bjordal J M. Effect of low-level laser therapy on hemorrhagic lesions induced by immune complex in rat lungs. *Photomed Laser Surg.* 2007 Apr;25(2):112-7.

65 - Bjordal J M, Johnson M I, Iversen V V, Aimbire F, Lopes-Martins R A. Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):158-68.

66 - Bjordal J M, Johnson M I, Lopes-Martins R A, Bogen B, Chow R, Ljunggren A E. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A

systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. BMC Musculoskelet Disord. 2007 Jun 22;8:51. Review.

67 - Bjordal J M, Klovning A, Lopes-Martins R A, Roland P D, Joensen J, Slørdal L. Overviews and systematic reviews on low back pain. Ann Intern Med. 2008 May 20;148(10):789-90; author reply 791-2.

68 - Bjordal J M, Lopes-Martins R A, Iversen V V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. Br J Sports Med. 2006 Jan;40(1):76-80; discussion 76-80.

69 - Bjordal J M, Lopes-Martins R A, Iversen V V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations. Br J Sports Med. 2006 Jan;40(1):76-80; discussion 76-80.

70 - Bjordal J M, Lopes-Martins R A, Joensen J, Couppe C, Ljunggren A E, Stergioulas A, Johnson M I. A systematic review with procedural assessments and meta-analysis of low level laser therapy in lateral elbow tendinopathy (tennis elbow). BMC Musculoskelet Disord. 2008 May 29;9:75.

71 - Correa F, Lopes Martins R A, Correa J C, Iversen V V, Joenson J, Bjordal J M. Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. Photomed Laser Surg. 2007 Aug;25(4):245-9.

72 - Leal Junior E C, Lopes-Martins R A, Vanin A A, Baroni B M, Grosselli D, De Marchi T, Iversen V V, Bjordal J M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. Lasers Med Sci. 2008 Jul 23.

73 - Stergioulas A. Low-power laser treatment in patients with frozen shoulder: preliminary results. *Photomed Laser Surg.* 2008 Apr;26(2):99-105.

74 - Lopes-Martins R A, Albertini R, Lopes-Martins P S, De Carvalho F A, Neto H C, Iversen V V, Bjordal J M. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. *Photomed Laser Surg.* 2006 Apr;24(2):197-201.

75 - Lam F Y, Ferrell W R. Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances neuropeptide-mediated vasodilatation assessed by laser Doppler perfusion imaging. *Neuroscience.* 1993 Jan;52(2):443-9.

76 - Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Abe A, Yoshimura H, Fujimura K. Expression of capsaicin receptor TRPV-1 in synovial tissues of patients with symptomatic internal derangement of the temporomandibular joint and joint pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):674-81.

77 - Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982 Mar;78(3):206-9.

78 - Hunter JE. Variable effects of iron status on the concentration of ferritin in rat plasma, liver, and spleen. *J Nutr.* 1978 Mar;108(3):497-505.

79 - Egan C G, Lockhart J C, Ferrell W R, Day S M, Mclean J S. Pathophysiological basis of acute inflammatory hyperaemia in the rat knee: roles of cyclo-oxygenase-1 and -2. *J Physiol.* 2002 Mar 1;539(Pt 2):579-87.

80 - Krasnouktsky, S., Samuels, J. Abramson, S.B. Osteoarthritis in 2007, *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* v 65 p 222-8, 2007

- 81 - Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir Res.* 2007 Oct 30;8:75.
- 82 - Serhan C N, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1191-7.
- 83 - Van Den Berg W B. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol.* 1999 Jun;58(3):136-41.
- 84 - Goupille P, Mulleman D, Chevalier X. Is interleukin-1 a good target for therapeutic intervention in intervertebral disc degeneration: lessons from the osteoarthritic experience. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(6):110.
- 85 - Rajakariar R, Yaqoob MM, Gilroy DW. COX-2 in inflammation and resolution. *Mol Interv.* 2006 Aug;6(4):199-207.