

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento**

REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DE LASERES DE BAIXA
POTÊNCIA, NA REGIÃO DO VISÍVEL-VERMELHO, EM
INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA POR CARRAGENINA**

**São José dos Campos – SP
2006**

Regiane Albertini de Carvalho

**Análise do Mecanismo de Ação de Laseres de Baixa Potência,
na Região do Visível-Vermelho, em Inflamação Aguda Induzida
por Carragenina**

Tese apresentada ao programa Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba como Complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio G J Balbin Villaverde
Profa. Dra. Maricilia Silva Costa

**São José dos Campos – SP
2006**

C327a

Carvalho, Regiane Albertini de

Análise do mecanismo de ação de lasers de baixa potência, na região do visível-vermelho, em inflamação aguda induzida por carragenina / Regiane Albertini de Carvalho. São José dos campos: UNIVAP, 2006.
1 Disco laser. Color.

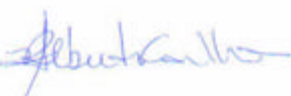
Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Terapia a laser de baixa potência 2. Inflamação 3. Carragenina 4. Raios infravermelho 5. Fisioterapia. I. Villaverde, Antonio G. J. Balbin, orientador. II. Costa, Maricília Silva, Orientadora. III. Título.

CDU:616-002

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos a reprodução parcial ou total desta tese, por processo de fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Aluna:



Data: 12 de dezembro de 2006

“ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DE LASERES DE BAIXA POTÊNCIA EM
INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA POR CARRAGENINA”

Regiane Albertini de Carvalho

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **RENATO AMARO ZÂNGARO** (UNIVAP) 

Prof. Dr. **ANTONIO G J. BALBIN VILLAVARDE** (UNIVAP) 

Profª. Dra. **MARICÍLIA SILVA COSTA** (UNIVAP) 

Profª. Dra. **ANA PAULA LIGEIRO DE OLIVEIRA** (USP) 

Prof. Dr. **HÉLIO FLAPLER** (UNI/FESP) 

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida para que cada vez me torne uma pessoa melhor

Ao Flávio Aimbire que acrescentou muito carinho e amor a minha vida e fez que os momentos de tempestade perdurassem pouco e os de felicidade perdurassem por muito tempo...

E a Deus que sempre me iluminou o caminho e me deu forças para superar dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Baptista Gargione Filho por incentivar a capacitação profissional dos professores da UNIVAP.

Ao Prof. Dr. Renato A. Zângaro e Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco por acreditarem em minha capacidade.

À Prof. Dra. Maricília Silva Costa pela amizade, dedicação e acompanhamento de todo processo experimental. Sem dizer do apoio e incentivo em todos os momentos..sempre me motivando quando os experimentos não davam certo e as nas atribuições do dia a dia que me faziam fraquejar.

Ao Prof. Dr. Antonio G J Balbin Villaverde pela orientação e discussão dos fundamentos da laserterapia.

Prof. Dr.Miguel A. Castilho Salgado pela orientação da parte histológica deste trabalho, e que me fez conhecer um mundo novo de pesquisa através das lentes do microscópio e ainda por ter colocado seu laboratório a disposição para elaboração das laminas histológicas

Ao Prof. Dr. José Antônio Silva Junior pela colaboração nas análises de RT-PCR

A prof. Dr. Josane, Prof. Dr. Marco Antonio, Prof. Dra . Cristina Pacheco, Prof. Dr. Newton Soares por seus ensinamentos e ajuda.

Prof. Dr. Aldo Brugnera por ter cedido o laser.

Ao Prof. Dr. Egberto Munin por ter cedido o laser e microscópio e auxiliado na revisão do artigo referente a histologia.

Aos amigos Leandro Procópio, Tony, Ana Maria, Janaína, Alisson, Rodrigo Gontijo, Thais, Leandro Kawaguchi, pela disponibilidade em ajudar, sobretudo pela solidariedade. E a todos os demais colegas da Pós-Graduação pelos bons momentos de convívio.

A Kátia Calligaris por ser estar pronta a ajudar

A Valéria, Ivone e Nídia pela colaboração em resolver as questões burocráticas.

A Bibliotecária Rosangela Regis Cavalcanti pela revisão e adequação da tese as normas da UNIVAP

Aos alunos do curso de Fisioterapia e a Ivanilda que souberam compreender os momentos de ausência sempre torcendo para que tudo desse certo...

A todos os professores da Pós-Graduação, pela atenção e apoio; e a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Em especial meus agradecimentos à FAPESP, pelo financiamento deste projeto.

**ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO DE LASERES DE BAIXA POTÊNCIA,
NA REGIÃO DO VISÍVEL-VERMELHO, EM INFLAMAÇÃO AGUDA
INDUZIDA POR CARRAGENINA**

RESUMO

A resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar os produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Sendo esta uma resposta celular e humoral de magnitude variável com repercussões locais, loco-regionais ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos que envolvem os sistemas: complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados, juntos, com a ativação de fagócitos e das células endoteliais. Durante a década de 60, a carragenina passou a ser muito utilizada experimentalmente, principalmente por sua habilidade em induzir uma reação inflamatória aguda. A terapia com laser de baixa potência na região de vermelho e infravermelho próximo (600-1000nm) é utilizada clinicamente para promover efeitos antiinflamatórios, aliviar a dor e acelerar o processo de reparação tecidual. O presente trabalho teve como objetivo investigar o mecanismo de ação de lasers de baixa potência, na região do visível (vermelho), no processo inflamatório agudo, utilizando os modelos clássicos de edema de pata e pleurisia em ratos. Foram utilizados 2 modelos clássicos de inflamação aguda, edema de pata e pleurisia, induzida por carragenina, para determinar a densidade de energia, tempo de irradiação, migração de células e produção de mediadores inflamatórios após o tratamento com laser de baixa potência; ainda avaliamos, em animais adrenalectomizados se existe a participação do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal para o efeito do LBP. Os resultados mostram que a densidade de energia (DE) de 7,5J/cm² reduziu a formação do edema, migração de células inflamatórias e a expressão de RNAm para IL-1 β e IL-6 TNF- α e iNOS e COX-2. mas, em animais adrenalectomizados estes efeitos não foram observados. Desta forma, podemos concluir que a terapia com LBP é eficiente para modular o processo inflamatório e seus efeitos são mediados via eixo endócrino.

Palavras Chave: inflamação aguda, mediadores inflamatórios, análise histológica, RNAm, RT-PCR, laser de baixa potência

ANALYSIS OF ACTION MECHANISM OF LOW LEVEL LASERS IN THE VISIBLE-RED REGION ON ACUTE INFLAMMATION INDUCED BY CARRAGEEN

ABSTRACT

The inflammatory response has the objective to fight against the aggressive agent and eliminate the products derived of cellular destruction, promoting best conditions to repair the damage tissue. Thus, the inflammatory response is characterized by events humoral and cellular of variable intensity, generally being a local response and in other situations presenting systemic response. The second step of inflammatory reaction is the activation of a cascade of events involving diverse biologic systems such as, complement system, kinines, and fibrinolytic system, beside of activation of phagocytes and endothelial cells. The 60's decade the carrageenan was utilized principally by its ability to induce an acute inflammatory response. The low power laser therapy (LLLT) on red and near infra-red region (600 – 1000 nm) of the electromagnetic spectrum has been used to relief pain and accelerate the tissue healing process. The present study has the objective to investigate the action mechanism of two lasers in visible region (red laser) of electromagnetic spectrum on acute inflammation, using two inflammation classic models: paw edema and pleurisy induced by carrageenan, in order to determine the energy density, time of irradiation, cells migration and production of inflammatory mediators after treatment with LLLT. Futhermore, in other series of experiments, we evaluate the anti-inflammatory effect of LLLT in adrenalectomized rats intending to study the involvement of adrenal-hypothalamus-hypophysis axis on the effect of LLLT. Our results showed that LLLT, with energy density of 7.5 J/cm^2 , reduce the edema and inflammatory cells influx and mRNA expression to IL-1 β , IL-6, and TNF- α , iNOS and COX-2. Those effects were not observed in adrenalectomized rats. Therefore, we can conclude that LLLT is efficient in modulating the inflammatory process, suggesting that these effects are mediated by the endocrine axis.

Keywords: acute inflammation, inflammatory mediators, histological analysis, mRNA, RT-PCR, Low Level Laser

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais citocinas do processo inflamatório	31
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da inter-relação das citocinas, células e enzimas no processo inflamatório	37
Figura 2 - Representação esquemática da ação do LBP	44
Figura 3 - Interação laser-tecido biológico	50
Figura 4 - Esquema sugerido para o mecanismo de ação do Laser de Baixa Potência	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 A reação Inflamatória	01
1.2 Citocinas do processo inflamatório	11
1.2.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)	13
1.2.2 Interleucina-1	15
1.2.3 Interleucina-6	16
1.3 Eicosanóides	18
1.4 Óxido nítrico	20
1.4.1 As isoenzimas da síntese do NO	21
1.4.2 Aspectos fisiológicos e tóxicos do NO	23
1.5 O uso da carragenina como agente flogógeno	25
1.6 Terapias antiinflamatórias	26
1.7 Laser de Baixa Potência (LBP)	27
1.7.1 Características da radiação laser	34
1.7.2 Parâmetros de irradiação	35
1.7.3 Interação Laser-tecido	36
1.7.4 Laser de Baixa Potência (LBP) e inflamação	38
2 . OBJETIVO	43
3. RESULTADOS	44
3.1. Artigo 1	44
3.2. Artigo 2	45
3.3. Artigo 3	46
3.4. Artigo 4	47
3.5. Artigo 5	48
3.6. Artigo 6	49
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP .	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 A reação Inflamatória

A inflamação foi descrita, pela primeira vez, por Celsius, que viveu entre os anos 30 AC e 30 DC; e observou que os sinais cardinais da inflamação eram: o calor, o rubor, o tumor e a dor, aos quais, Virchow acrescentou a perda da função (PARADISO; VOEUX, 1998).

A inflamação é uma resposta orgânica local ou geral, de magnitude variável, desencadeada por diversos fatores, tendo como fim proteger o organismo contra qualquer tipo de agressão. Esta resposta ocorre através de um processo de regulação que mantém o equilíbrio das diversas funções e composições químicas do corpo, ou seja, a reação inflamatória é o mecanismo fisiopatológico básico em resposta a diversas doenças, sendo representada por um conjunto de reações locais e gerais do organismo (ROBBINS et al., 2000).

A reação inflamatória é composta por uma série de fenômenos biológicos que se associam e se complementam, formando reações em cascata, envolvendo a interação complexa entre as células inflamatórias, tais como: neutrófilos, linfócitos e monócitos/ macrófagos (TEDGUI; MALLAT, 2001).

A resposta inflamatória visa, em última instância, combater o agente agressor e eliminar os produtos resultantes da destruição celular, assim, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Todo este processo de restituição da normalidade tecidual é concluído pela reparação, fenômeno inseparável da inflamação (TEDGUI; MALLAT, 2001).

Inicialmente, duas teorias foram postuladas, no sentido de caracterizar a reação inflamatória:

a) Teoria Humoral – preconiza que a resposta inicial partiria do sangue e dos fluidos tissulares, ricos em sistemas enzimáticos complexos, responsáveis por diversos eventos relacionados à reação inflamatória;

b) Teoria Celular – Alternativa a Teoria Humoral - postulada por Metchnikoff, afirmava que as células brancas que apareciam durante a reação inflamatória eram as responsáveis pela proteção do organismo contra infecções (CONTRAN et al., 1996; CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

O fato de a inflamação ser produzida por diferentes agentes e manter características uniformes levaram a sugestão de que os sintomas seriam causados por mensageiros químicos gerados no local da reação. Estes mensageiros são agora conhecidos como mediadores químicos da inflamação (SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

A inflamação é uma resposta celular e humoral de magnitude variável com repercussões locais, loco-regionais ou sistêmicas, cujo disparo é produtor de uma cascata de eventos, envolvendo os sistemas: complemento, cininas, fibrinolítico e coagulantes estimulados, em conjunto com a ativação de fagócitos e das células endoteliais (COMPTON, 1991).

A resposta inflamatória é dividida em três fases distintas, sendo:

I. fase aguda - evento transitório caracterizado pelos sinais clássicos da inflamação;

II. fase sub-aguda retardada – nota-se, predominantemente, a infiltração leucocitária e,

III. fase crônica, onde a proliferação é fato de destaque, com a ocorrência da degeneração tissular e da reparação fibrótica (STEVENS et al., 2002).

Estas três fases são desejáveis e fundamentais, podendo ser consideradas benignas dentro de padrões em que as atividades celulares e dos mediadores permanecem apropriadamente reguladas, podendo ser identificadas por alterações locais notáveis pelos seguintes sinais e sintomas: rubor, calor, tumor e dor (STEVENS et al., 2002).

A reação que ocorre durante as primeiras horas após a injúria é independente da natureza (biológica, física ou química) do agente nocivo, sendo a resposta bastante similar, mesmo após uma grande variedade de estímulos. Inicialmente, o agente agressor é combatido por duas linhas de proteção; a defesa inata não induzida (ataque humoral – sistema complemento e macrófagos residentes), entretanto, se o agente agressor não for combatido nessa etapa de defesa inicial, uma segunda via de resposta é induzida – a resposta inflamatória aguda ou defesa inata induzida (SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

A resposta inflamatória parece ser parcialmente mediada por componentes (sistemas enzimáticos) presentes nos fluidos corporais como: Sistema de coagulação; Sistema fibrinolítico; Sistema calicreína-cininas; Sistema complemento (ALI et al., 1997).

Classicamente, são descritos alguns fenômenos básicos comuns a qualquer tipo de inflamação, independentemente do agente inflamatório. Estas fases caracterizam a inflamação do tipo aguda, a qual sempre antecede a inflamação do tipo crônica; e pode ser definida como uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com a conseqüente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas para o espaço extravascular

(SIQUEIRA; DANTAS, 2000). Todos estes eventos acontecem como um processo único e concomitante, caracterizando a inflamação como um processo dinâmico. Entretanto, podemos dividi-lo em fases para sua melhor compreensão:

I) Fase irritativa: ocorrem modificações morfológicas e funcionais dos tecidos agredidos, promovendo a liberação de mediadores químicos estes desencadeantes das demais fases inflamatórias. Os fenômenos irritativos estão intimamente ligados aos fenômenos vasculares, por envolverem a mediação química de fármacos que agem diretamente sobre a parede vascular, ocasionando alterações vasculares (DALE; RANG; VOEUX, 2004). Esta fase apresenta, como característica fundamental, a mediação química, ou seja, fenômeno em que ocorre a produção e/ou liberação de substâncias químicas diante da ação de um agente inflamatório. Estas substâncias atuam, principalmente, na microcirculação do local inflamado, provocando, dentre outras modificações, o aumento da permeabilidade vascular. Desta forma, temos alguns mediadores de ação rápida e mediadores de ação prolongada.

a) Mediadores de ação rápida: liberados imediatamente após a ação do estímulo agressor. Agem, principalmente, sobre os vasos sanguíneos. Envolvem o grupo das aminas vasoativas (ROBBINS et al., 2000). As aminas vasoativas são originárias do tecido agredido. Atuam sobre a parede vascular, não exercendo quimiotaxia sobre os leucócitos, como alguns mediadores de ação prolongada. Compreendem, dentre outros, a histamina e a serotonina (ROBBINS et al., 2000).

- **Histamina:** sintetizada nos granulócitos basófilos nas plaquetas e, principalmente, nos mastócitos, que a liberam quando agredidos. Provoca contração das células endoteliais venulares, com conseqüente aumento da permeabilidade vascular e

vasodilatação. Tem destacada participação no mecanismo de formação do edema inflamatório.

- **Serotonina:** encontrada nas plaquetas, na mucosa intestinal e no sistema nervoso central (SNC). A serotonina apresenta uma provável ação vasodilatadora, aumentando a permeabilidade vascular.

b) Mediadores de ação prolongada: liberados mais tardiamente, diante da persistência do agente flogístico. Atuam sobre os vasos e, principalmente, sobre os mecanismos de quimiotaxia celular, contribuindo para a exsudação celular. Compreendem substâncias plasmáticas e lipídios ácidos (ROBBINS et al., 2000).

- **Substâncias plasmáticas:** as substâncias plasmáticas estão divididas em três grandes sistemas: o sistema das cininas (envolvendo principalmente a plasmina e a bradicinina), o sistema complemento e o sistema de coagulação (representado pelos fibrinopeptídeos) (ROBBINS et al., 2000).

Plasminogênio/Plasmina: a plasmina é uma protease que degrada uma ampla gama de proteínas teciduais, como fibrina, protrombina, globulina, entre outras. Sua forma inativa, o plasminogênio, é ativada por enzimas lisossômicas, quinases bacterianas, teciduais e plasmáticas. A presença da plasmina incrementa a permeabilidade vascular, provoca o surgimento de fibrinopeptídeos, libera cininas e atua sobre o sistema complemento (ROBBINS et al., 2000).

Bradicinina: ativada no interstício, este peptídeo apresenta ação vasodilatadora sobre pequenas artérias e arteríolas, aumentando a permeabilidade vascular. Por atuar em terminações nervosas, pode provocar o surgimento de dor (ROBBINS et al., 2000).

Sistema complemento: é um fragmento protéico originário de uma proteína plasmática termolábil que se rompe, devido a algumas reações entre proteínas

plasmáticas e intersticiais (como, por exemplo, as reações antígeno-anticorpo). Aumenta a permeabilidade vascular por provocar a liberação de histamina ou, por ação direta sobre a parede vascular. Também apresenta atividade de quimiotaxia, contribuindo para a exsudação celular, principalmente de neutrófilos (ROBBINS et al., 2000).

Fibrinopeptídeos: são o produto da transformação do fibrinogênio em fibrina (no sistema de coagulação) ou, da ação da plasmina sobre estas duas substâncias. Os fibrinopeptídeos apresentam ação quimiotática sobre os leucócitos, evento observado na fase de exsudação celular, podendo aumentar a permeabilidade vascular (ROBBINS et al., 2000).

- **Lipídios ácidos**: estão representados, principalmente pelas prostaglandinas.

Prostaglandina: participa de fases mais tardias da inflamação; é uma molécula de cadeias longas formadas por ácidos graxos, tendo sido observada, primeiramente no líquido seminal (daí ter o nome de prostaglandina - "prosta"=próstata; "glandina"= provavelmente "glândula"). Provocam a contração das células endoteliais e a vasodilatação, potencializando as respostas vasculares oriundas da ação da bradicinina (DALE; RANG; VOEUX, 2004).

II) Fase vascular: alterações hemodinâmicas da circulação e da permeabilidade vascular no local da agressão. A fase vascular reúne todas as transformações ocorridas na microcirculação do local inflamado. Esta fase ocorre alguns minutos após o início da ação do agente flogístico; intervalo em que se processa a liberação dos mediadores químicos (DALE; RANG; VOEUX, 2004).

As modificações vasculares incluem alterações no leito vascular e no fluxo sanguíneo, originando diferentes formas de hiperemia, estas moduladas pela intensidade do agente agressor e pelos graus de resposta do tecido. Acompanhando

a hiperemia vêm a isquemia e o edema, outras duas formas de reações vasculares (DALE; RANG; VOEUX, 2004). Estes três fenômenos, juntos, formam um conjunto de respostas vasculares imediatas à presença do estímulo agressor, sendo esse conjunto denominado de *Tríplice resposta de Lewis* (ROBBINS et al., 2000).

Em termos macroscópicos, imediatamente após a agressão, observa-se inicialmente uma zona esbranquiçada (isquemia), sendo substituída por uma zona avermelhada ou eritema (hiperemia) ao redor do local agredido; mais tardiamente, surge o aumento de volume local (edema). O mecanismo desta resposta pode ser:

- **Isquemia transitória:** devido à constrição arteriolar oriunda de um reflexo axo-axônico local, provocado pelo estímulo agressor; ocorre a parada do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o local fica esbranquiçado.

- **Hiperemia. a) arteriolar ou ativa:** após a contração e a parada da circulação sanguínea, o fluxo é restabelecido, sendo os capilares totalmente preenchidos por sangue. Esta reação na microcirculação, aliada à parada da estimulação simpática vascular, resulta em uma vasodilatação arteriolar por toda a rede microcirculatória local, levando ao aparecimento do eritema (zona avermelhada);

b) venular ou passiva: dilatação das vênulas mediada por estimulação farmacológica, principalmente histamínica, com posterior exsudação plasmática e edema.

- **Edema:** ocorre devido ao aumento da pressão hidrostática e da permeabilidade vascular, provocando a perda de água e de eletrólitos e a diminuição da velocidade sanguínea.

Esta tríplice resposta é desencadeada por reflexos nervosos locais provocados pelo agente inflamatório. A hiperemia e o edema são mantidos por mais

tempo devido à ação da fase irritativa, o que leva à fase exsudativa (ROBBINS et al., 2000).

III) Fase exsudativa: característica do processo inflamatório, este fenômeno compõe-se de exsudato celular e plasmático, oriundo do aumento da permeabilidade vascular. Os fenômenos da exsudação referem-se à migração, para o foco inflamatório, de líquidos e células, provenham eles de vasos ou de tecidos vizinhos.

- **Exsudação Plasmática:** A exsudação plasmática é a responsável pela formação do edema inflamatório. A saída do líquido plasmático ocorre principalmente nas vênulas, sendo pouco observada nos capilares e arteríolas. Isto ocorre devido à estrutura histológica das vênulas, que apresentam menor aderência intercelular na sua parede em relação as arteríolas, fato este que facilita o aumento da permeabilidade vascular (ROBBINS et al., 2000). O aumento da permeabilidade vascular pode ser originado de mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular ou indiretos, em que há ação de mediadores químicos (DALE; RANG; VOEUX, 2004). O aumento da permeabilidade vascular, fato não observado nos demais fenômenos de saída de plasma do vaso, é peculiar aos edemas inflamatórios. Podem ser imediatos e transitórios, observados 15-30 minutos após a agressão e regredindo após 3 horas, sendo oriundos das vênulas; imediatos e prolongados, aparecendo imediatamente após a agressão e regredindo após 8 horas, havendo agressão direta do endotélio (ex.: queimaduras graves); e tardio e prolongado, surgindo 2-4 horas após o aumento da permeabilidade inicial e tendendo a aumentar e estabilizar após 6 horas do seu início (ex.: queimadura por exposição ao sol).

- **Exsudação Celular:** Os movimentos migratórios celulares são devidos, principalmente, à abertura de fendas na parede vascular - o aumento da

permeabilidade , aliado à liberação de mediadores químicos com ação de quimiotaxia, citados na fase irritativa. Colaboram com estes fatores, as diminuições da velocidade sanguínea - decorrentes das modificações hemodinâmicas apresentadas na fase vascular - e, principalmente, a adesividade das células do tecido vascular (como hemácias e leucócitos) aos endoteliócitos (DALE; RANG; VOEUX, 2004). A marginação destas células e seus movimentos de diapedese em direção às fendas previamente formadas caracterizam a exsudação celular; ou seja, os fenômenos celulares (ALI et al., 1997).

IV) Fase degenerativa-necrótica: caracterizada por células com alterações degenerativas reversíveis ou não (neste caso, originando um material necrótico), derivadas da ação direta do agente agressor ou das modificações funcionais e anatômicas, conseqüentes das três fases anteriores.

V) Fase produtiva-reparativa: relacionada à característica de hiperemia da inflamação; ou seja, exprime os aumentos de quantidade dos elementos teciduais (principalmente de células), resultado das fases anteriores. Esta hiperemia da reação inflamatória visa destruir o agente agressor e reparar o tecido injuriado.

Atualmente se sabe que o sistema nervoso e fatores endócrinos também interferem na reação inflamatória (GARCIA et al., 1973; FOREMAN et al., 1987).

Nestes casos, e mesmo antes do descontrole, as citocinas são os principais mensageiros fisiológicos da resposta inflamatória com o envolvimento de moléculas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL -1, IL -6), o interferon, o fator cólico estimulante (CSFs) e efetores celulares, tais como os polimorfonucleares (PMN), monócitos e células endoteliais (PAUL, 1999).

Também ocorre a ativação dos leucócitos, com aumento de sua agregação dentro da microcirculação, maior infiltração celular com substancial aumento do

consumo de oxigênio, bem como, a produção de mais citocinas e de outros mediadores inflamatórios (PAUL, 1999).

A presença de mediadores químicos no processo inflamatório faz com que a inflamação mantenha características uniformes mesmo sendo produzida por diferentes irritantes.

As prostaglandinas são mediadores inflamatórios que desempenham importantes papéis no processo inflamatório. A interferência na síntese de prostaglandinas determina uma sensível redução das alterações proporcionadas pela inflamação (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998), visto que a inibição da síntese de prostaglandinas é o mecanismo de ação de muitos anti-inflamatórios não-hormonais.

Por fim, a inflamação aguda pode apresentar quatro tipos de resolução, ou seja: 1) a resolução completa, com restauração ao normal do local inflamado, sendo este o resultado provável quando ocorre uma inflamação leve; 2) cura por fibrose, que ocorre após substancial destruição do tecido ou quando a inflamação ocorre em tecidos que não se regeneram; 3) formação de abscesso, que ocorre, particularmente nas infecções por organismos pirogênicos; 4) Progressão para inflamação crônica (PARADISO; VOEUX, 1998).

A transição da inflamação aguda para crônica é bastante difícil de detectar, mas a inflamação crônica possui características singulares que, se analisadas permitem a sua diferenciação.

Os pontos fundamentais da inflamação crônica são infiltração por células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos; proliferação de fibroblastos e, em muitos casos, de pequenos vasos sanguíneos; aumento do tecido conjuntivo (fibrose); e destruição celular (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

1.2 Citocinas do processo inflamatório

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, geralmente em torno dos 30.000 Daltons, pertencentes ao grupo das glicoproteínas, pertencente à família das hematopietinas (PAUL, 1999). As citocinas são produzidas por células do sistema imune com a propriedade de atuar sobre outras células do organismo, pertencentes ou não ao sistema imunológico (MONTES et al., 2000). A sua secreção é induzida por estímulos específicos, tais como a presença de produtos bacterianos, o contato com superfícies estranhas ou a mutação de determinados grupos celulares. Elas são responsáveis pela produção, estimulação e diferenciação de múltiplos tipos celulares, bem como pela produção de outras citocinas capazes de estimular ou de inibir a síntese de proteínas ou os efeitos biológicos de determinados tipos celulares ou de outras proteínas (CURFS; MÉIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997)

As primeiras citocinas identificadas eram produzidas por leucócitos. Por esta razão, imaginou-se que tinham a função de intermediar ou transmitir mensagens exclusivamente entre os leucócitos. Como consequência, foram denominadas interleucinas. Do mesmo modo, as citocinas secretadas pelos monócitos (macrófagos) foram chamadas monocinas. Atualmente, é sabido que as citocinas podem ser produzidas por todos os tipos celulares existentes no organismo. Este sistema funciona de um modo integrado, com a finalidade de regular respostas imunes e inflamatórias.

Existe uma ampla variedade de designações para as citocinas, dependendo de suas características. As citocinas produzidas pelos leucócitos são conhecidas como interleucinas (IL), ex: IL-1, IL-2, IL-6, IL8. Algumas citocinas passaram a ser conhecidas como Interferons (IFN), porque apresentavam uma atuação de intermediação entre as células do sistema de defesa e certos vírus, ex: ILNa, IFNb,

IFFNy. Outras citocinas são conhecidas como fatores de necrose tumoral, cuja sigla é TNF, ex: TNF α , TNF β . Outras, ainda, são conhecidas como fatores de crescimento (GF), ex: NGF, EGF. A tendência geral é usar a denominação citocinas quando se deseja referir a todas estas substâncias (CURFS; MÉIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; ARAI et al., 1990).

O volume de citocinas secretadas e liberadas pelas células produtoras é pequeno e a sua liberação ocorre durante um período bastante curto, enquanto dura o rápido contato com o agente agressor. Os seus efeitos, porém, são desproporcionalmente acentuados. As citocinas lançadas na circulação unem-se a receptores específicos existentes na membrana de células-alvo, iniciando uma cascata de transmissão intracelular de um sinal capaz de ativar uma determinada resposta celular.

É de extraordinária importância reconhecer que há citocinas que atuam excitando a célula de defesa produtora da inflamação, seja diretamente, seja pelo estímulo à produção de outras citocinas. Estas citocinas, das quais as mais conhecidas são as interleucinas **IL-1 α** , **IL-1 β** , **IL-6** e **IL-8** e o fator de necrose tumoral (**TNF**) são denominadas citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, outras citocinas atuam exatamente no sentido oposto; ou seja, desmobilizam as células de defesa produtoras da reação inflamatória ou inibem a produção das citocinas que estimulam a inflamação. As mais conhecidas deste tipo são a interleucina-10 (IL-10) e a interleucina-13 (IL-13); são denominadas citocinas anti-inflamatórias. A interleucina-10, produzida pelos linfócitos, possui notáveis propriedades anti-inflamatórias, como a capacidade de inibir a produção do TNF e das interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8. Isto representa uma redução substancial da intensidade do processo inflamatório.

As citocinas participam de uma série de repostas do organismo, tais como:

1. Ativação dos mecanismos da imunidade natural,
 - a- os macrófagos e outras células fagocitárias são ativadas,
 - b- as células NK (natural killer) são ativadas,
 - c- os eosinófilos são ativados,
 - d- indução da produção das proteínas da resposta aguda.
2. Ativação e proliferação dos linfócitos B,
3. Intervenção na resposta celular específica,
4. Intervenção nas reações inflamatórias, aguda ou crônica,
5. Controle dos processos hematopoiéticos da medula óssea,
6. Indução da cura das feridas.

1.2.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, sendo considerado o principal mediador inflamatório, por ser a primeira citocina liberada pelas células do hospedeiro, após contato com a bactéria ou seus produtos. Ainda, conforme demonstrado em estudos com animais, a administração de TNF induz a síntese de outros mediadores, como a IL-1 e IL-6, cuja liberação é inibida pela neutralização da atividade do TNF (FONG; LOWRY, 1990). A primeira descrição desta substância ocorreu na década de 70, quando Carswell et al., em 1975, descreveram pela primeira vez o TNF, como uma proteína presente no soro de animais tratados com o Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), produzindo a necrose tumoral "in vivo" e apresentando atividade citostática e citocida em células tumorais "in vitro". O TNF é estrutural e funcionalmente semelhante a linfotóxina, proteína produzida por linfócitos ativados e que, originalmente, foi

descrita por Williams e Granger (1968). A clonagem do DNA da linfotoxina foi realizada em 1984, por Gray; Aggarwall e Benton (1984).

A linfotoxina apresenta 30% de homologia com o TNF e, também promove a necrose tumoral "in vivo". Apesar da pouca semelhança na seqüência de resíduos de aminoácidos, o TNF e a linfotoxina podem se ligar ao mesmo receptor na superfície celular, apresentando várias ações comuns. Assim, o produto derivado de macrófagos foi denominado TNF- α e o derivado de linfócitos de TNF- β . Nos processos infecciosos bacterianos, o TNF- α é o mais estudado. O TNF desempenha papel-chave no disparo e na regulação da resposta inflamatória e imunológica, além de atuar como mediador de algumas respostas metabólicas e cardiovasculares que ocorrem durante a infecção (GIRARDIN et al., 1992; GRUNFELD; PALLADINO; 1990; LE; VILCEK, 1987).

A principal célula produtora de TNF é o macrófago, embora outras células sintetizem TNF, entre elas, linfócitos, mastócitos (as únicas a armazenar TNF), neutrófilos, célula muscular lisa, entre outras (BEUTLER, 1993). Apesar de esta citocina receber o nome de TNF, parece claro que seu papel na citólise direta de tumores naturais não é relevante e, possivelmente, não é responsável pela caquexia observada em humanos neoplásicos (BEUTLER, 1993).

Os efeitos biológicos observados após a estimulação "in vitro" ou "in vivo" com o TNF, são uma consequência de sua ligação a receptores específicos localizados na membrana celular. Pelo menos dois tipos de receptores para o TNF já foram descritos (LEWIS et al., 1991). O TNF exerce profundos efeitos sobre a fisiologia celular, induzindo a produção de mediadores inflamatórios tais como NO e eicosanóides.

1.2.2 Interleucina-1

A interleucina-1 (IL-1) foi, inicialmente descrita por Atkins (1960), como pirogênio endógeno (PE). Dinarello; Renfer e Wolff (1977), a partir de leucócitos do sangue periférico, realizaram a purificação do pirogênio endógeno, assim denominado pela sua atividade potente na indução da febre. A denominação "fator ativador de linfócitos" demonstra sua capacidade em aumentar a resposta dos linfócitos T frente a mitógenos. Os estudos moleculares confirmaram a existência de pelo menos dois tipos de IL-1. Auron et al. (1984) isolaram o DNA para a IL-1 a partir de monócitos humanos do sangue periférico, descrevendo a IL-1 β e, March et al. (1985) descreveram a clonagem do DNA de duas moléculas distintas de IL-1, a partir de macrófagos humanos (IL-1 α e IL-1 β). As cadeias de aminoácidos destes dois tipos de IL-1 apresentam somente 26% de homologia entre si, porém reconhecem os mesmos receptores na superfície celular e deflagram respostas biológicas semelhantes (LE; VILCEK, 1987).

Assim como o TNF, a IL-1 também é considerada um potente mediador na patogênese da inflamação. O TNF- α é capaz de induzir a síntese e a liberação de IL-1 a partir de monócitos e células endoteliais, como demonstrado por Dinarello et al. (1986). Por outro lado, a IL-1 potencializa vários efeitos biológicos do TNF e pode induzir "in vivo" às alterações observadas no choque séptico.

Observa-se também, que a administração de IL-1 é capaz de induzir a síntese e a liberação de outros mediadores, como a IL-6 e a IL-8, e levar ao aparecimento de hipotensão, taquicardia, acidose láctica e neutrofilia (VAN DEUREN, 1992).

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α participam na degeneração do osso e da cartilagem, sendo que o TNF- α ocupa a primeira posição nas citocinas da cascata inflamatória, pois apresenta a capacidade de regular a produção de outras

citocinas, incluindo IL-1 β , fator de estimulação de crescimento de colônia de macrófagos (GMCSF), IL-6, IL-8 e IL-10 (BRENNAN; MAINI; FELDMANN, 1998; FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996). A expressão de TNF- α por monócitos/macrófagos tem sido demonstrada no líquido sinovial e na cartilagem articular (CHU et al., 1991; FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996).

Endotoxinas, imunoglobulinas, heparina e agentes indutores de reumatismo são importantes em diversas afecções. Recentemente, alguns autores demonstraram a importância de células T na modulação da síntese de TNF- α e IL-1 β por monócitos/macrófagos, especialmente através da sinalização de receptores destas citocinas sobre as células T após "priming" com IL-15 (MCINNES; AL MUGHALES; FIELD, 1996; MCINNES et al., 1997; SEBBAG et al., 1997).

1.2.3 Interleucina-6

Antes da introdução do termo IL-6, esta molécula protéica recebeu várias denominações relacionadas com seus efeitos biológicos. Foi descrita originalmente por Ritchie e Fuller (1983) como "fator estimulador de fibrinogênio" e, posteriormente, como "fator estimulador de hepatócitos". Caracterizava-se como um polipeptídeo liberado por macrófagos ativados, com peso molecular entre 25-30Kd, responsável pela síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado. Em 1987, Gauldie et al. (1987) observaram que queratinócitos também liberavam o "fator estimulador de hepatócitos", determinando as mesmas alterações nos hepatócitos. Foi definido, então, como um hormônio que interagia com as células hepáticas, induzindo a síntese de uma série de proteínas plasmáticas, características de uma reação de fase aguda hepática.

A IL-6 está associada a várias doenças inflamatórias agudas e crônicas, incluindo artrite reumatóide, pancreatite aguda, meningite viral e bacteriana e doença de Alzheimer. O sinal clínico da inflamação observado na artrite reumatóide é o edema. A artrite reumatóide é uma doença crônica e, assim, níveis elevados de citocinas como a IL-6 e de seus receptores são encontrados em fluidos sinoviais e no soro de pacientes que sofrem desta doença (DE BENEDETTI; MARTINI, 2005; DE BENEDETTI, et al., 2006; GUERNE et al., 1989; HOUSSIAU et al., 1988; KOTAKE et al., 1996; ROBAK et al., 1999).

Ainda, a IL-6 está relacionada à gravidade da doença. Camundongos geneticamente modificados para não expressar a IL-6 apresentam uma depleção de proteoglicanas mais pronunciada do que animais que expressam a IL-6 em modelo experimental de artrite induzido por zimosan (VAN DE LOO; ARNTZ,; VAN DEN BERG, 1997). Entretanto, outros autores têm demonstrado que a IL-6 é capaz de desencadear artrite induzida por colagenase em camundongos (ALONZI et al., 1998). Ainda, anticorpos monoclonais anti-IL-6 são capazes de aliviar os sintomas da artrite induzida por colagenase em camundongos (TAKAGI et al., 1998).

Estudos clínicos preliminares com anticorpo monoclonal anti-IL-6 têm mostrado resultados positivos no tratamento de pacientes com artrite reumatóide refratária (BARTON, 1996; DINARELLO., 1991; SCHINDLER; GELFAND; TREPICCHIO et al., 1996; WENDLING; RACADOT; WIJDENES, 1993).

Quadro 1 - Principais citocinas do processo inflamatório

Quadro 1. Principais citocinas humanas e sua origem celular		
CITOCINA	PESO MOLECULAR (Kd)	ORIGEM CELULAR
TNF- α	17	Monócitos/Macrófagos, Fibroblastos, Linfócitos T, Linfócitos B, Eosinófilos, Astrócitos
TNF- β	25	Linfócitos T, Linfócitos B
IL-1 α e IL-1 β	17,5	Monócitos/Macrófagos, Células Endoteliais, Linfócitos T, Queratinócitos, Fibroblastos, Células da Glia, Astrócitos, Neutrófilos
IL-6	26	Monócitos/Macrófagos, Células Endoteliais, Fibroblastos, Linfócitos T, Linfócitos B, Neutrófilos
IL-8	6-8	Monócitos/Macrófagos, Fibroblastos, Condrócitos, Neutrófilos
IFN- γ	20-25	Linfócitos T, Linfócitos B

Fonte: LAU, A.S. *Cytokines in the pathogenesis and treatment of infectious diseases. Adv. Pediatr. Infect. Dis. V.9, p.211-36, 1994*³¹

1.3 Eicosanóides

Os eicosanóides estão implicados no controle de numerosos processos fisiológicos e estão entre os mais importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória. Os eicosanóides não são encontrados pré-formados nos tecidos; são produzidos a partir da via metabólica dos fosfolipídios. O interesse pelos eicosanóides surgiu na década de 30, após relatos de que o sêmen continha uma

substância que provocava contração do músculo liso uterino. Acreditou-se que a substância tivesse sua origem na próstata e, assim, recebeu a designação errônea de prostaglandina. Posteriormente, ficou claro que a prostaglandina não era apenas uma substância, mas uma família de substâncias, produzidas em muitos, se não na maioria, dos tecidos. A principal fonte de eicosanóides é o ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro ligações duplas (daí o termo “eicosa” para referir-se aos 20 átomos de carbono e “tetraenóico” para designar as quatro ligações duplas).

O AA é um ácido graxo liberado a partir dos fosfolipídios da membrana, tanto por meio da ação da seqüência da fosfolipase C e da lipase do diacilglicerol, como por meio da ação direta da fosfolipase A_2 sobre o fosfolipídio de membrana. Uma vez liberado, o AA é reesterificado ou metabolizado pela via da lipooxigenase ou pela via da ciclooxigenase (COX).

A COX é a enzima responsável pelo metabolismo do AA livre a prostaglandina- H_2 . Este complexo enzimático produz prostanóides a partir da ação de diversas enzimas específicas da classe das sintases (SMITH; MARNETT, 1991). Dentre os prostanóides formados, incluem-se a prostaglandina E_2 (PGE_2), a prostaciclina (PGI_2) e a tromboxana A_2 (TXA_2).

Pelo menos duas isoformas distintas da COX foram identificadas, COX-1 e COX-2 (VANE et al., 1994). A COX-1 é responsável pela produção de prostanóides com importante efeito sobre a homeostasia celular e algumas funções fisiológicas, por isso é expressa constitutivamente na maioria das células e tecidos (APPLETON et al., 1995). Entretanto, alguns autores admitem que a COX-1 possa ser induzida em algumas células sob determinadas condições (SMITH et al., 1994).

A segunda isoforma da COX, denominada COX-2 foi identificada a partir de observações “in vivo” e “in vitro”, mostrando o aumento da atividade da COX em resposta a estímulos inflamatórios, como citocinas e Lipopolissacarídeo (LPS). A COX-2 é regulada pelo glicocorticóide dexametasona (MASFERRER et al., 1992; VANE et al., 1994). Experimentos em Biologia Molecular sugeriram que os inibidores específicos da COX-2 poderiam atuar como anti-inflamatórios, preservando os efeitos fisiológicos da COX-1. Esta hipótese foi corroborada pela descoberta e síntese de anti-inflamatórios que, seletivamente inibem a COX-2, mas não interferem com os efeitos fisiológicos da COX-1.

Alguns autores mostraram que a COX-2 apresenta-se de forma constitutiva em diversos órgãos (ISEKI, 1995). De acordo com a literatura pode-se notar que as divergências a respeito do papel da COX na fisiologia celular e nos processos inflamatórios ainda são inúmeras. Isto chama atenção para a complexidade dos efeitos decorridos da atividade desta enzima.

1.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa de semivida curta com efeitos variados nos sistemas biológicos (GELLER et al., 1993). Identificado pela 1ª vez em 1987, como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), sabe-se ter ação importante na regulação do tônus vascular, função plaquetária, ação bactericida e moduladora do sistema imunológico (SNYDER; BREDET, 1992).

A evidência inicial do papel de óxidos de nitrogênio sobre o metabolismo veio de experimentos, demonstrando a produção de nitratos em

camundongos “germ-free” no início da década de 80 (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMANN, 1981). Em 1985, foi demonstrado que macrófagos ativados por lipopolissacarídeos bacterianos eram capazes de produzir nitritos e nitratos (STUEHR et al., 1991). Na seqüência, foi observado que a L-arginina era o substrato e a L-citrulina era formada como co-produto da reação (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987). Marletta et al.(1988), identificaram o NO como o produto da reação de oxi-redução da L-arginina.

Quase que simultaneamente, Furchgott investigava um fator vasodilatador associado ao endotélio vascular (endothelium-derived relaxing factor – EDRF) (FURCHGOTT et al., 1984) e, poucos anos mais tarde, concluiu-se ser o NO o responsável pela atividade biológica do EDRF (IGNARRO et al., 1987).

1.4.1 As isoenzimas da síntese do NO

Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemoproteínas da família citocromo P450-like, chamadas de NO sintase (NOS) (MARLETTA et al., 1988). As NOS são dependentes de O₂, NADPH, flavinas e biopterinas. Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. Estas três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e 17 (isoforma III) (WANG; MARDSEN, 1995).

A iNOS ou Isoforma II não é expressa constitutivamente, ou seja, não está presente de modo habitual, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolissacarídeos bacterianos e/ou citocinas (STUEHR et al., 1991). Esta isoenzima também pode ser chamada de macNOS (macrophage NO synthase). Vários autores consideram que qualquer célula do organismo apresenta a capacidade de produzir iNOS sob estímulos apropriados. Uma vez induzida, a iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo, caracterizando o seu envolvimento em vários processos inflamatórios. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos e outras células ativadas, que deveria ser tóxico para micróbios, parasitas ou células tumorais, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes (SNYDER; BREDET, 1992).

Sob o ponto de vista prático, as isoenzimas NOS podem ser caracterizadas como de baixo ou alto débito, conforme a duração da atividade da NOS. As isoformas I e III (cNOS e eNOS) são de baixo débito, estando envolvidas em processos homeostáticos como neurotransmissão, peristaltismo e controle imediato da pressão arterial (ZHANG; DAWSON; SNYDER, 1994). Considera-se a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de menor débito do que cNOS. Já a isoenzima II ou iNOS, quando estimulada permanece em atividade por horas com mecanismo de sinergismo de indução inclusive do próprio NO produzido (REES et al., 1990). Esta ação lhe confere uma importante característica podendo levar à morte da célula (NATHAN; XIE, 1994a; NATHAN; XIE, 1994b).

1.4.2 Aspectos fisiológicos e tóxicos do NO

As funções do NO até hoje descritas são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser, tanto benéfica, como potencialmente tóxica, conforme a sua concentração e depuração tecidual. Alguns autores, como Schmidt (1991), denominam muito apropriadamente o NO como uma "faca de dois gumes" (double-edged sword).

O NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores de membrana celular nas células alvos; estes receptores são, habitualmente, transmembranosos, tendo contato com o citoplasma e desencadeando uma "cascata" de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula. Devido às suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (IGNARRO et al., 1987).

Existe um tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para a ação antimicrobiana. No caso de doenças autoimunes e situações de sobrecarga exageradas do organismo, o NO encontra-se em concentrações tóxicas para as células do organismo. Portanto, o NO atua como toxina conforme a sua

concentração e o tecido em questão, devendo, ainda, ser considerada a capacidade de depuração tecidual.

Evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o NO contribui para algumas afecções, como Asma (HAMID et al., 1993), artrite reumatóide (SAKURAI et al., 1995), lesões ateroscleróticas e tuberculose (NICHOLSON et al., 1996).

A demonstração da produção de NO é, ainda difícil, sendo geralmente feita de maneira indireta. Aliás, as pesquisas pioneiras não demonstraram o NO propriamente dito, devido a sua evanescência, considerando-se a concentração de nitrito e nitrato como prova de sua produção. A determinação direta de NO é obtida utilizando-se metodologias complexas como ressonância eletrônica para-magnética, quimioluminescência e por detecção eletroquímica, utilizando sensores intravasculares (MORIYAMA et al., 2005).

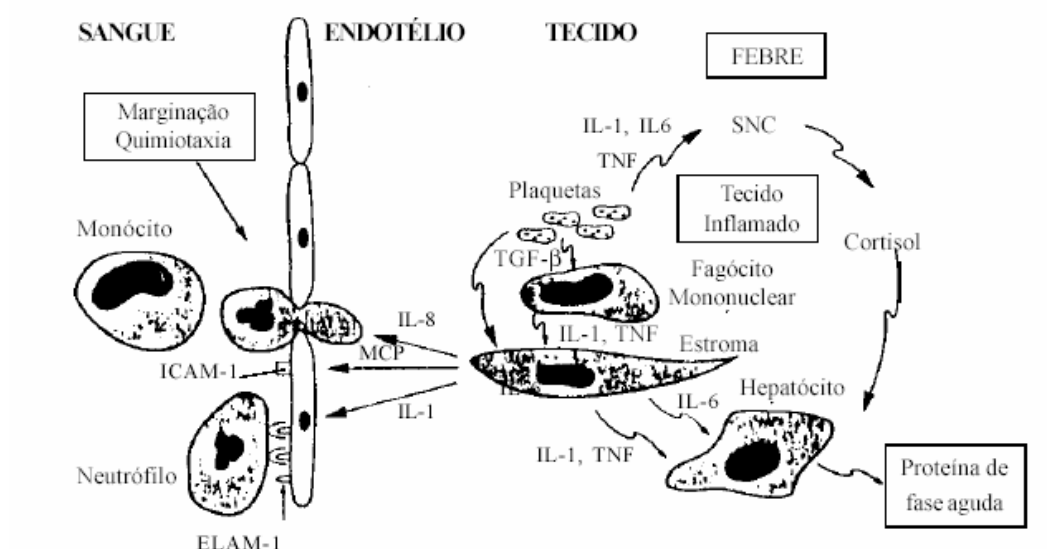


Figura 1 - Representação da inter-relação das citocinas, células e enzimas no processo inflamatório.

1.5 O uso da carragenina como agente flogógeno

Durante a década de 60, a carragenina passou a ser muito utilizada experimentalmente, principalmente por sua habilidade em induzir uma reação inflamatória aguda (DI ROSA, 1972 ; DI ROSA, SORRENTINO, PARENTE; 1972; DI ROSA; WILLOUGHBY 1971). Apesar da falta de conhecimento do mecanismo desta reação, centenas de compostos anti-inflamatórios foram desenvolvidos baseados neste ensaio.

A principal fonte de carragenina é a alga *Chondrus crispus*, também conhecida como Irish Moss, ocorrendo em Carragheen (Waterford, Irlanda), onde cresce abundantemente. Posteriormente, material de composição semelhante com propriedades similares foi isolado de outras algas incluindo *Gigartina stellata*, *Rhodymenia palmata* e outras.

A carragenina extraída da *Chondrus crispus* é um polissacarídeo sulfatado que pode ser separado em 2 frações. Uma fração transforma-se em gel sob a ação do íon potássio, sendo designada como K, e a outra que é insensível ao potássio foi chamada de lambda. As frações K e lambda representam, respectivamente, 40 e 60% do extrato não fracionado (DI ROSA, 1972).

O uso da carragenina como agente irritante para indução de edema na pata de rato foi introduzido por Winter; Riskey e Nuss (1962). Logo em seguida, o efeito da indometacina foi ensaiado utilizando este modelo, o qual com pequenas modificações tornou-se um dos métodos mais populares como teste para avaliação de drogas e terapias anti-inflamatórias (DI ROSA, 1972, MISIEWICZ et al., 1996).

1.6 Terapias antiinflamatórias

O estudo da reação inflamatória e o desenvolvimento de novas drogas ou terapias sempre dependeram da existência de modelos animais apropriados. Apesar da maioria das doenças inflamatórias severas apresentarem natureza crônica, os modelos de inflamação aguda são importantes e necessários (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

As doenças de origem inflamatória e não infecciosas são, tradicionalmente, tratadas com anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou não-esteroidais (AINEs) (DALE; RANG; VOEUX, 2004; ZANINI; OGA, 1994). Entretanto, terapias físicas como, estimulação elétrica (GERSH, 1990), ondas curtas (BOUWHUIJSEN, 1986; KO; CHEN; CHEN, 2001), irradiação infravermelha (MICHLOVITZ, 1990), acupuntura e ultra-som terapêutico de baixa e média intensidade (ZISKIN; MCDIAMID; MICHLOVITZ, 1990) e, também, com laser de baixa potência vêm ganhando espaço como alternativa de tratamento anti-inflamatório. Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos nesta área relatando vantagens em relação à terapia medicamentosa devido aos menores efeitos adversos produzidos por estas terapias físicas.

Vários trabalhos têm sido publicados para melhorar o entendimento dos efeitos da terapia Laser. Porém, apesar de todas as investigações realizadas e do importante uso clínico do laser de baixa potência, a aceitação desta terapia pode ser decorrente da publicação de trabalhos controversos na literatura, mostrando tanto efeitos benéficos como nenhum efeito da terapia com laser em baixa intensidade (BASFOR, 1995).

Muitos trabalhos não são publicados na língua inglesa, o que dificulta a sua circulação pelo mundo. É muito comum, também, que uma investigação falhe em

demonstrar um efeito particular devido à escolha de parâmetros incorretos (TURNÉR; HODE, 1998;1999). Há vários tipos de laser com diferentes especificidades e, ainda, pode haver falhas na dosimetria, modo de aplicação e modelo animal utilizado para o estudo. São encontrados muitos relatos sem controle adequado e com análise subjetiva dos resultados (BASFOR, 1995; VILLARROYA-APARICIO, 1994; VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004). No trabalho de revisão de Bjordal et al. (2006a), foi possível considerar apenas 19 trabalhos discutindo o efeito do laser como modulador do processo inflamatório, 15 trabalhos discutindo o laser como analgésico e 9 trabalhos em lesão de tecido, mostrando, mais uma vez, a dificuldade em se pesquisar esta terapia.

1.7 Laser de Baixa Potência (LBP)

A luz tem sido utilizada como agente terapêutico por séculos. Na Grécia antiga, o sol era empregado na helioterapia, ou seja, exposição do corpo à luz solar para a restauração da saúde (BASFOR, 1995). Partindo do princípio de que a luz pode curar doenças, a utilização do laser nas áreas biomédicas surgiu como consequência natural de suas propriedades e se iniciou com o aproveitamento de seus efeitos térmicos.

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

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

de 80, com a participação de pesquisadores de São Paulo. Posteriormente, trabalhos na área foram publicados por Genovese em São Paulo e Pinheiro e colaboradores, inicialmente na Inglaterra e, posteriormente, em Recife (BRUGNERA JR.; PINHEIRO,1998).

A palavra Laser é um acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação), e designa, atualmente uma vasta série de dispositivos com emissão de radiação eletromagnética em diversas faixas do espectro eletromagnético, desde raios X até a microonda. As características que diferem a luz laser da luz (branca) de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação, coerência (SCHAWLOW, 1995).

Baseado no conceito de energia quântica de Max Planck, Albert Einstein publicou, em 1917 o artigo “Zur Quantum Theori der Strahlung”, destacando o princípio da emissão estimulada de fótons. Entretanto, o primeiro laser no qual o espectro se encontrava na faixa de luz visível foi construído em 1960, por Theodore Maiman (1960). A partir daí, Maiman criou um campo fértil para estudos posteriores que culminaram em 1961, com a fabricação dos lasers de Hélio-Neônio (He-Ne), Neodímio-Yttrium Aluminium Garnet (Nd:YAG), o laser de Argônio (Ar) em 1962 e, em 1964, o laser de dióxido de carbono e os semicondutores como o Arseneto de Gálio (GaAs).

Nas ciências da saúde, a utilização do laser está baseada em fenômenos associados (reflexão, transmissão, absorção e espalhamento) à interação da luz coerente por um sistema biológico. Estes fenômenos possuem características distintas, e dependem dos componentes estruturais do meio ativo do laser e, ainda, de sua interação com os tecidos biológicos. O precursor de estudos com laser na Medicina foi Mester, mostrando resultados dos efeitos não-térmicos do laser;

também foi o primeiro a utilizar o termo “bioestimulação”, propondo que o laser poderia interagir com o tecido em diferentes níveis: molecular, celular, tissular e orgânico, com efeitos sinérgicos, similar ao que ocorre nas respostas do sistema imunológico (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: os lasers cirúrgicos de alta potência (HILT-High-Intensity Laser Treatment) e lasers não-cirúrgicos de baixa potência (LILT-Low-Intensity Laser Treatment). Em geral, quase todas as aplicações com HILT tomam por base os seus efeitos fototérmicos e fotoablativos sobre o tecido, assim, os lasers são utilizados para cortar, destruir tecidos, soldar, remover tatuagens, entre outros efeitos. Nas décadas de 60 e 70 os pesquisadores voltaram-se para as aplicações com LILT, e estas se baseiam nas interações atérmicas da luz do laser com o tecido, produzindo efeitos de Biomodulação (TURNÉR; HODE, 1998, OSHIRO, 1991).

A terapia com o laser de baixa potência (LBP) incide sobre as reações não térmicas (atérmicas) da luz com o tecido, ocasionando efeitos fotoquímicos (HONMURA et al., 1993; SCHAFFER et al., 2000), ou seja, radiações com baixa densidade de potência (DP) de 0,01 a 1W/cm² e, ainda, baixa densidade de energia (DE) de 1 a 10J/cm² (SCHINDL et al., 2000). Nestes limites, se produz um pequeno e não significativo aumento de temperatura, não ultrapassando 1º Celsius (KARU, 1987).

Al-Watban e Zhang (1999) e Maegawa et al. (2000), sugeriram que a variação da temperatura deste tipo de terapia resulta em um acréscimo de no máximo 1ºC, pois a energia dos fótons absorvidos por fotorreceptores de uma célula não será transformada em calor suficiente para produzir o efeito fototérmico. De outra forma, os efeitos do LBP poderiam ser explicados por efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/o

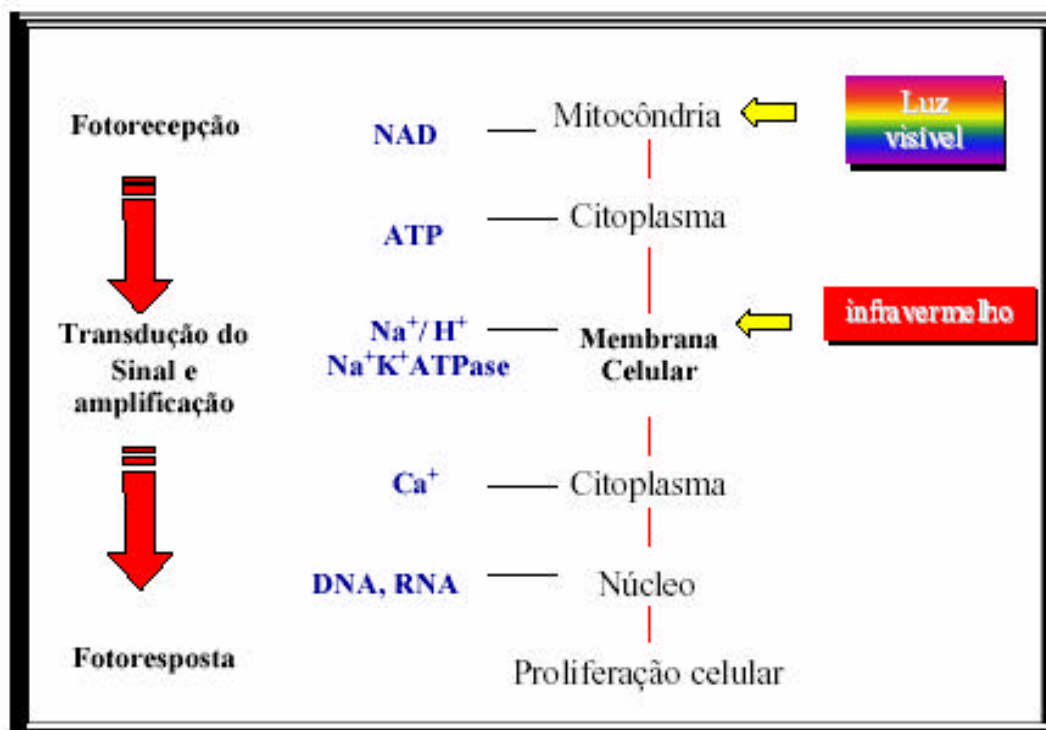
fotobiológicos sobre as células submetidas a este tipo de radiação. Esta radiação faz com que a energia possa provocar mudanças nas moléculas, que por sua vez promoveriam respostas biológicas. Estas respostas podem ocorrer em três diferentes níveis, onde os aspectos da fototerapia podem ser analisados: níveis moleculares, celulares e orgânicos.

A função fotorreguladora ocorre em função dos fotorreceptores presentes nas células. Os fotorreceptores são moléculas de variedade morfológica, que se encontram distribuídas nas células do organismo, entre elas: flavoproteínas, porfirinas, citocromo, tirosina, asparagina. Estas moléculas interferem no metabolismo celular sem a necessidade de energia luminosa. Entretanto uma vez que sobre elas incida uma radiação com comprimento de onda específico, são capazes de absorver os fótons da radiação e provocar variações no metabolismo celular. Assim, estas ações determinarão mudanças fotodinâmicas em cadeias complexas e moléculas básicas de processos fisiológicos com conotações terapêuticas (KARU,1999).

O LBP age, principalmente, sobre mitocôndrias e membranas, gerando o aumento da síntese de ATP, modificando o transporte iônico. Estes processos ocorrem por meio dos fotorreceptores celulares, descritos acima. Desta forma o LBP acelera, em curto prazo a glicólise e a fosforilação oxidativa e, em longo prazo a transcrição e a replicação do DNA (KARU,1987).

A luz laser estimula a atividade energética da membrana celular, induzindo processos de bioestimulação (BASFORD et al., 1995), conduzindo à liberação de fatores de crescimento por macrófagos (YOUNG et.al., 1989), proliferação de queratinócitos (HAAS et al, 1990), aumento da população e degranulação de

mastócitos (EL SAYED; DYSON, 1996) e angiogênese (SCHINDL et al., 2000) e, ainda aceleram o processo cicatricial de feridas (RABELO et al., 2006).



Adaptado de SMITH, K. ⁴⁷

Figura 2-Representação esquemática da ação do LBP

Dois diferentes meios são os mais utilizados nas aplicações de terapia laser de baixa potência. O laser de hélio e neônio (He-Ne), operando em um comprimento de onda de 632,8nm (luz vermelha) ou, alternativamente, semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (As-Ga-Al) que, tipicamente produzem radiação na faixa situada entre 630 e 950nm (vermelho visível até o infravermelho próximo) (KITCHEN; BAZIN, 1996).

Karu (1998) demonstrou alguns efeitos biológicos associados à terapia com LBP, tais como: crescimento celular estimulado (tecidos conjuntivo, tendinoso e ósseo), reparação celular (aceleração nas células nervosas), efeito antiinflamatório (redução da capacidade dos linfócitos em reagir a estímulos antigênicos), redução

de edema/revascularização (aceleração na regeneração de vasos linfáticos e veias), redução da formação de tecido fibroso (reduz/retarda a fibrose tissular após injúrias teciduais), maior atividade tissular (mudanças no conteúdo de prostaglandina, maior conteúdo de enzimas específicas, aumento da formação de produtos celulares) e função nervosa estimulada (aumento na amplitude dos potenciais de ação). Um aspecto importante da terapia com LPB é a necessidade de que o tecido biológico esteja de alguma forma em desequilíbrio homeostático; ou seja, alguns autores relatam que o LBP não apresenta efeitos sobre células ou tecidos que não apresentam algum tipo de alteração fisiopatológica (TURNÉR; HODE, 1998).

Ainda, no intuito de descrever os efeitos biológicos do laser, Karu (1998) demonstrou que os efeitos biomodulatórios desta terapia definem a bioestimulação como um fenômeno fotoquímico e/ou fotobiológico. Também é enfatizada a importante função dos fotorreceptores primários como componentes da cascata de eventos que ocorrem na cadeia respiratória nas mitocôndrias, estimulando reações de oxido-redução (redox) do metabolismo celular. A foto-ativação enzimática contribui para as reações químicas metabólicas, realizando a transdução do sinal luminoso detectado pelos fotorreceptores (processo onde a energia é transferida de um sistema a outro) a outras partes celulares (membranas), assim, inferindo na produção de uma fotorresposta (biomodulação). O quantum de luz ("pacote" de elétrons) é apenas o desencadeador do metabolismo celular. A magnitude do efeito biomodulador depende do estado fisiológico em que as células são encontradas no momento da irradiação, o que explica o motivo pelo qual os efeitos não seguem uma padronização.

Karu (1987) refere-se aos mecanismos de ação primária como aqueles referentes aos efeitos da foto-excitação de estados eletrônicos, tais como: mudanças

nas propriedades redoxes dos componentes da cadeia respiratória, após a excitação dos seus estados eletrônicos, liberação de óxido nítrico (NO) do centro catalítico do citocromo *c* oxidase, formação de oxigênio singlete, aquecimento transitório local de cromóforos receptores e aumento da produção do ânion superóxido, com o subsequente aumento na concentração dos produtos de sua dismutação. Também são descritos mecanismos secundários, tais como: metabolismo celular e síntese de colágeno mais acentuada em fibroblastos, aumento do potencial de ação de células nervosas, estímulo da formação de DNA e RNA, efeitos sobre o sistema imunológico, formação de capilares mais pronunciados pela liberação de fatores de crescimento, aumento de atividade de leucócitos, aumento das radiações emitidas sobre as células. Neste mesmo contexto, Karu (1998), ainda sugere que a enzima citocromo *c* oxidase seria o provável fotorreceptor.

Kamikawa e Tawa (1987) corroboram que a irradiação infravermelha sobre os cromóforos, por razões de propriedades fotofísicas e fotoquímicas, é importante para desencadear a cascata de eventos metabólicos sobre as membranas celulares (provavelmente os canais de cálcio), conduzindo à mesma resposta terapêutica final.

Células com pH mais baixo que o normal são consideradas mais sensíveis à ação estimuladora da luz, contribuindo para as diferenças de efeito observadas após a LLLT. O mecanismo de regulação redox proposto por Karu (1998) e descrito acima, pode explicar alguns efeitos clínicos da radiação. Por exemplo, os resultados positivos obtidos em tratamento de feridas e inflamações crônicas, ambas caracterizadas por acidose (pH diminuído) e hipóxia (pO_2 , tensão de oxigênio, diminuída). A transdução e a amplificação do sinal fotobiológico da célula conduziria a uma cascata de reações ligadas a alterações nos parâmetros da homeostase celular, que poderiam acontecer em ausência de luz. Ainda, de acordo com Karu

(1987), não se pode ter uma visão reducionista destes efeitos e imaginar que somente um destes processos possa ocorrer quando uma célula é irradiada.

Apesar de existir uma grande quantidade de estudos mostrando os efeitos da LLLT sobre as células em diferentes situações metabólicas, é importante ressaltar que as informações sobre o mecanismo de ação dos efeitos do laser não-térmico sobre os tecidos biológicos ainda não são conclusivas. Assim, estudos que permitam compreender o tipo de sinalização celular desencadeado pelo laser se fazem necessários.

1.7.1 Características da radiação laser

As características que identificam e diferenciam a luz laser das outras ondas luminosas são: monocromaticidade, colimação, coerência.

A monocromaticidade indica que cada meio que gera laser vai corresponder, idealmente, a um único comprimento de onda. Esta característica é considerada a mais importante da luz laser pois, determina quais moléculas absorverão a radiação e, portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos específicos (BAXTER, 1997).

A colimação refere-se ao alto grau de paralelismo do feixe laser, mantendo um pequeno tamanho do feixe em uma distância relativamente grande (BAXTER, 1997).

A coerência é a sincronicidade das ondas da luz, podendo ser temporal, quando estas se encontram em fase; ou espacial, quando os fótons estão ajustados em planos espaciais paralelos entre si e, portanto, são assim mantidos em grandes distancias (BAXTER, 1997; KITCHEN; BAZIN, 1996).

1.7.2 Parâmetros de irradiação

Os parâmetros que descrevem o laser são: tipo, comprimento de onda, potência, forma de emissão do feixe, densidade de potência e densidade de energia. Quando utilizamos o aparelho laser temos de escolher o comprimento de onda e ajustar alguns parâmetros como densidade de potência, densidade de energia e, para obter os efeitos fisiológicos desejados, esses parâmetros são ajustados de acordo com a doença a ser tratada. A densidade de energia é o parâmetro mais importante, pois, este determina a energia entregue ao tecido biológico, uma vez que a resposta fisiológica é dose-dependente (BASFOR, 1989; YEW; LING; CHAN, 1982).

A densidade de potência ou irradiância (DP) é definida como sendo a potência óptica de saída do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm^2 . É através do controle da irradiância que se pode gerar fotobio-ativação ou fotobio-inibição, com LPB. Este parâmetro é considerado o mais importante nos trabalhos em culturas de células (KARU, 1998).

Outro fator sobre o qual o clínico tem controle é o tempo de aplicação. Multiplicando a irradiância pelo tempo de aplicação (em segundos), pode-se obter a fluência ou densidade de energia (DE) em J/cm^2 . A DE é o parâmetro que o clínico deve se ater, uma vez que é este determina a quantidade de energia que o tecido está recebendo. A dosimetria ótima para a terapia com LBP ainda é desconhecida, sendo, portanto, uma questão controversa.

O comprimento de onda (?) é extremamente importante, pois é ele quem define a profundidade de penetração no tecido alvo (FULLER, 1983). Diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido. As radiações emitidas nas regiões do ultravioleta e do infravermelho

médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na superfície. No entanto, nas regiões do vermelho e do infravermelho próximo (630 e 840nm) constata-se baixo coeficiente de absorção, implicando em máxima penetração no tecido. É importante ressaltar que existe uma janela óptica terapêutica entre 600 e 1.300nm, permitindo a penetração da radiação até níveis mais profundos (BRUGNERA JR.; PINHEIRO, 1998; SCHAWLOW, 1995)

1.7.3 Interação Laser-tecido

A luz laser, ao incidir em um meio, pode ser refletida, transmitida, espalhada ou absorvida.

A reflexão varia com o ângulo de incidência da luz e as propriedades ópticas da superfície do tecido. Anderson e Parrish (1981) demonstraram que a reflexão da pele quando se incide laser perpendicularmente é de 4-7%, variando para mais com a aplicação de pomadas, líquidos e secreção sebácea. Então, 93-97% da radiação incidente sobre a superfície penetra nos substratos subseqüentes, encontrando substâncias com índices de refração diferentes. Desta forma os fótons vão se distribuir de acordo com a absorção de cada estrutura, determinando qual comprimento de onda, cada estrutura será capaz de absorver, promovendo, desta forma, transformações na atividade funcional e metabólica da célula (MICKINLEY, HARLEN, WHILLOCK, 1988).

Como mencionado anteriormente, as características que diferem a luz laser de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência (SCHAWLOW, 1995). A coerência se perde nos primeiros extratos da pele. Isto ocorre devido à grande variedade de estruturas celulares que compõem a pele (HACZEKI; TAMURA.;1989). Apesar da perda da coerência da radiação do LBP no interior dos

tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo, tanto em tecidos superficiais, como profundos (SVAASAND, 1990). O efeito de biomodulação com o LBP é dependente do comprimento de onda, da dose e da intensidade da luz utilizada na irradiação (FEDOSEYEVA et al.,1988).

Dentre os modos de interação, a absorção é considerada como o mais importante, em termos da base fotobiológica da laserterapia, pois, sem a absorção, não seriam possíveis efeitos fotobiológicos e, portanto, clínicos. Esta absorção ocorre quando um fóton de luz interage com um átomo ou molécula, sendo a diferença expressa em termos de energia das bandas de valência equivalente à energia transportada pelo fóton. (KITCHEN; BAZIN, 1996).

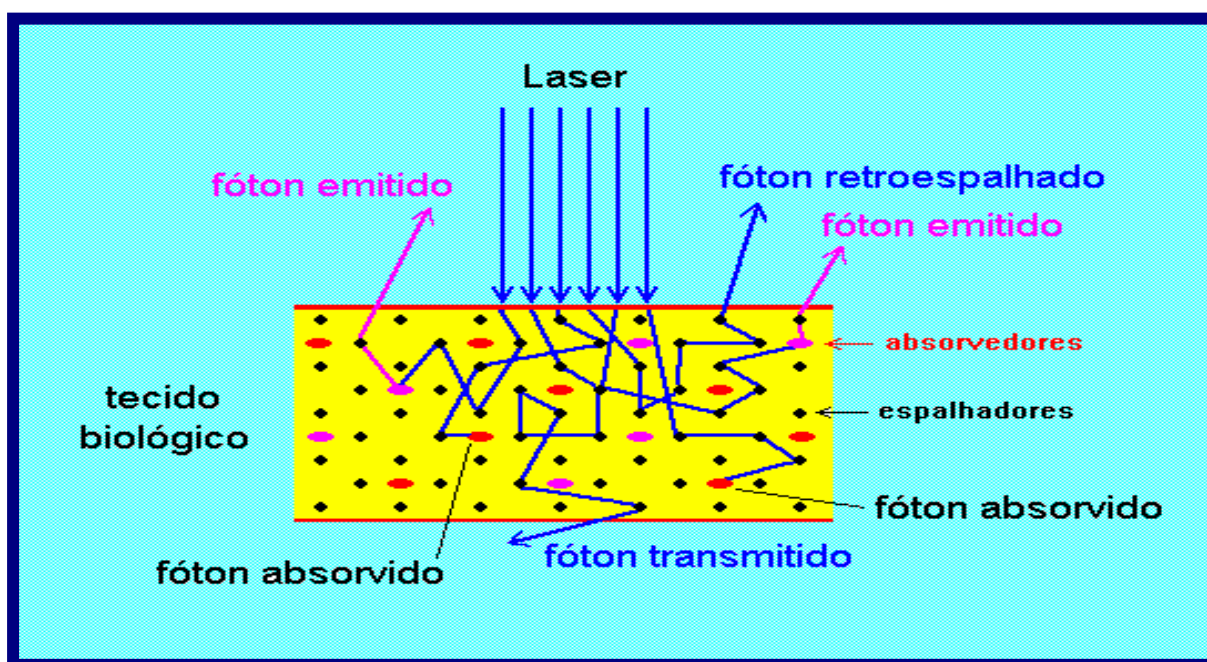


Figura 3 - Interação laser-tecido biológico

1.7.4 Laser de Baixa Potência (LBP) e inflamação

Acredita-se que a ação do LBP sobre o tecido esteja relacionada à possibilidade desta terapia inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação; interferir com os efeitos dos mediadores químicos sintetizados na inflamação (CAMPANA et al., 1998, CAMPANA et al., 1999); inibir a síntese das prostaglandinas (SATTAYUT; HUGES; BRADLEY, 1999), além de modular o tônus do esfíncter pré-capilar através de mediadores químicos. O uso de lasers na prática clínica como antiinflamatório em diferentes patologias, baseia-se em um reduzido número de publicações de caráter científico (DEVOR, 1990; VILLARROYA-APARICIO, 1994).

A terapia com LBP vem sendo utilizada no tratamento de diferentes processos inflamatórios, principalmente aqueles que acometem o sistema músculo-esquelético, como artrite reumatóide (BROSSEAU et al., 2000; GUR; COSUT; SARAC, 2003) e tendinites (VASSELJEN, 1992).

As vantagens terapêuticas do LBP têm sido reportadas por vários autores. Estes relatam os efeitos benéficos da aplicação do laser em processos inflamatórios, sugerindo vantagens terapêuticas comparadas aos placebos e a outros tratamentos (AIMBIRE et al, 2005; AIMBIRE et al, 2006; ALBERTINI, 2004; BASFORD, 1986; BASFORD, 1989; BASFORD, 1993; BASFORD, 1995; BAXTER, 1993; BOULNOIS, 1985; CAMPANA et. al., 1998; CAMPANA et al., 1999; DOURADO et al., 2003; FRETZ; ZHOUNG; 1992, HERMAN; KHOSLA; 1989, HEUSSLER et al., 1993; HONMURA et al., 1992; HONMURA et al., 1993; KING, 1990; KITCHEN; PARTRIDGE; 1991, LONGO et al., 1987; NOMURA; YAMAGUCHI; ABIKO, 2001; OZAWA; SHIMIZU; ABIKO, 1997; SHEFER et.al., 2001).

Goldman et al. (1980) demonstraram que pacientes portadores de artrite reumatóide obtiveram melhora no quadro clínico quando irradiados com laser de diodo As-Ga-Al (780nm) com $DE=2,3J/cm^2$. England e col. (1989) compararam a laserterapia e a terapia medicamentosa com o antiinflamatório naproxeno sódico (550mg) no tratamento de pacientes com tendinite bicipital e do músculo supra-espinhoso. Os autores observaram melhora significativa da dor, mobilidade e função nos pacientes tratados com LBP (AsGa) quando comparados com o tratamento medicamentoso. Brosseau e col. (2000) estudaram a terapia com LBP em pacientes com artrite reumatóide e observaram 70% de redução da dor em relação ao placebo e aumento de 1,3 cm de flexibilidade.

O tratamento convencional das doenças que atingem a musculatura esquelética inclui uma variedade de corticosteróides e outros agentes capazes de modificar a doença inflamatória, tais como ciclosporina e imunoglobulinas por via intravenosa (PILKINGTON; WEDENBURG, 2005).

Embora tenham sido descritas evidências clínicas de alívio da dor na artrite inflamatória, a terapia laser ainda apresenta resultados controversos, visto que alguns autores não observaram eficácia do laser sobre a função de células inflamatórias, tais como monócitos (BOUMA; BUURMAN ; VAN DEN WILDENBERG, 1996). Entretanto, alguns estudos mais recentes revelaram que a terapia com LBP foi eficaz sobre o acúmulo de PGE_2 e a formação de edema tanto em modelos experimentais “in vitro” como “in vivo” (CAMPANA et al., 1999; ALBERTINI et al., 2004).

Honmura et al. (1992), relataram uma significativa melhora do quadro inflamatório quando comparado ao grupo controle, utilizando laser com $\lambda=780nm$, $DE=2,3J/cm^2$ (30 seg. por cada ponto irradiado) em modelo inflamatório de edema

de pata e “air-pouch” induzido por carragenina. Este mesmo grupo de pesquisadores, em 1993 relatou redução da dor comparada à utilização da indometacina, sugerindo que o efeito não deve ser dependente de opióides endógenos, uma vez que o efeito foi revertido por naloxano.

Lee; Wong e Mason (1996) utilizaram diodo AsGaAl (830nm) para tratamento de síndrome cérvico-torácica, observando a redução da dor e a reversão do espasmo muscular. Utilizando laser de He-Ne (632,8nm), $DE=1J/cm^2$, durante 14 dias consecutivos no tratamento de tendão pós-cirúrgico, foi observada a melhora nas condições biomecânicas (aumento na força de tensão) e no processo de reparação (REDDY et al., 1998). Huang; Queshi e Biundo Jr (2000), realizaram um estudo de revisão sobre o tratamento de diferentes doenças (bursites, tendinites e DORT) com LBP e observaram a melhora dos pacientes tratados com laser em relação ao placebo e/ou controle.

As desordens têmporo-mandibulares também podem ser tratadas com a terapia laser, uma vez que nesta alteração a dor é referida pelos pacientes. Conti (1997) estudou o efeito do LBP sobre pacientes que apresentavam dor têmporo-mandibular. Os resultados mostraram que o laser de Arseneto de Gálio Alumínio (As-Ga-Al, 830nm) aliviou a dor de pacientes com dor miogênica e artrítica, quando comparando ao efeito placebo.

Flemming, Cullum e Nelson (1999) observaram o efeito do LBP sobre pacientes portadores de úlcera venosa. Estes autores demonstraram que a irradiação somente com laser não foi eficaz, porém ao associar a luz laser com a luz infravermelha, a cicatrização foi mais rápida e de melhor qualidade. Ainda que controversos, a maioria dos resultados revelou eficácia da terapia com LBP.

Considerando estes resultados, independentemente do tecido e da doença investigada, a terapia com LBP se mostra capaz de interferir em distintos níveis celulares. Evidências clínicas têm mostrado a eficácia do laser em diferentes processos de indução da inflamação, aliviando a dor e reduzindo o edema. De fato, o laser parece estabilizar a resposta inflamatória, ainda que, buscando a melhor resposta, a dosimetria ideal, seja um paradoxo entre os pesquisadores e clínicos.

No que diz respeito ao efeito do LBP em reduzir a dor inflamatória, a literatura ainda reporta dados controversos. Além disso, embora alguns resultados sejam importantes, a medicina tradicional ainda observa com ceticismo os efeitos antiinflamatórios do laser. Provavelmente porque, apesar de vários estudos que mostram a eficácia antiinflamatória do laser, muito pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desta terapia. A partir dos resultados obtidos, vários grupos de pesquisa têm formulado hipóteses para explicar como o LBP é capaz de reduzir a dor inflamatória, principalmente aquelas relacionadas às afecções que acometem a musculatura esquelética.

Bjordal et al. (2006a) realizaram um estudo sistemático de revisão da literatura mostrando os possíveis mecanismos de ação e os efeitos clínicos da terapia com LBP. Nesta revisão, Bjordal concluiu que a terapia com LBP pode modular processos inflamatórios de maneira dependente da dose e, ainda, que esta terapia reduz significativamente a dor inflamatória na clínica médica. Desta forma ainda que muito controversa e pouco explorada, a terapia com LBP aparece como importante adjuvante no controle das reações inflamatórias, com destaque para a dor e o edema, em pacientes portadores de desordens que acometem o sistema músculo-esquelético.

Entretanto, existe uma dificuldade muito grande em se comparar os diversos trabalhos devido à grande diversidade de modelos e a falta de parâmetros adequados.

2 . OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo investigar o mecanismo de ação do laser de baixa potência na região do visível (vermelho) sobre o processo inflamatório agudo, utilizando, os modelos clássicos de edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo 1

Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, De Nucci G, Castro-Faria-Neto HC, Zangaro RA, Lopes-Martins RA. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J Photochem Photobiol B**. 2004 May 27; 74 (2-3):101-107.

Os resultados descritos neste primeiro estudo demonstraram a eficácia da terapia com LBP em modular a resposta inflamatória, sendo dependente da dose e do momento da irradiação.

Artigo 2

Lopes-Martins RA, Albertini R, Martins PS, Bjordal JM, Faria Neto HC Spontaneous effects of low-level laser therapy (650nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. **Photomed Laser Surg.** 2005 Aug; 23(4): 377-381.

No presente estudo a terapia de LBP foi capaz de reduzir a migração de células inflamatórias (neutrófilos) para o lavado pleural, quando os animais foram tratados com LBP com densidades de energia de 3; 7,5 e 10 J/cm² após a indução da inflamação.

Artigo 3

Lopes-Martins RA, Albertini R, Lopes-Martins PS, de Carvalho FA, Neto HC, Iversen VV, Bjordal JM. Steroid receptor antagonist mifepristone inhibits the anti-inflammatory effects of photoradiation. **Photomed Laser Surg.** 2006 Apr; 24(2): 197-201.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que, após o bloqueio dos receptores para cortisol a terapia de LBP não foi capaz de inibir a migração de células inflamatórias para a cavidade pleural dos animais.

Artigo 4

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MAC, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS. Effect of Low Level Laser Therapy (LLLT) on Carrageenan-induced Acute Inflammation in Rat Paw. **Submetido a “J Photochem Photobiol B.”**

Os resultados apresentados neste estudo mostraram por meio da análise histológica do tecido subplantar, que a terapia com LBP com $DE=7,5J/cm^2$ reduziu o influxo inflamatório, tanto na região entre as fibras musculares, como no tecido conjuntivo adjacente, não alterando a morfologia do tecido.

Artigo 5

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Silva JA, Bjordal JM, Brugenera A, Costa MS. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of paw rat submitted to carrageenan-induced inflammation after treatment with Low Level Laser Therapy (LLLT). **Submetido a “Arthr Res Therapy”**.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a ação do LBP sobre o mecanismo da inflamação aguda pode estar relacionado à modulação de citocinas inflamatórias, uma vez que após o tratamento com LBP foi observada a redução da expressão de RNAm para as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Artigo 6

Albertini R, Aimbire F Villaverde AB, Silva JA, Costa MS. "COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. **Inflammation research (2006), no prelo**

O presente estudo mostrou a inibição da expressão do RNAm para a COX-2 após a terapia com LBP em tecido subplantar de ratos submetidos ao modelo de inflamação aguda induzida por carragenina.

4. DISCUSSÃO

O efeito da terapia com LBP sobre doenças inflamatórias tem sido descrito, entretanto o seu mecanismo de ação antiinflamatória ainda é pouco explorado (AL-WATBAN ; ZANG 1999; CAMPANA et al., 1998; MIZUTANI et al., 2004). No presente estudo o autor se propõe a contribuir para a compreensão do mecanismo de ação do laser de baixa potência (LBP) sobre a inflamação aguda músculo-esquelética.

Inicialmente foram determinados os parâmetros de irradiação para o LBP sobre o processo inflamatório agudo, considerando como método de análise a medição do volume de edema, sendo este um dos principais sinais clínicos da inflamação (WILLOUGHBY et al., 2000).

Após a determinação dos parâmetros de densidade de energia (DE) e do tempo de irradiação, nosso estudo investigou o mecanismo de redução do edema pela terapia com LBP, considerando a possibilidade de que o LBP poderia modular a liberação dos mediadores químicos e a expressão de enzimas envolvidas no processo inflamatório.

Os efeitos do laser de baixa potência (LBP) são baseados em mecanismos não térmicos da luz sobre os tecidos biológicos (BASFORD, 1995; KITCHEN; BAZIN, 1996; KING,1990). Quando a luz interage com o tecido biológico induz efeitos de modulação sobre a atividade celular, através de mecanismos fotoquímicos; ou seja, ocorrem modificações nas funções celulares, tais como, a estimulação ou a inibição das atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas, promovendo a biomodulação (BASFORD, 1995).

A ocorrência do efeito de biomodulação é dependente do comprimento de onda, da Densidade de Energia (DE) e da Densidade de Potência (DP) utilizada (BECKERMAN et al., 1992; DE BIE et al., 1998).

O comprimento de onda escolhido no presente estudo foi determinado, baseando-se na grande maioria de trabalhos científico relatados na literatura e que utilizam comprimentos de onda na região do vermelho (KOLARI, 1985). Desta forma, se avaliou os efeitos antiinflamatórios de lasers operando com comprimentos de onda de 650, 660 e 684nm.

Heussler et al. (1993), mostraram que a radiação com laser de diodo é segura e eficiente, uma vez que o aparelho produz um feixe de luz com características de monocromaticidade, coerência e colimação permitindo controle da densidade de potência e da densidade de energia capaz de promover efeitos biológicos sem dano tecidual.

Em geral, os lasers semicondutores operando na faixa de 600-1300nm têm sua radiação pouco absorvida pelo componente aquoso e hemoglobina, uma vez que seus comprimentos de onda estão localizados na janela óptica terapêutica do espectro eletromagnético (TURCYNSKI; CIESLAR; SIERON, 1993). A absorção é facilitada para cromóforos a uma profundidade de 2 a 3 cm (TURNÉR; HODE, 1999).

Em relação às características do laser que o diferem da luz branca, existem dúvidas se todas as características são necessárias para criar uma reação fotobiológica ou se apenas a monocromaticidade seria suficiente (LAAKSO; RICHARDSON; CRAMOND, 1993). Inicialmente, os efeitos do laser foram atribuídos à coerência da radiação, embora, atualmente, não existam bases físicas que expliquem a necessidade da coerência para a produção dos efeitos fotobiológicos (KARU, 1987). Hoje, na literatura, ainda que preliminares, são encontrados estudos

com LED (**L**ight-**E**mitting **D**iode) mostrando que os efeitos biológicos não são dependentes da coerência (MARQUES, 2004).

Entretanto, alguns autores consideram que a coerência, a monocromaticidade e a colimação são muito importantes nos tecidos vivos, pois são estas características que asseguram a penetração (OSHIRO, 1991).

Turnér e Hode (1999) consideram que a coerência é diminuída no caso de reflexão difusa, mas não se anula totalmente; além do que, a luz não coerente é menos eficiente e, provavelmente, atua apenas sobre as estruturas superficiais. Labbe et al. (1990) mostraram que a absorção de luz não coerente é extremamente baixa, podendo explicar a necessidade de uma luz coerente, para que energia suficiente seja absorvida e promova a conversão de um fóton iniciador em energia bioquímica, gerando compostos de alta energia, como o ATP.

Nossos resultados demonstraram que a terapia com LBP apresentou efeito antiinflamatório quando utilizado com densidade de energia de 1 ou 2,5J/cm², e com no mínimo 2 aplicações, à partir da 1^o hora após a indução da inflamação por carragenina. Contudo, quando a terapia foi repetida por 3 vezes, observamos resultados mais pronunciados, obtendo uma inibição de 50% no volume de líquido extravasado. Este mesmo resultado foi encontrado ao se irradiar apenas uma vez com DE total de 7,5J/cm². Este resultado está de acordo com vários trabalhos publicados mostrando que, a energia absorvida pelo organismo é cumulativa (OSHIRO, 1991; KARU, 1987).

Honmura et al. (1992) analisando o efeito terapêutico do LBP (As-Ga-Al) em modelo inflamatório de edema de pata induzido por carragenina observaram a redução do edema (20-30%), o que corrobora com nossos resultados.

A respeito do mecanismo de ação do LBP sobre a redução do edema, alguns autores sugerem que os componentes celulares (fotorreceptores) podem absorver fótons fornecidos através da energia do LBP e acelerar a produção de ATP, fornecendo assim, energia para a célula e modulando a resposta inflamatória (BREITBART et al., 1996; LUBART et.al., 2005; MANTEIFEL; BAKEEVA; KARU, 1997; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Os fotorreceptores presentes na célula são capazes de absorver energia da radiação do LBP na região do espectro eletromagnético, com comprimentos de onda variando entre 600 e 700nm (região visível). Nesta região a energia eletromagnética seria absorvida pela citocromo c oxidase estimulando a cadeia respiratória e aumentando a produção do ATP mitocondrial (WILDEN; KARTHEIN., 1998; YU et.al., 1997).

Nesta mesma linha, Wilden e Karthein (1998) sugerem que a luz fornece energia à célula, assim como a quebra de ligações químicas, levando ao aumento do fluxo de elétrons na cadeia transportadora destes com conseqüente aumento na produção de ATP.

Considerando a faixa de radiação do vermelho (632,8-685nm), podemos considerar que, tanto a penetração no tecido, como a resposta dos fotorreceptores poderia ser muito similar, nesta faixa. Nossos resultados mostraram que, mantendo os parâmetros de potência e densidade de energia, o tratamento da inflamação com diferentes comprimentos de onda: 650, 660 e 684nm, não mostrou diferença.

Devemos considerar o efeito primário do laser sobre os fotorreceptores, no entanto, é fundamental o estudo das células e dos mediadores químicos da inflamação, pois, independente da natureza do estímulo lesivo, as células do sistema mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos teciduais) iniciam a

casca de eventos da resposta inflamatória aguda, secretando em uma etapa inicial as citocinas da família IL-1 e TNF-a, sendo que estas citocinas apresentam ação pleiotrópica, local e sistêmica (GAULDIE et.al., 1987).

Inicialmente, agem sobre os fibroblastos e células endoteliais, causando a liberação de um segundo conjunto de citocinas (IL-6 e IL-8) e proteínas quimiotáticas dos macrófagos. Por sua vez, IL-1, IL-8 e as proteínas quimiotáticas dos macrófagos atraem para o sítio inflamatório monócitos e neutrófilos que secretam TNF-a e outros fatores quimiotáticos, retro-alimentando o processo inflamatório. (OKUSAWA et.al., 1988; SEBBAG et al., 1997; WILLIAMS; GIROIR, 1995).

A figura a seguir sintetiza as possíveis interações da radiação laser na cascata de eventos da resposta inflamatória aguda; que é discutida a seguir.

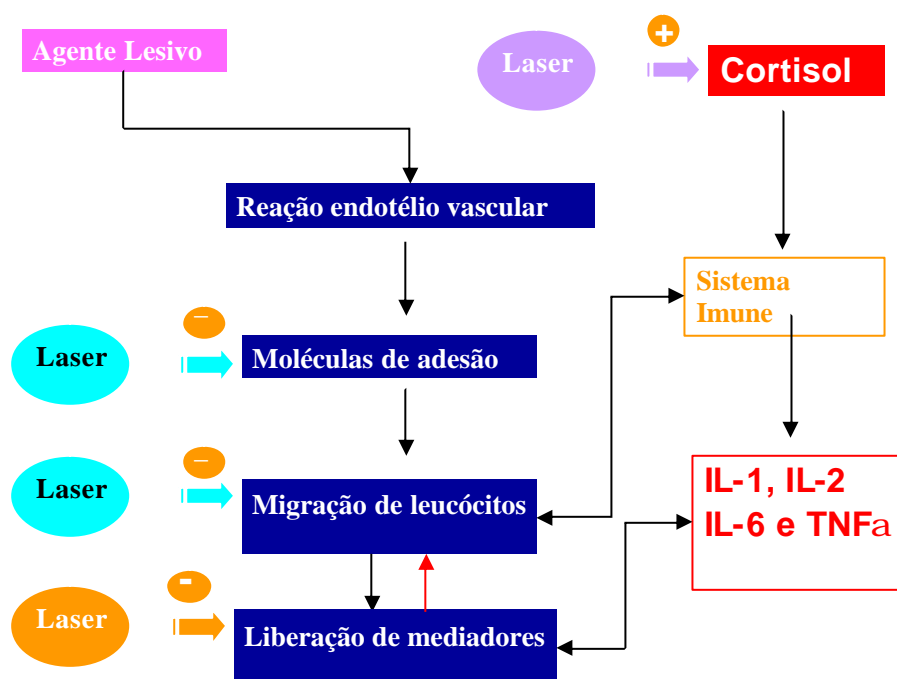


Figura 4 - Esquema sugerido para o mecanismo de ação do Laser de Baixa Potência

Nossos resultados mostram que a terapia com LBP foi capaz de reduzir a expressão de RNAm para COX-2, iNOs , TNF- α , IL-1 e IL-6. Estas citocinas são fatores desencadeantes, participantes e perpetuantes da cascata inflamatória conforme relacionado acima.

Uma vez que nossos resultados mostraram a redução da expressão de RNAm para a enzima iNOs , podemos ressaltar que alguns estudos mostraram uma íntima relação entre iNOS e o processo inflamatório (VANE et al., 1994), tornando o NO alvo da ação de terapias antiinflamatórias. Utilizando bioluminescência, Moryama et al. (2005) mostraram que o NO está presente nos processos inflamatórios e que a sua regulação pode ser mediada através da fototerapia, dependendo do comprimento de onda utilizado e da dose escolhida.

Bjordal et al. (2006b) demonstraram que a terapia com LBP apresenta ação antiinflamatória em tendinite de Aquiles, devido a diminuição da PGE_2 . Estes eicosanóides são responsáveis por diferentes fases do processo inflamatório agudo e crônico em doenças como a artrite, a tendinite e a lesão hemorrágica.

Campana et al. (1998) sugerem que a resposta inflamatória pode ser normalizada ou reduzida pela ação fotoquímica do LBP agindo como seletivo da COX-2, visto que a redução do fibrinogênio plasmático obtida com LBP foi semelhante àquela provocada por diclofenaco sódico. Nossos resultados mostraram a queda na expressão do RNAm para COX-2 após a terapia com LBP. Sattayut; Huges; Bradley (1999) investigaram o efeito do laser As-Ga-Al (820nm) sobre a produção de PGE_2 em cultura de células estimuladas com IL-1 β e mostraram a inibição da síntese de PGE_2 , sugerindo ser este o mecanismo analgésico para as dores músculo-esqueléticas.

Em um modelo de artrite reumatóide induzida por hidroxiapatita em ratos, Campana et al. (2004) observaram a redução nos níveis de FP, PGE₂ plasmático e PGE₂ sinovial após o tratamento com LBP (632,8nm) com DE=8J/cm². Estes resultados sugerem que o LBP pode inibir os efeitos quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação ou podem interferir com os mediadores químicos, inibindo a COX. Nossos resultados mostraram que a terapia com LBP atua sobre os estágios iniciais da inflamação, conforme sugerido por Campana et al. (2004), uma vez que foi observada a redução do RNAm para a COX-2.

Nossos resultados mostraram ainda que, a terapia com LBP reduziu a evolução da inflamação induzida por carragenina, evidenciando um perfil de resposta antiinflamatória semelhante ao diclofenaco de sódio (1mg/kg), associando este resultado ao de diminuição da expressão do RNAm para a COX-2, sugerindo que com a terapia LBP a participação dos eicosanóides na resposta inflamatória é reduzida.

É conhecido que os eicosanóides causam aumento da permeabilidade vascular, a vasodilatação e, conseqüentemente, a hipotensão arterial, durante a inflamação, e como conseqüência da menor participação destes eicosanóides no evento inflamatório como mostrado por meio do resultado de redução na menor expressão de RNAm para COX-2, justifica-se a redução do edema observada após a terapia com LBP.

Em nosso estudo foi observado o aumento do volume da pata, caracterizado como edema, após a indução da inflamação por carragenina. Muitos autores têm demonstrado que um dos principais responsáveis pelo início da inflamação é a presença de células inflamatórias no sítio da lesão (VOLTARELLI, 1994; MORRIS, 2003).

O aumento do número de células inflamatórias no tecido ocorre devido à interação entre o tecido lesionado e os leucócitos circulantes no sangue. Após o estímulo inflamatório, o endotélio vascular inicia a sinalização para a expressão de moléculas de adesão que vão facilitar a migração de células inflamatórias para o tecido lesionado. Liberados por células residentes, os mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (PGE_2), tromboxanas (TXA_2), leucotrienos (LTD_4), óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL- 1β e IL-6) modificam o tônus vascular por meio da vasodilatação, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular e, conseqüente, para o aumento do número de células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) para o sítio da lesão.

Nossos resultados demonstraram a capacidade do LBP em reduzir o número de células no sítio inflamatório, quando analisamos o processo inflamatório ao redor do tecido muscular e conjuntivo de pata de rato. Estes resultados permitem sugerir que o efeito antiinflamatório da terapia com LBP pode estar relacionado à modulação da resposta inflamatória em algumas das etapas da migração celular. Pode-se sugerir que, com a redução da migração de células inflamatórias para o tecido lesionado, a liberação de citocinas e de outros eicosanóides também estará reduzida.

Outros autores têm reportado o efeito da terapia com LBP sobre a cicatrização em ratos diabéticos, mostrando a redução da densidade de células inflamatórias e a diminuição do tempo de cicatrização (PESSOA et.al., 2004; RABELO et al., 2006). Estes resultados são de grande relevância, uma vez que na literatura é descrito que o endotélio vascular desempenha um importante papel na comunicação entre o sítio de inflamação e os leucócitos circulantes, tanto para a expressão de moléculas de adesão, que facilitam a migração de monócitos e

neutrófilos, como pela modificação do tônus vascular mediado pelo ácido araquidônico (FAN,.; MALIK., 2003). Ainda, a importância da redução da migração de monócitos e neutrófilos para o sítio da inflamação estão no fato de que estas células, depois de atraídas para o foco da inflamação secretam TNF- α , e outros fatores quimiotáticos, retro-alimentando o processo inflamatório (VOLTARELLI, 1994). Assim, a terapia com LBP estaria contribuindo para a quebra da retroalimentação positiva da inflamação.

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que o processo de migração de células inflamatórias, também possa ser o local de ação da terapia com LBP. A migração de neutrófilos (ou outros leucócitos) da circulação para o tecido requer diferentes fatores, tais como: moléculas de adesão, das famílias das selectinas, interinas e imunoglobulinas. A ativação e a “up-regulação” dos membros da família CD das integrinas (CD11/CD18) são a chave da ligação das moléculas de adesão intracelular (ICAM-1 e ICAM-2) na superfície das células endoteliais (PETERS et.al., 2006; MIZGERD et al., 1997). Assim, é possível que a eficácia da terapia com LBP sobre o modelo de inflamação aguda possa estar relacionada ao efeito do laser sobre algum dos eventos anteriormente descritos.

Um outro ponto importante a ser considerado está no envolvimento dos mediadores inflamatórios liberados pelas células que migram para o tecido lesado. Não podemos descartar a idéia de que a terapia com LBP poderia modular a ação de mediadores inflamatórios e, assim, reduzir a densidade de células inflamatórias. Assim, outro possível mecanismo de ação para o LBP sobre o processo inflamatório pode estar relacionado à modulação no mecanismo de produção de citocinas inflamatórias.

Têm sido mostrado o aumento da expressão de RNAm para algumas citocinas, particularmente TNF- α , IL-1 β e IL-6, durante a inflamação. De fato, o que torna possível a ação destes mediadores como agentes pró-inflamatórios é o aumento da expressão de RNAm para as citocinas acima descritas.

As citocinas inflamatórias podem ser divididas em citocinas capazes de atrair quimicamente células inflamatórias e em citocinas que, apesar de participarem do processo inflamatório, não apresentam esta capacidade. As citocinas inflamatórias TNF e IL-1 são capazes de induzir a expressão de moléculas de adesão sobre os polimorfonucleares (PMN).

Embora estas citocinas sejam capazes de promover a adesão das células inflamatórias sobre o endotélio vascular em modelos experimentais "in vitro", TNF e IL-1 não são suficientes para promover a migração das células inflamatórias (NEDREBO; BERG; REED, 1999). Para isso é necessária a presença de fatores quimiotáticos específicos que possibilitem a migração das células inflamatórias para o local da inflamação. Alguns fatores quimiotáticos promovem a expressão de moléculas de adesão sobre os PMN de maneira semelhante às respostas induzidas por TNF e IL-1 (SCHIFF, 2000; SEBBAG et al., 1997).

As duas citocinas importantes no que se refere à expressão de moléculas de adesão durante a maioria dos processos inflamatórios são exatamente TNF e IL-1 (NEDREBO et al., 2004), cuja principal fonte celular de ambos é os monócitos/macrófagos.

Alguns autores têm demonstrando que o TNF- α e a IL-1 β agem sinergicamente em diversas condições inflamatórias, sendo capazes de regular a inflamação através de estímulos constantes para a migração celular e a liberação de mediadores inflamatórios (GARBACKI et al., 2004).

Considerando que nossos resultados mostraram que a terapia com LBP foi capaz de reduzir a expressão do RNAm para as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, podemos sugerir que a quimiotaxia para as células inflamatórias também esteja reduzida, reduzindo assim a densidade de células no sítio inflamatório, conforme relatado anteriormente.

Os resultados do presente estudo referentes ao efeito da terapia com LBP sobre a expressão de RNAm podem estar relacionados à inibição, não apenas de uma única citocina, mas do efeito modulador do laser sobre a expressão de RNAm para o TNF- α e, conseqüentemente, reduzindo a expressão da IL-1 β . Alguns autores têm demonstrado que as alterações causadas pela IL-1 β durante o processo inflamatório são atenuadas quando os animais são tratados com drogas anti-TNF- α ou com antagonistas de seus receptores (DAYER; MOLNARF; BURGER., 2005).

Embora não tenha sido determinada a concentração de mediadores inflamatórios após a indução da inflamação e a terapia LBP, podemos sugerir que a redução da expressão de RNAm para TNF- α , IL-1 β e IL-6 estaria relacionada a diminuição da disponibilidade desses mediadores no sítio da inflamação.

Aimbire et al. (2006) demonstraram a redução dos níveis de TNF- α e da lesão hemorrágica em modelo de inflamação aguda pulmonar após o tratamento com LBP. Kettelhut; Fiers e Goldberg (1987), estudando os efeitos "in vivo" do TNF, tais como, febre, hipoglicemia e mortalidade, demonstraram que os inibidores da COX previnem esses efeitos. Estes resultados estão de acordo com Belvisi et al. (1997), estes autores demonstraram que o aumento da expressão de COX-2 em macrófagos está intimamente relacionado a síntese exagerada de prostanóides, após a exposição dessas células a IL-1 β e TNF- α . Pang e Knox (1997) demonstraram a liberação de prostanóides (PGE₂ e TXA₂) em resposta à estimulação com IL-1 β e TNF- α ainda

que, esta resposta seja mediada pela indução da COX-2 e não pela indução da isoforma COX-1 (SHI et.al., 2006).

A despeito dos resultados acima descritos não serem exatamente produzidos pelo modelo de inflamação induzida por carragenina, a interação entre os mediadores e, principalmente, a expressão do RNAm responsável pela síntese de cada um destes mediadores deve ser compreendida no contexto da inflamação, uma vez que a carragenina é apenas um entre vários estímulos capazes de induzir a inflamação aguda.

A partir dos resultados obtidos, podemos sugerir que o LBP modula a inflamação através da redução do número de células inflamatórias no sítio da inflamação por mecanismos dependentes da redução da expressão do RNAm para TNF- α , IL-1 β e IL-6. O LBP inibiu a expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 na mesma magnitude, assim nossos resultados não permitem dizer se o laser apresenta diferentes graus de inibição para cada citocina em questão.

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que a terapia com LBP possa modular a inflamação induzida por carragenina, agindo separadamente sobre a expressão do RNAm para cada citocina. Alguns autores têm demonstrado que o efeito antiinflamatório está ligado à ativação de fatores de transcrição tais como NF- κ B (HARVEY et al. 2005). Este fator de transcrição é o mesmo que estimula o aumento da expressão de RNAm para TNF- α , IL-1 β e IL-6. Assim, a ação antiinflamatória do LBP demonstrada em nossos resultados poderia estar relacionada à inibição de fatores de transcrição ligados a expressão de RNAm para as citocinas pró-inflamatórias.

Em contrapartida, foi observado que a terapia com LBP não reduziu a formação do edema induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados (retirada

da glândula adrenal). Utilizando o modelo de pleurisia induzido por carragenina, em animais tratados com mifepristone (antagonista dos receptores de corticóide), novamente o LBP não foi capaz de reduzir a inflamação. Estes resultados, ainda que primários, sugerem que o mecanismo de ação do LBP pode estar relacionado à estimulação do eixo endócrino hipotálamo-hipófise-adrenal e, conseqüente, seja dependente da liberação de corticóide endógeno.

Os glicocorticóides e as citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) são liberados frente a estímulos lesivos na tentativa de modular a resposta inflamatória aguda, entretanto, as citocinas pró-inflamatórias desencadeiam uma série de mediadores e fatores quimiotáticos que, prevalecendo sobre os efeitos do glicocorticóide e de outros fatores que apresentam função inibitória promovem a perpetuação da inflamação. (BLOM et al., 1997; UTSUNOMIYA et al., 1996).

A mais importante ação do corticóide sobre a inflamação é a inibição da síntese destas citocinas antes que a lesão tecidual seja agravada (VOLTARELLI, 1994). Assim, é possível que agindo como corticóide endógeno, a terapia com LBP seja capaz de reduzir a expressão de RNAm para IL-1 β e IL-6.

Ainda é razoável sugerir que, durante a terapia LBP possa ocorrer o predomínio do efeito dos glicocorticóides e de outros fatores de inibição, como as citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2 (IL-4 e IL-10), que antagonizam a produção de IL-1 β e IL-6 no sítio da lesão, promovendo a redução da resposta inflamatória aguda.

Estes resultados sugerem que pacientes que fazem uso de terapia com corticóides e tratados com LBP, devem suspender a terapia medicamentosa por, pelo menos, seis meses até o início do tratamento com LBP. O uso prolongado de

corticóides promove a redução da expressão de receptores para corticóides, contribuindo para o insucesso da terapia com LBP.

Considerando que os AINEs e os AIEs são as terapias farmacológicas mais freqüentemente utilizadas nas afecções músculo-esqueléticas e, ainda, que os efeitos colaterais deste tipo de terapia comprometem seu uso no longo prazo (PINHEIRO; CALIXTO, 2002), o LBP aparece como uma eficiente terapia alternativa de tratamento.

Bjordal et al. (2006b) demonstraram que a laserterapia de baixa potência, não somente reduz o processo inflamatório, como também melhora a reparação tecidual de uma maneira mais eficiente do que o uso de corticóides. Assim, o tratamento conservador com a terapia de LBP poderia ser indicado para as afecções inflamatórias, tais como: bursites, tendinites, DORT e fascíte plantar, na tentativa de minimizar a dor e os sintomas inflamatórios (HUANG; QUESHI; BIUNDO JR, 2000).

Nossos resultados reforçam o papel da terapia com LBP como terapia antiinflamatória, uma vez que o LBP foi capaz de reduzir o processo inflamatório em diferentes modelos experimentais. Ainda, a terapia com LBP apresenta maior eficiência, quando comparada com os antiinflamatórios convencionais, uma vez que estes últimos retardam o processo de reparação tecidual.

Tendo em vista a grande complexidade do processo fisiopatológico da inflamação e os efeitos adversos dos agentes antiinflamatórios convencionais (fármacos), podemos sugerir que a terapia com LBP proporciona uma ação específica direcionada às citocinas promovendo controle eficaz da inflamação.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a ação antiinflamatória da terapia com laser de baixa potência, na região do visível-vermelho, não ocorre em apenas uma, mas em diferentes etapas do processo inflamatório. Ou seja, o mecanismo de ação da terapia com LBP, atua na inibição da expressão de moléculas de adesão, na migração de leucócitos e/ou a liberação de mediadores inflamatórios, podendo ainda agir sinergicamente ao eixo hipófise-hipotálamo-adrenal potencializando seu efeito e/ou aumentando a liberação do cortisol endógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AIMBIRE, F.; ALBERTINE, R.; MAGALHÃES, R. G.; LOPES-MARTINS, R. A. B.; CASTRO FARIA NETO, H. C.; ZANGARO, R. A.; CHAVANTES, C.; PACHECO, M. T. T. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. **Lasers Med Sci**, v. 20, n. 1, p. 11-20, 2005.

AIMBIRE, F.; BJORDAL, J. M.; IVERSEN, VV.; ALBERTINI, R.; FRIGO, L.; PACHECO, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; CHAVANTES, M. C.; LABAT, R. M.; LOPES-MARTINS, R. A. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction **Lasers Surg Med**. v.38. n. 8 p. 773-778, 2006.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.; CORREA, F.I.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S.A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; ZANGARO, R.A.; LOPES-MARTINS, R.A.; Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema **J Photochem Photobiol B**. v. 74, n. 2-3, p. 101-107, 2004.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Med. Clin. North. Am.** n. 81, p.1-28, 1997.

ALONZI, T.; FATTORI, E.; LAZZARO, D.; COSTA, P.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; DE BENEDETTI, F.; POLI, V.; CILIBERTO, G. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis **J Exp Med**. v. 187. n. 4. p.461-468, 1998.

AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X. Y. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. **Laser Therapy**. v. 11, n. 2, 1999.

ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. Microvasculature can be selectively damaged using dye lasers: a basic theory and experimental evidence in human skin **Lasers Surg Med**. v.1. n. 3. p. 263-276, 1981.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; MITCHELL, J. A.; WILLOUGHBY, D. A. Distribution of cyclooxygenase isoforms in murine chronic granulomatous inflammation. Implications for future anti-inflammatory therapy. **J Pathol**, v. 176, n. 4, p.413-420, 1995.

ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MYAJIMA, S.; ARIA, N.; YOKOTA, T. Cytoquines: coordinators of immune and infamllatory responses. **Annu Rev Biochem** v.59. p. 783-836, 1990.

ATKINS, E. Pathogenesis of fever. **Physiol. Rev.**, v. 60, p.5804, 1960.

AURON, P. E.; WEBB, A. C.; ROSENWASSER, L. J.; MUCCI, S. F.; RICH, A.; WOLFF, S. M.; DINARELLO, C. A. Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p.790-711, 1984.

¹ De acordo com as normas do programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da UniVap.

BARTON, B. E. The biological effects of interleukin 6. **Med Res Rev.** v.16 n.1. p.87-109, 1996.

BASFORD, J. R. Low-energy laser treatment of pain and wounds, hype, hope or hokum ? **Proceedings of the Mayo Clin.**, v.61, p.671-677, 1986.

BASFORD, J. R. Low-intensity laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg Med**, v. 9, p. 1-5, 1989.

BASFORD, J. R. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopaedics**, v. 16, n. 5, p.541-547, 1993.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy – still not na established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v. 16, n. 4, p.331-342, 1995.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.

BAXTER G. D. **Therapeutic Laser.** Edinburg: Churchill Livingstone 1997.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria- based met-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy.** v.72. p. 483-491, 1992.

BELVISI, M. G.; SAUNDERS, M. A.; HADDAD, EL-B.; HIRST, S. J.; YACOUB, M. H.; BARNES, P. J.; MITCHELL, J. A. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type **Br J Pharmacol.** v.120. n.5. p.910-916, 1997.

BEUTLER, B. Endotoxin, tumor necrosis factor, and related mediators: New approaches to shock. **New Horiz.**, v.1, p. 312, 1993.

BJORDAL, J. M.; JOHNSON, M. I.; IVERSEN, V.; AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R. A. Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials **Photomed Laser Surg.** v.24. n.2. p.58-68, 2006a.

BJORDAL, J.M.; LOPES-MARTINS R.A.; IVERSEN, V.V. A randomised, placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2 concentrations **Br J Sports Med.** v.40. n.1. p.76-80, 2006b.

BLOM, M. A.; VAN TWILLERT, M. G.; DE VRIES, S. C.; ENGELS, F.; FINCH, C. E.; VEERHUIS, R.; EIKELENBOOM, P. NSAIDS inhibit the IL-1 beta-induced IL-6 release from human post-mortem astrocytes: the involvement of prostaglandin E2 **Brain Res.** v. 28. n.1-2.p.210-218, 1997.

BOULNOIS, J. L. Photophysical processes in recent medical laser development: a reiew. **Lasers in Medical Science**, v.1, p. 47-66, 1985.

- BOUMA, M. G.; BUURMAN, W. A.; VAN DEN WILDENBERG, F. A. Low energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells. **Lasers Surg Med**.v.19. n.2. p.207-215, 1996.
- BOUWHUIJSEN, F. **Terapia de onda corta pulsátil y continua**. Al Delft: B. V. enraf-Nonius, 1986.
- BREITBART, H.; LEVINSHAL, T.; COHEN, N.; FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633nm (HeNe laser) **J. Photochem. Photobiol. B**: n. 34, p.117-121, 1996.
- BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. Springer Semin. **Immunopathol.** v.20. p.133–147, 1998.
- BROSSEAU, L.; WELCH, V.; TUGWELL, P.; BIE, R.; GAM, A.; HARMAN, K.; SHEA, B.; MORIN, M. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A metaanalysis. **Journal of Rheumatology**. v.27. n.8. p.1961-1969, 2000.
- BRUGNERA JR, A.; PINHEIRO, A. L. **Laser na odontologia moderna**, São Paulo: Pancast, 1998.
- CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J.A. Effects of diclofenac sodium and HeNe laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **J Clin Laser Med Surg**, v.16. n.6. p. 317-320, 1998
- CAMPANA, V. R.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; SORIANO, F.; JURI, H. O.; SPITALE, L. S.; SIMES, J. C.; PALMA, J. A. The relative effects of He-Ne laser and meloxicam on experimentally induced inflammation **Laser Therapy**, v. 11, n. 2, p.6-10, 1999.
- CAMPANA, V. R.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; SPITALE, L.; SORIANO, F.; PALMA, J. A. Laser therapy on arthritis induced by urate crystals **Photomed Laser Surg**. v.22, n.6, p.499-503, Dec.2004.
- CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N., WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.72. n.9. p.3666-3670, 1975.
- CHU, C. Q.; FIELD, M.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Localization of tumour necrosis factor a in synovial tissue and at the cartilage pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. v.34. p.1125–1132, 1991.
- COMPTON, C. C. **Patologia estrutural e funcional: Perguntas e respostas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 215.
- CONTI, P. C. Low level laser therapy in the treatment of temporomandibular disorders (TMD): a double-blind pilot study **Cranio**. v.15. n.2. p.144-149, 1997.
- CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro:Guanabara, Koogan, 2000. p.1051.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; SCHOEN, F. J. Edit. Robbins: **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 1277.

CURFS, J. A. H. J.; MÉIS, M. G. F. J.; HOOGKAMP-KORSTANJE, A. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 742-780, 1997.

DALE, M. M.; RANG, H. P.; VOEUX, P. L. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.p. 904.

DAYER, J. M.; MOLNARFI, N.; BURGER, D. From cellular receptors to transduction-transcription pathways for cytokines: at which level should the inhibition be targeted in inflammation? **Expert Opin Biol Ther**. v.1. p.83-96, 2005.

DE BENEDETTI, F.; MARTINI, A. Targeting the interleukin-6 receptor: a new treatment for systemic juvenile idiopathic arthritis? **Arthritis Rheum**. v.52. n.3. p.687-693, 2005.

DE BENEDETTI, F.; RUCCI, N.; DEL FATTORE, A.; PERUZZI, B.; PARO, R.; LONGO, M.; VIVARELLI, M.; MURATORI, F.; BERNI, S.; BALLANTI, P.; FERRARI, S.; TETI, A. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. **Arthritis Rheum**. v.54. n.11. p.3551-3563, 2006.

DE BIE, R. A.; DE VET, H.; LENSSEN, T. F.; WILDENBERG, F.; KOOTSTRA, G. Low level laser therapy in ankle sprains: a randomized clinical trial. **Arch Phys med Rehabil**. v.79. p.1415-1420, 1998.

DEVOR, M. What's in a beam for pain therapy? **PAIN**, v.43, p.139-145, 1990.

DI ROSA, M. Pharmacological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol**. v.24. p. 89-102, 1972.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L.; PARENTE, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leukocyte emigration. **J. Pharm. Pharmacol**. v.24. p. 575-577, 1972.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol** v. 23. p. 297-298, 1971.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. **J. Infect. Dis**. v. 163, p. 1177-1184, 1991.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M.; BERNHEIM, H. A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A.; O'CONNOR, J. V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. **J. Exp. Med**. v. 163, p.1433-1450, 1986.

DINARELLO, C. A.; RENFER, L.; WOLFF, S. M. Human leukocytic pyrogen purification and development of a radioimmunoassay. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p.4624-4627, 1977.

DOURADO, D. M.; FAVERO, S.; BARANAUSKAS, V.; DA CRUZ-HOFLING, M. A. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops Moojeni snake venom **Lasers Surg Med**.v.33. n.5. p.352-357, 2003.

EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg Med**, v.19, n. 4, p. 433-437, 1996.

ENGLAND, S. et al. Low power laser therapy of shoulder tendonitis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 18, p. 427-31, 1989.

FAN, J.; MALIK, A. B. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors **Nat Med**.v.9. n. 3. p.315-321. 2003.

FEDOSEYEVA, G. E.; KARU, T.I.; LYAPUNOVA, T. S.; POMOSHNIKOVA, N. A.; MEISSEL, M. N. The activation of yeast metabolism with He-Ne laser radiation – I protein synthesis in various cultures. **Lasers life Sci** v.2, n.2, p.137-146, 1988.

FELDMANN, R. N. M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Springer Semin Immunopathol** v. 20. p.133–147, 1998.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu Rev Immunol**. v. 14. p.397–440, 1996.

FLEMMING, K. A.; CULLUM, N. A.; NELSON, E. A. A systematic review of laser therapy for venous leg ulcers **J Wound Care**. v. 8. n. 3. p. 111-114,1999.

FONG, Y.; LOWRY, S. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.55, p.157-170, 1990.

FOREMAN, D.; ZUK, L.; MILLER, D. B.; SALOMON, R. G. Effects of E2 levuglandins on the contractile activity of the rat uterus. **Prostaglandins** v. 34. n. 1. p.91-98, 1987.

FRETZ, P. B.; ZHOUNG, L. Low energy laser irradiation treatment for second intention wound healing in horses. **Canine Veterinary journal**. v. 33, 1992.

FULLER, A. T. Fundamental of lasers in surgery and medicine. In: DIXON, J.A. (ED) **Surgical applications of lasers**. Chigaco: Year Book medical Publishers,1983.p. 11.

FURCHGOTT, R. F.; CHERRY, P. D.; ZAWAKZKI, J. V.; JOTHIANANDA, D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **J Cardiovasc Pharm**. v. 53. p. 557-573, 1984.

GARBACKI, N.; TITS, M.; ANGENOT, L.; DAMAS, J. Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats **BMC Pharmacol.** v. 4. n. 1. p.1-25, 2004.

GARCIA, L. J.; HAMAMURA, L.; LEITE, M. P.; ROCHA E SILVA, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carragenin and heating **Br. J. Pharmac.** v. 48. p.88-96, 1973.

GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D.; LANSDORP, P.; BAUMANN, H. Interferon β / B - cell stimulatory factor type 2 shares identify with monocyte - derived hepatocyte - stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7251-7255, 1987.

GELLER, D. A.; LOWENSTEIN, C. J.; SHAPIRO, R. A.; NUSSLER, A. K.; DI S. M.; WANG, S. C.; NAKAYAMA, D. K.; SIMMONS, R. L.; SNYDER, S. H.; BILLIAR, T. R. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 90. p. 3491-3495, 1993.

GERSH, M. R. Transcutaneous electrical nerve stimulation for management of pain. In: Gersh, M.R. (ed.). **Electrotherapy in Rehabilitation**. Philadelphia: F.A. Davis Co., 1990. p.149-196.

GIRARDIN, E. P.; ROUX-LOMBARD, P.; GRAU, G. E.; SUTER, P.; GALLATI, H.; DAYER, J. M. Imbalance between tumor necrosis factor- α and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. **Immunol.** v. 76, p. 20-23, 1992.

GOLDMAN, J. A. et al. Laser therapy of rheumatoid arthritis. **Lasers Surg Med**, v.1, p. 93-101, 1980.

GRAY, P. W.; AGGARWALL, B. B.; BENTON, C. V. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity. **Nature**, v. 312, p. 7214, 1984.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMANN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science** v. 212. p. 56-58, 1981.

GRUNFELD, C.; PALLADINO, M. A. Tumor necrosis factor: immunologic, antitumor, metabolic, and cardiovascular activities. **Adv. Intern. Med.**, v. 35, p. 45-72, 1990.

GUERNE, P. A.; ZURAW, B. L.; VAUGHAN, J. H.; CARSON DA, L. M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis **J Clin Invest.** v. 83. n. 2. p. 585-592, 1989.

GUR, A.; COSUT, A.; SARAC, A. J. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. **Lasers Surg Med**, v.33, p. 330-338, 2003.

HAAS, A. F.; ISSEROFF, R. R.; WHEELAND, R. G.; ROOD, P. A.; GRAVES, P. J. Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 94, n. 6, p. 822-826, 1990.

HACZEKI, O.; TAMURA, M. Near infrared quadruple wl. Spectrophotometry of the rat head. **Adv. Exper. Med. Biol.** v.248, p. 63, 1989.

HAMID, Q.; SPRINGALL, D. R.; RIVEROS-MORENO, V.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J. M. Induction of nitric oxide synthase in asthma **Lancet**. v.342. n.8886-8887. p.1510-1513, 1993.

HARVEY, B. H.; BOTHMA, T.; NEL, A.; WEGENER, G.; STEIN, D. J. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma Hum **Psychopharmacol.** v. 20. n. 5. p. 367-373, 2005.

HERMAN, J. H.; KHOSLA, R. C. Nd: YAG laser modulation of synovial tissue metabolism. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.7, p. 505-512, 1989.

HEUSSLER, J. K.; HINCHEY, G.; MARGIOTTA, E.; QUINN, R.; BUTLER, P.; MARTIN, J.; STURGES, A. D. A double blind randomised trial of low power lasere treatment in reumatoid arthritis **Annals of the Rheumatic Diseases** ,v. 52, p. 703-706, 1993.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**. v. 235. p. 473-476, 1987.

HONMURA, A.; AKEMI, I.; MASAHIRO, Y.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers in surgery and medicine** , n. 13, p. 463-69, 1993.

HONMURA, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentaly induced inflammation in rats. **Lasers in surgery and medicine**, n. 12, p. 441-449, 1992.

HOUSSIAU F. A.; DEVOGELAER J. P.; VAN DAMME J.; DE DEUXCHAISNES C.N.; VAN SNICK J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides **Arthritis Rheum.** v. 31. n. 6. p. 784-788, 1988.

HUANG, H. H.; QUESHI, A. A.; BIUNDO JR., J. J. Sports and other soft tissue injuries, tendinitis, bursitis, and occupation-related syndromes **Current Opinion in rheumatology**, v.12, p.150-154, 2000.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 84, p.9265-9269, 1987.

ISEKI, S. Immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the rat stomach. **Histochem J**, v. 27, n. 4, p. 323-328, 1995.

KAMIKAWA, K.; TAWA, M. Clinical application of low-intensity lasers. 3. Therapy of pain and inflammation. **Nippon Rinsho**, v. 45, n. 4, p. 756-761, 1987.

KARU, T. I. Photobiological fundamental of low power laser therapy. **IEEE J Quant Elect** ., v.23, p.1703, 1987.

KARU, T. **The science of low power laser therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells **J Photochem Photobiol B**. v.49, n.1, p.1-17, Mar.1999.

KETTELHUT, I. C.; FIERS, W.; GOLDBERG, A. L. The toxic effects of tumor necrosis factor in vivo and their prevention by cyclooxygenase inhibitors **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 84. n. 12. p. 4273-4277, 1987.

KING, P. R. Low laser therapy: a review. **Physiotherapy Practice**, v.6, p. 127-138, 1990.

KITCHEN, S. S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole , 1996.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. H. A review of low intensity laser therapy': parts 1, 2 and 3. **Physiotherapy**. v. 77, N. 3, p. 166-170, 1991.

KO J.H; CHEN H.S.; CHEN L.M. Treatment of lateral epicondylitis of the elbow with shock waves. **Clin Orthop**. v.1. n.387. p. 60-67, 2001.

KOLARI, P. J. Penetration of unfocused laser light into the skin **Arch. Dermatol.**, v.277, p.342-344, 1985.

KOTAKE, S.; SATO, K.; KIM, K. J.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; NAKAMURA, I.; YAMAGUCHI, A.; KISHIMOTO, T.; SUDA, T.; KASHIWAZAKI, S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation **J Bone Miner Res**. v. 11. n. 1. p. 88-95, 1996.

LAAKSO, L.; RICHARDSON, C.; CRAMOND, T. Factors affecting low level laser therapy. **Australian Physiotherapy**, v.39, p.95-99, 1993.

LABBE, R.; SKOGERBOE, K. J.; DABIS, H. A.; RETTMER, R. Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. **Laser in Surg and Med**.,v. 10, p.201-207, 1990.

LE, J.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **Lab. Invest.**, v.56, p.234-248, 1987.

LEE, G.; WONG E.; MASON, D. New concepts in pain management and in the application of low power laser for relief of cervicothoracic pain syndromes. **Am. Heart J**. v. 132, n. 6, p. 1329-1334, 1996.

LEWIS, M.; TARTAGLIA, L. A.; LEE, A.; BENNETT, G. L.; RICE, G. C.; WONG, G. H.; CHEN, E. Y.; GOEDDEL, D. V. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88, n. 7, p. 2830-2834, 1991.

- LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, A.G. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904nm on healing experimental wounds. **Laser in surgery and medicine**, v.7, p.744-747,1987.
- LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBERG,A. Low energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomed Laser Surg** v. 23. p 3–9, 2005.
- MAEGAWA, Y.; ITOH, T.; HOSOKAWA, T.; YAEGASHI, K.; NISHI, M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. **Lasers Surg Med**. v. 27. n. 5. p. 427-437, 2000.
- MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, p.493, 1960.
- MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with he-ne laser: appearance of giant mitochondria **Journal of Photochem. And Photobiol. B: Biol**, n. 38, p. 25-30, 1997.
- MARCH, C. J.; MOSLEY, B.; LARSEN, A.; CERRETTI, D. P.; BRAEDT, G.; PRICE, V.; GILLIS, S.; HENNEY, C. S.; KRONHEIN, S. R.; GRABSTEIN, K.; CONLON, P. J.; HOPP, T. P.; COSMAN, D. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. **Nature**, v. 315, p. 6415, 1985.
- MARQUES, C. R. S. **Análise evolutiva da cicatrização em úlceras: LEDterapia e oxigenioterapia hiperbárica**. 80f. 2004. Dissertação (Mestrado Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento . Universidade do Vale do Paraíba.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**. v. 27. p. 8706-8711, 1988.
- MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; ZWEIFEL, B.; NEEDLEMAN, P. Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 9, p. 3917-3921, 1992.
- MCINNES, I.B.; LEUNG, B.P.; STURROCK, R.D.; FIELD, M.; LIEW, F.Y. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumour necrosis factoralpha in rheumatoid arthritis. **Nature Med**. v.3. p.189–195, 1997.
- MCINNES, I.B.; AL MUGHALES, J.; FIELD, M., *et al*: The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. **Nature Med**. v.2, p.175–182, 1996.
- MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.5, p. 31-39, 1985.
- MICHLOVITZ, S. I. **Thermal Agents in Rehabilitation**. 2. ed. Philadelphia: F. A Davis, 1990. p. 88.

MICKINLEY, A. F.; HARLEN, F.; WHILLOCK, M.J. Biological interactions of optical radiations. IN: HILGER, **A Hazards of optical radiation**, Adam Hilger. 1988. p. 12-23.

MISIEWICZ, B.; GRIEBLER, C.; GOMEZ, M.; RAYBOURNE, R.; ZELAZOWSKA, E.; GOLD, P. W.; STERNBERG, E. M. The estrogen antagonist tamoxifen inhibits carraneenan induced inflammation in lew/ n female rats **Life sciences**, v. 58, n. 16, p. 281-286, 1996.

MIZGERD, J.P.; KUBO, H.; KUTKOSKI, G.J.; BHAGWAN, S.D.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BEAUDET, A.L.; DOERSCHUK, C.M. Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. **J Exp Med**. v. 186. n. 8. p.1357-1364, 1997.

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**. v. 22. n. 6. p.537-539, 2004.

MONTES, R.; RODRIGUEZ W; HURTADO, V.; PÉREZ, A.; ROCHA, E. Importância de las citocinas y del sistema fibrinolítico en la fisiopatología de la CID y su control. **Rev Iberoamer Tromb Hemostasia** . v. 13. p. 99-115, 2000.

MORIYAMA, Y.; MORIYAMA, E.H.; BLACKMORE, K.; AKENS, M.K.; LILGE, L. In vivo study of the inflammatory modulating effects of low-level laser therapy on iNOS expression using bioluminescence imaging. **Photochem Photobiol**. v. 81. n.6. p. 1351- 1355, 2005.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol**. v. 225. p.115-121. Review, 2003.

NATHAN, C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. **Cell** v. 78. p.915-918, 1994a.

NATHAN C.; XIE, Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**. v. 269. p. 13725-13728, 1994b.

NEDREBO, T.; BERG, A.; REED, R.K. Effect of tumor necrosis factor-alpha, IL-1beta, and IL-6 on interstitial fluid pressure in rat skin. **Am J Physiol**. v. 277. p.H1857-1862, 1999.

NEDREBO, T.; REED, R.K.; JONSSON, R.; BERG, A.; WIIG, H. Differential cytokine response in interstitial fluid in skin and serum during experimental inflammation in rats. **J Physiol**. v. 556. p. 193-202, 2004.

NICHOLSON, S.; ALMEIDA, M.G.B.; SILVA, J.R.L.; NATHAN, C.; XIE, Q.; MUMFORD, R.; WEIDNER, JR.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J.L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J Exp Med**. v. 83. p. 2293-2302, 1996.

NOMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibition of interleukin-1beta production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. **Lasers Med Sci.** v. 16. n. 3. p. 218-223, 2001.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J. A.; IKEJIMA, T.; CONNOLLY, R. J.; DINARELLO, C. A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. **J. Clin. Invest.**, v. 81, p.1162-1172, 1988.

OSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application.** Chichester: Jhon Wiley & Sons, 1991. p.3-10.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; ABIKO, Y. Low-energy diode laser irradiation reduced plasminogen activator activity in human periodontal ligament cells. **Lasers Surg Med.** v. 21. n. 5. p. 456-463, 1997.

PANG, L.; KNOX, A.J. Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. **Br J Pharmacol.** v. 121. n. 3. p. 579-587, 1997.

PARADISO, C; VOEUX, P. J. Trad. **Fisiopatologia.** Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 1998. p. 363.

PAUL, W E. **Fundamental immunology.** 4. ed. Philadelphia: Lippincott-raven, 1999.

PESSOA, E.S.; MELHADO, R.M.; THEODORO, L.H.; GARCIA V.G. A histological assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. **Photomed Laser Surg** v. 22. p. 199–204, 2004.

PETERS, T.; SINDRILARU, A.; WANG, H.; ORESHKOVA, T.; RENKL, A.C.; KESS, D.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. CD18 in monogenic and polygenic inflammatory processes of the skin. **J Invest Dermatol Symp Proc.** v. 11. n. 1. p. 7-15, 2006.

PILKINGTON, C. A.; WEDDERBURN, I. R. Pediatric idiopathic inflammatory disease: recognition and management. **Drugs**, v.65, n. 10, p. 1355-1365, 2005.

PINHEIRO, R.M; CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflamm Res.** v. 51. n. 12. p. 603-610, 2002.

RABELO, S.B.; VILLAVARDE, A.B.; NICOLAU, R.; SALGADO, M.C.; MELO, MDA. S.; PACHECO, M.T. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.** v. 24. n.4. p. 474-479, 2006.

REDDY, G. K.; GUM, S.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Biochemistry and biomechanics of healing tendon: part II effects of combined laser therapy and electrical stimulation. **Med Sci Sports exerc**, v. 36, n. 6, p. 794-800, 1998.

REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; SCHULTZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxid synthase in vitro and in vivo. **Brit J Pharm** v. 101. p. 746-752, 1990.

RITCHIE, D. G.; FULLER, G. M. Hepatocyte-stimulating factor: a monocyte-derived acute-phase regulatory protein. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 408, p. 490-502, 1983.

ROBAK, T.; WIERZBOWSKA, A.; BLASINSKA-MORAWIEC, M.; KORYCKA, A.; BLONSKI, J.Z. Serum levels of IL-6 type cytokines and soluble IL-6 receptors in active B-cell chronic lymphocytic leukemia and in cladribine induced remission. **Mediators Inflamm**. v.8, n.6, p.277-286, 1999.

ROBBINS, S L; COTRAN, R S; KUMAR, V; COLLINS, T. R. **Patologia Estrutural E Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p. 1251.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M.F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MIYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. **J Clin Invest**. v. 96. n. 5. p. 2357-2363, 1995.

SATTAYUT, S.; HUGES, F.; BRADLEY, P. 820 nm gallium aluminum arsenide laser modulation of prostaglandin E2 production in interleukin I stimulated myoblasts. **Laser Therapy**, v. 11, n. 2, p. 8895, 1999.

SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; ACHAFFER, P. M.; BUSCH, M.; REISER, M., DÜHMKE, E. Effect of 780nm diode laser irradiation on blood microcirculation preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J.Photochem. Photobil.B: Biol** v. 54. p. 55-60, 2000.

SCHAWLOW, A. L. Principle of laser. **J. Clin. Laser Med. Surgery**, v. 13, n. 3, 1995.

SCHIFF, M.H. Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v. 59. n.1. p.i103-8, 2000.

SCHINDL, A.; M. SCHINDL; H. PERNERSTORFER-SCHÖN; L. SCHINDL. Low-intensity laser therapy: a review. **Journal of Investigative Medicine**., v.48. n. 5. p. 312-326, 2000.

SCHINDLER, R.; GELFAND, J.A.; DINARELLO, C.A. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL -1 itself. **Blood**. v. 76. n. 8 p. 1631-1638, 1990.

SCHMIDT, H.H.H.W.; POLLOCK, J.S.; NAKANA. M.; GORSKY, L.D.; FÖRSTERMANN, U.M.F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.88, p. 365-369, 1991.

SEBBAG, M.; PARRY, S.L.; BRENNAN, F.M.; FELDMANN, M. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumour necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: Possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Eur J Immunol**. v. 27. p. 624-632, 1997.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: BONTA, I.L., BRAY, M.A., PARNHAM, M.J., Ed.. **Handbook of Inflammation**, The Pharmacology of Inflammation, Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1985. v.5. p. 27-47.

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.** v. 187. n. 1. p.73-80, 2001.

SHI, Q.; VAILLANCOURT, F.; COTE, V.; FAHMI, H.; LAVIGNE, P.; AFIF, H.; Di BATTISTA, J.A.; FERNANDES J.C.; BENDERDOUR, M. Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal **Arthritis Res Ther.** v.8. n. 6. p. R159, 2006.

SIQUEIRA Jr, J. F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**, São Paulo: Medsi, 2000. p. 238.

SMITH, T.W.; BALLIGAND, J.L.; KAYE, D.M.; WIVIOTT, S.D.; SIMMONS, W.W.; HAN, X.; MICHEL, T.; SINGH, K.; KELLY, R.A. The Role of the NO pathway in the control of cardiac function. **J Card Fail** v.4. p. S141-S147, 1994.

SMITH, W. L.; MARNETT, L. J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1083, n. 1, p. 1-17, 1991.

SNYDER, S.H.; BREDET, D.S. Biological role of nitric oxide. **Science Am.** v. 266. p. 68-77, 1992.

STEVENS, A.; LOWE, J.; GUBERT, I.C.; SILVESTRE, F.G. **Patologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2002.p. 655.

STUEHR, D.J.; CHO, H.J.; KWON, N.S.; WEISE, M.F.; NATHAN, C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v.88,p. 7773-7777,1991.

SVAASAND, L.O. Bioestimulation with-intensity lasers-physics or metaphysics? **Nordisk Med.** p. 105-172, 1990.

TAKAGI, N.; MIHARA, M.; MORIYA, Y.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; TAKEDA, Y.; OHSUGI, Y. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.** v. 41. n. 12. p. 2117-2121, 1998.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall **Cir. Res.** v.88. p. 877-887, 2001.

TREPICCHIO, W.L.; BOZZA, M.; PEDNEAULT, G.; DORNER, A.J. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. **J Immunol.** v. 157. n. 8. p. 3627-3634, 1996.

TURNÉR, J.; HODE, L. Low level laser therapy. **Clinical practical and scientific background**. Sweden: Prima Books, 1999.

TURNÉR, J.; HODE, L. It's all in the parameters: A Critical analysis of some well-known negative studies on low power laser therapy *Journal of Clin. Laser med. & Surgery*, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

TURCYNYSKI, B.; CIESLAR, G.; SIERON, A. Changes of rheologic properties of blood in experimental animals irradiated with low energy laser. **Laser Technology IV: Applications in medicine**, n.2203, p. 165-167, 1993.

UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; WATANABE, K.; TSURUFUJI, S.; MATSUSHIMA, K.; OH, S. Infiltration of neutrophils by intrapleural injection of tumour necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-8 in rats, and its modification by actinomycin D. **Br J Pharmacol**. v. 117. n. 4. p. 611-614, 1996.

VAN DE LOO, F.A.; ARNTZ, O.J.; VAN DEN BERG, W.B. Effect of interleukin 1 and leukaemia inhibitory factor on chondrocyte metabolism in articular cartilage from normal and interleukin-6-deficient mice: role of nitric oxide and IL -6 in the suppression of proteoglycan synthesis **Cytokine**. v. 9. n. 7. p. 453-462, 1997.

VAN DEUREN, M.; DOFFERHOFF, A.S.M.; VAN DER MEER, J. W. Cytokines and the response to infection. **J. Pathol.**, v. 168, p. 349-356, 1992.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2 **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v. 38. p.97-120, 1998.

VANE, J. R.; MITCHELL, J. A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D. Inducible isoform of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 2046-2050, 1994.

VASSELJEN, O. Low-level laser versus traditional physiotherapy in the treatment of tennis elbow. **Physiotherapy**, v. 78, n. 5, p. 483-491, 1992.

VILLARROYA-APARICIO A. El laser y el dolor. **Rehabilitación**, v. 28. n. 5. p. 346-353, 1994.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. **Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation Biochemistry (Mosc)**. v. 69. n. 1. p. 81-90, 2004.

VOLTARELLI, J. C. Fever and Inflammation. **Medicina**, v. 27. n. ½, p.7-48. 1994.

WANG, Y.; MARDSEN, P.A. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. **Curr Opin Nephrol Hypert** v.4. p. 12-22, 1995.

WENDLING, D.; RACADOT, E.; WIJDENES, J. Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody. **J Rheumatol**. v. 20. n. 2. p. 259-62, 1993.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clin laser Med & Surgery**, v. 16, n. 3 p.159-165, 1998.

WILLIAMS, G.; GIROIR, B. P. Regulation of cytokine gene expression: tumor necrosis factor, interleukin-1, and the emerging biology of cytokine receptors. **New Horiz.**, v.3, p. 276-287, 1995.

WILLIAMS, T. W.; GRANGER, G. A. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. **Nature**, v. 219, p.1076-1078, 1968.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R.; GILROY, D. Resolution of inflammation Int. **J Immunopharmacol.** v. 22. n. 12. p. 1131-1135, 2000.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A., NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of rats as an assay method for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** n. 111, p. 544-547, 1962.

YEW, D.; LING, W. S. L.; CHAN, Y. Stimulating effect of the low dose laser: a new hypothesis. **Acta Anatómica**, v.112, p. 131- 136, 1982.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C. Marchophages responsiveness to light therapy **Laser in Surgery and Med.**, n. 9, p. 497-505, 1989.

YU W, NAIM JO; MCGOWAN M; IPPOLITO K; LANZAFAME RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem Photobiol.** , v.66, p.866–871, 1997.

ZANINI, A C; OGA, S. **Farmacologia** aplicada. 5. ed. Sao Paulo: Atheneu, 1994.

ZHANG, J.; DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Nitric oxid activation of poly(ADP-ribose) synthase in Neurotoxicity. **Science.** v. 263. p. 687-689, 1994.

ZISKIN, M.C.; MCDIAMID, T. MICHLOVITZ, S.I. Therapeutic ultrasound. In: Michlovitz, S.I. (ed.). **Thermal Agents in Rehabilitation.** 2 ed. Philadelphia: F.A. Davis Co.,1990. p. 134-169.

ANEXO

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A034/2006/CEP, intitulado “*Estudo do efeito antiinflamatório da terapia laser de baixa potência sobre a inflamação de pata de ratos submetidos ao modelo de inflamação induzida por carragenina*”, sob a responsabilidade da Profa. Maricília Silva Costa, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecação de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 13 de setembro de 2006.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP