MARIA STELLA MOREIRA

**Análise da biomodulação da inflamação após lesão criogênica no
sistema nervoso central em ratos submetidos à fototerapia com laser
em baixa intensidade**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obter o título de
Doutor Ciências

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco

Co-Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2009

Oh! quão bom e quão suave é que os irmãos vivam em união! É como o óleo precioso sobre a cabeça, que desceu sobre a barba, a barba de Arão, que desceu sobre a gola das suas vestes; como o orvalho de Hermom, que desce sobre os montes de Sião; porque ali o Senhor ordenou a bênção, a vida para sempre.

(SALMO 133)

Não tenhas medo, pois estou contigo. Não olhes em volta, pois eu sou teu Deus. Vou fortificar-te. Vou realmente ajudar-te. Vou deveras segurar-te firmemente com a minha direita de justiça.'

(Isaias 41:10)

A Deus dedico este trabalho

*Aos meus pais, Dalva e José, e aos meus irmãos, Débora, Eduardo e Mariângela,
pelo carinho, compreensão e apoio em todas as etapas da minha vida.*

A vocês dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco pela orientação, transmissão de conhecimentos, respeito, paciência e apoio nos meus momentos mais difíceis. Jamais vou esquecer.

A Profa Dra. Marcia Martins Marques, pela co-orientação, ensinamentos, exemplo de vida, paciência. Sempre nos contagiando com suas idéias e entusiasmo. Jamais vou esquecer.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, pelo incentivo ao estudo da Fototerapia Laser com muita dedicação e seriedade.

Aos meus amigos, Anna Liubuska Oliveira Belsuzarri e Pierre Rouchon, pela amizade, carinho, apoio, preocupação, respeito. Sinto muito a falta de vocês!

A minha amiga Fernanda de Paula Eduardo, parceira de estudo e de vida, pelo apoio, amizade.

Ao Joseph Tafur, pelo apoio e carinho....Estar presente depende daquilo que sentimos..

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho no LIM-51.

Ao Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, pelo apoio na realização deste trabalho .

A todos os meus amigos pertencentes ao laboratório de Investigação Médica – LIM 51 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente a Suely, pela sua dedicação e carinho em ensinar. Tudo foi possível com a ajuda e carinho de vocês!

Aos amigos pertencentes ao laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, especialmente a Leila e a Suely. Tudo foi possível com a ajuda de vocês!

Aos amigos pertencentes ao Laboratório Especial de Laser em Odontologia – LELO da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

As minhas amigas e amigos do Programa de Pós Graduação em Ciências da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Compartilhar com vocês as dificuldades também me ajudou muito!

As minhas amigas e amigos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, especialmente a Emanuela, Alessandra e Angela. Somos responsáveis por quem cativamos....

À Angélica e Rose, simplesmente pela excelência do trabalho que prestam a todos os alunos do Programa de Pós Graduação.

Aos funcionários do Biotério, especialmente o Antonio, pela dedicação depositada aos animais de experimentação e também pelo apoio e organização da parte experimental deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, que me concedeu uma bolsa durante a realização deste doutorado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP pelo apoio financeiro.

Moreira MS. Análise da biomodulação da inflamação após lesão criogênica no sistema nervoso central em ratos submetidos à fototerapia com laser em baixa intensidade [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.

RESUMO

Este estudo teve por finalidade estudar os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade (*Low Level Laser Therapy* – LLLT) sobre a inflamação e reparação após lesão criogênica realizada no sistema nervoso central (SNC) de ratos. Foram realizados 3 experimentos. Em todos os experimentos foi utilizado um modelo de deformação cortical direta induzida por lesão criogênica. A LLLT foi realizada com laser de diodo em baixa intensidade emitindo no vermelho visível (InGaAlP, 660 nm) ou no infravermelho (AlGaAr, 780 nm). Os parâmetros de irradiação foram: potência de 40 mW, área do feixe de 0,04 cm², densidades de energia de 3 J/cm² (3 s) ou 5 J/cm² (5 s) determinando energias por ponto de 0,12 J e 0,20 J, respectivamente. Foram realizadas 2 irradiações com intervalo de 3 h, no modo contato e em 2 pontos por lesão. No experimento 1, 50 ratos da linhagem Wistar foram utilizados para determinar os parâmetros de LLLT capazes de influenciar na dinâmica da produção de citocinas próinflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e antiinflamatória (IL-10). As citocinas foram mensuradas pelo teste ELISA no cérebro e no sangue dos animais, 6 e 24h após a lesão. Os grupos experimentais foram: controle (não irradiado) e 4 grupos irradiados com 3 J/cm² ou 5 J/cm² para cada comprimento de onda (n=10 por grupo). Para os experimentos 2 e 3 foram utilizados 40 ratos (20 não irradiados – controles e 20 irradiados). A LLLT foi realizada somente com o parâmetro de irradiação do laser no infravermelho e a densidade de energia de 3 J/cm². Nestes experimentos o processo de reparação das lesões criogênicas no SNC foi acompanhado em 6 h, 1, 7 e 14 dias após a última irradiação (n=5 por grupo por tempo experimental). No experimento 2 foi realizada a análise morfológica da região lesionada do SNC. No experimento 3 foi analisada a distribuição das células inflamatórias (linfócitos T, leucócitos e macrófagos). Os dados de cada experimento foram comparados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis seguido dos testes de Tukey ou de Dunn, respectivamente ($\alpha=5\%$). O trauma criogênico foi capaz de criar lesões focais no córtex representadas por necrose, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório. Os achados mais marcantes foram: no experimento 1 com a irradiação do laser no infravermelho e 3 J/cm², o TNF- α e a IL-6 se mantiveram nos mesmos níveis em 6 e 24 h, enquanto no controle houve aumento significativo. Experimento 2: as lesões não tratadas apresentaram maior perda tecidual em 6 h que as irradiadas. Experimento 3: as lesões irradiadas apresentaram menor quantidade de leucócitos e linfócitos T nas primeiras 24 h do que nas lesões controle. A quantidade de macrófagos foi similar nos dois grupos. Conclusões: Levando em consideração as condições experimentais deste estudo concluiu-se que LLLT exerce efeitos nos processos de inflamação e reparação diminuindo a concentração de citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-6) no sangue e mantendo a de IL-1 β no cérebro. Adicionalmente, diminui a perda tecidual inicial pós-lesão criogênica e a infiltração inicial de leucócitos e linfócitos T.

Descritores: IL-1 β . IL-6. IL-10. Interleucinas. Laser de baixa potência. Lesão encefálica criogênica. TNF- α .

Moreira MS. Analysis of biomodulation of inflammation after cryogenic injury in the central nervous system in rats subjected to phototherapy with low-intensity laser [PhD thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2009.

ABSTRACT

This study aimed to study the effects of phototherapy with low-intensity laser (Low Level Laser Therapy - LLLT) on inflammation and repair after cryogenic injury held in central nervous system (CNS) of rats. There were 3 experiments. In all experiments a model of deformation induced by direct cortical cryogenic injury was used. The LLLT was carried out with a low intensity diode laser emitting in the visible red (InGaAlP, 660 nm) or infrared (AlGaAs, 780 nm). The irradiation parameters were: power of 40 mW, beam area of 0.04 cm², energy densities of 3 J/cm² (3 s) or 5 J/cm² (5 s) providing energy per point of 0.12 J and 0.20 J, respectively. Two irradiations were performed at 3 h-intervals, in contact mode and in 2 points for lesion. In experiment 1, 50 Wistar rats were used to determine the parameters of LLLT able to influence the dynamics of production proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and antiinflammatory cytokine (IL-10). Cytokines were measured by ELISA in the brain and blood of animals, 6 and 24 hours after injury. The experimental groups were: control (non-irradiated) and 4 irradiated groups [3 J/cm² and 5 J/cm² for each wavelength (n = 10 per group)]. For experiments 2 and 3 40 rats (20 non-irradiated - controls and 20 irradiated).were used. The LLLT was performed only with the parameter of laser irradiation on the infrared and the energy density of 3 J/cm². In these experiments, the process of repair of cryogenic injury in the CNS was followed in 6 h, 1, 7 and 14 days after the last irradiation (n = 5 per group and time trial). In experiment 2 a morphometric analysis of the injured area of the CNS was done. In experiment 3 the distribution of inflammatory cells (lymphocytes, leukocytes and macrophages) was analyzed. Data from each experiment were compared statistically by analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis followed by tests of Tukey or Dunn, respectively (α = 5%). Cryogenic trauma was able to create focal lesions in the cortex represented by necrosis, edema, hemorrhage and inflammatory infiltrate. The most striking findings were: in experiment 1 with the laser irradiation in the infrared and 3 J/cm², TNF- α and IL-6 remained at the same levels at 6 and 24 h, while in the control there was a significant increase. Experiment 2: untreated lesions showed greater tissue loss than irradiated lesions in 6 h. Experiment 3: lesions irradiated had fewer leukocytes and lymphocytes in the first 24 h than control lesions. The amount of macrophages was similar in both groups. Conclusions: Considering the experimental conditions of this study it was concluded that LLLT has effects in the processes of inflammation and repair by decreasing the concentration of proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-6) in blood and holding the IL-1 β in the brain. Additionally, decreases the initial tissue loss after cryogenic injury and the initial infiltration of leukocytes and lymphocytes T.

Descriptors: Cryogenic brain injury. IL-1 β . IL-6. IL-10. Interleukins. Low power laser. TNF- α .

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP	<i>adenosina triphosphate</i>
BBB	Barreira Hematoencefálica (Blood Brain Barrier)
BCSFB	Blood Cerebrospinal Fluid Barrier
CBI	Lesão Criogênica Cerebral (Cryogenic Brain Injury)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHI	Closed Head Injury
COX-2	<i>Cyclooxygenase</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine</i>
ELISA	Ensaio imunoabsorbente de ligação enzimática
GABA	<i>Gamma-aminobutyric Acid</i>
h	hora
H&E	hematoxilina e eosina
HSP 70	<i>heat shock protein</i>
ICAM-1	molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
J	joules
J/cm ²	Joules/centímetro quadrado
kDa	quilodaltons
LAD	Lesão Axional Difusa
LLLT	Low Level Laser Therapy
MAPK	<i>Mitogen – activated protein kinases</i>

μl	microlitro
mg/kg	miligrama de droga para cada kilograma de animal
mg/ml	miligrama por mililitro
MHC	Complexo de histocompatibilidade (Major Histocompatibility Molecule)
mm	milímetros
mM	milimolar
MMP	Matrix metalloproteinases
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NFκβ	<i>Nuclear factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIR	<i>near infrared</i>
nm	nanômetros
NMDA	<i>N-metil D-asparte</i>
NO	óxido nítrico (Nitric Oxide)
PBS	tampão fosfato salina
pg/ml	picograma por mililitro
PMN	Polimorfonucleares
rpm	rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TBI	Trauma Cranioencefálico (Trauma Brain Injury)
TC	Tomografia Computadorizada
TNF α	fator de necrose tumoral
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	06
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5 RESULTADOS	69
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÕES	101
8 REFERÊNCIAS	103
9 APÊNDICE	123

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (*traumatic brain injury*; TBI) é um dos problemas mais relevantes de saúde pública que afeta anualmente mais de 2 % da população dos Estados Unidos e representa uma das causas mais importantes de morbi- mortalidade, especialmente na população jovem. A mortalidade dos pacientes vítimas de TBI está em torno de 40 % e não está limitada somente aos países desenvolvidos, sendo o TBI bastante presente em todo o mundo. No Brasil, Masini estimou, para Brasília, no ano de 1991, uma incidência de TBI da ordem de 341 para cada 100000 habitantes. Infelizmente, mais da metade dos mortos por TBI ocorre no local do trauma, sem tempo para a reanimação.

As lesões encefálicas, decorrentes do trauma, são classificadas segundo os critérios temporais e topográficos. Inicialmente, foi enfatizada a divisão das lesões encefálicas em primárias e secundárias

A lesão primária é resultante das forças mecânicas iniciais, ocorre no momento do trauma e corresponde à contusão cerebral e à lesão axonal difusa. A lesão secundária é determinada por processos iniciados no momento do trauma, mais clinicamente evidente algum tempo depois. São lesões secundárias: os hematomas intracranianos, a tumefação cerebral, a lesão cerebral secundária à hipertensão intracraniana e a lesão cerebral hipóxica. Está associada às mudanças celulares e moleculares que ocorrem após a lesão primária que, por sua vez, causa distorção e destruição tecidual no período inicial pós - lesão.

A evolução clínica pós-trauma depende da modulação das respostas celulares e biomoleculares que ocorrem após o período inicial. A lesão secundária ocasiona alterações nas funções celulares e propagação da lesão através dos processos tais como despolarização dos neurônios, interrupção da homeostase do cálcio e da barreira hematoencefálica, além de isquemia, edema e hipertensão intracranial.

Do ponto de vista topográfico (anatomopatológico) as lesões se classificam em focais e difusas. As lesões focais caracterizam-se por serem macroscópicas e limitadas a determinadas áreas. São lesões focais a contusão cerebral, o hematoma intracraniano, a hemorragia e a inflamação do tronco encefálico consequentes à hipertensão intracraniana. As lesões encefálicas são, portanto, responsáveis por cerca de 60 % das internações hospitalares.

O conhecimento dos mecanismos da lesão cerebral é importante uma vez que há consequências sensomotoras, cognitivas, comportamentais e sociais diretamente decorrentes da injúria. Com a finalidade de estudar as sequelas agudas das lesões cerebrais e o papel das alterações neuroquímicas, que se admite sejam os causadores da morte ou do dano celular secundário, diferentes pesquisadores tem empregado modelos experimentais biomecânicos de TBI em animais. Esses modelos procuram reproduzir os insultos traumáticos ao tecido cerebral, utilizando diferentes formas de aplicação de energia e produzindo lesões corticais focais ou difusas.

Entre estes modelos se destaca o da deformação cortical direta que pode ser induzida através de lesão criogênica (*cryogenic brain injury* ; CBI).

O modelo de CBI é importante em estudos que avaliam a patologia de contusões focais e a qualidade de tratamento que visam à redução do tamanho de lesões focais.

O tratamento clínico de lesão craniana traumática está dirigido para as medidas imediatas de salvamento da vida do paciente, e para a detenção do mesmo para observação, em busca de complicações secundárias que podem ameaçar a vida.

Esteróides ou diuréticos osmóticos podem ser usados em auxílio à redução do edema cerebral e pressão intracraniana. Uma vez que o paciente esteja estabilizado, o tratamento médico se focaliza na contínua avaliação neurológica, prognóstico, procedimentos ortopédicos e complicações secundárias (infecção e convulsões). A recuperação do traumatismo craniano frequentemente tem forma variável e complexa.

A despeito de numerosas pesquisas não existe, até o momento, uma terapêutica neuroprotetora eficiente para o trauma cerebral, portanto estudos que permitam melhorar a recuperação e a qualidade de vida dos pacientes com lesão cerebral traumática ainda são necessários.

Uma terapia que, mesmo de forma coadjuvante, poderia melhorar os tratamentos convencionais de TBI seria a fototerapia com laser em baixa intensidade (*low level laser therapy*; LLLT). Efeitos benéficos da LLLT na modulação do processo inflamatório em diversos tecidos têm sido amplamente pesquisados. Entretanto, são pouco conhecidos os efeitos da LLLT sobre a resposta inflamatória do tecido nervoso decorrente de trauma.

O estudo dos efeitos da LLLT na inflamação do SNC após o trauma, poderia contribuir para estabelecer bases que possibilitassem a adoção de

novas estratégias terapêuticas no tratamento dos pacientes com TBI. Portanto este estudo, utilizando o modelo de deformação cortical focal em ratos, visa analisar o efeito da LLLT nos processos de inflamação e reparação de lesões criogênicas no SNC de ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TBI)

A injúria traumática no cérebro (*traumatic brain injury*; TBI) é um dos problemas de saúde pública mais relevante, e o conhecimento dos mecanismos da lesão cerebral se faz importante uma vez que há consequências sensomotoras, cognitivas, comportamentais e sociais diretamente decorrentes dessa injúria. Adicionalmente, a despeito de numerosas pesquisas ainda não existe, até o momento, uma terapêutica neuroprotetora eficiente para o trauma cerebral.

O TBI é classificado segundo os critérios temporais e topográficos. Inicialmente, foi enfatizada a divisão das lesões encefálicas em primárias e secundárias (Gennarelli, 1993).

A lesão primária é resultante das forças mecânicas iniciais, ocorre no momento do trauma e corresponde à contusão cerebral e à lesão axonal difusa. A lesão secundária é determinada por processos iniciados no momento do trauma, mas clinicamente evidente algum tempo depois. São lesões secundárias: os hematomas intracranianos, a tumefação cerebral, a lesão cerebral secundária a hipertensão intracraniana e a lesão cerebral hipóxica (Gennarelli, 1993).

As lesões secundárias estão associadas às mudanças celulares e moleculares que ocorrem após a lesão primária e causam distorção e destruição tecidual no período inicial pós-lesão. A evolução clínica depende da modulação das respostas celulares e biomoleculares que ocorrem após o período inicial. Além disso, ocasionam alterações nas funções celulares e propagação da lesão através dos processos, tais como despolarização dos neurônios, interrupção da homeostase do

cálcio e da barreira hematoencefálica (*blood brain barrier*, BBB), além de isquemia, edema e hipertensão intracranial (Gennarelli, 1993).

Do ponto de vista topográfico (anatomopatológico) as lesões se classificam em focais e difusas. As lesões focais caracterizam-se por serem macroscópicas e limitadas a determinadas áreas. São lesões focais a contusão cerebral, o hematoma intracraniano, a hemorragia e a inflamação do tronco encefálico consequentes à hipertensão intracraniana (Gennarelli, 1993).

As lesões traumáticas cerebrais focais podem ser secundárias tanto aos efeitos diretos do impacto quanto às forças de inércia, enquanto que as lesões difusas são sempre secundárias aos movimentos de aceleração e desaceleração da cabeça. Além disso, as lesões cerebrais difusas tendem a produzir uma disfunção global das funções corticais e se associam a um pior prognóstico neurológico do que as lesões focais (Pietro et al., 2009).

As lesões cerebrais traumáticas do tipo focal que ocorrem com mais frequência são as contusões superficiais e as lacerações que podem vir acompanhadas de fratura de crânio e ou hematomas intracranianos (Gennarelli, 1993). As principais lesões cerebrais do tipo focal que se observa na prática clínica, decorrentes de um TBI, são as contusões cerebrais. Os modelos experimentais mais empregados que reproduzem lesões cerebrais pós-traumáticas do tipo focal são os modelos de deformação cortical direta, destacando, o trauma criogênico, percussão fluida, impacto controlado e de balão inflável (Pietro et al., 2009). O modelo de lesão criogênica consiste na aplicação de fluído frio (James et al., 1990) ou de uma barra metálica resfriada com nitrogênio líquido (Tood et al., 1993). Esse modelo induz uma lesão cortical por resfriamento local do cérebro (Klatzo et al., 1958) consistente com

foco necrótico rodeado de vasos com a permeabilidade aumentada pela ruptura da *BBB* (Reulen et al., 1978).

O TBI se deve basicamente à intensidade e rapidez com que a energia liberada pelo traumatismo atua sobre o crânio. O prognóstico de um paciente que tenha sofrido um TBI vai depender tanto da energia liberada do traumatismo quanto do mecanismo causal do mesmo. Nos países desenvolvidos a causa mais freqüente do TBI são os acidentes de trânsito (Tagliaferri et al., 2006). Uma evolução desfavorável é o estado vegetativo permanente ou uma morbidade grave pós-traumática, podendo se apresentar em 20% dos casos (Fleminger et al., 2005). Apesar da intensa investigação realizada nas últimas décadas não que existe atualmente nenhum tratamento específico e efetivo do dano cerebral traumático, excetuando-se as intervenções cirúrgicas dos hematomas intracranianos com um efeito em massa e um controle estrito da pressão arterial e da pressão intracraniana do paciente.

Conhecimento mais profundo das diversas alterações fisiopatológicas produzidas no dano cerebral traumático, especialmente em nível celular e molecular é um requerimento básico prévio na busca de qualquer terapia capaz de interferir especificamente com os mecanismos subjacentes às lesões cerebrais traumáticas. Os modelos experimentais são a melhor ferramenta de que dispomos para estudar as múltiplas alterações fisiopatológicas associadas ao dano cerebral traumático assim como a investigação das novas estratégias terapêuticas (Morales et al., 2005).

As lesões cerebrais traumáticas presentes em cada paciente são únicas e seus fatores desencadeantes sumariamente complexos, existindo uma grande

variedade de lesões com uma infinidade de combinações das mesmas segundo a gravidade e a localização específica de cada uma delas.

Clinicamente é possível diferenciar dois grandes grupos de lesões do parênquima cerebral secundárias a um TBI: lesões traumáticas focais e lesões traumáticas difusas (Gennarelli, 1993). As lesões focais incluem as contusões cerebrais e os hematomas intracranianos, esses últimos são de localização epidural, subdural ou intraparenquimatosa. As lesões focais são facilmente identificáveis nos estudos de tomografia computadorizada (TC). Enquanto que as lesões difusas podem sobrepor-se diante da ausência de achados patológicos nas imagens de TC em pacientes com deteriorização neurológica inicial e progressiva. As lesões difusas incluem a lesão axional difusa (LAD) e o edema cerebral difuso (Povlishock et al., 2005).

A complexidade e heterogenicidade do TBI em humanos têm conduzido o desenho de uma grande variedade de modelos experimentais, cada um deles reproduz um aspecto do dano observado na clínica (Leker et al., 2002). Alguns modelos reproduzem fundamentalmente lesões cerebrais focais (Dixon et al., 1988; McIntosh et al., 1989; Denny-Brown, 2006), enquanto outros reproduzem dano cerebral difuso (Marmarou et al., 2003; Cernak et al., 2004,2005). Na última década, junto aos modelos experimentais de TBI tem sido desenvolvida uma série de modelos experimentais *in vitro* que permitem estudar de forma mais precisa condições específicas do dano cerebral traumático em nível celular. Os modelos experimentais nos permitem analisar múltiplos parâmetros tanto fisiológicos, quanto neuroquímicos e patológicos. Além disso, permitem avaliar a utilidade de novas ferramentas diagnósticas e pesquisar os efeitos de potenciais agentes terapêuticos.

As lesões traumáticas também são classificadas segundo critérios temporais em primárias e secundárias. Enquanto a lesão cerebral primária resulta de forças mecânicas aplicadas sobre crânio e cérebro no momento do impacto, causando lesões focais ou difusas, a lesão cerebral secundária representa as conseqüências de complicações dos processos iniciados pela lesão primária e cujos principais riscos são constituídos pela hipóxia e pela hipotensão, durante o período de reanimação (Gennarelli, 1993).

Os eventos secundários induzem uma inflamação pela ativação de uma resposta imune inata, desencadeando uma resposta inflamatória profunda no compartimento intracraniano. Após o TBI a lesão primária é exacerbada pela cascata de eventos da lesão secundária que persiste por horas, dias e meses pós-injúria (McIntosh et al., 1989,1998). Os mecanismos das lesões secundárias abrangem os eventos inflamatórios que contribuem para a evolução clínica (Shoyami et al., 1994; Stahel et al., 2000). Esses eventos incluem alterações na BBB, recrutamento e acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos do sangue, com subsequente formação de citocinas e radicais livres reativos, que contribuem para os processos patológicos (Morganti e Kossmann et al., 2001; Scholz et al., 2007).

As citocinas sintetizadas pelo cérebro lesado bem como os leucócitos circulantes são capazes de alterar a permeabilidade e exacerbar a formação de edema (Shohami et al., 1994). Os eventos inflamatórios agudos podem estimular o recrutamento de outros tipos de células e a produção de espécies reativas de oxigênio tais como o óxido nítrico e outras moléculas levando à necrose e apoptose (Nguyen et al., 2007).

2.2 INFLAMAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O SNC foi por longo tempo considerado como um órgão privilegiado, com uma BBB reguladora do influxo de células imunes e mediadores do compartimento vascular para o parênquima cerebral (Perry et al., 1998). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que as células imunes migram através da BBB e a barreira do fluído cerebrospinal (*blood cerebrospinal fluid barrier*; BCSFB), apesar de ocorrer migração em baixos níveis, isto sugere que a resposta imune pode ocorrer no cérebro (Engelhardt et al., 2006).

Em condições fisiopatológicas normais, a entrada de células imunes é passiva, associada à falta de apresentação do antígeno pelas moléculas de histocompatibilidade maior (*major histocompatibility molecule*; MHC). Entretanto, em condições patológicas, as células imunocompetentes podem rapidamente atravessar a BBB e a BCSFB e entrar no parênquima cerebral. Além disso, se considerava que o SNC falhava em responder as mudanças imunes e inflamatórias ou em ativar a resposta de defesa como era vista em outros órgãos (Kelley et al., 1994). O cérebro é diferente no seu sistema de defesa, mas se sabe atualmente que exibe algumas ferramentas tais como edema, invasão de células imunes, ativação da microglia, e expressão de mediadores clássicos do processo imune-inflamatório, como complemento, proteínas da fase aguda e citocinas.

A compreensão dos eventos que contribuem para o desenvolvimento de lesão secundária inflamatória cerebral após o TBI fechado não está plenamente estabelecida, devido à grande variedade de mediadores endógenos liberados no compartimento intracraniano após o trauma, as complexidades de suas interações e a regulação tempo-dependente da dualidade de funções, agonistas e antagonistas.

Os mediadores endógenos da neuro-inflamação são as citocinas pró-inflamatórias (Feuerstein et al., 1998; Ghirnikar et al., 1998), as quimiocinas (Ghirnikar et al., 1998) e as anafilotoxinas do sistema complemento (Stahel et al., 1998; Nataf et al., 1999). Esses mediadores são responsáveis pela quimiotaxia dos leucócitos derivados do sangue através da BBB dentro do espaço subaracnóideo (Holmin et al., 1997). O recrutamento de leucócitos contribui para o desenvolvimento da lesão secundária cerebral pela exacerbação e perpetuação da resposta inflamatória na lesão cerebral dentro do espaço subaracnóide (Schoettle et al., 1990; Zhuang et al., 1993).

2.3 CITOCINAS

As citocinas são importantes mediadores das doenças e das injúrias no SNC (Feuerstein et al., 1998; Simi et al., 2007). Essas são peptídeos que variam de 8-30 kDa e podem ser divididas de acordo com os seus efeitos pró e antiinflamatórios. A maioria é produzida em baixos níveis em tecidos saudáveis, mas são rapidamente aumentadas na resposta a mudanças patológicas (Rothwell et al., 2000). Além disso, os efeitos de uma citocina em particular podem mudar ao longo do tempo com uma expressão inicial após a injúria contribuindo para a evolução patológica, e mais tardiamente contribuindo no processo de reparo. Entretanto, ocorre sobreposição de funções entre diferentes citocinas resultando considerável redundância. Esse fato pode dificultar estratégias terapêuticas visando uma citocina em particular.

O efeito de uma citocina pode depender do tipo de célula sobre a qual atua, ou se esse efeito é direto ou indireto. Os locais de ação das citocinas são determinados pela presença de um receptor apropriado localizado na membrana

celular de cada célula em particular (Allan; Rothwell, 2001). A maioria dos receptores tem sido descritos no SNC (Szelényi, 2001). Em relação ao mecanismo de ação, é importante considerar o modelo experimental utilizado, já que o efeito da citocina observado em uma única célula isolada pode não representar uma situação mais complexa de um arranjo de tipos celulares como é o caso dos modelos *in vivo* (Allan; Rothwell, 2001).

No SNC, ações diretas das citocinas, incluindo mudanças na entrada de cálcio, liberação de neurotransmissores, e, plasticidade sináptica nos neurônios tem sido reportadas *in vitro* e poderiam contribuir para a viabilidade neuronal no cérebro lesado. Além disso, alguns desses efeitos poderiam ser considerados neuroprotetores e isso ilustra a importância de determinar as ações *in vitro* versus *in vivo*. É difícil demonstrar o efeito direto das citocinas nos neurônios *in vivo*, mas certas respostas podem ser certamente modificadas, diretamente ou indiretamente, pelas citocinas (Allan; Rothwell, 2003).

A glia e os neurônios estão extensivamente interligados no cérebro intacto, e, exercem efeitos um no outro, sendo que o neurônio depende da glia para sobreviver. As células da glia são as primeiras fontes e alvos de algumas citocinas no SNC, e podem liberar substâncias neuroativas em respostas à estimulação de citocinas, ambas neurotóxicas e neuroprotetoras. Essas substâncias incluem neurotrofinas e fatores de crescimento que podem promover a sobrevivência neuronal (Du; Dreyfus, 2002). Ao contrário, substâncias potencialmente neurotóxicas tais como óxido nítrico (*nitric oxide*; NO), radicais livres, proteases e aminoácidos podem ser produzidos por glias ativadas (Raivich et al., 1999). A partir disso, observa-se que a evolução clínica, em termos de viabilidade neuronal, depende do perfil das citocinas e das diferentes

substâncias liberadas pelas células da glia em resposta à estimulação dessas citocinas (Allan; Rothwell, 2003).

As citocinas e seus receptores estão presentes na vasculatura do cérebro e inicia a inflamação neste tecido em resposta à injúria isquêmica que ocorre no endotélio vascular cerebral (Del Zoppo et al., 2000). Os efeitos diretos das citocinas no fluxo sanguíneo não têm sido reportados, mas numerosas ações têm sido reportadas na vasculatura cerebral que podem afetar a viabilidade neuronal. O exemplo disso, é que a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) podem causar a quebra da BBB (Quagliarello et al., 1991; Blamire et al., 2000), regular a expressão de moléculas de adesão (Holmin; Mathiesen, 2000), bem como conduzir a liberação de moléculas tóxicas como o NO da vasculatura cerebral (Bonmann et al., 1997). Além disso, algumas dessas ações aumentam a invasão de leucócitos no parênquima cerebral, o que poderia contribuir para a injúria.

Algumas citocinas, incluindo TNF- α e IL-1 são proinflamatórias, promovem ou aumentam o processo inflamatório, enquanto outras, como a IL-10 e a IL-1ra são potentes moléculas antiinflamatórias.

As citocinas promovem atividade de macrófagos e linfócitos residentes no tecido, bem como induzem a quimo atração de células inflamatórias adicionais para a área lesada. Assim, achamos de importância analisar o componente celular do infiltrado inflamatório das lesões irradiadas e não irradiadas (controle). As células envolvidas na resposta inflamatória após o TBI são os leucócitos, microglia/macrófagos reativos e astrócitos reativos (Aihara et al., 1995; Holmin e Mathiesen, 1995). Estudos demonstraram os efeitos adversos desses polipeptídios e o papel duplo das citocinas na fisiopatologia do trauma cerebral fechado, particularmente no que diz respeito aos mediadores como TNF- α , IL-6, e os

membros da família IL-1 β (Shohami et al., 1999; Allan; Rothwell, 2001; Lenzlinger et al., 2001; Morganti-Kossmann et al., 2002).

2.4 FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

O TNF- α parece ser o mediador central da neuroinflamação (Sriram, O'Callaghan, 2007). O TNF se apresenta nas formas α e β e suas proteínas são derivadas de dois genes diferentes (Fiers, 1992). Essa citocina é produzida pela estimulação de monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, neutrófilos e mastócitos (Shohami et al., 1999). A forma TNF- α é sintetizada como um precursor ligado à membrana de 26-kDa, e que, após a clivagem na superfície da membrana, se transforma em uma subunidade de 17-kDa. Após a clivagem, ocorre a liberação de TNF- α solúvel e ativo para o espaço extracelular (Sriram; O'Callaghan, 2007).

As funções biológicas do TNF- α são mediadas através de dois receptores distintos de membrana, o TNFR1 55 kD (p 55) e TNFR2 75 kD (p 75) (Sriram; O'Callaghan, 2007). O padrão diferencial de localização dos receptores nos neurônios e células da glia, perfil de expressão, estágio ativacional dessas células e efetores ativados, tem um papel crítico em determinar se TNF- α terá um papel neuroprotetor ou neurotóxico (Fontaine et al., 2002; Dziewulska; Mossakowski, 2003; Akassoglou et al., 2003). Os receptores são membros da família TNF- α e conduzem sinais via recrutamento ou inibição de proteínas adaptativas.

2.4.1 EXPRESSÃO E EFEITOS NEUROTÓXICOS DE TNF- α

O TNF- α pode ser induzido após injúria traumática e promove neuroinflamação e neurodegeneração. Na lesão isquêmica traumática, o TNF- α pode ter um papel crítico no processo da injúria. Em modelos experimentais de isquemia, TNF- α é induzida precocemente após a injúria e em regiões específicas (Liu et al., 1994, Saito et al., 1996). Saito et al., (1996) demonstraram que após indução de isquemia transiente global, o TNF- α foi expresso na região do striatum e hipocampo, mas não em outras regiões cerebrais. Além disso, a expressão de TNF- α seguida de lesão isquêmica do cérebro ocorreu inicialmente nos neurônios sendo que a expressão tardia foi localizada nas células da glia (Buttini et al., 1996; Meistrell et al., 1997). Barone e colaboradores (1997) reportaram que após oclusão da artéria cerebral média, a expressão do TNF- α foi associada com a exacerbação de déficits neurológicos e tamanhos do infarto. Os estudos experimentais de trauma craniano demonstraram efeitos prejudiciais do TNF- α relacionados à toxicidade neuronal e evolução desfavorável do trauma (Knobloch et al., 1999; Trembovler et al., 1999).

A expressão de TNF- α tem sido observada no cérebro saudável de ratos e camundongos (Saper; Breder, 1992; Taupin et al., 1993) e também nos estudos em cultura de células residentes do SNC (Frei et al., 1987; Muñoz-Fernandez; Fresno, 1998). Entretanto, aumento dos níveis de produção de TNF- α pode também ser observado após lesão associada a trauma isquêmico, infecção ou doenças associadas com degeneração do parênquima do SNC (Konsman et al., 2007). Elevados níveis de TNF- α tem sido reportado no soro e líquido dos pacientes com injúria na cabeça (Goodman et al., 1990; Csuka et al., 1999). Os modelos

experimentais em animais, como percussão fluída (Taupin et al., 1993; Fan et al., 1996; Kita et al., 1997; Knobloch et al., 1999), contusão com peso (Holmin et al., 1997) tem demonstrado elevados níveis de TNF- α . Similarmente, em modelos experimentais de trauma fechado, ativação do complemento e aumento da expressão de TNF- α tem sido reportada (Shohami et al., 1997; Stahel et al., 2000)

A confirmação do papel neurotóxico do TNF- α surgiu de estudos realizados com neutralizadores ou antagonistas de TNF- α . Os anticorpos neutralizantes contra TNF- α mostraram ser protetores contra a isquemia cerebral (Lavine et al., 1998) e o pré-tratamento com anticorpos para TNF- α reduziu o volume infartado e melhorou a evolução neurológica.

O mecanismo pelo qual TNF- α estimula efeitos tóxicos (Benveniste et al., 1995; Shrikant et al., 1994) incluem: estimulação das células endoteliais e alteração da integridade da BBB resultando em adesão e infiltração de células inflamatórias no cérebro injuriado; estimulação de apoptose nas células endoteliais dos vasos cerebrais; ativação das células da microglia, promovendo um ciclo vicioso de estresse oxidativo e liberação de citocinas inflamatórias; modulação da expressão de metaloproteinases (MMPs) nos neurônios e astrócitos, deixando os astrócitos vulneráveis à citotoxicidade das células T; potencialização do glutamato; aumento do edema; modulação dos íons de cálcio intracelular e regulação do potencial de membrana. Desta forma, o TNF- α parece ser o mediador central da neuroinflamação.

2.4.2 EFEITOS NEUROPROTETORES DO TNF- α

Recentes estudos com camundongos geneticamente “nocauteados” definiram um novo papel para o TNF- α após o trauma cerebral. Os resultados desses estudos demonstraram que a deficiência de TNF- α poderia ser benéfica somente no período inicial pós-trauma, mas prejudicial na evolução tardia pós- traumática (Scherbel et al., 1999; Stahel et al., 2000).

O TNF- α exerce efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais, após a lesão cerebral, devido a mecanismos bifásicos inicialmente neuro-inflamatórios e tardiamente neuro-regeneradores. Esse efeito duplo na fisiopatologia da injúria fechada do cérebro (*closed head injury*- CHI) pode ser controlado pela regulação cinética da expressão de TNF- α dependendo do padrão e gravidade da lesão bem como de sua atuação local em função de liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios adicionais no foco de lesão (Shohami et al., 1999; Scherbel et al., 1999; Stahel et al., 2000; Arnett et al., 2001).

O TNF- α influencia a sobrevivência, diferenciação, proliferação e crescimento. O mecanismo pelo qual TNF- α parece mediar os efeitos neuroprotetores (Grassi et al., 1994; Barger et al., 1995; Mattson et al., 1995) inclui, a ativação de astroglia e estimulação da liberação de fatores neurotróficos, ativação do processo de reparo de nervos periféricos e vascularização cerebral, ativação do NF- κ B, indução de anti-apoptose, regulação de cálcio extracelular e cálcio ligado à proteína D28K.

2.4.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A DIVERGÊNCIA DE AÇÕES

O TNF- α tem funções que podem estimular a sobrevivência ou morte celular. Como o balanço entre esses divergentes papéis é mantido determina o papel dessa citocina. Enquanto os níveis basais não são necessariamente indicativos da função neuroprotetora versus neurotóxica (Mattson et al., 1995), as diferenças nos níveis e estágio de ativação dos receptores e efetores relacionados ao TNF- α podem conferir mudanças no seu papel.

Os receptores tipo 1 e tipo 2 são membros de uma super família que incluem outros receptores como Fas, linfotóxina B, fator de crescimento p75, e C40, entre outros receptores. Esses receptores têm homologia substancial, mas a função é mecanicamente diversa (Sprang et al., 1990). A expressão do receptor TNF- α ocorre em neurônios e vasos sanguíneos, entretanto, esses receptores são expressos nas células da glia (microglia e astrócito) e macrófagos após a lesão cerebral. Enquanto o receptor TNFR2 é predominantemente expressado pelos macrófagos, a microglia exibe um padrão diferente para ambos os receptores (Dziewulska; Mossakowsky, 2003). Desta forma, o padrão diferencial de expressão dos receptores de TNF- α nos neurônios e células da glia tem um papel crítico em determinar se o TNF- α terá um papel protetor ou neurotóxico (Fontaine et al., 2002 ; Dziewulska; Mossakowski, 2003; Akassoglou et al., 2003). Após a ativação, o receptor do TNF- α , interage com um arranjo de proteínas adaptativas intracelular para mediar sinalização celular.

O TNF- α não é somente influenciado pela regulação da sinalização intracelular, mas também pelas diferenças regionais em sua distribuição nas regiões cerebrais (Sriran, O' Callaghan, 2007). No cérebro, o TNF- α é predominantemente

produzido pela microglia. As microglias são localizadas nas proximidades dos neurônios e tem um papel importante na defesa do hospedeiro. Como a primeira célula imune no SNC, tem um papel duplo nas respostas celulares a injúria neuronal, um papel patogênico que inicia inflamação e exacerba a degeneração e um papel neuroprotetor (Streit et al., 2002; Stoll; Jander, 1999). Em condições fisiológicas normais, a microglia se mantém num estágio quiescente exibindo uma morfologia ramificada. Em resposta a lesões, a microglia retrai e seus processos adquirem uma forma amebóide (microglia ativada) ou arredondada (microglia fagocítica).

As microglias ativadas expressam uma série de proteínas imunológicas de superfície, como, complementos, complexo de MHC, antígenos citoplasmáticos lisossomais. A distribuição desses receptores difere baseados no tipo e extensão da injúria e sua distribuição topográfica no cérebro. Embora a microglia seja abundante no cérebro, a distribuição e heterogenicidade dessas células variam de acordo com a região cerebral (Lawson et al., 1990). O hipocampo, gânglio basal e substância negra são regiões densamente populadas por microglia, moderados níveis são encontrados no córtex, tálamo e hipotálamo, e as áreas densamente populadas incluem o cerebelo.

2.5 INTERLEUCINA -1 (IL-1)

A IL-1 não é uma molécula única, mas uma família de proteínas relacionadas, produtos de genes separados. As moléculas agonistas, IL-1 α e IL-1 β apresentam idêntica ação biológica pela ligação a um receptor de superfície (IL-1R1) (Sims et al., 1988). Esse receptor requer associação com uma proteína acessória (AcP), uma subunidade do receptor, necessária para o sinal de transdução (Greenfeder et al.,

1995). O segundo receptor, IL-1 R2 (McMahan et al., 1991), também se liga a IL-1, mas não inicia o sinal de transdução (Sims et al., 1993). O terceiro membro da família, IL-1ra, é um receptor antagonista altamente seletivo e competitivo que se liga ao receptor IL-1R1 e falha ao conduzir a ligação desse receptor com a AcP (proteína necessária para o sinal subsequente) bloqueando todas as ações da IL-1 α e IL-1 β (Greenfeder et al., 1995). As três moléculas são formadas como precursores, e, enquanto pro-IL-1 α e pro-IL-1ra são biologicamente ativos, a pro-IL-1 β é inativa e necessita ser clivada por uma enzima caspase-1 para que seja liberada em sua forma ativa (Thonberry et al., 1992).

2.5.1 A EXPRESSÃO E EFEITOS NEUROTÓXICOS DE (IL-1)

Todos os membros da família IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1 ra, IL-1 R1, IL1-R2, AcP) podem ser expressos pelas células endógenas cerebrais, embora em níveis baixos no SNC saudável. Entretanto a expressão de IL-1 é rapidamente aumentada em resposta a injúrias experimentais ou clínicas, incluindo isquemia, neurotoxicidade ou estímulo inflamatório (Vitkovic et al., 2001)..

A microglia, que também expressa a enzima caspase 1, parece ser a fonte inicial de IL-1 após lesão experimental e inflamação no SNC (Touzani et al., 1999). Os monócitos e macrófagos são as maiores fontes periféricas de IL-1 (Davies et al., 1999). Os astrócitos também são capazes de expressar a IL-1, porém mais tardiamente do que a microglia após a injúria aguda (Pearson et al., 1999). Ainda, os oligodendrócitos, as células endoteliais, o infiltrado inflamatório e os neurônios são capazes de expressar a IL-1 (Vitkovic et al., 2001). A IL-1ra é expressa pelo mesmo estímulo que induz a IL-1, entretanto essa expressão ocorre mais tardiamente (1-3h)

e preferencialmente nos neurônios (Loddick et al., 1997). A regulação da expressão, clivagem (no caso da IL-1 β) e liberação de IL-1 são pouco compreendidas e a maioria dos trabalhos foi conduzida em células periféricas (particularmente em monócitos), mas parece que as células do SNC regulam IL-1 por mecanismo similar.

A IL-1 β é a principal forma de IL-1 liberada pelas células. A expressão de IL-1 β tem sido descrita em camundongos, ratos, porcos e humanos saudáveis. A IL-1 β foi encontrada em homogeneizado de tecido cerebral de rato (Taupin et al., 1993; Yan et al., 1992) e também em camundongos (Takao et al., 1993). Em ratos, a IL-1 β e seu RNA mensageiro foram detectados em várias regiões cerebrais, incluindo cerebelo, hipotálamo, hipocampo e também em células da glia em diferentes regiões cerebrais (Bandtlow et al., 1990). Wang et al., (1997) também identificaram baixos níveis dessa citocina e seu RNA mensageiro no cérebro e na medula óssea de ratos.

A expressão de IL-1 β é induzida rapidamente em resposta a lesões cerebrais experimentais; sendo o RNA mensageiro expresso dentro de 15 minutos e sua proteína em 60 minutos. Os níveis de proteína têm sido mais difíceis de detectar, mas a imunorreatividade é frequentemente detectada, pela imunoistoquímica, em áreas danificadas 2 horas após lesão experimental. A expressão de IL-1 β e seu RNA mensageiro também têm sido demonstrados em modelos experimentais de lesão focal. Estudos clínicos demonstraram elevados níveis de IL-1 em tecido cerebral de recém nascidos e líquido dos pacientes com infarto ou cérebro com injúria. Alguns eventos celulares têm sido relacionados com a liberação de IL-1 β , como entrada de potássio, entrada de cálcio e ativação de fosfolipase C e fosfolipase A₂ (Andrei et al., 2004).

Em relação aos efeitos neurotóxicos, embora estudos recentes mostraram que a administração de IL-1 exógena no cérebro de ratos podem induzir perda de

neurônios, a maioria dos estudos reportaram que a administração direta de IL-1 isolada em células neuronais saudáveis falharam em detectar injúria (Carvey et al., 2004; Lawrence). Ao contrário, co-administração de IL-1 e outras citocinas podem resultar efeitos sinérgicos que levam a um elevado grau de toxicidade (Downen et al., 1999). Além disso, administração de IL-1 em cérebros de animais com injúria traumática, isquemia e excitotoxicidade aumentou o dano subsequente. Contudo, os resultados obtidos nesses estudos refletem efeitos de IL-1 exógeno que embora em concentrações baixas não represente os efeitos da citocina endógena.

As mais completas evidências implicando IL-1 endógena derivaram de estudos cuja expressão, liberação ou efeitos de IL-1 foram inibidos. Nesta proposta os cientistas utilizaram a IL-1ra (Hannum et al., 1990). Desta forma, os experimentos com IL-1ra mostraram marcante proteção contra a injúria neuronal resultante de lesões focais isquêmicas (induzidas pela oclusão da artéria cerebral) e também decorrente de injúria estimulada pela administração intracerebral de doses tóxicas de exotoxinas, como *N*-metil D-aspartate (NMDA) (Relton; Rothwell, 1992). Em ratos, gerbis e camundongos, administração de IL-1ra exógena ou a sua super expressão endógena inibiram marcadamente a injúria neuronal induzida por várias formas de isquemia cerebral, bem como excitotoxinas e trauma (Rothwell, Luheshe, 2000). Além disso, a administração intraventricular de anticorpos neutralizantes de IL-1 β , ou a inibição da clivagem ou liberação de IL-1 β pela caspase-1 ou inibição da caspase 1 atenuam dano isquêmico no cérebro (Yamasaki et al., 1995; Hara et al., 1997).

As evidências dos estudos *in vivo* indicam que a IL-1 é um importante mediador de injúria neuronal. A IL-1 é confinada localmente dentro do tecido injuriado e somente pequenas quantidades de IL-1 são necessárias para propagar uma resposta inflamatória que determina uma evolução clínica (Simi et al., 2007).

2.5.2 MECANISMO DE AÇÃO DE IL-1

IL-1 é um potente pirógeno que age em lugares específicos no hipotálamo para induzir febre (Hori et al., 1988) via interação com outra citocina como a IL-6. O aumento de temperatura exacerba injúria neuronal induzida experimentalmente e é associado com pobre evolução clínica dos indivíduos com infarto e trauma (Azzimond et al., 1995). Estudos experimentais indicam que os efeitos de IL-1 sobre temperatura não são os principais contribuintes da injúria neuronal. Em roedores, IL-1 pode exacerbar, e a IL-1ra pode inibir a injúria neuronal sem induzir aumento de temperatura. IL-1 pode influenciar a temperatura global ou regional, que pode influenciar a morte neuronal, embora estudo preliminar com ressonância magnética em roedores não confirmaram essas informações.

A severidade da injúria isquêmica é sensível a mudanças no fluxo sanguíneo das regiões afetadas. Em condições normais, a IL-1 aumenta o fluxo sanguíneo, onde em modelo de hipoperfusão ocorreu diminuição e a IL-1ra aumenta o fluxo (Maher et al., 2003). Essas diferenças podem refletir o papel fisiológico versus o patológico de IL-1 que depende do nível de expressão ou pode refletir o modelo experimental utilizado, portanto requer mais investigação.

A maioria dos estudos demonstra os efeitos da IL-1 nas células da glia, incluindo astrócitos e oligodendrócitos, mas os neurônios, as células endoteliais e células imunes também podem ser afetados pela IL-1. Todas essas células expressam o receptor de IL-1 (IL-1 R1). Em cultura, o tratamento dessas células com recombinante de IL-1 frequentemente resulta em forte ativação da sinalização

mediada pela IL-1 que é a ativação de MAPKs e de NF- κ B, e posterior liberação de mediadores inflamatórios secundários (PGE₂, IL-6 e NO). Entretanto um estudo recente mostrou uma sinalização mediada pela IL-1, envolvendo a ativação de p38 MAPKs nos neurônios enquanto NF- κ B é ativado nos astrócitos (Srinivasan et al., 2004).

Alguns estudos têm questionado o papel de IL-1 R1 em mediar as ações de IL-1 e IL-1ra na injúria neuronal. Os estudos *in vitro* demonstraram que o IL-1ra exerce atividade agonista se ligando a um receptor diferente de IL-1 R1 (Losher et al., 2003). Os estudos com camundongos sem o receptor IL-1 R1 demonstram um dano isquêmico cerebral que foi idêntico aos dos animais selvagens (*wild type*), embora no estudo de lesão isquêmica pouco severa mostrou a redução da injúria nos animais deficientes de IL1-R1 (Touzani et al., 2002; Bassu et al., 2005). Contudo a IL-1 exacerba o dano isquêmico na mesma extensão nos camundongos deficientes para IL-1 -R1 e nos animais selvagens (Touzani et al., 2002).

Nas células neuronais embora os efeitos diretos de IL-1 possam contribuir para a injúria neuronal, há conflito sobre a natureza desses efeitos. IL-1 injetada em cérebro sadio não causa dano e da mesma forma quando utilizado em cultura pura de neurônios não causa morte. A maioria dos dados é derivada de estudos *in vitro* e mostram que IL-1 tem efeitos que seria esperado em causar redução da morte neuronal, tais como, a inibição da liberação de glutamato, da entrada de cálcio, da potencialização de longo tempo e inibição da sinapse pelo ácido aminobutírico (GABA). Entretanto, a IL-1 possui outros efeitos que poderia contribuir com a injúria neuronal, incluindo o aumento da entrada de cálcio através do receptor de canal de íon NMDA, fortemente relacionado à morte neuronal (Viviani et al., 2003).

A IL-1 tem numerosos efeitos na glia, a maioria desses efeitos é mediado pelo receptor IL-1R1. Os astrócitos, de todas as células da glia, são os mais afetados pelos efeitos da IL-1 que promove sua proliferação, um processo chamado de astrogliosis. O papel funcional da astrogliosis na injúria neuronal é complexo, porque os astrócitos podem suportar os neurônios pela regulação de íons e neurotransmissores, modificando a transmissão elétrica e também são importantes fontes de citocinas pró-inflamatórias (Chen et al., 2003). Os dados de estudos utilizando *microarray* mostraram que a IL-1 é capaz de modificar a expressão de 1400 genes, incluindo a indução de expressão de genes codificados por quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, MMPs e citocinas (como IL-6) que se ligam a receptor contendo a proteína gp130 (John et al., 2005). Assim, uma variedade de mediadores pode ser expressa, alguns deles com potencial de ser neurotóxico. Ao contrário, alguns deles, podem promover a sobrevivência neuronal e ter um papel no processo de reparação após a injúria. Ultimamente, a consequência da exposição dos astrócitos a IL-1 depende do balanço entre o perfil de expressão temporal de moléculas que promovem sobrevivência e moléculas neurotóxicas.

IL-1 pode se ligar diretamente à célula de microglia de rato, o que resulta na expressão e liberação de vários mediadores, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, eicosanóides (como PGE₂), citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α) e quimiocinas (Basu et al., 2004). Entretanto, similar aos astrócitos, as células da microglia também podem produzir moléculas anti-inflamatórias que produzem benefícios (Aloisi et al., 2001). Há diferenças específicas na expressão de IL1-R1 ou sinalização mediada por IL-1 nas células da microglia, é reportado que a expressão de IL-1R1 é muito baixa e que a IL-1 falha em induzir o mecanismo de sinalização

clássica em células de microglia em cultura, o que é contrário ao observado nos estudos em ratos (Pinteaux e al., 2002).

O oligodendrócito expressa o receptor de IL-1 e pode produzir a IL-1, mas pouco se sabe sobre seus efeitos nessas células. Um estudo demonstrou que a IL-1 poderia promover a diferenciação de progenitores de oligodendrócitos e auxiliar na maturação e sobrevivência de células diferenciadas (Vela et al., 2002). Esse papel indica que a IL-1 pode afetar o processo de mielinização. De fato, ratos deficientes de IL-1 β mostraram um atraso no processo de remielinização, o que poderia indicar um papel da IL-1 no processo de reparo no SNC (Mason et al., 2001).

As células endoteliais cerebrais podem expressar os receptores de IL-1 resultando em uma importante região em que IL-1 induz injúria neuronal (Konsman et al., 2004). A IL-1 tem demonstrado exercer vários efeitos na vasculatura cerebral, incluindo aumento da expressão de moléculas que contribuem para o recrutamento de leucócitos, aumento de moléculas de adesão (como ICAM 1), e algumas vezes a quebra da BBB, conduzindo a invasão de neutrófilos e monócitos no parênquima cerebral (Bernardes-Silva et al., 2001). A injeção intracerebral de IL-1 pode induzir a expressão de E-seletina e P-seletina na ausência da quebra da BBB. Isso pode ser visto de 3-4 horas após a injeção, onde as selectinas estão presentes no endotélio ativado. Os anticorpos neutralizantes de selectinas bloqueiam a expressão de P- e não de E-selectina, o que conduz a um atraso no recrutamento de neutrófilos (Bernardes-Silva et al., 2001). A invasão dos leucócitos no cérebro que é induzida pela IL-1 depende do receptor IL-1 R1 e conduzem morte neuronal através da liberação de vários mediadores, como ON e eucosanóides (Ching et al., 2005). A injeção intracerebral de IL-1 aumenta a expressão de quimiocinas, o que pode contribuir para a passagem de leucócitos através do endotélio para o parênquima

cerebral (Anthony et al., 1998). Assim como tem um papel importante no recrutamento de leucócitos, as células endoteliais podem ativamente trazer alguns fatores neurotóxicos que foram produzidos pelas células da glia após exposição de IL-1, como prostaglandina, ON e MMPs.

2.6 INTERLEUCINA -6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina com funções pleiotrópicas no SNC (Gadiente; Otten, 1997). Além disso, uma importante característica desta citocina é a pluripotência. Essa proteína está envolvida em diferentes processos biológicos, incluindo hematopoiese, a resposta imune, e a inflamação (Gadiente; Otten, 1997). A IL-6 se liga a um receptor específico causando uma associação com duas moléculas de um componente adicional, gp130, deste modo ativando a enzima tirosinaquinase intracelular. Adicionalmente, um segundo mecanismo pode ser ativado, o que conduz a ativação das proteínaquinas mitógeno ativada (MAPKs) (Gadiente; Otten, 1997). A IL-6 foi originalmente caracterizada como uma citocina neuroprotetora e reguladora da homeostase intracerebral (Gadiente; Otten, 1997), no entanto esses achados foram recentemente rejeitados por modelos experimentais de EAE que demonstraram que a IL-6 contribui para uma evolução adversa em neuropatologia autoimune (Eugster et al., 1998).

No trauma de crânio, elevados níveis de IL-6 tem sido observados experimentalmente (Taupin et al., 1993; Shohami et al., 1997; Woodroffe et al., 1991), assim como no soro humano e no líquido dos pacientes (McClain et al., 1991, Kossman et al., 1995; Bell et al., 1997). Estudos clínicos têm demonstrado que a IL-6, liberada no compartimento intracraniano após trauma, induz a resposta hepática

da fase aguda depois de penetrar na circulação através da lesão da BBB. Estudos *in vitro* onde o líquido de humano após trauma de crânio foi incubado em cultura primária de astrócitos causou indução da produção de fator de crescimento neural (*nerve growth factor*; NGF). Esse efeito neuro-reparador poderia ser parcialmente inibido pela co-incubação com anticorpos neutralizantes anti-IL-6. Esses dados sugerem que a IL-6 poderia ser uma citocina neuro-reparadora na fisiopatologia do trauma de crânio. Esse conceito foi corroborado pelos estudos experimentais de axotomia e em modelos de lesão criogênica cerebral, fornecendo evidências de intensas reações inflamatórias no cérebro de camundongos geneticamente deficientes de IL-6 (Klein et al., 1997; Penkowa et al., 1999). Os estudos em animais transgênicos reportam a mediação da neuro-toxicidade pela IL-6 no papel dual da IL-6 na fisiopatologia do trauma de crânio (Shohami et al., 1994; Gadiant; Otten, 1997; Swartz et al., 2001).

2.6.1 EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DA INTERLEUCINA (IL-6) NO SNC

A IL-6 e o seu receptor são expressos em subpopulações neuronais específicas e em várias regiões cerebrais (Gadiante; Otten, 1993; 1994 a, b; Schobitz et al., 1993). As áreas que expressam grande quantidade de ambos os mRNAs são o hipocampo, o córtex e cerebelo (Gadiante; Otten, 1994 a). Os astrócitos também podem expressar ambos os genes (Schobitz et al., 1993).

Ringheim et al., (1995) utilizando células neuronais em cultura demonstrou que IL-6 e o seu RNA mensageiro foi fortemente induzido pela interleucina IL-1 β e TNF- α . A indução foi dose e tempo dependente e poderia ser bloqueada pelo receptor IL-1 antagonista ou por anticorpos contra TNF- α respectivamente. O

tratamento combinado entre ambas citocinas sinergicamente ativam a produção neuronal de IL-6.

Os astrócitos produzem citocinas, incluindo a IL-6 (Quintana et al., 2008). Vários estímulos diferentes têm sido descritos que alteram a síntese de IL-6 nos astrócitos. Como nos neurônios, as citocinas próinflamatórias IL-1 β e TNF- α e os interferons são potentes estimuladores da síntese de IL-6 (Norris et al., 1994). Ao contrário dos neurônios, a síntese de IL-6 também pode ser estimulada por vírus e bactérias (Wesselingh et al., 1990). As microglias, células residentes do SNC são potentes produtores de citocinas da inflamação. Os sinais tais como vírus e ou bactérias patogênicas são mediadores conhecidos que estimulam a síntese de IL-6 pelas microglias. O mecanismo de controle da síntese de IL-6 nas células cerebrais é idêntico ao dos neurônios, astrócitos e microglias. O fato da síntese de IL-6 ser induzida por citocinas próinflamatórias, patógenos infecciosos, bem como, neurotransmissores/neuropeptídeos corroboram o conceito de estreita comunicação entre neurônios e células da glia.

Em relação ao mecanismo de ação estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram as propriedades neuroprotetoras da IL-6. Hama et al. (1989) foram os primeiros a descreverem essas ações neuroprotetoras em subpopulações de neurônios em cultura (Hama et al., 1989; 1991). Os resultados desses estudos demonstraram que a IL-6 melhora a sobrevivência de neurônios colinérgicos e catecolaminérgico. IL-6 também é um fator de sobrevivência para neurônios sensoriais. Além disso, o pré-tratamento de neurônios do hipocampo em cultura protege essas células contra o glutamato que é um indutor de morte celular (Yamada e Hatanaka, 1994). Similarmente, Toulmond et al. (1992) observaram que IL-6 atenua efeitos neurotóxicos da NMDA em neurônios colinérgicos de rato *in vivo*. Entretanto, IL-6

falhou em proteger neurônios GABA - contra NMDA ocasionado pela morte celular. A ação citotóxica mediada pela enzima glutamato e aminoácidos ácidos antagonistas estão associados com a ativação de receptores de NMDA promovendo o aumento da concentração de cálcio intracelular.

O mecanismo pelo qual a IL-6 protege os neurônios contra exocitotoxicidade pode envolver o sistema de transporte de cálcio. Alguns autores demonstraram que o pré-tratamento com IL-6 de neurônios em desenvolvimento aumenta a entrada de cálcio decorrente da NMDA (Qiu et al., 1995; Holliday et al., 1995). A IL-6 não altera o influxo de cálcio através dos canais ativado pela despolarização da membrana. Adicionalmente, IL-6 protege os neurônios contra outras formas de agressão, incluindo a isquemia (Matsuda et al., 1996). Matsuda et al. (1996) demonstram que a aplicação de IL-6 protege a isquemia de neurônios do hipocampo, previne a perda da sinapse e prejuízo no aprendizado. A observação de que a hipóxia seguida da reoxigenação estimula os astrócitos a liberarem grande quantidade de IL-6 (Maeda et al., 1994) suporta o conceito que a IL-6 derivada da glia melhora a sobrevivência neuronal.

Os estudos de Satoh e colaboradores (1988) analisaram o efeito da IL-6 em um modelo de células PC12 e observaram a diferenciação dos neurônios. A IL-6 também promove proliferação dos astrócitos *in vitro* (Selmaj et al., 1990) e *in vivo* (Campbell et al., 1993). Desta forma, IL-6 contribui para a astrogliosis.

Os modelos de lesão do SNC tais como trauma, isquemia e exocitotoxicidade, têm sido utilizados para investigar os mecanismos de neurodegeneração (Kossman et al., 1995; Maeda et al., 1994; Woodroffe et al., 1991). Essas situações estimulam a produção de extensiva morte neuronal e ativação das células da glia frequentemente acompanhada da quebra da BBB e infiltração das células

mononucleares. A inflamação aguda pode ser modelada pela infecção viral e bacteriana no SNC, e encefalite autoimune experimental (Gijbels et al., 1990). Em todos esses modelos a IL-6 é fortemente acumulada no líquido dos animais. A elevação pode estar associada com a ativação local de microglia, astrócitos e neurônios, bem como a invasão de células de células mononucleares, incluindo a ativação de monócitos e células T, dentro do cérebro. A IL-6 tem um papel em amplificar o acúmulo de leucócitos nas regiões inflamadas (Romano et al., 1997).

A utilização de diferentes modelos de animais geneticamente modificados tem sido desenvolvido para estudar os potenciais neurotóxicos e neuroprotetores da IL-6. O primeiro modelo experimental de animais transgênicos foi apresentado por Campbell e colaboradores (1993). Nos animais com super expressão de IL-6 pelos astrócitos foi observada marcante proliferação da glia (astrogliosis), extensiva neurodegeneração e aumento da neovascularização, aumento das proteínas de fase aguda e quebra da BBB (Brett et al., 1995; Campbell et al., 1993; Steffensen et al., 1994). Além disso, esses animais mostraram sintomas clínicos de febre, anorexia, tremor, e paralisia. A análise morfológica revelou que o córtex e cerebelo foram particularmente afetados pela resposta gliótica estimulada pela super expressão de IL-6 no cérebro. Esses dados sugeriram fortemente que a IL-6 tem um papel em eventos neuropatológicos no SNC. Esses dados não foram confirmados em estudos com super expressão de IL-6 em neurônios do SNC (Fattori et al., 1995). Ao contrário, no modelo experimental de Campbell e seus colaboradores, esses animais não apresentaram sinais histológicos de dano neuronal. Entretanto esses animais desenvolveram astrogliosis e aumento de células da glia ramificada. No modelo de CBI, Swartz et al. 2001, demonstraram claramente o papel de IL-6 em promover a

reparação do tecido no cérebro. Esse achado também foi similar ao observado por Penkowa et al. (1999).

2.7 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

A IL – 10 é uma importante citocina antiinflamatória que promove a inibição de uma variedade de respostas dos macrófagos, incluindo a síntese de citocinas, de moléculas de adesão, das quimiocinas e também a supressão da proliferação de linfócitos T (Romano et al., 1996). Essa citocina tem sido estudada em diversos modelos de injúria do CNS *in vivo* (Bethea et al., 1999; Brewer et al., 1999; Csuka et al., 1999) e é geralmente considerada neuroprotetora. Essa citocina antiinflamatória com propriedades imunossupressivas exerce os seus efeitos através da inibição de citocinas proinflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (Cassatela et al., 1994; Joyce et al., 1994; Benveniste et al., 1995; Fan et al., 1996) e também pelo aumento da síntese e secreção de seus respectivos antagonistas endógenos (Cassatela et al., 1994; Knobloch et al., 1998). IL-10 também reduz as interações dos leucócitos com o endotélio que promovem a procoagulação e o extravasamento. Os efeitos antiinflamatórios de IL-10 têm sido demonstrados *in vivo*, quando a sua administração endógena auxiliou a recuperação neurológica pela redução da expressão de citocinas proinflamatórias (Joyce et al., 1994).

A evidência da produção intratraqueal de citocinas antiinflamatórias em pacientes portadores de TBI foi observada por Knobloch e colaboradores (1998). Os autores observaram que os níveis de IL-10 no líquido mostraram um aumento mais

acentuado dentro de 24 h, correlacionado com a diminuição do TNF (Knoblach et al., 1998).

2.8 FOTOTERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE (LLLT)

A modulação do processo inflamatório pela LLLT tem sido analisada em função dos diversos aspectos do processo. A terapia estimula a liberação de opióides endógenos (Laaksu et al., 2005; Hagiwara et al., 2007); inibem mediadores químicos como as prostaglandinas (PGE2) (Shimizu et al., 1995); reduz a expressão de COX-2 (Mizutani et al., 2004); reduz a expressão de citocinas como TNF- α e IL- β (Souza et al., 2009; Nomura et al., 2001). Não está totalmente esclarecido como a LLLT poderia modular as concentrações dessas citocinas. De fato, alguns estudos não encontraram modificações nos níveis de TNF- α em função da fototerapia (Kandolf-Sekulovic et al., 2001; Campana et al., 2003), enquanto outros encontraram significativa redução (Campana et al., 2003; Aimbire et al., 2006; Sousa et al., 2009). Além disso, a LLLT estimula o sistema linfático promovendo com maior rapidez a drenagem de substâncias álgicas e células do local da lesão.

Na fase proliferativa da inflamação, a LLLT acelera a reparação tecidual através do incremento na proliferação celular (Pereira et al., 2002; Kreisler et al., 2003; Azevedo et al., 2006; Eduardo et al. 2007, Fujihara et al., 2008), do aumento na secreção de fatores de crescimento, como o do b-FGF (Damante et al., 2008), de colágeno nos tecidos moles (Toyokama et al., 2003), da produção de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Zhang et al., 2004) e do processo de angiogênese (Mirsky et al., 2002).

Apesar de existirem muitos estudos dos efeitos da LLLT nas fases mais tardias da inflamação, poucos são os estudos sobre a ação da LLLT na fase aguda da inflamação, quando prevalecem os fenômenos exsudativos. Um estudo *in vivo* de Zhang e colaboradores (2004) analisou os efeitos da LLLT na permeabilidade vascular e demonstrou que o laser foi capaz de aumentá-la, além de incrementar a produção de VEGF, uma vez que o VEGF apresenta propriedades vasoativas, aumentando a permeabilidade endotelial (Villasante et al., 2008). Outros estudos *in vivo* demonstraram que o laser pode reduzir a formação de edema e a migração de células para o tecido inflamado (Albertini et al., 2004; Correa et al., 2007). Entretanto, os mecanismos pelos quais a LLLT influencia na permeabilidade vascular ainda não foram totalmente esclarecidos.

A LLLT pode ter efeito não só na célula endotelial, mas também em outras células envolvidas no processo inflamatório como, por exemplo, os mastócitos. Nosso grupo demonstrou em trabalho prévio, que a LLLT foi capaz de induzir em lesão de caráter inflamatório crônico, aumento significativo de degranulação de mastócitos *in vivo* (Sawasaki et al., 2007). Outros autores, em estudo *in vitro* com cultura de mastócitos demonstraram aumento do cálcio intracelular nas células irradiadas seguido do aumento da liberação de histamina (Yang et al., 2007). A histamina, sabidamente é capaz de aumentar a permeabilidade vascular, portanto existe a possibilidade de que o mecanismo de influência do laser na permeabilidade vascular tenha uma contribuição indireta.

Os mecanismos de ação da LLLT nos tecidos podem ser divididos em basicamente dois tipos de reações: reações primárias induzidas pela luz e reações secundárias que ocorrem na ausência de luz (Schindl, 2000).

Em relação ao mecanismo de ação, as reações fotoquímicas e fotofísicas primárias relevantes na laserterapia possuem pelo menos quatro modelos diferentes que foram propostos para responder como o laser pode interagir com as células vivas: 1) Olson e colaboradores (1980) sugerem que a absorção da luz pelas enzimas mitocondriais resultam em aquecimento local gerado pelo aumento de vibração molecular. 2) Karu (1988) e Labbe e colaboradores (1990) propõem que os efeitos estimulatórios e inibitórios induzidos pela luz laser é resultado respectivamente da absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em alterações na transferência de elétrons para seus pares reduzidos localizados na mitocôndria. 3) Polo et al. (1999) sugeriram em seu estudo que porfirinas endógenas foto-induzem oxigênios singlete. 4) Smith (1991) modificando o modelo de Karu, propôs que a radiação infravermelha em um caminho adicional pode ativar diretamente os canais de Ca^{+2} da membrana celular através de modificações fotofísicas, portanto induzindo a entrada de Ca^{+2} e proliferação celular. Muito provavelmente, dois ou mais destes modelos podem ocorrer simultaneamente no tecido irradiado contribuindo para os efeitos biológicos observados (Schindl, 2000).

Basicamente, as mitocôndrias têm sido consideradas como o principal sítio dos efeitos iniciais da luz e especificamente a citocromo c oxidase, que tem picos de absorção nas regiões do espectro eletromagnético do vermelho e do infravermelho que são comuns ao espectro de ação dos efeitos da LLLT. A descoberta de que as células empregam o NO sintetizado na mitocôndria para regular a respiração através de ligação competitiva à ligação do oxigênio à citocromo c oxidase, poderia explicar como a LLLT pode afetar o metabolismo celular. Se a LLLT foto dissociasse a

ligação inibitória do NO à citocromo c oxidase, isso explicaria o aumento de produção de ATP e demais efeitos dessa terapia (Demidova-Rice, 2007).

As reações secundárias (sem a presença de luz) sinalizam a transdução e amplificação. As alterações do pH intracelular, relacionadas com a ativação das ATPases e seguidas por alterações nos níveis de cálcio intracelular, parecem ser um caminho comum para a transdução do sinal e amplificação de todas as fotorreações primárias citadas. A mudança do estado redox para oxidação acarreta um aumento intracelular de Ca^{+2} e estimula o metabolismo celular. Altos níveis de Ca^{+2} intracelular por sua vez, estimulam vários processos biológicos, como síntese de RNA e DNA, mitose celular e secreção protéica. Mesmo assim, altos níveis de Ca^{+2} intracelular podem levar à inibição do metabolismo celular (Smith, 1991; Friedman e Lubard, 1996). De fato, tanto a estimulação quanto a inibição da entrada de Ca^{+2} nas células de mamíferos podem ser induzidos por luz vermelha monocromática dependendo da dosagem aplicada (Karu, 1996).

2.8.1 LLLT NA INFLAMAÇÃO DO SNC

A LLLT tem demonstrado biomodular vários processos biológicos (Honmura et al., 1992; Giuliani et al., 2004; Albertini et al., 2004; Lopes - Martins et al., 2005; Ambieri et al., 2006; Meneguzo et al., 2006; Conlan et al., 1996; Street et al., 2004).

Em modelo experimental de coração infartado foi previamente demonstrado que a LLLT tem um efeito cardioprotetor, resultando em 50 a 70% de redução no tamanho do infarto de 4 -6 semanas após a oclusão da artéria coronária descendente. Esse fenômeno foi particularmente atribuído ao aumento de mitocôndrias não lesadas e ATP, bem como a indução de proteínas *heat shock* nos

animais, ratos e cachorros, infartados e irradiados quando comparados com os animais não irradiados (Oron et al., 2001; Yaakobi et al., 2001; Street et al., 2004). A LLLT tem também demonstrado modular os processos biológicos no SNC (Byrnes et al., 2004; Oron et al., 2006 e 2007).

Anders e colaboradores (2004) revisaram os efeitos benéficos da LLLT na recuperação funcional de nervos injuriados. Outros estudos também observaram regulação das citocinas envolvidas na resposta imune após medula espinhal tratada com irradiação laser no comprimento de onda infravermelho (Byrnes et al., 2004). Estudos utilizando a fototerapia para o tratamento de injúrias do SNC foram realizados em modelo experimental de trauma em medula óssea utilizando o comprimento de onda no infravermelho 780 nm (Rochkind et al., 1987; 1988;). Esses estudos mostraram aumento na recuperação de nervos injuriados e diminuição de degeneração de neurônios nos segmentos correspondentes da medula dos ratos (Rochkind et al., 1988,1990). Foi também demonstrado que a aplicação transcraniana de laser no comprimento de onda infravermelho aplicado 6 horas após infarto em coelho (Lapchak et al., 2004) e 24 após infarto isquêmico em ratos (Detaboada et al., 2006) causou melhora significativamente nos escores neuronais dos animais.

Os estudos da LLLT do trauma no SNC, trauma na medula, sugeriram que a fototerapia induz uma cascata de eventos de sinalização que se inicia pela absorção da luz pela citocromo C oxidase e esse sinal aparentemente regula genes, fatores de transcrição, bem como aumento da atividade mitocondrial. No infarto, a redução do volume infartado pode ocorrer por dois caminhos ou a combinação deles, a preservação do tecido existente (neuroproteção) ou a geração de novo tecido (neurogênese) (Streeter et al., 2004)

Os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* suportam esses mecanismos. Os efeitos da fototerapia com comprimento de onda infravermelho no processo de neurogênese é explicado ou pelo aumento do número de células por prevenir a perda de novas células que é resultante da injúria isquêmica. A neuroproteção pode resultar no mínimo de três mecanismos, a estimulação direta do tecido sobrevivente, ou a estimulação indireta do tecido sobrevivente (p.e aumentando atividade de fator de crescimento); e finalmente através da diminuição de fatores tóxicos.

A estimulação direta do tecido pode ocorrer por síntese de ATP. A injúria isquêmica resulta em supressão de ATP na zona isquêmica e a falta de ATP resulta em diminuição da função celular. Em casos extremos a supressão da energia conduz à despolarização celular, influxo de cálcio, e, ativação de processo necrótico e apoptótico.

A isquemia cerebral pode resultar de uma variedade de causas que prejudicam o fluxo sanguíneo cerebral e conduzem à privação de oxigênio e glicose. Esse quadro quando persistente e severo conduz à morte neuronal (Aronowski et al., 1999). As células centrais na área isquêmica são vulneráveis e morrem em minutos (Kaufmann et al., 1999). A região de penumbra ao redor da área isquêmica central tem perfusão reduzida, porém as células ainda estão viáveis (Back et al., 1998; Aronowski et al., 1999). Entretanto, essas células estão sujeitas aos processos patológicos que podem levar ao seu desaparecimento e sobrevivência por um tempo limitado (Del Zoppo et al., 2000; Fuerstein et al., 1998).

A irradiação laser com comprimento de onda no infravermelho próximo (*near infrared*; NIR) tem sido utilizada em estudo em humano. Lampl et al., (2007) observaram que o tratamento com a luz foi seguro e efetivo para os pacientes portadores de infarto isquêmico. Estudo de Oron et al., (2001) mostrou que uma

simples irradiação no tecido cardíaco resultou em aumento de ATP e esse efeito é prolongado depois que a irradiação cessa. O efeito prolongado é em parte associado à preservação da função da mitocôndria. No mesmo experimento, a irradiação NIR, em tecido cardíaco infartado exibiu 50% de redução de dano na mitocôndria (Oron et al., 2001). Após isquemia, o tecido do miocárdio que é imediatamente perdido fica em um estado “perturbado”, e, pode permanecer nesse estado por um período de dias, em particular e a. mitocôndria neste tecido que fica “perturbada”. Apesar de esta mitocôndria parecer intacta, ela apresenta alterações morfológicas que indicam a ausência de atividade metabólica. Assim, mesmo quando o fluxo sanguíneo é restaurado as mitocôndrias não estão aptas a converter oxigênio em glicose para formação de energia utilizável (ATP) (Street et al., 2004).

A liberação do citocromo C pela mitocôndria para o citoplasma é um potente sinal apoptótico. O citocromo C liberado leva à ativação da caspase-3 e ativação do mecanismo de apoptose. As células apoptóticas aparecem poucas horas após o infarto, mas o número dessas células atinge um pico em 24-48 h após a reperfusão (Asahi et al., 1997). Em modelos experimentais em ratos, o citocromo C no citoplasma é detectado em 24 h após a oclusão. *In vitro* LLLT com laser de 810 nm pode prevenir a atividade do citocromo C. A LLLT pode também ser hábil em manter a atividade da citocromo c oxidase *in vivo* pela prevenção da liberação da citocromo C para dentro do citoplasma (Eells et al., 2003). Isso resultaria na prevenção da apoptose.

A estimulação indireta do tecido foi estudada através da angiogênese e dos genes e/ou fatores de sobrevivência celular. Mirsky e colaboradores utilizando o modelo de cultivo de endoteliócitos *in vitro*, estudo demonstrou o efeito angiogênico da LLLT. Estudos experimentais utilizando a fototerapia em modelos animais de

infarto têm sido conduzidos e verificou-se que os fatores de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*; VEGF) foram aumentados no grupo dos animais irradiados. (Zhang et al., 2004)

Além disso, tem sido observado que a fototerapia com laser pode aumentar os genes e/ou fatores de crescimento de células sobreviventes. Os estudos têm descrito que LLLT pode regular certos genes (Byrnes et al., 2004). Esses produtos/genos poderão prevenir ou melhorar a apoptose que ocorre na área de penumbra do infarto ou no miocárdio perturbado. Em modelos de infarto agudo do miocárdio a *heat shock protein 70* (HSP70) e o VEGF estão aumentados. No infarto, moléculas equivalentes neuroprotetoras podem ser aumentadas e resultar na redução do volume do infarto. São vários os fatores que podem implicar na neuroproteção além do VEGF e aumentar a sobrevivência neuronal. Em estudos em modelos de infarto crônico do miocárdio e injúria por isquemia e reperfusão a irradiação laser causou aumento de HSP70 e aumento de vasos formados (Yaakobi et al., 2001).

Diminuição de fatores tóxicos. LLLT com NIR pode reduzir o dano causado pelos radicais livres e pelas citocinas. Os subprodutos do dano causado pelos radicais livres são encontrados em tecido cerebral danificado após infarto. Esse dano é mediado pelos neutrófilos durante a reperfusão. A LLLT com NIR pode induzir a expressão de catalase nos modelos de infarto em animais. A catalase é um potente anti-oxidante, que previne o dano causado por radicais livres. Além disso, pode melhorar a sobrevivência axonal. Na verdade, foi recentemente demonstrado que o laser de argônio causa elevação da atividade de catalase em cardiomiócitos isolados (Zhu et al., 1997).

Vários citocinas e outros fatores são produzidos durante a reperfusão que são deletérias para a função e sobrevivência do tecido. Esses fatores promovem a atividade de células fagocíticas e linfocíticas. A LLLT com NIR pode diminuir os níveis de citocinas nos modelos de injúria neuronal, incluindo a IL-6 e MCP-1 induzidas após injúria da medula e promovem crescimento de neurônios na medula. Tem sido descrito que a regulação de várias citocinas envolvidas na resposta imune após a injúria da medula tratada com 810 nm (Byrnes et al., 2004).

Em revisão realizada por Anders e colaboradores (2004) foi citado o fato do mecanismo pelo qual a LLLT poderia afetar a transcrição de genes ou outra atividade celular ainda ser desconhecido. Várias pesquisas têm sugerido que os componentes da cadeia eletrônica de transporte da mitocôndria são os primeiros aceptadores de fótons (Passarella et al., 1984; Enwemeka, 1988; Yu et al., 1997; Karu, 1989, 1999) e tem sido postulado que 50% da luz infravermelha é absorvida por cromóforos dentro da mitocôndria, como a citocromo c oxidase (Beauvoit et al., 1994). Além disso, também tem sido postulado que a luz reverte o efeito inibitório de toxinas sobre a citocromo c oxidase, restaurando a sua atividade enzimática em níveis controlados (Wong-Riley et al., 2005). Adicionalmente, a luz induz mudanças na permeabilidade ao cálcio (Lubart et al., 1992) e no estado de oxidação celular, potencialmente através da absorção da luz pela nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), (Lubart et al., 2000).

A fototerapia induz alterações que podem potencialmente conduzir a mudanças na atividade celular, e conseqüentemente trazer alterações nos processos de transcrição e translação, proliferação celular e fagocitose. Essas alterações podem ser dose-dependentes (Túner; Hode, 2002), com baixas dosagens 0,001–10

J/cm² estimulam a atividade celular, enquanto em doses maiores que 10 J/cm² inibem a atividade, como no caso do estudo de Byrnes et al. (2004) que utilizou a dosagem de 1,589 J/cm² e que causou inibição.

Em relação à formação de tecido novo. O cérebro tem a habilidade de criar novas células nervosas em certa circunstância. As células neuronais em áreas perivasculares e no hipocampo (Brain, 2003). Após o infarto, algumas células migram para a área do dano e se transformam em neurônios adultos. A LLLT com NIR pode aumentar a sobrevivência de cardiomiócitos implantados em coração enfraquecido (Tuby et al., 2009). O estudo de Byrnes et al. (2005) mostrou que células progenitoras neuronais podem ser induzidas à diferenciação com a estimulação da irradiação de 810 nm sem a presença de fatores de crescimento que são normalmente necessários para a sua diferenciação. Esses dados sugerem que a neurogênese pode ocorrer tendo a LLLT com NIR como sinal estimulador, de forma similar a um fator de crescimento.

3 PROPOSIÇÃO

Geral:

Este estudo teve por finalidade analisar os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade (*low level laser therapy*; LLLT) sobre os processos de inflamação e reparação após a deformação cortical direta induzida por lesão criogênica realizada no sistema nervoso central de ratos.

Específicas:

- Determinar os parâmetros de LLLT capazes de influenciar na dinâmica de produção de citocinas pró (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e antiinflamatória (IL-10) utilizando a técnica do ELISA.
- Analisar o efeito da LLLT na determinação do tamanho das lesões nos primeiros 14 dias pós-lesão através de estudo morfométrico em cortes histológicos.
- Analisar o efeito da LLLT na determinação do infiltrado inflamatório (leucócitos, linfócitos e macrófagos) nas lesões durante a reparação nos primeiros 14 dias pós-lesão através da técnica de imunistoquímica.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

Para estudar os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade (*low level laser therapy*; LLLT) sobre os processos de inflamação e reparação após a deformação cortical direta induzida por lesão criogênica realizada no sistema nervoso central de ratos foram realizados 3 experimentos que serão descritos a seguir.

Nos 3 experimentos a deformação cortical direta induzida por lesão criogênica, bem como a LLLT foram realizadas da mesma forma. Assim sendo a metodologia aqui aplicada será apresentada em 5 tópicos, a saber:

4.1) Modelo experimental

4.2) LLLT

4.3) Experimento 1

4.4) Experimento 2

4.5) Experimento 3

4.1 O modelo experimental

Para estudar a modulação da resposta inflamatória aguda do sistema nervoso central (SNC) pela LLLT foi escolhido um modelo experimental de deformação cortical direta induzida por uma lesão criogênica. Esse modelo experimental, previamente descrito por Penkowa e Moss (1995), produz uma lesão focal uniforme e reprodutível.

4.1.2 Preparo dos animais

Os animais utilizados foram ratos (*Rattus norvegicus*: var. albinus, *Rodentia*, *Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e massa corporal média de $301,4 \pm 14,3$ gramas.

Os animais, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram mantidos no Biotério do Departamento de Clínica Médica da mesma instituição, durante todo o procedimento experimental. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas de polietileno padrão (1 animal por caixa), em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas), temperatura na faixa de 22° a 27°C, umidade de 45 a 65 % e ambiente higienizado, recebendo a ração própria comum e água *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory for animals* (National Research Council, 1996). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação de Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 1112/2006).

4.1.3 Indução da lesão criogênica

Inicialmente para induzir lesão através da criogenia os animais foram pesados e anestesiados com agente anestésico Ketamina (50mg/kg, i.p Ketalar, Cristália®) e Diazepan (5mg/kg, i.p; Valium, Cristália®). Em seguida, foram posicionados em um equipamento estéreo-tácico (Figura 4.1), seguindo-se à tricotomia e à desinfecção da superfície epitelial com álcool iodado (Figura 4.2).

Figura 4.1: Fotografias mostrando o posicionamento do animal em equipamento estereotácico. (A) vista lateral; (B) vista dorsal.

Figura 4.2: Fotografia mostrando a área tricotomizada da cabeça do animal onde será posteriormente feita a incisão cirúrgica para acesso a área a ser lesionada.

Com um bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal no sentido sagital sobre a sutura sagital, de aproximadamente 3,0 cm (Figura 4.3). Uma vez exposto o tecido conjuntivo subcutâneo foi realizada a dissecação romba das partes moles e exposição do osso (Figura 4.4).

Figura 4.3: Fotografia da Incisão longitudinal no sentido sagital

Figura 4.4: Fotografia ilustrando o procedimento da dissecção romba das partes moles e exposição do osso.

Em todos os animais, o local do cérebro onde foi realizada a lesão criogênica foi delimitado através das coordenadas estereotáxicas correspondentes à região motora C17 do SNC, de acordo com o “Atlas de Coordenadas de Paxinos e Watson” (Paxinos; Watson, 1986). Foi realizada a lesão a 2,8 mm a partir do Bregma no sentido ântero-posterior e a 3,6 mm bilateralmente à sutura mediana no sentido disto-ventricular (Figura 4.5).

Figura 4.5: Ilustração da definição da área a ser lesionada. Delimitação das coordenadas da região C17 motora do SNC. (A) Fotografia mostrando o ponto do Bregma; (B) Desenho esquemático mostrando as distâncias entre as coordenadas estereotáxicas; (C) Fotografia mostrando as coordenadas estereotáxicas das regiões C17 motora direita e esquerda.

Após a determinação estereotóxica da área cerebral a ser lesionada, o osso parietal do lado esquerdo foi removido até a exposição da duramáter, com um instrumento cortante rotatório de ponta esférica de 3 mm de diâmetro, acoplado em um equipamento *drimer* (Figura 4.6).

Figura 4.6: Fotografia ilustrando a remoção do osso parietal. (A) Broca acoplada ao *drimer*; (B) Área de osso parietal removida.

Em seguida, com a finalidade específica de realizar a lesão criogênica, um anel de cobre com 3 mm de diâmetro, originalmente fixado ao equipamento estereotáxico, foi resfriado em nitrogênio líquido por 90 segundos. A seguir, esse anel foi posicionado a 1 mm de profundidade, permanecendo em contato com a duramáter por 40 segundos, a uma temperatura correspondente a -80°C (Figura 4.7). A medida de profundidade padronizada em 1 mm foi determinada por método estereotáxico a partir da distância entre o osso parietal (superfície externa) e a duramáter (face externa) do lado direito (contralateral).

Figura 4.7: Fotografias da realização da lesão criogênica. (A) Posicionamento do anel de cobre na região a ser lesada; (B) Lesão criogênica

4.2 Fototerapia com Laser em baixa intensidade - LLLT

Para os grupos da LLLT, foi utilizado um equipamento de laser de diodo semiconductor (TWIN, MMOptics® Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com emissão no comprimento de onda vermelho visível (InGaAlP, 660 nm) com até 40 mW de potência, e no infravermelho (AlGaAs, 780 nm) com até 70 mW de potência. Para todos os grupos, a primeira irradiação foi realizada imediatamente após a realização da lesão criogênica, em contato, em dois pontos da lesão, com emissão contínua em 40 mW de potência (Figura 4.8). O tempo de irradiação por ponto e a densidade de energia foram ajustados no equipamento de acordo com os grupos experimentais. Os parâmetros de irradiação estão descritos na Tabela 4.1.

Figura 4.8: Fotografia ilustrando a LLLT. (A) Irradiação no modo contato; (B) Esquema da irradiação em 2 pontos da lesão.

Tabela 4.1: Parâmetros da LLLT:

Grupos	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Tempo (s)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia p/ ponto (J)	Nº de pontos	Energia total (J)
LV3	40	0,04	3	3	0,12	2	0,24
LV5	40	0,04	5	5	0,20	2	0,40
LIV3	40	0,04	3	3	0,12	2	0,24
LIV5	40	0,04	5	5	0,20	2	0,40

A segunda irradiação foi realizada 3 horas após a primeira. Nos grupos controle, a peça de mão do equipamento laser foi posicionada de maneira semelhante aos grupos da LLLT, porém com o equipamento laser desligado.

Antes e após cada irradiação, a potência do laser foi aferida por um medidor de potência *Laser Check power meter*, (Coherent Molelectron®, Inc., Santa Clara, Califórnia, EUA) (Figura 4.9). Caso necessário, a potência era ajustada no equipamento para os valores desejados apresentados no medidor de potência e não pelo valor apresentado no *display* do equipamento.

Figura 4.9: Fotografia mostrando a aferição da Potência do laser no equipamento *power meter*

Todos os procedimentos com o laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

A seguir, a área lesionada foi recoberta com cera óssea (Figura 4.10) e os planos superficiais foram suturados com fio de nylon monofilamentar de número 3,0.

Figura 4.10: Fotografia da lesão coberta com cera óssea

Os animais ficaram em observação sob uma lâmpada comum de luz vermelha, até a total recuperação da anestesia.

4.3 Experimento 1: Dinâmica das citocinas no cérebro e no sangue

A dinâmica das citocinas próinflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e antiinflamatória (IL-10) foi analisada no cérebro e no sangue de animais submetidos ao modelo de deformação cortical por lesão criogênica seguido ou não por LLLT. Essa análise foi feita em 2 tempos experimentais 6 e 24 h, através do teste ELISA.

4.3.1 Amostra

Para a análise da produção de citocinas da inflamação no tecido e no plasma, após a lesão do SNC, foram utilizados 50 ratos. Os animais foram randomizados e divididos em 5 grupos experimentais (n=10 por grupo) de acordo com o grupo experimental.

4.3.2 Grupo experimental

Controle (C): criolesão sem tratamento com a LLLT

RL3: criolesão e LLLT com laser vermelho, 3 J/cm² por ponto

RL5: criolesão e LLLT com laser vermelho, 5 J/cm² por ponto

IRL3: criolesão e LLLT com laser infravermelho, 3 J/cm² por ponto

IRL5: criolesão e LLLT com laser infravermelho, 5 J/cm² por ponto.

4.3.3 Coleta do material

Os animais foram sacrificados, por excesso de anestésico, no final dos tempos experimentais de 6 e 24 horas seguida da coleta do material. Os cérebros lesados foram dissecados para obtenção de lisato para análise de produção de citocinas através do teste ELISA. O cérebro foi retirado da caixa craniana (Figura 4.11). Em seguida, o cérebro foi dissecado e a região da lesão, com bordo de 1mm, foi removida da região cortical do hemisfério ipsilateral. A amostra de tecido removida foi colocada em tubo de criogenia e imediatamente congelada em nitrogênio líquido (- 70°C). Além disso, para determinar a concentração plasmática das citocinas foram coletados com uma seringa 3 ml de sangue através de punção cardíaca dos animais.

Figura 4.11: Fotografia mostrando o cérebro inteiro do rato onde se observa a lesão criogênica no hemisfério esquerdo.

O sangue foi coletado em tubo tipo Facon de aproximadamente 5 ml. Em seguida foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm, para separar as células do soro, e transferidos para tubo de criogenia para armazenamento.

Todos os tecidos e o plasma foram armazenados a -70°C até o ensaio do ELISA.

4.3.4 Análise ELISA

As amostras de tecido cerebral congelado, aproximadamente 100 mg, foram pulverizados e homogeneizados em 1 ml de solução de RIPA (100mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 % de desoxicolato de sódio, 1 % de NP40, 150 mM de NaCl, 0,1 % de SDS) por 30 min a 4°C. Em seguida o material foi centrifugado a 4000g por 20 minutos.

As proteínas totais das amostras foram detectadas pelo método de Bradford (1976), compreendendo as seguintes etapas. Foi preparado 50µL de uma solução de BSA a 2mg/mL e, a partir dessa solução, procedeu-se as diluições seriadas em água (Milli-Q) para a obtenção das demais concentrações (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL e 0,125mg/mL). Em seguida, foram pipetados 10µL de cada ponto da curva e 10µl de amostra na placa de 96 poços seguido de 200µl de solução de Bradford diluído (11,2ml de água , 2,8ml de Bradford). A leitura foi realizada em leitor de ELISA com absorbância de 595 nm.

O lisato dos cérebros e as amostra de plasma foram descongelados e aplicados aos *kits* do Sistema DuoSet ELISA® (Development System R&D Systems, Mineapolis MN, EUA) específicos para a detecção das seguintes citocinas: TNF-α (DY510), IL-1β (DY501), IL-6 (DY506), IL-10 (DY522). Os anticorpos foram adquiridos em *kits* para o desenvolvimento do teste imunoenzimático (ELISA), e foram seguidas as instruções de diluição, preparo e leituras fornecidas pelo fabricante para cada um dos *kits*. A leitura dos resultados foi feita em espectrofotômetro para leitor das placas de 96 poços.

Placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International) foram adsorvidas com 100 µl de anticorpo de captura, diluído em solução tampão fosfato (PBS- 8g/l de NaCl; 0,2 g/l de KCl; 1,15g/l de Na₂HPO₄; 0,2 g/l de KH₂PO₄ em pH 7,2 a 7,4)) e incubadas por 12 horas em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes (200µl/poço) com solução de lavagem (PBS contendo 0,05 % de Tween 20 Sigma Chemical Co). Os sítios inespecíficos, livres de plástico, foram bloqueados com 100µl de reagente diluente, PBS contendo 1 % de soro albumina bovina, pH 7,2 a 7,4 (BSA- Sigma Chemical Co), por 1 hora em temperatura ambiente. A placa foi lavada por três vezes para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, 50µl das soluções padrões e das amostras foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente. Ao final do período, as placas foram lavadas novamente. Adicionou-se aos poços 50µl do anticorpo de detecção biotinilado e incubados por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e foi acrescentado aos poços, 50µl de streptavidina conjugada com a peroxidase. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. As placas foram novamente lavadas por três vezes, e, adicionou-se em cada poço, 50µl do substrato de peroxidase, tetrametilbenzidina -TMB (1:1 H₂O₂ e tetrametilbenzidina). As placas foram mantidas em temperatura ambiente, cobertas por papel alumínio por 20 minutos. Ao final da incubação, adicionou-se 25 µl de solução de parada (H₂SO₄- 2N) em cada poço, obtendo-se coloração amarela. As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Genious Reader, TECAN Salzburg – Austria) no comprimento de onda de 550 nm, comparando as densidades ópticas das amostras com os padrões.

As quantificações do lisato de tecido cerebral foram normalizadas pela concentração de proteínas na solução. As concentrações de todas as citocinas foram expressas em picograma por miligrama de proteína e em picograma por ml para o plasma. Os resultados representam a média de no mínimo 7 animais por grupo para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e respectivamente.

4.3.4 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em 5 réplicas para todos os tratamentos e os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Todos os dados desta pesquisa foram tratados estatisticamente com auxílio do *software* BioStat 3.0. Quando a distribuição dos dados mostrou-se não aderente à curva de distribuição amostral normal, foi aplicado um teste não paramétrico de Kruskal Wallis complementado pelo teste de Dunn e quando aderente utilizou-se análise de variância *two-way* ANOVA complementada pelo teste de Tukey, considerando-se em ambos tratamentos o nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$).

4.4 Experimento 2: Estudo histológico do processo de reparação das lesões

O estudo histológico serviu para acompanhar a reparação após a lesão seguida ou não de LLLT. Foram realizados cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise morfométrica. As amostras foram obtidas em 6 h, 1, 7 e 14 dias após a última irradiação.

4.4.1 Amostras

A reparação das lesões foi avaliada em cortes histológicos do cérebro dos animais. Para tanto foram utilizados 40 ratos divididos em 2 grupos experimentais (n=20 por grupo).

Em função dos resultados do experimento 1 os parâmetros da LLLT selecionados para os demais experimentos da tese foram aqueles que utilizaram o laser emitido no infravermelho (780 nm) e na densidade de energia de 3 J/ cm² (IRL3).

4.4.2 Grupos Experimentais

Controle (C): criolesão sem tratamento com LLLT

IRL3: criolesão e tratamento com LLLT com laser infravermelho e 3 J/cm²

4.4.3 Coleta das amostras

Os animais foram sacrificados, por *overdose* de anestésico, nos tempos experimentais de 6 h, 1, 7 e 14 dias, seguida da coleta do material. Em cada período experimental foram sacrificados 5 animais por grupo. O cérebro foi retirado da caixa craniana, imerso para fixação em solução de formol a 10 %, por 48 horas em temperatura ambiente. Com uma lâmina de bisturi, os cérebros devidamente identificados, foram cortados no sentido frontal paralelamente à lesão mantendo uma pequena margem de segurança tanto para frontal quanto para caudal. O restante do material foi descartado. O material coletado foi submetido a processamento histológico de rotina no Laboratório LIM 51 (Emergências Clínicas) da FMUSP.

Os fragmentos foram posicionados nos blocos de modo a deixar a lesão no seu longo eixo paralela ao corte da lâmina. Os blocos de parafina obtidos foram utilizados nos experimentos 2 e 3. Foram obtidas secções histológicas da região da lesão localizada na parte parietal esquerda do cérebro. Foram realizados cortes histológicos de 5 μm . Uma em cada 4 secções foram colhidas para estudo. Os cortes histológicos foram corados por H&E.

4.4.4 Morfometria

Inicialmente as imagens dos cortes histológicos do cérebro foram observadas em microscópio de luz (Microscópio Leica, Carl Zeiss). Em seguida, imagens fragmentadas do cérebro foram capturadas utilizando objetiva de aumento 25x, totalizando aproximadamente 40 fotografias por corte histológico. As imagens foram inseridas no *Software* PTGUY (Axionvision 3.0.6 SP4 Carl Zeiss) e organizadas originando para cada corte histológico uma imagem final de um mosaico que contemplava toda a extensão do cérebro (Figura 4.12). Foi selecionado 1 corte histológico, ou seja, 1 mosaico de cérebro, por grupo experimental em cada tempo experimental, totalizando 40 fotografias. Estas imagens foram renomeadas por um pesquisador que as ordenou de forma randomizada. A seguir dois outros pesquisadores (o doutorando e um patologista) receberam de forma cega as imagens e realizaram a análise morfométrica em dois momentos com 1 semana de intervalo (Figura 4.13 -B).

A quantidade de tecido cortical perdida foi apresentada como uma porcentagem da extensão total do cérebro. Utilizando o *software* morfométrico *Image J* (NIH- <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foram mensuradas as áreas da lesão,

localizada na parte parietal nos hemisférios ipsilateral esquerdo, e a área total do cérebro correspondente aos hemisférios ipsi e contralateral

4.4.5 Análise Estatística

A replicabilidade dos resultados da morfometria foi analisada pelo teste Kappa intra-examinador (levando em consideração os resultados da 1ª e 2ª mensurações feitas pelo mesmo examinador) e inter-examinador (comparando os resultados dos 2 examinadores em cada tempo de análise). Para tanto, o ponto de corte das razões entre área lesada/área total foi 2, ou seja, os resultados foram agrupados em duas categorias, uma com razões ≥ 2 e os demais com razões > 2 . O nível de significância adotada foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Figura 4.12 fotomicrografia do mosaico dos cortes histológicos do cérebro (A), Delimitação da área da lesão (B).

4.5 Experimento 3: Estudo do infiltrado de células inflamatórias nas lesões durante o processo de reparação

Para este experimento foram utilizadas secções histológicas do material obtido no experimento 2. Foram estudados qualitativamente os leucócitos, linfócitos T e macrófagos

4.5.1 Análise Imunoistoquímica

Para a realização da análise imunoistoquímica foram obtidas secções histológicas de 5 µm a partir dos blocos de parafina, e, fixadas em lâminas de vidro silanizadas (Sigma, A-3648), desengorduradas e preparadas com adesivo à base de aminopropiltriethoxysilano a 5 % em álcool absoluto.

Os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro pré- aquecido a 60 °C durante 15 minutos, seguido de outro à temperatura ambiente por mais 30 segundos cada. Em seguida, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (etanol absoluto - 3x, seguido de etanol 95 % - 2x e 70 % -1x por 30 segundos cada) e lavados em água corrente e destilada.

No próximo passo as lâminas foram acondicionadas em berço de vidro para manter distância entre elas, de cerca de 4 mm. O bloqueio da peroxidase endógena tecidual será feito através de oito incubações de 5 minutos cada em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (10x). Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS, três banhos de 5 minutos. Foi realizado o procedimento de recuperação

antigênica com solução de citrato 10 mM pH 6.0 em panela a vapor (Steamer- pv): citrato 10 mM pH 6.0 por 40 minutos, resfriado até atingir temperatura ambiente. Esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas em PBS, três banhos de 3 a 5 minutos.

A seguir, os cortes foram incubados com leite desnatado a 2 % em PBS por 30 minutos a 1 hora para bloqueio de biotinas. Após esse bloqueio as lâminas foram incubadas com anticorpo primários monoclonais desenvolvidos em camundongos e diluídos em tampão PBS/albumina 1% (Sigma, A9647), por 16-18 horas a 40° C, em câmara úmida. Para detectar os leucócitos o anticorpo primário utilizado foi o anti CD45RA diluído 1:500 (US Biological Laboratory, EUA) Para os linfócitos T foi utilizado um anti-CD3 diluído 1:100 (anticorpo dos US Biological Laboratory, EUA), e, enquanto que para detectar especificamente os macrófagos foi utilizado um anticorpo contra o CD68 diluído 1:50 (Chemical Internacional INC, Canadá).

Após o período de incubação, os cortes foram lavados suavemente com PBS e removeu-se o excesso de umidade e, a seguir, os espécimes foram incubados com anticorpo secundário anti camundongo desenvolvido em cabra (VECTASTAIN Elite ABC Kit: Goat IgG Vector PK-6105 R&D System) durante 1 hora em temperatura ambiente em câmara úmida.

Depois de aplicados os anticorpos secundários as lâminas foram novamente lavadas em PBS, três banhos de 3 a 5 minutos. A revelação das reações foi feita pela incubação das lâminas no substrato DAB (3, 3'Diaminobenzidina Tetrahydroclorídrico, Sigma, D-5637) 1mg/ml PBS, adicionado a 25 µl de H₂O₂ 3 % /ml. Em seguida foram revelados por 3-10 minutos, controlando

ao microscópio a positividade acastanhada. Os cortes foram lavados em água por 10 minutos.

Os cortes foram contra - corados com solução de hematoxilina de Mayer, por 20 segundos a 1 minuto, lavados em água corrente por 10 minutos, e passados em água destilada. Em seguida foi realizada a desidratação dessas seções histológicas em álcool 70% (1x), 95% (2x), 100% (3x) e xilol (4x) 30 segundos cada.

Então os cortes foram recobertos por lamínulas de vidro, utilizando meio de montagem com Entellan. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de luz. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário na incubação, e os controles positivos foram determinados em função de cada anticorpo seguindo a sugestão do fabricante.

As lâminas de imunohistoquímica para CD45RA, CD3, CD68 e foram analisadas por um sistema de análise de imagens (QUANTIMET 520 - Leica).

A positividade das reações foi captada pela coloração acastanhada, presentes em 3 campos histológicos de cada lâmina. Os dados obtidos serviram para mostrar a frequência relativa da distribuição de células positivas em amostras controle e tratadas.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Modelo experimental

O modelo de deformação cortical direta foi capaz de induzir a formação da lesão. A Figura 5.1 ilustra a lesão criogênica no córtex representada por necrose, edema, hemorragia e infiltrado inflamatório.

Figura 5.1: Mosaico do corte de cérebro exibindo lesão cortical focal.

O diagrama da Figura 5.2 A ilustra o local do trauma criogênico no cérebro dos animais. Histologicamente, o trauma criogênico causou uma lesão focal no córtex cerebral ipsilateral representada por uma região central clara evidente circundada por um tecido eosinofílico homogêneo (Figura 5.2 B). O quadro histológico mostrou edema marcante com vacuolização tecidual no centro da lesão associada à discreta hemorragia e congestão dos vasos sanguíneos corticais (Figura 5.2 C). Polimorfos nucleares neutrófilos estavam presentes no local da lesão criogênica seis horas após a injúria (Figura 5.2 C).

Figura 5.2: Ilustração do local do trauma criogênico. (A) diagrama ilustrando a região do trauma criogênico, (B) secção histológica mostrando a região da lesão criogênica; (C) em detalhes a região central clara evidencia um edema marcante com vacuolização tecidual no centro da lesão associada à discreta hemorragia e congestão dos vasos sanguíneos corticais. Observa-se a presença de polimorfos nucleares neutrófilos.

5.2 Experimento 1: Análise de produção e quantificação de citocinas no tecido cerebral e no sangue

5.2.1 Cérebro

TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram detectadas no cérebro e no sangue de todos os animais. As concentrações médias (pg/ml) de todas as citocinas estudadas no cérebro e no sangue estão apresentadas nas tabelas 5.1

As quantidades de todas as citocinas no cérebro de animais irradiados (grupos RL3, RL5, IRL3 e IRL5) foram similares às aquelas detectadas nos animais controle que foram lesionados e não receberam tratamento após a injúria criogênica. As dinâmicas de produção de citocinas, ou seja, comparações entre resultados obtidos em 6 e 24 horas serão apresentadas a seguir em função dos grupos experimentais.

Grupo controle

No cérebro dos ratos lesionados e não tratados com a fototerapia (grupo controle) todas as citocinas estudadas foram observadas. No período de 6h, a proteínas com a produção mais marcante foi a IL-1 β , que foi significativamente reduzida no período de 24 h ($p=0,004$). O TNF- α foi detectado em pequenas quantidades permanecendo nos mesmos níveis durante todo o tempo experimental. IL-6 e IL-10 também permaneceram com concentrações similares em ambos os tempos experimentais (6 e 24 h; Tabela 5.1).

Grupo RL3

No cérebro de animais lesionados e submetidos à LLLT utilizando o comprimento de onda emitindo no vermelho visível e 3 J/cm^2 (grupo RL3) não foram observadas alterações nas concentrações de todas as citocinas em função do tempo. Diferentemente dos animais do grupo controle, onde a concentração de IL- 1β diminuiu significativamente, nos animais do grupo RL3 a concentração de IL- 1β foi mantida estável (Tabela 5.1).

Grupo RL5

No cérebro de animais lesionados e submetidos à LLLT utilizando o comprimento de onda emitindo no vermelho visível e 5 J/cm^2 (grupo RL5) somente a IL- 1β apresentou diferenças estatisticamente significantes em concentração em função do tempo. Como nos animais do grupo controle, houve diminuição significativa na concentração de IL- 1β em 24 h ($p < 0.05$). As concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 se mantiveram estáveis e nos mesmos níveis dos animais do grupo controle (Tabela 5.1).

Grupo IRL3

No tecido lesionado submetido à LLLT usando o infravermelho e 3 J/cm^2 (grupo IRL3) a concentração de IL- 1β , similarmente àquela dos animais do grupo controle, apresentou diminuição significativa ($p < 0.05$). As concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 se mantiveram estáveis do grupo controle (Tabela 5.1).

Grupo IRL5

Os perfis de citocinas no cérebro lesionado e submetido à LLLT usando o comprimento de onda infravermelho e 5 J/cm^2 (grupo IRL5) foram similares àqueles do grupo RL3. Não ocorreram alterações nas concentrações das proteínas em função do tempo para nenhuma das citocinas testadas. Diferentemente do que foi observado nos animais do grupo controle, onde a concentração de IL-1 β diminuiu significativamente, nos animais do grupo IRL5 a concentração desta citocina se manteve estável (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Conteúdos médios ($\pm$ erro padrão da média) das citocinas analisadas no cérebro dos animais de todos os grupos nos dois tempos experimentais. Em vermelho as concentrações com diferenças significantes. Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro do mesmo grupo nos diferentes tempos experimentais.

Citocinas	Tempo (h)	Controle	RL3	RL5	IRL3	IRL5
TNF- α	6	16,00 $\pm 2,51$	39,49 $\pm 8,65$	48,18 $\pm 13,74$	25,95 $\pm 9,41$	22,57 $\pm 8,96$
	24	17,68 $\pm 3,14$	26,62 $\pm 2,94$	19,82 $\pm 3,41$	26,64 $\pm 3,65$	22,68 $\pm 6,60$
IL-1 β	6	155,19 $\pm 30,65^a$	249,05 $\pm 66,45$	305,83 $\pm 102,89^a$	322,05 $\pm 120,71^a$	118,89 $\pm 20,09$
	24	67,69 $\pm 13,58^b$	131,14 $\pm 22,74$	92,44 $\pm 22,57^b$	104,42 $\pm 19,68^b$	97,64 $\pm 29,17$
IL-6	6	81,32 $\pm 19,03$	108,25 $\pm 4,53$	145,87 $\pm 33,89$	78,08 $\pm 15,11$	64,79 $\pm 9,59$
	24	81,50 $\pm 17,61$	108,65 $\pm 9,61$	93,83 $\pm 8,30$	114,67 $\pm 12,36$	81,65 $\pm 18,08$
IL-10	6	88,44 $\pm 13,31$	114,65 $\pm 19,24$	199,44 $\pm 50,74$	123,92 $\pm 62,04$	53,61 $\pm 11,16$
	24	79,33 $\pm 16,93$	107,84 $\pm 10,85$	99,46 $\pm 21,22$	130,24 $\pm 21,38$	140,92 $\pm 40,32$

5.2.2 Sangue

TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram detectadas no sangue de todos os animais. As concentrações médias (pg/ml) de todas as citocinas estudadas, a saber: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 no sangue estão apresentadas na tabela 5.2.

A única diferença nas quantidades de citocinas entre os grupos controle e os irradiados observada no sangue dos animais foi na citocina IL-6. As concentrações de IL-6 no grupo LR-3 foram significativamente menores que aquelas do grupo controle em ambos os tempos experimentais ($p < 0.05$). O sangue dos animais dos demais grupos irradiados apresentou concentrações de todas as citocinas estudadas similares àsquelas do grupo controle, nos dois tempos experimentais.

As dinâmicas de produção de citocinas, ou seja, comparações entre resultados obtidos em 6 e 24 horas serão apresentadas a seguir em função dos grupos experimentais.

Grupo controle

No sangue dos animais, duas citocinas apresentaram aumento significativo em concentração em 24 h, o TNF- α ($p < 0,01$) e a IL-6 ($p < 0,05$). As concentrações de IL-1 β e IL-10 não apresentaram alterações em função do tempo (Tabela 5.2).

Grupo RL3

No sangue, como observado nos animais do grupo controle, os animais do grupo LR-3 apresentaram aumento significativo na concentração de TNF- α ($p < 0,01$). A IL-6 também se comportou como no grupo controle apresentando um aumento significativo em concentração em 24 h ($p < 0,05$). As concentrações de IL-1 β e IL-10 no sangue de animais do grupo RL3 se mantiveram estáveis e nos mesmos níveis que aquelas do sangue dos animais do grupo controle em ambos os tempos experimentais (Tabela 5.2).

Grupo RL5

TNF- α ($p < 0,01$) e IL-6 ($p < 0,05$) no sangue, como observado nos animais do grupo controle, apresentaram aumentos significantes em concentração em 24h. As concentrações de IL-1 β e IL-10 se mantiveram estáveis e similares àquelas dos animais do grupo controle (Tabela 5.2).

Grupo IRL3

No sangue de animais do grupo LIR-3, diferentemente do que ocorreu nos controles, as concentrações de TNF- α e IL-6 se mantiveram estáveis durante todo o tempo experimental. As concentrações de IL-1 β e IL-10 também se mantiveram estáveis (Tabela 5.2).

Grupo IRL5

No sangue, as dinâmicas das produções de todas as citocinas foram similares àquelas dos animais do grupo controle, com aumento significativo nas concentrações de TNF- α ($p < 0,05$) e IL-6 ($p < 0,01$) e estabilidade nas concentrações de IL-1 β e IL-10 em ambos os tempos experimentais (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Conteúdos médios ($\pm$ erro padrão da média) das citocinas analisadas no sangue dos animais de todos os grupos nos dois tempos experimentais. Em vermelho as concentrações com diferenças significantes. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas dentro do mesmo grupo nos diferentes tempos experimentais. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas em comparação com o grupo controle.

Citocinas	Tempo (h)	Controle	RL3	RL5	IRL3	IRL5
TNF- α	6	9,19 $\pm 1,26^a$	8,50 $\pm 1,23^a$	8,80 $\pm 0,89^a$	11,97 $\pm 1,73$	8,67 $\pm 1,05^a$
	24	17,39 $\pm 1,87^b$	19,53 $\pm 1,10^b$	18,09 $\pm 1,22^b$	18,60 $\pm 2,43$	22,32 $\pm 3,80^b$
IL-1 β	6	84,37 $\pm 19,63$	66,91 $\pm 10,53$	73,59 $\pm 6,24$	89,27 $\pm 9,01$	63,37 $\pm 5,51$
	24	65,72 $\pm 4,81$	65,33 $\pm 4,82$	270,22 $\pm 76,29$	169,19 $\pm 99,72$	64,06 $\pm 3,56$
IL-6	6	109,93 $\pm 6,11^{A,a}$	80,82 $\pm 6,01^{B,a}$	88,07 $\pm 7,39^a$	112,89 $\pm 8,49$	96,26 $\pm 3,38^a$
	24	138,90 $\pm 7,98^{A,b}$	104,30 $\pm 5,51^{B,b}$	112,24 $\pm 6,55^b$	122,68 $\pm 7,88$	121,23 $\pm 5,66^b$
IL-10	6	21,04 $\pm 4,64$	14,71 $\pm 4,45$	14,28 $\pm 1,86$	23,01 $\pm 2,24$	13,89 $\pm 1,34$
	24	14,70 $\pm 0,66$	12,29 $\pm 1,42$	12,02 $\pm 1,60$	29,55 $\pm 12,24$	17,54 $\pm 1,51$

5.3 Experimento 2: Estudo histológico do processo de reparação das lesões

Os resultados do teste Kappa inter e intra-examinador estão apresentados na tabela 5.3. Uma vez que não houve diferenças significantes entre as mensurações inter-examinadores os dados das mensurações das lesões obtidos pelo examinador 1 foram utilizados para o estudo.

Tabela 5.3. Dados do teste Kappa inter e intra – examinador.

	Intra-examinadores		Inter-examinadores	
	Examinador 1	Examinador 2	1ª Medida	2ª Medida
Concordância observada	0,4865	0,5135	0,5135	0,5405
Concordância esperada	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
Kappa	-0,0270	0,0270	0,0270	0,0811
Z (Kappa)	0,2356	0,2328	0,2339	0,7016
(p-valor)	0,4069	0,4079	0,4075	0,2415

A Figura 5.3 ilustra graficamente a área da lesão (% do cérebro) em todos os tempos experimentais dos dois grupos estudados. Fotomicrografias ilustrativas das lesões de ambos os grupos experimentais estão apresentadas na Figura 5.4.

Grupo controle

Em 6 horas após a injúria criogênica, os animais que tiveram os cérebros lesionados e não submetidos à LLLT, usando o comprimento de onda infravermelho e 3 J/cm^2 (grupo IRL3), mostraram uma perda de tecido cortical significativamente maior do que aqueles animais submetidos à LLLT. Em 1, 7 e 14 dias a perda de tecido cortical nos animais foi significativamente menor daquela observada em 6h.

Grupo IRL3

Em 6 horas após a injúria criogênica, os animais que tiveram os cérebros lesionados e submetidos à LLLT, usando o comprimento de onda infravermelho e 3 J/cm^2 (grupo IRL3), mostraram uma perda de tecido cortical significativamente menor do que aqueles animais do grupo controle que não foram submetidos à LLLT. A perda de tecido cortical nos grupos submetidos à LLLT se manteve constante em 24 horas e nos mesmos níveis do grupo controle. Em 14 dias após a lesão a perda de tecido cortical nos animais irradiados foi significativamente menor daquela observada em 6 h e se manteve nos mesmos níveis do grupo dos animais controle.

Figura 5.3 Representação gráfica da área da lesão em relação ao tamanho do cérebro dos grupos controle (lesão:LE) e irradiado (laser: LA) em função dos tempos experimentais. (*) significativamente maior que o grupo irradiado em 6 h.

Figura 5.4 Fotomicrografias ilustrativas da reparação das lesões dos grupos controle (A e B) e irradiado (C e D) nos tempos de 6 h (A e C) e 14 dias (B e D). Os cortes histológicos mostram a lesão do cérebro em destaque em cada foto. Observe que em 6 h a lesão do grupo controle (A) é mais extensa e profunda que a do grupo irradiado (C). Em 14 dias o tamanho das lesões se equilibrou (B e D). As setas indicam a profundidade das lesões.

5.5 Experimento 3: Estudo do infiltrado de células inflamatórias nas lesões durante o processo de reparação

Linfócitos T, leucócitos e macrófagos foram detectados no cérebro de todos os animais durante todo o tempo experimental (Tabela 5.3). Fotomicrografias ilustrativas das reações de imunoistoquímica para o CD3, CD45RA e CD68 (Figuras 5.5; 5.6 e 5.7, respectivamente).

Lesões irradiadas apresentaram a tendência de exibir menor quantidade de linfócitos T CD3+ que as controle durante todo o tempo experimental. Lesões irradiadas apresentaram menor quantidade de células positivas para CD45RA (leucócitos) nas primeiras 24 h do que nas lesões controle. A quantidade de macrófagos CD68+ nas lesões irradiadas e não irradiadas foi similar e se manteve estável durante todo o tempo experimental (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Positividade relativa aos anticorpos utilizados para a detecção de linfócitos (CD3), leucócitos (CD45RA) e macrófagos (CD68) nas lesões controle (C) e irradiadas (IRL3).

Tempo Experimental	CD3		CD45RA		CD68	
	C	IRL3	C	IRL3	C	IRL3
6 horas	++	+	+++	+	++	++
1 dia	++	++	++++	++	++	++
7 dias	+++	++	++	++	++	++
14 dias	+++	++	++	++	++	++

Figura 5.5. Fotomicrografias ilustrativas das reações de imunoistoquímica para o CD3 dos grupos controle (A e B) e irradiado (C e D) nos tempos de 6 h (A e C) e 24 horas (B e D). Observe que em 6 h lesões irradiadas apresentaram a tendência de exibir menor quantidade de linfócitos T que as controle durante todo o tempo experimental. (DAB, Aumento original 200X).

Figura 5.6. Fotomicrografias ilustrativas das reações de imunoistoquímica para o CD45RA dos grupos controle (A e B) e irradiado (C e D) nos tempos de 6 h (A e C) e 24 horas (B e D). Observe que as lesões irradiadas apresentaram menor quantidade de células positivas para CD45RA (leucócitos) nas primeiras 24 h do que nas lesões controle. (DAB, Aumento original 200x).

Figura 5.7. Fotomicrografias ilustrativas das reações de imunoistoquímica para o CD68 dos grupos controle (A e B) e irradiado (C e D) nos tempos de 6 h (A e C) e 24 horas (B e D). Observe que a quantidade de macrófagos nas lesões irradiadas e não irradiadas foi similar e se manteve estável durante todo o tempo experimental. (DAB, Aumento original 200x).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As citocinas são os primeiros mediadores da resposta inflamatória, incluindo a família das interleucinas (IL) tais como IL-1, IL-6, IL-10 e o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) (Simi et al., 2007). Por essa razão, em um primeiro momento decidimos estudar a dinâmica de produção de cada uma destas citocinas durante o período experimental de 24 horas após a realização de injúria criogênica no cérebro (*cryogenic brain injury*; CBI) de ratos. Adicionalmente, analisamos os efeitos de diversos parâmetros da fototerapia com laser em baixa intensidade (*low intensity laser therapy*; LLLT) sobre esta dinâmica, com o objetivo final de verificar se esta terapia teria a capacidade de modular a resposta inflamatória local e sistêmica após a lesão focal nos cérebros dos ratos.

No nosso estudo não foram observados aumentos nos níveis de TNF- α no tecido cerebral durante todo o período experimental, somente no sangue. Entretanto, elevados níveis de TNF- α tem sido identificados no tecido cerebral nos modelos experimentais de trauma em cérebro (*trauma brain injury*; TBI; Taupin et al., 1993; Holmin et al., 1995, Fan et al., 1996; Kita et al., 1997; Knoblach et al., 1999) e no soro e líquido de pacientes que sofreram trauma craniano. Essa diferença de resultados poderia estar associada ao modelo experimental empregado, a CBI. Devido à ausência de extensas lesões difusas, a CBI não causa déficits significantes de longo prazo como ocorre nos modelos de TBI. Corroborando com a hipótese de que o modelo poderia ter influenciado as respostas observadas, outros estudos que empregaram outros modelos experimentais para analisar o efeito da LLLT sobre a expressão do TNF- α também não encontraram modificações nos níveis desta

citocina (Kandolf-Sekulovic et al., 2003; Campana et al., 2003; Shefer et al., 2001), enquanto outros até encontraram redução significativa (Aimbire et al., 2006; Sousa et al., 2007). Outro aspecto que deve ser levado em consideração diz respeito aos tempos experimentais, que poderiam não ter sido suficientes para mostrar possíveis mudanças nas concentrações de TNF- α nesse modelo de trauma em particular. Portanto, podemos dizer que ainda não está esclarecido como a LLLT poderia modular as concentrações de TNF- α .

No sangue onde significantes aumentos de TNF- α foram observados no grupo controle, esse aumento não foi observado no grupo tratado com a irradiação com o laser infravermelho e 3 J/cm² (grupo IRL3). Estes resultados sugerem que a LLLT com estes parâmetros de irradiação laser é hábil em modular a inflamação. De fato, prevenindo o aumento desta citocina pró-inflamatória no sangue durante todo o período experimental, como foi observado, a LLLT estaria exercendo seu efeito antiinflamatório. Esse fato poderia ser indicativo de um possível efeito benéfico da LLLT na resposta inflamatória no cérebro após a CBI. Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, onde foi analisado o efeito da LLLT na atividade secretória de macrófagos ativados, esses mesmos parâmetros da fototerapia levaram a uma diminuição significativa dos níveis de TNF- α quando comparado com o grupo controle não irradiado (Sousa et al., 2009). Por outro lado, Shefer et al. (2001) utilizando parâmetros similares (λ = 904 nm, irradiância de 60 mW/cm² e fluência de 3,6 J/cm²) demonstraram que não houve modificação na concentração de TNF- α em um modelo experimental de reação de hipersensibilidade de contato na pele (Shefer et al., 2001). Desta forma, mais estudos analisando os efeitos da LLLT nas concentrações de TNF- α após CBI são necessários.

A produção de IL-1 β , proteína pró-inflamatória, foi encontrada em níveis aumentados em nossas amostras, especialmente nos animais controles não tratados. De fato, independente do grupo experimental, elevados níveis de IL-1 β foram observados no tecido cerebral. Esses achados foram corroborados pela literatura, onde foi observado que expressão de IL-1 β é rapidamente elevada em várias lesões cerebrais experimentais, incluindo isquemia, trauma, hipóxia, e estímulo neurotóxico ou inflamatório (Taupin et al., 1993; Fan et al., 1996; Wang et al., 1997)).

Os níveis de IL-1 β diminuíram significativamente nas amostras controles no tecido cerebral, onde a lesão criogênica não recebeu tratamento e independentemente do comprimento de onda e da densidade de energia, a fototerapia laser modulou os níveis de IL-1 β . Níveis estáveis de IL-1 β foram observados no tecido cerebral dos grupos RL3 e IRL5 durante todo o tempo experimental. Esse resultado pode estar associado com o aumento do cálcio intracelular, que é um efeito conhecido da fototerapia (Karu et al., 1989). Esse aumento de cálcio intracelular, determinado pela entrada de cálcio na célula, poderia regular a liberação de IL-1. De fato, alguns eventos intracelulares tem sido ligados à IL-1 β , como fluxo de saída de potássio, fluxo de entrada de cálcio e ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfolipase A₂ (PLA₂) (Andrei et al., 2004)

Já no sangue, os níveis de IL-1 foram menos expressivos do que no tecido cerebral. Esses níveis se mantiveram estáveis durante todo o tempo experimental e sem modificações também entre os grupos experimentais. Esses resultados poderiam ser esperados porque a expressão de IL-1 é confinada localmente dentro do tecido injuriado e somente pequenas quantidades de IL-1 são necessárias para

propagar uma resposta inflamatória que determinaria uma evolução clínica (Simi et al., 2007).

Outra observação interessante do CBI foi o aumento significativo dos níveis circulantes de IL-6 em 24 h. Sabe-se que IL-1 é um direcionador da resposta inflamatória em humanos e o aumento dos níveis circulantes de IL-6 e das proteínas da fase aguda, são resultantes da ação da IL-1 (Simi et al., 2007). Desta forma, se IL-1 estiver altamente expressada em cérebro lesado como foi observado, o aumento de IL-6 no sangue seria esperada. Surpreendentemente em 24 h, quando os níveis de IL-1 no cérebro estavam diminuídos, a IL-6 no sangue aumentou. Esse achado poderia ser resultante de uma cascata de eventos, onde uma vez iniciado atuaria por longo tempo. Isso poderia ser verdade, uma vez que nas amostras onde os níveis de IL-1 β foram mantidos estáveis no cérebro, os níveis de IL-6 no sangue também aumentaram em 24 h.

Em relação a IL-6 os protocolos da LLLT que utilizaram baixa densidade de energia (3 J/cm²) foram hábeis em controlar os níveis no sangue. De fato, embora se tenha observado um significativo aumento dos níveis de IL-6 no sangue nas amostras tratadas com RL3, em 24 h, as concentrações de IL-6 foram significativamente menores do que aquelas das amostras controle. Adicionalmente, o aumento de IL-6 no sangue também não foi observado nas amostras tratadas com o protocolo de IRL3.

Os estudos utilizando animais deficientes de IL-6 e animais com super expressão dessa citocina tem demonstrado que a IL-6 tem papel balanceado na manutenção da integridade da BBB e ativação de astrócitos no SNC (Campbell et al., 1993). No modelo de CBI, Swartz et al., 2001, demonstraram claramente o papel de IL-6 em promover a reparação do tecido no cérebro. Esse achado foi similar ao

observado por Penkowa et al. (1999). Por outro lado, a super expressão de IL-6 pode ocasionar marcante neurodegeneração (Campbell et al., 1993). Então, IL-6 pode exercer tanto papel antiinflamatório quanto neuroprotetor no cérebro lesado. Consequentemente, algum desarranjo de IL-6 no cérebro no SNC, ou por sua ausência ou expressão crônica afetaria a resposta ao trauma do SNC. Desta forma, a manutenção dos níveis de IL-6, utilizando a fototerapia laser infravermelho e 3 J/cm², poderia favorecer a resposta do SNC ao trauma.

Os níveis de IL-10 foram mantidos estáveis em todos os grupos experimentais. Essa citocina antiinflamatória com propriedades imunossupressivas exerce os seus efeitos através da inibição de citocinas proinflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (Cassatela et al., 1994; Joyce et al., 1994; Benveniste et al., 1995 Fan et al., 1996) e também pelo aumento da síntese e secreção de seus respectivos antagonistas endógenos (Cassatela et al., 1994; Knobloch et al., 1998).

Os resultados do nosso estudo não demonstraram mudanças nos níveis de IL-10 no tecido e nem no sangue em todos os grupos experimentais. Esse achado poderia ser outra razão pela qual o TNF- α não diminuiu no cérebro. Provavelmente o tempo de observação no modelo experimental de lesão criogênica não foi suficiente para observar mudanças na concentração de IL-10. Estudos, particularmente utilizando o modelo de CBI, com tempos experimentais de longa observação poderiam ser interessantes no intuito de buscar o momento onde poderia ocorrer a elevação da IL-10 e diminuição do TNF- α , e conseqüentemente verificar os possíveis efeitos da fototerapia sobre essas citocinas.

Os nossos achados da dinâmica de expressão de citocinas pro e antiinflamatórias após CBI seguido ou não de LLLT utilizando vários parâmetros mostraram alterações locais e sistêmicas nos níveis das citocinas estudadas.

Porém, estes resultados não foram suficientes para se concluir se estas alterações seriam benéficas ou deletérias à reparação do SNC. Por essa razão se fez necessário continuar o estudo avaliando agora o efeito da LLLT na evolução do processo inflamatório e da reparação pós-CBI, especificamente aqueles relacionados ao tamanho da lesão e grau de infiltração de células inflamatórias.

Dentre os parâmetros da LLLT testados na fase da dinâmica de expressão das citocinas após CBI, os do grupo IRL3 foram os que mostraram os efeitos mais evidentes. Com estes parâmetros a LLLT foi capaz de inibir o aumento de concentração tanto de TNF- α quanto de IL-6 no sangue dos animais. De fato, estes parâmetros em outros sistemas, como já discutido acima, tem se mostrado promissores no sentido de modular a produção de citocinas

No intuito de analisar a reparações das lesões a mensuração do tamanho da lesão poderia revelar algum possível efeito da LLLT na determinação da extensão do dano causado pelo CBI. Para tanto analisamos o tamanho das lesões resultantes do CBI nos animais irradiados com o laser infravermelho e 3 J/cm² (grupo IRL3) ou não irradiados (grupo controle) em cortes histológicos.

Como era esperado houve uma tendência de diminuição do tamanho das lesões independente do grupo experimental observado. No entanto, o resultado mais interessante desta análise foi observado nas primeiras 6 h após a lesão criogênica. Os animais que tiveram os cérebros lesionados e submetidos à LLLT apresentaram lesões significativamente menores do que aquelas observadas nos animais do grupo controle que não foram submetidos à fototerapia. A partir das 24 h pós-lesão esta diferença não foi mais observada, sendo que ambos os grupos passaram a apresentar lesões de tamanhos similares até os 14 dias.

Devemos nos lembrar que a única diferença entre os grupos foi a realização da LLLT imediatamente e 3 h após a realização da lesão criogênica nos animais experimentais. Assim, qualquer diferença observada no tamanho das lesões dos dois grupos deve ser interpretada como efeito dessa terapia. Mas, como explicar que a LLLT foi capaz de coibir o dano à região do córtex limitando a extensão da lesão já nas primeiras 6 h, enquanto os animais não irradiados só conseguiam este resultado 18 h depois. Em tese, esse efeito da LLLT poderia ser explicado em termos de prevenção ou de morte celular, ou de infiltração por células inflamatórias, ou mesmo por um efeito vascular no sentido de compensar a isquemia causada pelo anel congelado no tecido.

De fato, estudando os efeitos da LLLT em modelos animais de infarto agudo do miocárdio, bem como, no tratamento de órgãos isquêmicos, alguns autores demonstraram que a terapia favorecia a sobrevivência celular (Oron e Yaakobi, 2001; PhotoThera Scientific Report, 2003). Da mesma forma que a LLLT foi capaz de influenciar na determinação do dano no modelo de CBI aqui utilizado, Oron et al. (2007) demonstraram redução da área do infarto em diversas espécies animais (camundongo, rato, cachorro e porco). Além disso, esses investigadores demonstraram que houve aumento de fatores antiapoptóticos, da atividade mitocondrial e da formação de ATP em células neuronais humanas em cultura pela ação da LLLT (Oron et al., 2007)

Corroborando com nossos achados, estudo em humanos sugeriram que a LLLT com laser emitindo no infravermelho também poderia ser benéfica no tratamento de infarto agudo isquêmico quando iniciada até 24 h após o infarto (Lampl et al., 2007). Além disso, foi demonstrado em modelo animal de infarto isquêmico utilizando a fototerapia com laser emitindo no infravermelho (810 nm)

significante redução do volume da região infartada e preservação da função neuronal. Esses efeitos foram observados também quando a LLLT foi aplicada 24 h após o infarto (PhotoTheraScientific Report, 2007).

A redução do volume infartado poderia ocorrer ou pela preservação do tecido existente (neuroproteção) ou pela formação de tecido novo (neurogênese). O potencial efeito da irradiação com laser emitido no infravermelho na neurogênese está relacionado com aumento do número de células novas ou a prevenção da perda de novas células resultantes da lesão isquêmica. A neuroproteção poderia ser resultante da estimulação direta ou indireta do tecido sobrevivente e também da diminuição de fatores tóxicos. Neste aspecto, a inibição do aumento da concentração de TNF- α e IL-6 no sangue dos ratos por nós observada nos animais tratados com LLLT (grupo IRL-3) poderia ter sido um dos fatores que favoreceram o controle do dano inicial causado pela *probe* congelada.

A estimulação direta do tecido poderia ser decorrente da produção de ATP. Assim, uma das possíveis explicações para o controle da extensão do dano pela LLLT que foi a prevenção de morte celular encontra respaldo no fato de um possível aumento do ATP na área lesionada, bem como da atividade mitocondrial. De fato, os achados do nosso grupo de pesquisa em LLLT tem sido consistentes no sentido de demonstrar o aumento da atividade mitocondrial em células em resposta à LLLT (Damante et al., 2008; Fujihara et al., 2008)

A limitação da extensão da lesão baseada na manutenção da viabilidade celular em resposta à LLLT também poderia ter sido obtida por outro mecanismo, que seria o da inibição de apoptose. É sabido que a liberação da citocromo c pela mitocôndria é um importante sinal apoptótico. Células apoptóticas aparecerem poucas horas após o infarto (Asahi et al., 1997). No modelo de infarto em ratos,

citocromo c pode ser detectado no citoplasma celular, ou seja, fora da mitocôndria, até 24 h após a lesão. Estudos *in vitro* demonstraram que a LLLT com laser de 810 nm pode prevenir a saída do citocromo c para o citoplasma (Eells et al., 2003). Assim, a LLLT seria capaz de controlar o efeito apoptótico da isquemia. Assim, uma menor escala de morte celular levaria a uma lesão de menores dimensões.

Outra de nossas hipóteses para explicar a lesão menor no grupo irradiado seria a da estimulação da circulação sanguínea local para compensar a isquemia causada pela *probe* congelada. A estimulação indireta do tecido está relacionada com a produção de moléculas neuroprotetoras, incluindo fatores de crescimento que favorecem o restabelecimento do fluxo sanguíneo. Os modelos experimentais de oclusão da artéria cerebral média demonstram que a infusão de fatores de crescimento como o fator de crescimento de endotélio vascular (*vascular endothelium growth factor*; VEGF) resulta em redução da área do infarto. Foi documentado em modelos de infarto agudo do miocárdio, aumento significativo de VEGF com o efeito da LLLT (Oron et al., 2001). Adicionalmente, utilizando o modelo de cultivo de endoteliócitos *in vitro*, estudo demonstrou o efeito angiogênico da LLLT (Mirsky et al., 2002).

Outra hipótese que poderia explicar o controle da extensão do dano ao cérebro nas primeiras 6 horas pós-CBI nos animais irradiados seria baseada na formação de tecido novo (neurogênese). Alguns estudos também têm demonstrado que o cérebro em certas circunstâncias tem a habilidade de regenerar novas células. O NIR poderia ser efetivo em aumentar o número de novas células formadas ou pela prevenção da perda de novas células formadas. Arvidsson et al. (2001) demonstraram que a maioria das células formadas morre dentro de 2 a 5 dias após o infarto. A LLLT com laser no infravermelho pode aumentar a

sobrevivência de células cardíacas implantadas no coração enfraquecido (Tuby et al., 2009). Recentemente Byrnes et al., (2005) demonstraram que a irradiação de 810 nm associada a fatores de crescimento pode estimular a diferenciação de células neuronais progenitoras humanas. Esse fato pode sugerir que a neurogênese poderia ocorrer decorrente da estimulação com a irradiação com o laser no infravermelho.

Finalmente, pela observação de lesão de menores dimensões após CBI nos animais irradiados associado ao controle no aumento de citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL-6) no sangue poderiam ser resultantes de alterações na composição do infiltrado inflamatório das lesões. Para estudar o infiltrado inflamatório de lesões irradiadas e não irradiadas (controles) utilizamos a técnica da imunoistoquímica para estimar a presença de células positivas para o CD-45RA, o CD-3 e o CD-68, marcadores para leucócitos, linfócitos T e macrófagos, respectivamente. Esta análise foi realizada nos mesmos cortes histológicos utilizados para mensurar as lesões. Observamos que as lesões irradiadas apresentaram menor quantidade de células positivas para CD45RA e para o CD-3 nas primeiras 6h do que nas lesões controle. Além disso, houve uma tendência das lesões irradiadas exibirem menor quantidade de linfócitos T que as controle durante todo o tempo experimental. No entanto, a quantidade de macrófagos nas lesões irradiadas e não irradiadas foi similar e se manteve estável durante todo o tempo experimental.

Nas primeiras 24 h de observação as células mais prevalentes nos animais não irradiados foram os leucócitos. Esses resultados vêm de encontro com os observados em outros modelos experimentais onde houve acúmulo de leucócitos, especialmente PMNs, no parênquima cerebral no período inicial pós-trauma (Soares et al., 1995; Carlos et al., 1997, Schoettle et al., 1990). Embora a participação e o

acúmulo de leucócitos não serem uniformes em todos os modelos experimentais de isquemia cerebral (Clark et al., 1994), adicionado ao fato do anticorpo aqui utilizado não ser específico para detecção de PMNs exclusivamente e sim leucócitos de forma geral, podemos inferir que esta população de leucócitos nas primeiras 24 h fosse predominantemente de PMNs, já que estas são as primeiras células a sair do vaso na inflamação aguda. De fato, Means e Aderson (1983) já observaram acúmulos de PMNs em 4 h após injúria da medula espinal. Adicionalmente, nas primeiras 24 h no nosso estudo, os outros leucócitos pesquisados que foram os macrófagos e os linfócitos T apresentaram-se em menor quantidade ou estáveis, respectivamente. Portanto, a população do *pool* de leucócitos CD-45RA+ neste período deveria ser mais representada por PMNs do que por macrófagos e linfócitos que são células da fase crônica da inflamação.

A menor infiltração de leucócitos nas primeiras 6h pós-CBI, por nós observados no grupo irradiado, poderia ter determinado um menor volume de edema o que teria culminado com o volume menor das lesões neste grupo comparado com o grupo não irradiado. Segundo Schouttle et al., 1990, a inibição do acúmulo de PMNs atenuaria o desenvolvimento do edema pós-TBI e a terapêutica clínica que pudesse obter essa inibição seria de importância para os casos de TBI. No entanto, se realmente houve uma inibição do acúmulo de PMNs no nosso estudo, esta teoria mereceria uma maior reflexão, já que em trabalho anterior verificamos que a inibição da formação de edema não ocorreu com a LLLT. Pelo contrário, houve um maior volume de edema nos animais irradiados com o laser no infravermelho e 3,2 J/cm² três dias após o CBI (Meneguzzo et al., 2006). Portanto, novos estudos devem ser realizados no sentido de comprovar o possível

efeito inibitório do acúmulo de PMNs pela LLLT nos modelos de CBI e a relação desta inibição com o controle da extensão da lesão imediatamente após o trauma.

Outra observação interessante, que justificaria os resultados encontrados em relação à diminuição do recrutamento de leucócitos nos grupos irradiados, estaria relacionada ao controle da concentração da IL-6 no sangue pela LLLT. O aumento de IL-6 no sangue observado nos animais controle foi prevenido pela LLLT (grupo IRL-3). No experimento 1 foi observado que os protocolos da fototerapia laser que utilizaram baixa energia (3 J/cm^2) foram hábeis em controlar os níveis de IL-6 no sangue. No sangue de animais do grupo IRL-3, diferentemente do que ocorreu nos grupos controles, as concentrações de IL-6 se mantiveram estáveis durante todo o tempo experimental. Romano et al. (1997) demonstrou que a IL-6 tem um papel na amplificação do acúmulo de leucócitos nas regiões inflamadas. Desta forma, a manutenção dos níveis de IL-6, utilizando a fototerapia laser infravermelho e 3 J/cm^2 , poderia contribuir para a diminuição no recrutamento dos leucócitos.

A LLLT não exerceu efeito na infiltração de macrófagos nas lesões. A positividade ao CD-68 foi uniforme, não soe entre os grupos experimentais, como durante todo o tempo experimental. Esperávamos que houvesse uma quantidade menor de macrófagos no grupo irradiado, uma vez que as lesões deste grupo eram menos extensas inicialmente. O macrófago é um fagócito que entre inúmeras funções é responsável por limpar a área inflamada, portanto onde há menos dano se espera observar menos macrófagos. Por outro lado, sabemos que macrófagos ativados são capazes de produzir diversas citocinas, entre elas o $\text{TNF-}\alpha$. E neste aspecto, também esperávamos encontrar menor atividade destas células no grupo irradiado, já que em trabalho anterior verificamos que a LLLT, em parâmetros semelhantes aos aqui empregados, levaram à diminuição significativa desta citocina

próinflamatória (Sousa et al., 2009). Assim sendo, o estudo da participação dos macrófagos, bem como os efeitos da LLLT sobre estas células precisam ser mais estudados no futuro sempre levando em consideração a complexidade das funções desta célula, em especial no cérebro.

Antes de concluirmos este trabalho temos que lembrar que todas as comparações dos nossos resultados que os observados em outros modelos de trauma devem ser considerados com cautela. Devemos nos lembrar que modelos diferentes podem apresentar particularidades que os diferenciam. Buscamos apresentar os resultados de trabalhos que utilizaram modelos de trauma no cérebro de animais e trabalhos clínicos de pacientes com TBI, porque estes eram os modelos que mais se assemelharam ao modelo de isquemia aqui utilizado no sentido de entender os efeitos da LLLT em trauma cerebral. Mais ainda devemos ter em mente que muitos destes trabalhos, como infelizmente ocorre largamente na literatura da área da LLLT, não apresentaram todos os parâmetros empregados nas irradiações de sua fototerapia, o que muitas vezes dificulta a reprodução das metodologias, bem como a comparação com os resultados de outros trabalhos.

Nas condições experimentais deste estudo pudemos verificar que a LLLT foi capaz de exercer efeitos nos processos de inflamação e reparação após a deformação cortical direta induzida por lesão criogênica realizada no sistema nervoso central de ratos que foram dependentes dos parâmetros de irradiação utilizados. De fato, os parâmetros da LLLT testados só foram capazes de influenciar a dinâmica de produção de citocinas próinflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e nenhum deles influenciou na dinâmica da antiinflamatória (IL-10). No cérebro, tanto o laser emitindo no vermelho visível (0,12 J por ponto) quanto no infravermelho (0,20 J por ponto) mantiveram os níveis de IL-1 β . No sangue somente a irradiação com o laser

emitindo no infravermelho (0,12 J por ponto) foi capaz de inibir o aumento de TNF- α e da IL-6. Adicionalmente, a LLLT quando aplicada com o laser emitindo no infravermelho e energia por ponto de 0,12 J foi capaz de controlar a perda tecidual inicial pós lesão criogênica, bem como inibir a infiltração inicial de leucócitos e linfócitos T, mas não influenciou a infiltração por macrófagos. Como discutido até aqui ainda está por ser provado se estes efeitos poderiam ser considerados benéficos ou deletérios à recuperação das lesões no SNC. A duplicidade de efeitos na inflamação e no reparo das citocinas estudadas em função do momento destes processos onde a expressão das mesmas foi analisado dificulta sobremaneira a tomada de posição entre considerar a LLLT benéfica ou deletéria. No entanto, levando em consideração o tamanho inicial das lesões de ratos irradiados, bem como a menor infiltração de células inflamatórias no início do processo de reparo destas lesões nos faz pender para uma ação benéfica da LLLT como tratamento coadjuvante para este tipo de lesão. Os resultados obtido em investigações *in vitro*, aliados aos achados de outros grupos de pesquisa que estudam a LLLT em modelos de TBI, nos levam a crer na possibilidade de, no futuro, indicar a LLLT no tratamento de pacientes traumatizados. No entanto, ainda há muito que se estudar no sentido não só de determinar se a LLLT seria indicada para este tipo de tratamento, mas também na definição dos parâmetros mais adequados para cada situação clínica e determinação do momento mais apropriado para introduzir esta terapia após o trauma. De qualquer maneira, este que é um dos primeiros estudos *in vivo* dos efeitos da LLLT no modelo de lesão criogênica no cérebro já trouxe alguns achados que podem servir de ponto de partida para outros estudos que certamente serão realizados em futuro próximo sempre visando o bem estar e a pronta recuperação dos pacientes com traumatismo craniano.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

Levando em consideração as condições experimentais deste estudo concluiu-se que a fototerapia com laser em baixa intensidade (*Low Level Laser Therapy* – LLLT) exerce efeitos nos processos de inflamação e reparação após a deformação cortical direta induzida por lesão criogênica realizada no sistema nervoso central de ratos como se segue:

- Os parâmetros da LLLT testados só foram capazes de influenciar a dinâmica de produção de citocinas próinflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e nenhum deles influenciou na dinâmica da antiinflamatória (IL-10). No cérebro tanto o laser emitindo no vermelho visível (0,12 J por ponto) quanto no infravermelho (0,20 J por ponto) mantiveram os níveis de IL-1 β . No sangue somente a irradiação com o laser emitindo no infravermelho (0,12 J por ponto) foi capaz de inibir o aumento de TNF- α e de IL-6.
- A LLLT quando aplicada com o laser emitindo no infravermelho e energia por ponto de 0,12 J foi capaz de controlar a perda tecidual inicial pós- lesão criogênica.
- A LLLT quando aplicada com o laser emitindo no infravermelho e energia por ponto de 0,12 J foi capaz de inibir a infiltração inicial de leucócitos e linfócitos T, porém não influenciou a infiltração por macrófagos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aihara S, Murakami N, Tomita T, Naruse T, Namba K. Inhibitory action of indomethacin on neutrophil infiltration in monosodium urate-induced pleurisy in rats. *Jpn. J Pharmacol.* 1995;68(3):271-7.

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* 24 (2006) 33-37.

Akassoglou K, Douni E, Bauer J, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(2):709-14.

Albertini R, Aimbre FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zângaro 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.* 2004; 27;74 (2-3):101-7.

Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358 (1438):1669-77.

Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia.* 2001;36 (2):165-79.

Anders JJ, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy promotes regeneration and functional recovery of injured peripheral nerve. *Neurol Res.* 2004;26 (2):233-9.

Andrei C., Margiocco P., Poggi A., Lotti L.V., Torrisi M.R., Rubartelli A.. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 9745-9750.

Anthony D, Dempster R, Fearn S, Clements J, Wells G, Perry VH, Walker K. CXC chemokines generate age-related increases in neutrophil-mediated brain inflammation and blood-brain barrier breakdown. *Curr Biol.* 1998; 8 (16):923-6

Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci.* 2001; 4 (11):1116-22.

Aronowski J, Cho KH, Strong R, Grotta JC. Neurofilament proteolysis after focal ischemia; when do cells die after experimental stroke? *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19 (6):652-60.

Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall ON. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci.* 2001; 14(1):10-8.

Asahi M, Hoshimaru M, Uemura Y, Tokime T, Kojima M, Ohtsuka T, Matsuura N, Aoki T, Shibahara K, Kikuchi H. Expression of interleukin-1 beta converting enzyme

gene family and bcl-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17(1):11-8.

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci* 2006;21(2):86-9.

Azzimondi G, Bassein L, Nonino F, Fiorani L, Vignatelli L, Re G, D'Alessandro R. Fever in acute stroke worsens prognosis. A prospective study. *Stroke* 1995;26(11):2040-3.

Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (20):9328-32.

Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 2004; 15; 78 (2):151-6. Review

Basu A, Lazovic J, Krady JK, Mauger DT, Rothstein RP, Smith MB, Levison SW. Interleukin-1 and the interleukin-1 type 1 receptor are essential for the progressive neurodegeneration that ensues subsequent to a mild hypoxic/ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25 (1):17-29.

Beauvoit B, Kitai T, Chance B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: A theoretical and practical approach. *Biophys J* 1994;67 (6):2501–2510.

Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD, Clark RS, Whalen MJ, DeKosky ST. Comparison of the interleukin-6 and interleukin-10 response in children after severe traumatic brain injury or septic shock. *Acta Neurochir Suppl.* 1997;70:96-7.

Benveniste EN, Tang LP, Law RM. Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6 and IL-10. *Int J Dev Neurosci.* 1995;13(3-4):341-9.

Bernardes-Silva M, Anthony DC, Issekutz AC, Perry VH. Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of E- and P-selectins. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(9):1115-24.

Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loores K, Green J, Dietrich WD Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999;16 (10):851-63.

Blamire AM, Anthony DC, Rajagopalan B, Sibson NR, Perry VH, Styles P. Interleukin-1beta -induced changes in blood-brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient, and cerebral blood volume in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neurosci.* 2000;20 (21):8153-9.

- Bonmann E, Suschek C, Spranger M, Kolb-Bachofen V. The dominant role of exogenous or endogenous interleukin-1 beta on expression and activity of inducible nitric oxide synthase in rat microvascular brain endothelial cells. *Neurosci Lett*. 1997;230 (2):109-12.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7; 72:248-54.
- Brain, G.F 2003. Repair yourself. *Sci. Ami*. 2003; 47-53.
- Brett FM, Mizisin AP, Powell HC, Campbell IL. Evolution of neuropathologic abnormalities associated with blood-brain barrier breakdown in transgenic mice expressing interleukin-6 in astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54 (6):766-75.
- Brewer KL, Bethea JR, Yeziarski RP. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Exp Neurol*. 1999;159 (2):484-93.
- Buttini M, Appel K, Sauter A, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience*. 1996;71(1):1-16.
- Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, Heckert R, Gerst H, Anders JJ. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers Surg Med*. 2005;36 (3):171-85.
- Campana V., Moya M., Gavotto A., Simes J.C., Spitale L., Soriano F., Palma J.A.. He-Ne laser on microcrystalline arthropathies. *J. Clin. Laser Med. Surg* 21 (2003) 99-103.
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Nov 1;90 (21):10061-5.
- Carlos TM, Clark RS, Franicola-Higgins D, Schiding JK, Kochanek PM. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol*. 1997 Mar;61(3):279-85.
- Carvey PM, Chen EY, Lipton JW, Tong CW, Chang QA, Ling. Intra-parenchymal injection of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-beta produces dopamine neuron loss in the rat. *J Neural Transm*. 2005 May;112(5):601-12. Epub 2004 Dec 7.
- Cassatella ZD M.A., Meda L., Gasperini S., Calzetti F., Bonora S.. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J. Exp. Med* 179 (1994) 1695-1699.
- Cernak I, Vink R, Zapple DN, Cruz MI, Ahmed F, Chang T, Fricke ST, Faden AI. The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis*. 2004;17 (1):29-43.
- Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx*. 2 (2005) 410-422

- Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23(2):137-49. Review
- Ching S, He L, Lai W, Quan N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 2005;19(2):127-37
- Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma.* 1994 Oct;11(5):499-506.
- Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol.* 1996;23 (5):492-6.
- Correa F, Lopes Martins RA, Correa JC, Iversen VV, Joenson J, Bjordal JM. Low-level laser therapy (GaAs $\lambda = 904$ nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. *Photomed Laser Surg* 2007;25 (4):245-9.
- Csuka E., M.C. Morganti-Kossmann, P.M. Lenzlinger, H. Joller, O. Trentz, T. Kossmann. IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and blood-brain barrier function. *J. Neuroimmunol* 101 (1999) 211-221.
- Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Laser Med Sci*, 2008; 24 (6) 885-91.
- Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jan;19(1):87-98.
- del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 2000;10(1):95-112. Review
- Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med.* 2007 Oct;39(9):706-15.
- Denny-Brown, D.: Cerebral concussion. *Physiol Rev* 1945; 25: 296-325. Langlois, J.A., Ruthlan-Brown, W., Wald, M.M.: The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 2006;21: 375-378.
- Detaboada L, Ilic S, Leichter-Martha S, Oron U, Oron A, Streeter J. Transcranial application of low-energy laser irradiation improves neurological deficits in rats following acute stroke. *Lasers Surg Med.* 2006 Jan;38(1):70-3.
- DeTaboada, M. Chopp. Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke* 37 (2006) 2620-2624

- Dixon CE, Lighthall JW, Anderson TE. Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1988;5 (2):91-104.
- Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*. 1999 Nov;28(2):114-27.
- Du Y, Dreyfus CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res*. 2002;68(6):647-54. Review
- Dziewulska D, Mossakowski MJ. Cellular expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors in human ischemic stroke. *Clin Neuropathol*. 2003;22(1):35-40.
- Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 2007;39(4):365-72.
- Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, Wong-Riley MT, Buchmann EV, Kane M, Whelan NT, Whelan HT. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18;100(6):3439-44. Epub 2003 Mar 7.
- Engelhardt B. Regulation of immune cell entry into the central nervous system. *Results Probl Cell Differ*. 2006;43:259-80. Review
- Enwemeka CS. Laser biostimulation of healing wounds: Specific effects and mechanisms of action. *J Orthop Sports Phys Ther* 1988;9:333-338.
- Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1998;28(7):2178-87.
- Fan L., Young P.R., Barone F.C., Feuerstein G.Z., Smith D.H., McIntosh T.K.. Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the CNS. *Brain Res. Mol. Brain Res* 36 (1996) 287-291.
- Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T, Ciliberto G. IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrogliosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci*. 1995;1;7(12):2441-9.
- Feuerstein G, Wang X, Barone FC. Cytokines in brain ischemia--the role of TNF alpha. *Cell Mol Neurobiol*. 1998;18(6):695-701.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation*. 1998;5(3-4):143-59 Review.
- Fiers W. Precursor structures and structure-function analysis of TNF and lymphotoxin. *Immunol Ser*. 1992;56:79-92 Review.
- Fleminger S, Ponsford J. Long term outcome after traumatic brain injury. *BMJ*. 2005 Dec 17;331(7530):1419-20. Comment in: *BMJ*. 2006 14;332 (7533):118

- Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*. 2002;22(7):RC216 Epub 2002.
- Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol*. 1987 Sep;17(9):1271-8.
- Friedman H, Lubard R. Photostimulation by light-induced cytosolic calcium oscillations. *Laser Ther* 1996;8:137-142.
- Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006;38(4):332-6.
- Gadient RA, Otten U. Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res*. 1994; 21;637(1-2):10-4.
- Gadient RA, Otten U. Differential expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat hypothalamus. *Neurosci Lett*. 1993; 16;153 (1):13-16.
- Gadient RA, Otten U. Identification of interleukin-6 (IL-6)-expressing neurons in the cerebellum and hippocampus of normal adult rats. *Neurosci Lett*. 1994; 5;182 (2):243-6.
- Gadient RA, Otten UH. Interleukin-6 (IL-6) a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol*. 1997;52(5):379-90 Review.
- Gennarelli TA. Mechanisms of brain injury *J Emerg Med*. 1993;11 Suppl 1:5-11. Review.
- Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res*. 1998;23(3):329-40 Review.
- Gijbels K, Van Damme J, Proost P, Put W, Carton H, Billiau A. Interleukin 6 production in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1990;20(1):233-5.
- Giuliani A, Fernandez M, Farinelli M, Baratto L, Capra R, Rovetta G, Monteforte P, Giardino L, Calzà L. Very low level laser therapy attenuates edema and pain in experimental models. *Int J Tissue React*. 2004;26(1-2):29-37.
- Goodman JC, Robertson CS, Grossman RG, Narayan RK. Elevation of tumor necrosis factor in head injury. *J Neuroimmunol*. 1990;30(2-3):213-7.
- Grassi F, Mileo AM, Monaco L, Punturieri A, Santoni A, Eusebi F. TNF-alpha increases the frequency of spontaneous miniature synaptic currents in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res*. 1994;659(1-2):226-30

- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem*. 1995; 270(23):13757-65
- Hagiwara S, Iwasaka H, Okuda K, Noguchi T. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Lasers Surg Med*. 2007;39(10):797-802
- Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N, Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neuroscience*. 1991;40(2):445-52.
- Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C, Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci Lett*. 1989; 9;104(3):340-4.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature*. 1990; 25;343(6256):336-40.
- Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 4;94(5):2007-12.
- Holliday J, Parsons K, Curry J, Lee SY, Gruol DL. Cerebellar granule neurons develop elevated calcium responses when treated with interleukin-6 in culture. *Brain Res*. 1995; 27;673(1):141-8.
- Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1beta and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J Neurosurg*. 2000;92(1):108-20.
- Holmin S, Mathiesen T. Biphasic edema development after experimental brain contusion in rat. *Neurosci Lett*. 1995 14;194(1-2):97-100.
- Holmin S, Schalling M, Höjeberg B, Nordqvist AC, Skeftruna AK, Mathiesen T. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *J Neurosurg*. 1997;86(3):493-504.
- Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med*. 1992;12(4):441-9.
- Hori T, Shibata M, Nakashima T, Yamasaki M, Asami A, Asami T, Koga H. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol Cell Biol*. 1988;8(8):3546-9.
- James, H.E., Schneider, S.: Cryogenic brain oedema: loss of cerebrovascular autoregulation as a cause of intracranial hypertension. Implications for treatment. *Acta Neurochir (Wien) [Suppl]* 1990; 51: 79-81.

John GR, Lee SC, Song X, Rivieccio M, Brosnan CF. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia*. 2005;15;49(2):161-76. Review.

Joyce D.A., D.P. Gibbons, P. Green, J.H. Steer, M. Feldmann, F.M. Brennan. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur. J. Immunol* 24 (1994) 2699-2705.

Kandolf-Sekulovic L., Kataranovski M., Pavlovic M.D.. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed* 19 (2003) 203-201.

Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J. Photochem. Photobiol* 3 (1989) 638-640.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999;49(1):1-17.

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. *Lasers Surg Med*. 1996;18(2):171-7

Karu TI. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Laser Life Sci* 1988; 2:53-74.

Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungries CA, Yonas H. Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke*. 1999;30(5):1150-3.

Kelley KW, Johnson RW, Dantzer R. Immunology discovers physiology. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994 Oct;43(1-3):157-65 Review.

Kita T., Liu L., Tanaka N., Kinoshita Y. The expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat brain after fluid percussive injury. *Int. J. Legal Med* 110 (1997) 305-311.

Klatzo, I., Piraux, A., Laskowski, E.J.: The relationship between edema, blood brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1958; 17: 548-564.

Klein MA, Möller JC, Jones LL, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Raivich G. Impaired neuroglial activation in interleukin-6 deficient mice. *Glia*. 1997;19(3):227-33

Knoblauch S.M., Faden A.I.. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp. Neurol* 153 (1998) 143-151.

Knoblauch S.M., Fan L., Faden A.I.. Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J. Neuroimmunol* 95 (1999) 115-125.

Konsman J.P., Drukarch B., Van Dam A.M.. (Peri) vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin. Sci (Lond)* 112 (2007) 1-25.

- Konsman JP, Vigues S, Mackerlova L, Bristow A, Blomqvist A. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*. 2004; 19;472(1):113-29.
- Kossmann T, Hans VH, Imhof HG, Stocker R, Grob P, Trentz O, Morganti-Kossmann C. Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock*. 1995 ;4(5):311-7.
- Kreisler M, Christoffers AB, Willerstaen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003;30:353–358.
- Laakso EL, Cabot PJ. Nociceptive scores and endorphin-containing cells reduced by low-level laser therapy (LLLT) in inflamed paws of Wistar rat. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(1):32-5.
- 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; 10:201-207.
- Lampl Y, Zivin JA, Fisher M, Lew R, Welin L, Dahlof B, Borenstein P, Andersson B, Perez J, Caparo C, Ilic S, Oron U. Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1). *Stroke*. 2007 Jun;38 (6):1843-9. Epub 2007 Apr 26
- Lapchak PA, Wei J, Zivin JA. Transcranial infrared laser therapy improves clinical rating scores after embolic strokes in rabbits. *Stroke*. *Lasers Surg Med*. 1996;18(2):171-7 2004 Aug;35(8):1985-8. Epub 2004 May 20.
- Lavine SD, Hofman FM, Zlokovic BV. Circulating antibody against tumor necrosis factor-alpha protects rat brain from reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18 (1):52-8.
- Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *Eur J Neurosci*. 1998;10 (3):1188-95.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990;39 (1):151-70.
- Leker RR, Shohami E, Constantini S. Experimental models of head trauma. *Acta Neurochir Suppl*. 2002;83:49-54 Review.
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2001;24 (1-3):169-81 Review.

- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994 Jul;25(7):1481-8.
- Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell NJ. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;234 (1):211-5.
- Lopes-Martins RA, Albertini R, Martins PS, Bjordal JM, Faria Neto HC. 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.
- Loscher CE, Mills KH, Lynch MA. Interleukin-1 receptor antagonist exerts agonist activity in the hippocampus independent of the interleukin-1 type I receptor. *J Neuroimmunol*. 2003;137(1-2):117-24.
- Lubart R, Breitbart H. Biostimulative effects of low energy lasers and their implications for medicine. *Drug Development Res* 2000;50:471–475.
- Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1992 28;12(3):305-10
- Maeda Y, Matsumoto M, Hori O, Kuwabara K, Ogawa S, Yan SD, Ohtsuki T, Kinoshita T, Kamada T, Stern DM. Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin 6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med*. 1994;1;180(6):2297-308
- Maher CO, Anderson RE, Martin HS, McClelland RL, Meyer FB. *J Neurosurg*. 2003 Nov;99(5):907-12. Links Interleukin-1 β and adverse effects on cerebral blood flow during long-term global hypoperfusion.
- Marmarou A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir Suppl*. 2003;86:7-10. Review
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK. Interleukin-1 β promotes repair of the CNS. *J Neurosci*. 2001;15;21(18):7046-52.
- Matsuda S, Wen TC, Morita F, Otsuka H, Igase K, Yoshimura H, Sakanaka. Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neurosci Lett*. 1996 2;204(1-2):109-12
- Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S. Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res*. 1995 15;42(3):357-70.
- McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury: 1998. *J Neurotrauma*. 1998;15 (10):731-69. Review.

- McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*. 1989;28(1):233-44
- McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, et al. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J*. 1991;10(10):2821-32
- Means ED, Anderson DK. Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1983;42 (6):707-19
- Meistrell ME 3rd, Botchkina GI, Wang H, Di Santo E, Cockcroft KM, Bloom O, Vishnubhakat JM, Ghezzi P, Tracey KJ. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock*. 1997;8(5):341-8.
- Meneguzzo D.T., C.Y. Okada, M.K. Koike, B.A. Silva Jr, M.S. Moreira, C.P. Eduardo, M.M. Marques. Effect of low intensity laser therapy in an experimental model of cranioencephalic trauma in rats. *Proc. SPIE 6428 (2007) 64280G* (available at the website <http://www.scopus.com>).
- 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;22(6):537-9.
- Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, Longhi L, Laurer H, Maegele M, Neugebauer E, Graham DI, Stocchetti N, McIntosh TK. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap. *Neuroscience*. 2005;136 (4):971-89. Epub 2005 Review.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8(2):101-5. Review
- Muñoz-Fernández MA, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998;56 (3):307-40. Review
- Nataf S, Davoust N, Ames RS, Barnum SR. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol*. 1999;162 (7):4018-23
- Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF- α . *J Neurochem*. 2007;102 (3):900-12. Epub 2007 Jun 11
- Nomura K, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibition of interleukin-1 β production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2001;16:218-223.
- Norris JG, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor- α . *J Immunol*. 1994 Jan 15;152(2):841-50.

- Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res* 1980; 204:436-440.
- Oron A, Oron U, Chen J, Eilam A, Zhang C, Sadeh M, Lampl Y, Streeter J, DeTaboada L, Chopp M. Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits. *Stroke*. 2006;37(10):2620-4. Epub 2006 Aug 31.
- Oron U, Ilic S, De Taboada L, Streeter J. Ga-As (808 nm) laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(3):180-2.
- Oron U. Ad N Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2001;80 (2-3):109-16.
- Paxinos G., Watson C.. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA 1986: plate 31.
- Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S. Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1 β protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia*. 1999; 15;25(4):311-23.
- Penkowa M, Moos T, Carrasco J, Hadberg H, Molinero A, Bluethmann H, Hidalgo J. Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*. 1999; 15;25(4):343-57.
- Pereira AN, Eduardo C de P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31 (4):263-7.
- Perry VH, Bolton SJ, Anthony DC, Betmouni S. The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. *Res Immunol*. 1998;149 (7-8):721-5. Review
- Photothera Scientific Report, 2003.
- Pinteaux E, Parker LC, Rothwell NJ, Luheshi GN. Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *J Neurochem*. 2002;83 (4):754-63.
- Polo L, Presti F, Schindl A, Schindl L, Bertoloni G, Jori G. Role of ground and excited singlet state oxygen in the red light induced stimulation of *Escherichia coli* cell growth. *Biochem Biophys Res Com* 1999; 257:753-58.
- Povlishock JT, Katz DI. Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*. 2005;20(1):76-94. Review
- Prieto R, Gutiérrez-González R, Pascual JM, Roda JM, Cerdán S, Matias-Guiu J, Barcia JA. Experimental models of traumatic brain injury] *Neurocirugia (Astur)*. 2009 Jun;20(3):225-44.

Qiu Z, Parsons KL, Gruol DL. Interleukin-6 selectively enhances the intracellular calcium response to NMDA in developing CNS neurons. *J Neurosci*. 1995 Oct;15(10):6688-99.

Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ Jr, Scheld WM. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest*. 1991;87(4):1360-6.

Quintana, A. Molinero, R. Borup, F.C. Nielsen, I.L. Campbell, M. Penkowa, J. Hidalgo. Effect of astrocyte-targeted production of IL-6 on traumatic brain injury and its impact on the cortical transcriptome. *Dev. Neurobiol* 68 (2008) 195-208S.

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999;30(1):77-105. Review

Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull*. 1992;29(2):243-6.

Reulen, H.J., Tsuyumu, M., Tack, A., Fenske, A.R. Prioleau, G.R.: Clearance of edema fluid into cerebrospinal fluid. A mechanism for resolution of vasogenic edema. *J Neurosurg* 1978; 48: 754-764.

Ringheim GE, Burgher KL, Heroux JA. Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain. *J Neuroimmunol*. 1995 Dec 31;63 (2):113-23.

Rochkind S, Barrnea L, Razon N, Bartal A, Schwartz M. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery*. 1987 Jun;20 (6):843-7.

Rochkind S, Nissan M, Lubart R, Avram J, Bartal A. The in-vivo-nerve response to direct low-energy-laser irradiation. *Acta Neurochir (Wien)*. 1988;94 (1-2):74-7.

Rochkind S, Vogler I, Barr-Nea L. Spinal cord response to laser treatment of injured peripheral nerve. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1990 Jan;15(1):6-10.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997;6(3):315-25.

Romano MF, Lamberti A, Petrella A, Bisogni R, Tassone PF, Formisano S, Venuta SIL-10 inhibits nuclear factor-kappa B/Rel nuclear activity in CD3-stimulated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol*. 1996 Mar 15;156(6):2119-23.

Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*. 2000 Dec;23(12):618-25. Review

- Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile AS. Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett*. 1996;206(2-3):149-52.
- Saper CB, Breder CD. Endogenous pyrogens in the CNS: role in the febrile response. *Prog Brain Res*. 1992;93:419-28; discussion 428-9. Review
- Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. *Mol Cell Biol*. 1988 Aug;8(8):3546-9. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6.
- Sawasaki I, Geraldo-Martins VR, Ribeiro MS, Marques MM. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. *Lasers Med Sci* 2007.
- Sawasaki I, Geraldo-Martins VR, Ribeiro MS, Marques MM. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. *Lasers Med Sci*. 2009;24(1):113-6. Epub 2007 Dec 15.
- Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, Marino MW, McIntosh TK. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96 (15):8721-6.
- Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med*. 2000;48 (5):312-26. Review
- Schöbitz B, de Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci*. 1993 Nov 1;5(11):1426-35.
- Schoettle RJ, Kochanek PM, Magargee MJ, Uhl MW, Nemoto EM. Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats. *J Neurotrauma*. 1990 Winter;7(4):207-17.
- Schoettle RJ, Kochanek PM, Magargee MJ, Uhl MW, Nemoto EM. Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats. *J Neurotrauma*. 1990;7(4):207-17.
- Selmaj KW, Farooq M, Norton WT, Raine CS, Brosnan CF. Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990; 1;144(1):129-35.
- Shefer G., Oron U., Irintchev A., Wernig A., Halevy O.. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J. Cell Physiol* 187 (2001) 73-80.
- Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res*. 1995;74 (7):1382-8.

- Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexamethasone (DEX) is a novel TNF- α inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol*. 1997 Feb;72(2):169-77. Review
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor α in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1999;10(2):119-30. Review
- Shohami E, Novikov M, Bass R, Yamin A, Gallily R. Closed head injury triggers early production of TNF α and IL-6 by brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14(4):615-9.
- Shrikant P, Chung IY, Ballesteros ME, Benveniste EM. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interferon- γ in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1994;51(2):209-20.
- Simi, N. Tsakiri, P. Wang, N.J. Rothwell. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem. Soc. Trans* 35 (2007) 1122-1126.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, et al. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(13):6155-9.
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science*. 1988 29;241(4865):585-9.
- Smith C.J., Emsley H.C., Gavin C.M., Georgiou R.F., Vail A., Barberan E.M., del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M., Rothwell N.J., Hopkins S.J., Tyrrell P.J.. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC. Neurol* 4 (2004) 2
- Smith KC. The photobiological basis of low level laser irradiation therapy. *Laser Ther* 1991;3:19-24.
- Soares HD, Hicks RR, Smith D, McIntosh TK. Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci*. 1995;15(12):8223-33.
- Soares Mirsky N., Krispel Y., Shoshany Y., Maltz L., Oron U.. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid. Redox Signal* 4 (2002) 785-790.
- Sousa L.R., Cavalcanti B.N., Marques M.M.. Effect of Laser Phototherapy on the Release of TNF- α and MMP-1 by Endodontic Sealer-Stimulated Macrophages. *Photomed. Laser Surg* 2009; 27 (1): 37-42.
- Sprang SR. The divergent receptors for TNF. *Trends Biochem Sci*. 1990 Oct;15(10):366-8. Review.

- Spriggs DR, Sherman ML, Frei E 3rd, Kufe DW. Clinical studies with tumour necrosis factor. *Ciba Found Symp.* 1987;131:206-27.
- Srinivasan D, Yen JH, Joseph DJ, Friedman W. J. Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *Neurosci.* 2004; 21;24 (29):6482-8.
- Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2 (2):140-53. Review
- Stahel P.F., Morganti-Kossmann M.C., Kossmann T.. The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res. Rev* 27 (1998) 243-256.
- Stahel P.F., Shohami E., Younis F.M., Kariya K., Otto V.I., Lenzlinger P.M., Grosjean M.B., Eugster H.P., Trentz O., Kossmann T., Morganti-Kossmann M.C.. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb. Blood Flow Metab* 20 (2000) 369-380.
- Steffensen SC, Campbell IL, Henriksen SJ. Site-specific hippocampal pathophysiology due to cerebral overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Brain Res.* 1994; 25;652 (1):149-53.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 2002;513:87-113.
- Stoll G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol.* 1999;58(3):233-47. Review
- Streeter J., De Taboada L., Oron U.. Mechanisms of action of light therapy for stroke and acute myocardial infarction. *Mitochondrion* 4 (2004) 569-576.
- Streit WJ. Glia. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. 2002;40(2):133-9. Review
- Swartz K.R., Liu F., Sewell D., Schochet T., Campbell I., Sandor M., Fabry Z.. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res* 896 (2001) 86-95.
- Szelényi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001;54 (4):329-38. Review
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei E. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2006 Mar;148(3):255-68; discussion 268. Review
- Takao T., Culp S.G., De Souza E.B. Reciprocal modulation of interleukin-1 beta (IL-1 beta) and IL-1 receptors by lipopolysaccharide (endotoxin) treatment in the mouse brain-endocrine-immune axis. *Endocrinology* 132 (1993) 1497-1504.

Taupin V, Gogusev J, Descamps-Latscha B, Zavala F. Modulation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetrapeptide: evidence for a role of prostaglandins. *Mol Pharmacol*. 1993;43 (1):64-9.

Taupin V., Toulmond S., Serrano A., Benavides J., Zavala F.. Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J. Neuroimmunol* 42 (1993) 177-185.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*. 1992;356 (6372):768-74.

Tood, M.M., Weeks, J.B, Warner, D.S.: A focal cryogenic brain lesion does not reduce the minimum alveolar concentration for halothane in rats. *Anesthesiology* 1993; 79:139-143.

Toulmond S, Vige X, Fage D, Benavides J. infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons. *Neurosci Lett*. 1992; 14;144(1-2):49-52.

Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *J Neuroimmunol*. 1999;100 (1-2):203-15. Review

Touzani O, Boutin H, LeFeuvre R, Parker L, Miller A, Luheshi G, Rothwell N. Interleukin-1 influences ischemic brain damage in the mouse independently of the interleukin-1 type I receptor. *J Neurosci*. 2002 Jan 1;22 (1):38-43.

Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, Tsuchiya H, Teshima S, Nakanishi H, Kwon AH, Azuma Y, Nagaoka T, Ogawa T, Kamiyama Y. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228 (6):724-9.

Trembovler V, Beit-Yannai E, Younis F, Gallily R, Horowitz M, Shohami E. Antioxidants attenuate acute toxicity of tumor necrosis factor- α induced by brain injury in rat. *J Interferon Cytokine Res*. 1999;19 (7):791-5.

Tuby H, Maltz L, Oron U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. *Photomed Laser Surg*. 2009 Apr;27 (2):227-33.

Tuner J, Hode L Laser therapy: Clinical practice and scientific background. Tallinn, Estonia: Prima Books AB; 2002.

Vela JM, Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Almazán G, Guaza C. Interleukin-1 regulates proliferation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2002;20 (3):489-502.

- Villasante A, Pacheco A, Pau E, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Soluble vascular endothelial-cadherin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 2008;23 (3):662-7.
- Vitkovic L, Maeda S, Sternberg E. Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9(6):295-312
- Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M. Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci*. 2003; 24;23(25):8692-700.
- Wang X., Barone F.C., Aiyar N.V., Feuerstein G.Z.. Stroke Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats. 28 (1997) 155-161.
- Wesselingh SL, Gough NM, Finlay-Jones JJ, McDonald PJ. Detection of cytokine mRNA in astrocyte cultures using the polymerase chain reaction. *Lymphokine Res*. 1990 Summer;9 (2):177-85.
- Wesselingh SL, Levine B, Fox RJ, Choi S, Griffin DE. Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. *J Immunol*. 1994 1;152(3):1289-97.
- Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 11;280 (6):4761-71. Epub 2004 Nov 22
- Woodroffe M.N., Sarna G.S., Wadhwa M., Hayes G.M, Loughlin A.J, Tinker A., Cuzner M.L. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J. Neuroimmunol* 33 (1991) 227-236.
- Yaakobi T, Shoshany Y, Levkovitz S, Rubin O, Ben Haim SA, Oron U. Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion injury in the rat heart. *J Appl Physiol*. 2001 J;90 (6):2411-9.
- Yamada M, Hatanaka H. Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain Res*. 1994; 18;643 (1-2):173-80.
- Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*. 1995;26(4):676-80; discussion 681.
- Yan H.Q., Banos M.A., Herregodts P., Hooghe R., Hooghe-Peters E.L. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur. J. Immunol* 22 (1992) 2963-2967.
- Yang WZ, Chen JY, Yu JT, Zhou LW. Effects of low power laser irradiation on intracellular calcium and histamine release in RBL-2H3 mast cells. *Photochem Photobiol* 2007;83 (4):979-84.

- Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanza fame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol* 1997;66 (6):866–871.
- Zhang WG, Wu CY, Pan WX, Tian L, Xia JL. Low-power Helium-Neon laser irradiation enhances the expression of VEGF in murine myocardium. *Chin Med J (Engl)* 2004;117 (10):1476-80.
- Zhu Q, Yu W, Yang X, Hicks GL, Lanza fame RJ, Wang T. Photo-irradiation improved functional preservation of the isolated rat heart. *Lasers Surg Med.* 1997;20 (3):332-9.
- Zhuang J, Shackford SR, Schmoker JD, Anderson ML. The association of leukocytes with secondary brain injury. *J Trauma.* 1993;35 (3):415-22.

APÊNDICE

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat

Maria Stella Moreira^{a,b}, Irineu Tadeu Velasco^a, Leila Soares Ferreira^b, Suely Kunimi Kubo Ariga^a, Denise Frediani Barbeiro^a, Daiane Thais Meneguzzo^b, Fatima Abatepaulo^a, Márcia Martins Marques^{b,*}

^aLIM-51, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^bFaculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2009

Received in revised form 24 July 2009

Accepted 3 September 2009

Available online xxxx

Keywords:

IL-1 β

IL-6

IL-10

TNF- α

Low power laser

Cryogenic brain injury

ABSTRACT

Brain injury is responsible for significant morbidity and mortality in trauma patients, but controversy still exists over therapeutic management for these patients. The objective of this study was to analyze the effect of phototherapy with low intensity lasers on local and systemic immunomodulation following cryogenic brain injury. Laser phototherapy was applied (or not-controls) immediately after cryogenic brain injury performed in 51 adult male Wistar rats. The animals were irradiated twice (3 h interval), with continuous diode laser (gallium–aluminum–arsenide (GaAlAs), 780 nm, or indium–gallium–aluminum–phosphide (InGaAlP), 660 nm) in two points and contact mode, 40 mW, spot size 0.042 cm², 3 J/cm² and 5 J/cm² (3 s and 5 s, respectively). The experimental groups were: Control (non-irradiated), RL3 (visible red laser/ 3 J/cm²), RL5 (visible red laser/5 J/cm²), IRL3 (infrared laser/3 J/cm²), IRL5 (infrared laser/ 5 J/cm²). The production of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was analyzed by enzyme immunoassay technique (ELISA) test in brain and blood samples. The IL-1 β concentration in brain of the control group was significantly reduced in 24 h ($p < 0.01$). This reduction was also observed in the RL5 and IRL3 groups. The TNF- α and IL-6 concentrations increased significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) in the blood of all groups, except by the IRL3 group. The IL-6 levels in RL3 group were significantly smaller than in control group in both experimental times. IL-10 concentration was maintained stable in all groups in brain and blood. Under the conditions of this study, it is possible to conclude that the laser phototherapy can affect TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the brain and in circulation in the first 24 h following cryogenic brain injury.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Injury to the central nervous system (CNS) leads to a well-regulated inflammatory response, which is important for tissue regeneration [1–3]. This inflammatory response involves activation of microglia, brain macrophages, and astrocytes; processes likely mediated by the release of inflammatory cytokines. Numerous cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) are induced rapidly after acute CNS insults [4,5]. They are expressed in a temporal and spatial pattern consistent with their involvement in subsequent neuronal death.

IL-1 β and TNF- α are known pro-inflammatory cytokines which have been detected in brain tissue of experimentally brain-injured rats [6,7] and in the cerebrospinal fluid of patients with severe

brain injuries [8,9]. IL-10, on the other hand, has been found to inhibit expression of IL-1 β and TNF- α and therefore has anti-inflammatory effect [10,11]. IL-6 and TNF- α can either enhance or inhibit neuronal injury, probably depending on the time course and extent of expression. These mediators play a vital role not only propagating the neuroinflammatory response, but also serving as useful indicators of its presence [12].

Phototherapy with low intensity laser has shown favorable results on the inflammatory response modulation [13–17]. The laser phototherapy modulates various biological processes by increasing mitochondrial respiration and ATP synthesis, facilitating wound healing and promoting the angiogenesis process in injured ischemic organs [18–20]. The laser phototherapy has been presented as a new modality with beneficial effects in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury [21 and reviewed in 22]. Moreover, it was demonstrated that the transcranial laser phototherapy applied after embolic stroke in rats [23] caused significant improvements of neurological scores. More recently, studies have demonstrated that laser phototherapy in brain traumatized by a weight-drop device caused a significant long-term functional

* Corresponding author. Address: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, Departamento de Dentística, Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 30917839.

E-mail address: mmmarques@usp.br (M.M. Marques).

neurological benefit to mice [24]. On the other hand, laser phototherapy in brain after cryogenic injury caused an increase in the cerebral vascular permeability [25] which could be deleterious for the brain regeneration. Then, although the laser phototherapy emerges as an alternative or auxiliary therapy for traumatic injuries on peripheral as well as central nervous system tissues, its effects are still controversial. Thus, the objective of this study was to analyze the effect of phototherapy with low intensity lasers after cryogenic brain injury on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines (e.g. TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10).

2. Material and methods

2.1. Sampling

Fifty-one adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighting an average of 250–350 g were used. All animals were kept under constant temperature and with free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the School of Medicine, University of São Paulo.

2.2. Cryolesion and phototherapy with low intensity laser procedures

The brain cryogenic trauma was carried out as previously described [26] with modifications. Fig. 1 illustrates the brain cryogenic trauma and laser phototherapy experimental procedures. Briefly, the animals were injured under anesthesia with a mixture of Ketamine (0.15 mg/kg, i.p.) and Diazepam (5 mg/kg, i.p.). The anesthetized animals were fixed on the stereotaxic frame (Fig. 1). The injury site coordinates corresponded to the C17-motor region according to Paxinos and Watson [27]. The skull above the left frontoparietal cortex was exposed (Fig. 1A and B) and a focal cryo-injury on the surface of the brain was produced with liquid nitrogen at -80°C . The cryogenic injury was done in standardized conditions, as follows: a cylindrical copper probe (7.06 mm diameter) was immersed into liquid nitrogen for 90 s and then applied on the top of the duramater during 40 s (Fig. 1C and D).

The laser phototherapy was applied on two points at the injured site immediately after lesion according to the experimental groups. The laser irradiation was done in contact. For controlling the aseptic conditions prior to the irradiations the laser handpiece was cleaned with 70% alcohol solution and was coated with a physical barrier (thin translucent plastic film) (Fig. 1E). Non-irradiated lesions were used as controls. After irradiation, the injured sites (irradiated and non-irradiated) were coated with bony wax (Fig. 1F) and the skin incisions were sutured. The animals were kept at 20°C and then returned to their cages. Three hours later, under gentle restriction, without anesthesia, the animals received a second irradiation. This irradiation was done in contact to the rat skin immediately over the lesion site. The rationale to perform two irradiations resides on the efficacy improvement of the phototherapy with low intensity laser when applied in a fractioned approach [28]. Control animals were submitted to the same environmental conditions of irradiated animals; however, the laser equipment was kept off.

Laser irradiation was delivered with semiconductor diode laser equipment (MM Optics Ltda, São Carlos, SP, Brazil) using the parameters described at Table 1. The LaserCheck power meter (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) was used to verify the output power of the laser equipment.

The rats were sacrificed at two time points: 6 and 24 h post-lesion. Immediately after sacrifice samples of blood were collected from the heart of the animals by using a syringe. The blood was centrifuged (300g for 5 min at 4°C), and then the supernatant was collected. The ipsilateral brain cortex containing the injured

site (Fig. 1G) was dissected and both, blood supernatant and brain tissue were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later cytokines production analyses using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

For illustrative purposes the brain of one rat was fixed in 10% formalin for obtaining light microscopic images of the injured site.

2.3. Experimental groups

After brain cryogenic trauma the animals were randomly divided into five groups ($n = 10$ animals per group):

- Control: no laser irradiation.
- RL3: 660 nm laser irradiation, 3 J/cm² per point.
- RL5: 660 nm laser irradiation, 5 J/cm² per point.
- IRL3: 780 nm laser irradiation, 3 J/cm² per point.
- IRL5: 780 nm laser irradiation, 5 J/cm² per point.

2.4. Elisa

The rat injured brain tissue was assayed twice using a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. The Human IL1- β (DY501), TNF- α (DY510), IL-6 (DY506) and IL-10 (DY522) ELISA kits (DuoSet from R&D System, Minneapolis, USA) were used following the manufacturer's instructions. The absorbance was read in a micro plate reader (Genious Reader, TECAN Salzburg – Austria) using a 450 nm filter.

2.5. Data analysis and statistics

The experiments were done in five replicates for all treatments. The concentrations of all cytokines in pg/ml are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The data were compared by two-way ANOVA complemented by the Tukey's test or using the Kruskal–Wallis complemented by the Dunn's test. The level of significance was 5% ($p \leq 0.05$).

3. Results

The diagram of Fig. 2A illustrates the brain cryogenic trauma site. Histologically, the cryogenic trauma caused a focal lesion at the ipsilateral brain cortex represented by an apparent pale core region surrounded by a homogeneous eosinophilic stained tissue (Fig. 2B). There was a marked edema with tissue vacuolization at the core lesion associated to minor bleeding and congestion of cortical blood vessels (Fig. 2C). Neutrophil polymorph nuclear leukocytes were present at the site of the cryogenic lesion 6 h after injury (Fig. 2C).

TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 were detected in the brain and in the blood of all animals. The mean concentrations (pg/ml) of all cytokines studied (e.g. TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10) in the brain and in the blood are presented in Tables 2 and 3, respectively.

The amounts of all cytokines in the brain samples of irradiated groups (RL2, RL5, IRL3 and IRL5) were similar to those detected in the rat cryo-injured brain with no further treatment (control group). The only difference in cytokines amounts between control and irradiated groups was observed in the blood. The concentrations of IL-6 in the RL3 group were significantly smaller than those of control samples at both experimental times ($p < 0.05$). The blood of the remaining irradiated groups presented concentrations of all cytokines similar to those of control samples.

The dynamics of the cytokines production (comparisons between the results of 6 and 24 h) are described below in function of the experimental groups.

Fig. 1. Photographs for illustrating the cryogenic brain injury and laser phototherapy procedures. (A) exposition of the cortex, (B) exposed cortex, (C) the cryogenic injury using a freezing cylindrical copper probe, (D) cryolesion, (E) laser irradiation (observe the plastic film coating the laser handpiece), (F) injured site coated with bony wax and (G) brain exhibiting the cryolesion (arrow).

3.1. Control group

In the rat cryo-injured brain with no further treatment (control group) all cytokines studied were observed. The IL-1 β was significantly reduced in 24 h ($p = 0.004$). The TNF- α remained in the same levels during whole experimental time. IL-6 and IL-10 also remained with similar concentrations in both experimental times (e.g. 6 h and 24 h; Table 2).

In the blood, two cytokines presented significant increase in concentration in 24 h, the TNF- α ($p < 0.01$) and IL-6 ($p < 0.05$). The concentrations of IL-1 β and IL-10 presented no changes in function of time (Table 3).

3.2. RL3 group

In the cryo-injured brain tissue submitted to the laser phototherapy using visible red laser and 3 J/cm² (RL3 group) there were no changes in the concentrations of all cytokines in function of time. Differently from the control samples, where IL-1 β decreased significantly, in the RL3 samples the concentration of IL-1 β was maintained stable (Table 2).

In the blood, as observed in the control samples, RL3 group presented a significant increase in TNF- α concentration ($p < 0.01$). IL-6 also behaved as in control samples presenting a significant increase in concentration during the experimental time ($p < 0.05$). IL-1 β and

Table 1

Laser irradiation parameters.

Irradiated groups	RL3	RL5	IRL3	IRL5
Wavelengths	660 nm	660 nm	780 nm	780 nm
Mode	Continuous	Continuous	Continuous	Continuous
Output power (mW)	40	40	40	40
Beam spot (cm ²)	0.04	0.04	0.04	0.04
Irradiation time (s)	3	5	3	5
Number of irradiations/3 h interval	2	2	2	2
Energy density (J/cm ²)	3	5	3	5
Energy per point (J)	0.12	0.20	0.12	0.20
Number of points	2	2	2	2
Total energy (J)	0.24	0.40	0.24	0.40

IL-10 concentrations in the RL3 group blood samples were maintained stable and in the same levels of control samples in both experimental times (Table 3).

3.3. RL5 group

In the cryo-injured brain tissue submitted to the laser phototherapy using visible red laser and 5 J/cm² (RL5 group) only the IL-1 β presented significant differences in concentration in function of time. As the control group, there was a significant decrease in IL-1 β concentration in 24 h ($p < 0.05$). TNF- α , IL-6 and IL-10 concentrations were stable and in the same levels of controls (Table 2).

TNF- α ($p < 0.01$) and IL-6 ($p < 0.05$) in the blood, as observed in the control samples, presented significant increase in concentration in 24 h. IL-1 β and IL-10 concentrations were stable and similar to those of control samples (Table 3).

3.4. IRL3 group

In the cryo-injured brain tissue submitted to the laser phototherapy using infrared laser and 3 J/cm² (IRL3 group) the IL-1 β concentration, as observed in the control samples, presented a significant decrease ($p < 0.05$). TNF- α , IL-6 and IL-10 concentrations were stable as occurred with the control samples (Table 2).

In the blood of the animals of IRL3 group, differently from the controls, the concentrations of TNF- α and IL-6 were maintained stable during whole experimental time. This concentration stabilization was also observed for IL-1 β and IL-10 (Table 3).

3.5. IRL5 group

The cytokines profiles of the cryo-injured brain tissue submitted to the laser phototherapy using infrared laser and 5 J/cm² (IRL5 group) were similar to those of RL3 group. There were no changes in protein concentrations in function of time for any of the tested cytokines. Differently from the control samples, where IL-1 β decreased significantly, in the IRL5 samples this cytokine concentration was maintained stable (Table 2).

In the blood the dynamics of the concentrations of all cytokines were similar to those of the control samples with significant increase in the TNF- α ($p < 0.05$) and IL-6 ($p < 0.01$) concentrations and stable IL-1 β and IL-10 concentrations at both experimental times (Table 3).

4. Discussion

Animal models of traumatic brain injury (TBI) are used to elucidate primary and secondary sequelae underlying human head injury in an effort to identify potential neuroprotective therapies

Fig. 2. Illustration of the cryogenic brain injury site. (A) diagram illustrating the cryogenic brain injury site, (B) histological section showing the cryolesion in the brain cortex, (C) in detail the core lesion exhibiting marked edema associated to minor bleeding and congestion of cortical blood vessels. Neutrophil polymorph nuclear leukocytes are observed.

for developing and adult brain (reviewed in [29]). According to Cernak [29] TBI is caused by mechanical forces. Although the cryogenic brain injury (CBI) model used in this study has a physical cause, it generates a dynamic cortical deformation with corresponding metabolic effects. So, this model is helpful for evaluating quality control of treatments aimed to reduce focal lesions, such as the laser phototherapy. Moreover, both traumatic mechanisms (TBI and CBI) may be complicated by secondary injury including inflammation.

Neuroinflammation induces rapid expression of key inflammatory mediators – cytokines, chemokines and prostaglandins – which in turn up-regulate adhesion molecules, increase permeability of the blood brain barrier (BBB), facilitating invasion of peripheral immune cells, induce release of potentially toxic molecules and

Table 2 Mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of the concentrations (pg/ml) of all cytokines studied in the brain samples of all experimental groups.

Cytokines	Time (h)	Control	RL3	RL5	IRL3	IRL5
TNF- α	6	16.00 $\pm$ 2.51	39.49 $\pm$ 8.65	48.18 $\pm$ 13.74	25.95 $\pm$ 9.41	22.57 $\pm$ 8.96
	24	17.68 $\pm$ 3.14	26.62 $\pm$ 2.94	19.82 $\pm$ 3.41	26.64 $\pm$ 3.65	22.68 $\pm$ 6.60
IL-1 β	6	155.19 $\pm$ 30.65^a	249.05 $\pm$ 66.45	305.83 $\pm$ 102.89^a	322.05 $\pm$ 120.71^a	118.89 $\pm$ 20.09
	24	67.69 $\pm$ 13.58^b	131.14 $\pm$ 22.74	92.44 $\pm$ 22.57^b	104.42 $\pm$ 19.68^b	97.64 $\pm$ 29.17
IL-6	6	81.32 $\pm$ 19.03	108.25 $\pm$ 4.53	145.87 $\pm$ 33.89	78.08 $\pm$ 15.11	64.79 $\pm$ 9.59
	24	81.50 $\pm$ 17.61	108.65 $\pm$ 9.61	93.83 $\pm$ 8.30	114.67 $\pm$ 12.36	81.65 $\pm$ 18.08
IL-10	6	88.44 $\pm$ 13.31	114.65 $\pm$ 19.24	199.44 $\pm$ 50.74	123.92 $\pm$ 62.04	53.61 $\pm$ 11.16
	24	79.33 $\pm$ 16.93	107.84 $\pm$ 10.85	99.46 $\pm$ 21.22	130.24 $\pm$ 21.38	140.92 $\pm$ 40.32

*Different small caps indicate differences in the same group at different experimental times.

Table 3 Mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of the concentration (pg/ml) of all cytokines in the blood samples of all experimental groups.

Cytokines	Time (h)	Control	RL3	RL5	IRL3	IRL5
TNF- α	6	9.19 $\pm$ 1.26^a	8.50 $\pm$ 1.23^a	8.80 $\pm$ 0.89^a	11.97 $\pm$ 1.73	8.67 $\pm$ 1.05^a
	24	17.39 $\pm$ 1.87^b	19.53 $\pm$ 1.10^b	18.09 $\pm$ 1.22^b	18.60 $\pm$ 2.43	22.32 $\pm$ 3.80^b
IL-1 β	6	84.37 $\pm$ 19.63	66.91 $\pm$ 10.53	73.59 $\pm$ 6.24	89.27 $\pm$ 9.01	63.37 $\pm$ 5.51
	24	65.72 $\pm$ 4.81	65.33 $\pm$ 4.82	270.22 $\pm$ 76.29	169.19 $\pm$ 99.72	64.06 $\pm$ 3.56
IL-6	6	109.93 $\pm$ 6.11^{A,a}	80.82 $\pm$ 6.01^{B,a}	88.07 $\pm$ 7.39^a	112.89 $\pm$ 8.49	96.26 $\pm$ 3.38^a
	24	138.90 $\pm$ 7.98^{A,b}	104.30 $\pm$ 5.51^{B,b}	112.24 $\pm$ 6.55^b	122.68 $\pm$ 7.88	121.23 $\pm$ 5.66^b
IL-10	6	21.04 $\pm$ 4.64	14.71 $\pm$ 4.45	14.28 $\pm$ 1.86	23.01 $\pm$ 2.24	13.89 $\pm$ 1.34
	24	14.70 $\pm$ 0.66	12.29 $\pm$ 1.42	12.02 $\pm$ 1.60	29.55 $\pm$ 12.24	17.54 $\pm$ 1.51

*Different capital letters indicate significant differences between groups at the same experimental time. *Different small caps indicate differences in the same group at different experimental times.

compromise brain cells [30]. Cytokines are primary mediators of the inflammatory response, which contributes to acute neuronal loss [4,5]. It is known that IL-1, IL-6, TNF- α and IL-10 are inflammation mediators [30]. In this study, after CBI, different production dynamics of such cytokines during the time course of 24 h post lesion were observed. Using laser phototherapy, it was possible to observe local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat.

Sriram and O'Callaghan [31] stated that TNF- α appears to be a central mediator of neuroinflammation and brain injury. This pro-inflammatory cytokine presents neurotoxic, as well as, neuro-protective roles in the brain injury process. Moreover, its toxic effects are mediated by several mechanisms. High levels of TNF- α have been reported in serum and cerebral serum fluid (CSF) of patients with head injury. In experimental models of TBI, such as the fluid percussion injury [6,32–34] and weight drop contusion injury [35] elevated levels of several cytokines including TNF- α were found. Similarly, in experimental closed head injury, activation of the complement component and increase of expression of TNF- α have been reported [36,37]. Increases of TNF- α levels in the brain in the time course of our study were not observed. This could be due to the model of trauma employed, the CBI. CBI does not cause significant long-term deficits because of the absence of extensive diffuse injuries. Other explanation would be related to the experimental times that could be not appropriate for observing changes in TNF- α concentration in the brain in this particular trauma model.

Whether laser phototherapy can modulate TNF- α concentrations is still unclear. In fact, some studies in models other than brain trauma found no changes in TNF- α levels in function of laser phototherapy [38,39], whereas others found significant reductions [40–42]. No effects of the phototherapy with low intensity lasers were observed in the brain. However, in the blood, where significant increases in the TNF- α concentration were observed in the control group, this increase was not observed in the group treated

with infrared laser irradiation and 3 J/cm² (IRL3 group). So, the phototherapy with these parameters of laser irradiation was at least able to prevent the TNF- α increase in the blood during the time course. This could be indicative of a putative effect of such laser phototherapy, which would be of importance for modulating the brain inflammation. In a previous study of our research group, where the effect of laser phototherapy on the secretory activity of activated macrophages was analyzed, these laser phototherapy parameters led to a significant decrease in TNF- α compared to the non-lased counterpart groups [42]. On the other hand, Shefer et al. [38] using similar parameters (λ = 904 nm, irradiance 60 mW/cm², fluence 3.6 J/cm²) showed no changes in the TNF- α concentration in the experimental model of contact hypersensitivity reaction in skin [38]. Thus, more laser phototherapy studies on TNF- α suppression are clearly needed.

Production of IL-1 β , a pro-inflammatory protein, was also searched in this study. This cytokine is probably the most important molecule capable of modulating cerebral functions during systemic and localized inflammatory insults. IL-1 β is found in the homogenized brain tissue in rat [6,43] and in mouse [44]. Members of the IL-1 family are expressed at low or undetectable levels in healthy brain but their expression is rapidly up-regulated by various experimental brain insults including ischemia, trauma, hypoxia and neurotoxic or inflammatory stimuli [6]. In rats, IL-1 β and its mRNA have been detected after TBI in different regions including the cortex [6,30,45,46]. Thus, it was expected to find increasing levels of IL-1 β in our samples, especially at control non-treated rats. In fact, independently of the experimental group, high levels of IL-1 β were observed in the brain. However, the IL-1 β levels significantly decreased in time in the control samples, where the cryogenic lesion has received no further treatment.

In spite of wavelength and energy density, laser phototherapy modulated the IL-1 β level. Stable IL-1 β levels were observed in the brain of RL3 and IRL5 groups during the whole experimental time. This result could be due to the intracellular calcium increase,

which is a known effect of laser phototherapy [47]. This intracellular calcium increase, determined by calcium influx, would regulate the IL-1 release. In fact, many intracellular events have been linked to IL-1 β release, such as potassium efflux, influx of calcium and activation of phospholipase C (PLC) and phospholipase A₂ (PLA₂) [48].

IL-1 acts on the endothelial cells of the brain vasculature to up-regulate the expression of adhesion and chemoattractant molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), CC chemokine ligand-2 (CCL-2) and E- and P-selectin, and even promotes BBB breakdown, events that are involved in leukocyte recruitment [49]. Thus, the maintenance of the IL-1 β in high levels in the laser groups is in consonance with our previous study [25], where laser phototherapy induced higher levels of edema, probably as result of the BBB breakdown.

In the blood the IL-1 levels were less expressive than in the brain tissue. These levels were maintained stable in time with no changes amongst the experimental groups. This result would be expected because IL-1 expression is confined locally within the injured tissue and only small amounts of IL-1 are needed to propagate an inflammatory response that will determine the clinical outcome [30].

Other interesting observation of the CBI was the significant increase of the circulating levels of IL-6 in 24 h. It is known that IL-1 is a key driver of CNS inflammation in humans, and increased circulating levels of IL-6 and acute-phase proteins, are downstream effectors of IL-1 [30]. Thus, if the IL-1 is highly expressed in the injured brain as observed, the increase in IL-6 in the blood will occur. Surprisingly, in 24 h when the IL-1 β in the brain was diminished, the IL-6 in the blood increased. Maybe this finding would be resultant of a cascade of events, where once initiated will be acting for longer time. This could be true, once even in the samples where the levels of IL-1 β were maintained stable in the brain (RL3 and IRL5 groups) the levels of IL-6 in the blood also increased in 24 h.

The protocols of laser phototherapy able to control the IL-6 levels in the blood were those using low energy density (3 J/cm²). In fact, samples treated with RL3, although presenting a significant increase in 24 h, presented IL-6 levels in the blood significantly smaller than those of control samples. Additionally, an IL-6 level increase in the blood was not observed in samples treated with IRL3 protocol. Studies using IL-6-deficient animals and animals overexpressing this cytokine have shown that IL-6 has a balance role in the maintenance of normal BBB integrity and astrocyte activation in the CNS [50]. In the CBI model, Swartz et al. [50], clearly demonstrated the role of IL-6 in promoting tissue healing in the brain. This finding was similar to that observed by Penkowa et al. [26]. On the other hand, overexpression of IL-6 can lead to marked neurodegeneration [51]. So, IL-6 exerts both pro-inflammatory and neuroprotective roles in injured CNS [52]. Consequently, any derangement of IL-6 in the CNS, either its absence or chronic expression would affect the CNS response to trauma. Thus, by upholding the IL-6 levels the laser phototherapy using infrared laser and 3 J/cm² would favor the response of the CNS to trauma.

IL-10 levels were maintained stable in all experimental groups. This anti-inflammatory cytokine with immunosuppressive attributes exerts their effects by inhibiting pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 [30,11,53,54] and enhancing the synthesis and secretion of their endogenous antagonist [55,56]. IL-10 also reduces leukocyte endothelial interactions that promote procoagulation and extravasations. The anti-inflammatory effects of IL-10 have been demonstrated *in vivo*, when exogenous administration of the cytokine aided neurological recovery by reducing pro-inflammatory cytokine expression [57]. Evidence for the intrathecal production of anti-inflammatory cytokines in TBI patients were observed by Knoblach and Faden [58]. The authors found that CSF levels of IL-10 showed more acute increase within 24 h, correlating

with decrease in TNF [58]. Changes in the IL-10 levels were neither detectable in the brain nor in the blood in all experimental groups. This could be another reason why the TNF- α has not decreased in the brain. Probably the observation times in this specific cryogenic brain injury model could be not appropriate for observing changes in IL-10 concentration. Studies with longer observation time could be interesting in order to pursue the moment of IL-10 rise and TNF- α decrease in this particular CBI model and then verify the possible effect of laser phototherapy in these cytokines.

The effect of laser phototherapy on the expression of cytokines in the nervous system, particularly for neuroprotective purposes, is far from elucidated. Although phototherapy accelerates wound healing and has an anti-inflammatory action, in the CNS its beneficial effect is still to be proved. In fact, in a previous study using the CBI model, we showed a significant increase in vascular permeability indirectly measured by the edema formation [25], which would be deleterious to the brain, especially in closed head trauma. On the other hand, it was possible to observe changes in the distribution of the inflammatory cells depending on the brain area analyzed, with a particular decrease in the inflammatory cell amount at the subcortical area irradiated with infrared laser and 3.2 J/cm² which would be beneficial toward the brain regeneration [25].

In this study, the inflammatory outcome of the phototherapy with low intensity laser (e.g. lesioned area and/or volume, secondary cell death rate, degree of leukocyte infiltration, etc.) was not analyzed. Thus, although some alterations of the local and systemic levels of the studied cytokines in the cryolesioned rats were observed, at this point it is difficult to conclude if these changes would be beneficial or deleterious to the CNS healing. Hence, more studies are needed in order to further explore the possibility of using laser phototherapy for preventing and/or limiting the brain damage in the traumatic brain injury clinical outcome.

Acknowledgments

We thank the staffs of the Labs: LIM51 at the Medicine School and LELO (Special Laboratory of Lasers in Dentistry) at the School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil. We are also grateful to ours Grants sponsors Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, Brazil and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasília, DF, Brazil.

References

- [1] D. Giulian, J. Chen, J.E. Ingeman, J.K. George, M. Noponen, The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain, *J. Neurosci.* 9 (1989) 4416–4429.
- [2] K. Unsicker, C. Grothe, R. Westermann, K. Wewetzer, Cytokines in neural regeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.* 2 (1992) 671–678.
- [3] P.J. Gebicke-Haerter, D. Van Calker, W. Nörenberg, P. Illes, Molecular mechanisms of microglial activation. A. Implications for regeneration, neurodegenerative diseases, *Neurochem. Int.* 29 (1996) 1–12.
- [4] S.M. Allan, P.J. Tyrrell, N.J. Rothwell, Interleukin-1 and neuronal injury, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 629–640.
- [5] S.M. Lucas, N.J. Rothwell, R.M. Gibson, The role of inflammation in CNS injury and disease, *Br. J. Pharmacol.* 147 (2006) 232–240.
- [6] V. Taupin, S. Toulmond, A. Serrano, J. Benavides, F. Zavala, Increase in IL-6, IL-1, TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand, *J. Neuroimmunol.* 42 (1993) 177–185.
- [7] R. Tehrani, S. Andell-Jonsson, S.M. Beni, I. Yatsiv, E. Shohami, T. Bartfai, J. Lundkvist, K. Iverfeldt, Improved recovery, delayed cytokine induction after closed head injury in mice with central overexpression of the secreted isoform of the interleukin-1 receptor antagonist, *J. Neurotrauma* 19 (2002) 939–951.
- [8] P.F. Stahel, M.C. Morganti-Kossmann, T. Kossmann, The role of the complement system in traumatic brain injury, *Brain. Res. Rev.* 27 (1998) 243–256.
- [9] L. Ott, C.J. McClain, M. Gillespie, B. Young, Cytokines, metabolic dysfunction after severe head injury, *J. Neurotrauma* 11 (1994) 447–472.
- [10] E. Csuka, M.C. Morganti-Kossmann, P.M. Lenzlinger, H. Joller, O. Trentz, T. Kossmann, IL-10 levels in cerebrospinal fluid and serum of patients with

- severe traumatic brain injury: relationship to IL-6, TNF- α , TGF- β 1 and blood-brain barrier function, *J. Neuroimmunol.* 101 (1999) 211–221.
- [11] E.N. Benveniste, L.P. Tang, R.M. Law, Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10, *Int. J. Dev. Neurosci.* 13 (1995) 341–349.
  - [12] M.C. Morganti-Kossmann, L. Satgunaseelan, N. Bye, T. Kossmann, Modulation of immune response by head injury, *Injury* 38 (2007) 1392–1400.
  - [13] Y. Moriyama, J. Nguyen, M. Akins, E.H. Moriyama, L. Lilje, In vivo effects of low level laser therapy on inducible nitric oxide synthase, *Lasers Surg. Med.* 41 (2009) 227–231.
  - [14] E.S. Boschi, C.E. Leite, V.C. Saciura, E. Caberlon, A. Lunardelli, S. Bitencourt, D.A. Melo, J.R. Oliveira, Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat, *Lasers Surg. Med.* 40 (2008) 500–508.
  - [15] J. Kujawa, L. Zavadnik, I. Zavadnik, V. Buko, A. Lapshyna, M. Bryszewska, Effect of low-intensity (3.75–25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 22 (2004) 111–117.
  - [16] C.A. Damante, S.L. Greggi, A.C. Sant'Ana, E. Passanezi, R. Taga, Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty, low-level laser therapy, *Lasers Surg. Med.* 35 (2004) 377–384.
  - [17] I. Sawasaki, V.R. Geraldo-Martins, M.S. Ribeiro, M.M. Marques, Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa, *Lasers Med. Sci.* 24 (2009) 113–116.
  - [18] N. Mirsky, Y. Krispel, Y. Shoshany, L. Maltz, U. Oron, Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation, *Antioxid. Redox Signal* 4 (2002) 785–790.
  - [19] J. Streeter, L. De Taboada, U. Oron, Mechanisms of action of light therapy for stroke, acute myocardial infarction, *Mitochondrion* 4 (2004) 569–576.
  - [20] A. Oron, U. Oron, J. Chen, A. Eilam, C. Zhang, M. Sadeh, Y. Lampl, J. Streeter, L. DeTaboada, M. Chopp, Low-level laser therapy applied transcranially to rats after induction of stroke significantly reduces long-term neurological deficits, *Stroke* 37 (2006) 2620–2624.
  - [21] S. Rochkind, V. Drory, M. Alon, M. Nissan, G.E. Ouaknine, Laser phototherapy 780 nm. A new modality in treatment of long-term incomplete peripheral nerve injury: a randomized double-blind placebo-controlled study, *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 436–442.
  - [22] J.J. Anders, S. Geuna, S. Rochkind, Phototherapy promotes regeneration, functional recovery of injured peripheral nerve, *Neurol. Res.* 26 (2004) 233–239.
  - [23] L. Detaboada, S. Ilic, S. Leichter-Martha, U. Oron, A. Oron, J. Streeter, Transcranial application of low-energy laser irradiation improves neurological deficits in rats following acute stroke, *Lasers Surg. Med.* 38 (2006) 70–73.
  - [24] A. Oron, U. Oron, J. Streeter, L. De Taboada, A. Alexandrovich, V. Trembovler, E. Shohami, Low-level laser therapy applied transcranially to mice following traumatic brain injury significantly reduces long-term neurological deficits, *J. Neurotrauma* 24 (2007) 651–656.
  - [25] D.T. Meneguzzo, C.Y. Okada, M.K. Koike, B.A. Silva Jr., M.S. Moreira, C.P. Eduardo, M.M. Marques, Effect of low intensity laser therapy in an experimental model of *Cranioencephalic Trauma* in rats. in: *Proc. SPIE* 6428 (2007) 64280G. <<http://www.scopus.com>>.
  - [26] M. Penkowa, T. Moos, J. Carrasco, H. Hadberg, A. Molinero, H. Bluethmann, J. Hidalgo, Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice, *Glia* 41 (1999) 343–357.
  - [27] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed., Academic Press, San Diego, CA, 1986 (Plate 31).
  - [28] D.T. Meneguzzo, C.P. Eduardo, M.S. Ribeiro, M.M. Marques, Influence of the fractionated irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts, in: *Proc. SPIE*, 6846, 2008, 68460A. <<http://www.scopus.com>>.
  - [29] I. Cernak, Animal models of head trauma, *NeuroRx*. 2 (2005) 410–422.
  - [30] A. Simi, N. Tsakiri, P. Wang, N.J. Rothwell, Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1122–1126.
  - [31] K. Sriram, J.P. O'Callaghan, Divergent roles for tumor necrosis factor- α in the brain, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2 (2007) 140–153.
  - [32] L. Fan, P.R. Young, F.C. Barone, G.Z. Feuerstein, D.H. Smith, T.K. McIntosh, Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- α mRNA in the CNS, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 36 (1996) 287–291.
  - [33] T. Kita, L. Liu, N. Tanaka, Y. Kinoshita, The expression of tumor necrosis factor- α in the rat brain after fluid percussive injury, *Int. J. Legal Med.* 110 (1997) 305–311.
  - [34] S.M. Knoblach, L. Fan, A.I. Faden, Early neuronal expression of tumor necrosis factor- α after experimental brain injury contributes to neurological impairment, *J. Neuroimmunol.* 95 (1999) 115–125.
  - [35] S. Holmin, M. Schalling, B. Höjeberg, A.C. Nordqvist, A.K. Skeftruna, T. Mathiesen, Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion, *J. Neurosurg.* 86 (1997) 493–504.
  - [36] E. Shohami, M. Novikov, R. Bass, A. Yamin, R. Gallily, Closed head injury triggers early production of TNF α , IL-6 by brain tissue, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14 (1994) 615–619.
  - [37] P.F. Stahel, E. Shohami, F.M. Younis, K. Kariya, V.I. Otto, P.M. Lenzlinger, M.B. Grosjean, H.P. Eugster, O. Trentz, T. Kossmann, M.C. Morganti-Kossmann, Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (2000) 369–380.
  - [38] G. Shefer, U. Oron, A. Irintchev, A. Wernig, O. Halevy, Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway, *J. Cell Physiol.* 187 (2001) 73–80.
  - [39] L. Kandolf-Sekulovic, M. Kataranovski, M.D. Pavlovic, Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19 (2003) 201–203.
  - [40] V. Campana, M. Moya, A. Gavotto, J.C. Simes, L. Spitalé, F. Soriano, J.A. Palma, He-Ne laser on microcrystalline arthropathies, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 21 (2003) 99–103.
  - [41] F. Aimbire, R. Albertini, M.T. Pacheco, H.C. Castro-Faria-Neto, P.S. Leonardo, V.V. Iversen, R.A. Lopes-Martins, J.M. Bjordal, Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation, *Photomed. Laser Surg.* 24 (2006) 33–37.
  - [42] L.R. Sousa, B.N. Cavalcanti, M.M. Marques, Effect of laser phototherapy on the release of TNF- α and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages, *Photomed. Laser Surg.* 2009. doi:10.1089/pho.2007.2220 (Epub ahead of print).
  - [43] H.Q. Yan, M.A. Banos, P. Herregodts, R. Hooghe, E.L. Hooghe-Peters, Expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury, *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2963–2967.
  - [44] T. Takao, S.G. Culp, E.B. De Souza, Reciprocal modulation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-1 receptors by lipopolysaccharide (endotoxin) treatment in the mouse brain-endocrine-immune axis, *Endocrinology* 132 (1993) 1497–1504.
  - [45] M.N. Woodroffe, G.S. Sarna, M. Wadhwa, G.M. Hayes, A.J. Loughlin, A. Tinker, M.L. Cuzner, Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production, *J. Neuroimmunol.* 33 (1991) 227–236.
  - [46] X. Wang, F.C. Barone, N.V. Aiyar, G.Z. Feuerstein, Stroke Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats, 28 (1997) 155–161.
  - [47] T. Karu, Laser biostimulation: a photobiological phenomenon, *J. Photochem. Photobiol.* 3 (1989) 638–640.
  - [48] C. Andrei, P. Margiocco, A. Poggi, L.V. Lotti, M.R. Torrisi, A. Rubartelli, C. Phospholipases, A₂ control lysosome-mediated IL-1 β secretion: Implications for inflammatory processes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9745–9750.
  - [49] J.P. Kinsman, B. Drukarch, A.M. Van Dam, (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology, *Clin. Sci. Lond.* 112 (2007) 1–25.
  - [50] K.R. Swartz, F. Liu, D. Sewell, T. Schochet, I. Campbell, M. Sandor, Z. Fabry, Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system, *Brain Res.* 896 (2001) 86–95.
  - [51] I.L. Campbell, C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B. Oldstone, L. Mucke, Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 1061–1065.
  - [52] A. Quintana, A. Molinero, R. Borup, F.C. Nielsen, I.L. Campbell, M. Penkowa, J. Hidalgo, Effect of astrocyte-targeted production of IL-6 on traumatic brain injury and its impact on the cortical transcriptome, *Dev. Neurobiol.* 68 (2008) 195–208S.
  - [53] G. Kremlev, C. Palmer, Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures, *J. Neuroimmunol.* 162 (2005) 71–80.
  - [54] M.C. Morganti-Kossmann, M. Rancan, V.I. Otto, P.F. Stahel, T. Kossmann, Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept, *Shock* 16 (2001) 165–177.
  - [55] C.J. Smith, H.C. Emsley, C.M. Gavin, R.F. Georgiou, A. Vail, E.M. Barberan, G.J. del Zoppo, J.M. Hallenbeck, N.J. Rothwell, S.J. Hopkins, P.J. Tyrrell, Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome, *BMC Neurol.* 4 (2004) 2.
  - [56] M.A. Cassatella, L. Meda, S. Gasperini, F. Calzetti, S. Bonora, Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 1695–1699.
  - [57] D.A. Joyce, D.P. Gibbons, P. Green, J.H. Steer, M. Feldmann, F.M. Brennan, Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes, *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 2699–2705.
  - [58] S.M. Knoblach, A.I. Faden, Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury, *Exp. Neurol.* 153 (1998) 143–151.