

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

NÚBIA CRISTINA RODRIGUES DE MORAIS

**EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO LASER E LED DE BAIXA POTÊNCIA NA
ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS WISTAR**

**São José dos Campos
2008**

NÚBIA CRISTINA RODRIGUES DE MORAIS

**EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO LASER E LED DE BAIXA POTÊNCIA NA
ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof^a Dr^a Stella Regina Zamuner

Prof. Dr. Antônio Guillermo José Balbin Villaverde

**São José dos Campos
2008**

M826e

Morais, Núbia Cristina Rodrigues de

Efeitos antiinflamatórios do laser e LED de baixa potência na artrite induzida por Zymosan em ratos Wistar/ Núbia Cristina Rodrigues de Moraes. Orientadores: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner , Prof. Dr. Antonio Guillermo José Balbin Villaverde. São José dos Campos, 2008.

1 disco laser: color.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1. Antiinflamatórios 2.Terapia a laser de baixa intensidade 3. Artrite 4. Polissacarídeos I. Zamuner, Stela Regina, Orient. II Villaverde, Antonio Guillermo Balbin Orient. III. Título

CDU: 615.276

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura da Aluna: *N. Moraes*

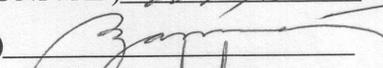
São José dos Campos, 24 de novembro de 2008

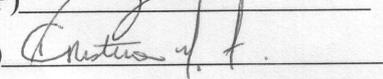
NÚBIA CRISTINA RODRIGUES DE MORAIS

**“EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO LASER E LED DE BAIXA POTÊNCIA NA
ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS WISTAR”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

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

Prof^ª. Dra. **STELLA REGINA ZAMUNER** (UNIVAP) 

Prof^ª. Dra. **CRISTINA MARIA FERNANDES** (USP) 

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 10 de dezembro de 2008.

Dedico este trabalho

“Ao mestre Paulo Cesar,

*Minha gratidão eterna... O mestre é o que serve de laço entre o
discípulo e o Universo... entre o discípulo e o seu sonho de vida.*

Seja abençoado...”

Núbia

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me conceder muita força, fé, paciência em prosseguir nesta caminhada e por conseguir passar por todos os obstáculos, tendo ânimo para nunca desistir.

Agradeço aos meus pais (Lúcia e Fausto) pelo alto investimento em meus estudos; e acima de tudo pelo amor, confiança, apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Stella Regina Zamuner pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antônio Balbin Villaverde pela confiança em me orientar, pela dedicação e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Carlos Cogo, pelo grande apoio, ajuda e por ceder o laboratório de Fisiologia para realizar parte de meu experimento e ao Prof. Carlos José de Lima por ceder gentilmente os aparelhos lasers e LED.

Ao Prof. Ronaldo Ribeiro, em colaboração com a Prof^a Dra. Mariana Lima Vale por nos receberem com presteza e tão abertamente em seu laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará onde foi realizado o teste de incapacitação articular.

À Prof^a Cristina Maria Fernandes do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan pela valiosa ajuda na técnica experimental da indução da artrite em joelho dos ratos.

Aos colegas Leandro Procópio Alves, Ana Maria Barbosa, pela paciência, ajuda na adequação do laser de baixa potência e pela grande ajuda nos experimentos.

Aos meus tios Jean de Paula e Catarina de Paula que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e minha tia Ana que me concedeu além da sua ótima companhia, a viagem à Fortaleza para realização de parte deste experimento.

Agradeço a direção, aos mestres e funcionários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP pela dedicação, esforço e amizade.

Muito Obrigada!!!

AMAR SE APRENDE AMANDO

De hoje em diante todos os dias ao acordar, direi:

- Eu hoje vou ser feliz!

Vou lembrar de agradecer ao sol pelo seu calor e luminosidade.

Sentirei que estou vivendo, respirando.

Posso desfrutar de todos os recursos da natureza gratuitamente.

Não preciso comprar o canto dos pássaros, nem o murmúrio das ondas do mar.

Lembrarei de sentir a beleza das árvores e das flores.

Vou sorrir mais, sempre que puder.

Vou cultivar mais amizades e neutralizar as inimizades.

Não vou julgar os atos de meus semelhantes ou companheiros.

Vou aprimorar os meus.

Lembrarei de ligar para alguém para dizer que estou com saudade!

Reservarei minutos de silêncio para ter a oportunidade de ouvir.

Não vou lamentar nem amargar as injustiças.

Vou pensar no que posso fazer para diminuir seus efeitos.

Terei sempre em mente que um minuto passado, não volta mais.

Vou viver todos os momentos, proveitosamente.

Não vou sofrer por antecipação prevendo futuros incertos, nem com atraso, lembrando de coisas sobre as quais não tenho mais ação.

Não vou pensar no que não tenho e que gostaria de ter, mas em como ser feliz com o que possuo.

E, o maior bem que possuo, é a própria vida.

Vou lembrar de ler uma poesia e de ouvir uma canção, vou dedicá-las a alguém.

Vou fazer alguma coisa para alguém, sem esperar nada em troca, apenas pelo prazer de ver alguém sorrir.

Vou lembrar que existe alguém que me quer bem.

Vou dedicar uns minutos de pensamento para os que já se foram, para que saibam que será sempre uma doce lembrança, até que venhamos a nos encontrar outra vez.

Vou procurar dar um pouco de alegria para alguém, especialmente quando sentir que a tristeza e o desânimo querem se aproximar.

E, quando a noite chegar, vou olhar para o céu, para as estrelas e para o luar e agradecer a Deus...

Porque hoje eu fui feliz!...

CARLOS DRUMONND DE ANDRADE

EFEITOS ANTIINFLAMATÓRIOS DO LASER E LED DE BAIXA POTÊNCIA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOZAN EM RATOS WISTAR

RESUMO

Foi sugerido que a terapia laser de baixa potência (TLBP) pode modular processos inflamatórios. Neste trabalho investigamos o efeito dos lasers diodo 685nm, 830nm e diodo emissor de luz 639nm (LED) sobre a incapacitação articular (I.A.), formação edema, permeabilidade vascular e influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan em ratos Wistar. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular de zymosan 1mg no joelho direito e o pico de I.A. foi obtido na 3ª ou 4ª hora de artrite através do registro do Tempo de Suspensão da Pata durante 60 segundos. O edema e permeabilidade vascular (P.V.) foram medidos na 3ª hora após indução inflamatória. O edema foi avaliado pela diferença entre peso úmido e peso seco da membrana sinovial e o aumento da P.V. pelo extravasamento do corante azul de Evans. Na 6ª hora de artrite, os animais foram sacrificados sob anestesia e o exsudato articular coletado para contagem do número de células em câmara de Neubauer. O grupo controle recebeu apenas Dexametasona (4mg/kg-i.p.) 1 h antes da injeção de Zy. O tratamento com TLBP (685nm e 830 nm) imediatamente, 1ª e 2ªh após indução inflamatória inibiu significativamente a I.A., a formação de edema, o aumento da P.V. e o influxo de leucócitos. Sendo que o tratamento com LED (639 nm) diminuiu apenas o influxo de leucócitos na artrite induzida por zymosan. Estes resultados demonstraram que os lasers 685nm e 830 nm têm um efeito analgésico e anti-inflamatório em artrite induzida por zymosan, enquanto o LED apresentou redução de células inflamatórias.

Palavras chave: artrite, laser de baixa potência, inflamação, zymosan, dor.

ANTH-INFLAMMATORY EFFECTS OF LOW-LEVEL LASER AND LED THERAPY IN ZYMOSAN – INDUCED ARTHRITIS IN WISTAR RATS

ABSTRACT

It was suggested that the low level laser therapy (LLLT) can modulate inflammatory processes. This work investigated the effect of laser diode 685nm, 830nm and 639nm light emitting diode (LED) on the articular incapacitation (I.A.), edema formation, vascular permeability and leukocytes influx in zymosan (Zy)-induced arthritis in rats. Wistar rats were subjected to intraarticular injection of Zy (1mg) in the right knee and A.I. peak was measured after 3 or 4h of arthritis by measuring the Paw Elevation Time during 60s. The edema and vascular permeability (P.V.). were measured at the 3h after induction inflammatory. The swelling was measured by the difference wet weight and dry weight of the synovial membrane and increased P.V. by the leakage of Evans blue dye. After 6h of arthritis, the animals were sacrificed under anesthesia with and the articular exsudate was collected for cell counting using Neubauer chamber. The control group received only Dexamethasone (4mg/kg-ip) 1 h before the injection of Zy. O treatment with LLLT (685 nm and 830nm) immediately, 1st and 2nd h after inflammatory induction significantly inhibited the IA, the formation of edema, the increase in PV and leukocytes influx. The treatment with LED (639 nm) decreased only the influx of leukocytes in arthritis induced by zymosan. These results demonstrated that the lasers 685nm and 830 nm have an effect analgesic and anti-inflammatory drug in arthritis induced by zymosan, while the LED showed a reduction of inflammatory cells.

Key words: arthritis, low level laser therapy, inflammation, zymosan, pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Articulação sinovial e artrósica	22
Figura 2 – Vias aferentes envolvidas no processo doloroso	31
Figura 3 - Espectro Eletromagnético	36
Figura 4 - Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico	38
Figura 5 - Normalização da função celular, alívio da dor e cicatrização de feridas através do laser.....	41
Figura 6 - Sistema de registro da incapacitação articular	48
Figura 7 - Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na incapacidade articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos	53
Figura 8 - Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na redução do aumento de permeabilidade vascular causado por zymosan	55
Figura 9 - Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na redução do edema causado por zymosan	57
Figura 10 - Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na redução do Influxo de leucócitos para a cavidade articular de ratos induzido pela injeção de zymosan	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de irradiação laser	47
Tabela 2 – Protocolo de irradiação LED	47

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micro-grama
μL	micro-litro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
AE	Azul de Evans
AR	Artrite Reumatóide
ATP	Adenosina Trifosfato
AZY	Artrite induzida por zymosan
BK	Bradicinina
Ca^{+2}	Íons Cálcio
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
COX1	Ciclooxigenase 1
COX2	Ciclooxigenase 2
D.E.	Densidade de energia
DNA	Ácido desoxiribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
g	Grama
GaAs	Arseneto de Gálio
GaAIAs	Arseneto de Gálio Alumínio
H^+	Íons Hidrogênio
HeNe	Hélio Neônio
i.art.	Intra-articular
IA	Incapacitação Articular
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina-1
i.m.	Intramuscular
INF - α	Interferon alfa
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
J/cm^2	Joule por centímetro quadrado

K ⁺²	Íons potássio
LBP	Laser de Baixa Potência
LED	Diodo Emissor de Luz
LTBs	Leucotrienos
mg/Kg	Miligrama por Kilograma
mL	Mililitro
mL/Kg	Mililitro por Kilograma
mm	Milímetro
MN	Mononucleares
mW	MiliWatts
Na ⁺	Íons Sódio
nm	Nanometro
NO	Óxido Nítrico
OA	Osteoartrite
PBS	Tampão fosfato salina
PAF	Fatores Ativadores de Plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE1	Prostaglandina E1
PGE2	Prostaglandina E2
PMN	Polimorfonucleares
PV	Permeabilidade Vascular
r.p.m.	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
s	Segundos
TGF-β	Fator de transformação de crescimento β
TLBP	Terapia a Laser de Baixa Potência
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TSP	Tempo de suspensão da pata
TXAs	Tromboxanas
U.I.	Unidade Internacional
W	Watt
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado
Zy	Zymosan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CLASSIFICAÇÃO	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA	17
1.3 FATORES DE RISCO	18
1.4 QUADRO CLÍNICO	20
1.5 FISIOPATOLOGIA	21
1.5.1 Cartilagem articular	21
1.5.2 Osso subcondral	22
1.5.3 Membrana sinovial e cápsula fibrosa	23
1.5.4 Músculos	24
1.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO	24
1.7 A INFLAMAÇÃO ARTICULAR	26
1.8 DOR - Conceitos gerais	28
1.8.1 Sistemas de neuromodulação envolvidos no processo doloroso	29
1.8.2 Classificação da dor	30
1.8.3 Hiperalgesia	32
1.9 ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN (ZY)	34
1.10 DEXAMETASONA	35
1.11 LASER	35
1.11.1 Efeitos diretos da radiação	39
1.12 LED	42
2 OBJETIVO	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 ANIMAIS	45
3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	45
3.3 INDUÇÃO DA ARTRITE POR ZYMOSAN	46
3.4 DEXAMETASONA	46
3.5 IRRADIAÇÃO DO LASER	46
3.6 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA	47
3.7 REGISTRO DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR	47
3.7.1 Descrição do sistema	47
3.8 DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE VASCULAR (PV)	49
3.9 AVALIAÇÃO DO EDEMA LOCAL	49
3.10 COLETA E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	49
3.11 SOLUÇÕES UTILIZADAS	50
3.11.1 Tampão Fosfato-Salina (PBS)	50
3.11.2 Solução de Turk	51
3.11.3 Solução de Azul de Evans	51
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS	52
4.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE A INCAPACIDADE ARTICULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY EM RATOS	52
4.2 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE O AUMENTO DA P.V. NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY.	54

4.3 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE O AUMENTO DE EDEMA NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY.....	56
4.4 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY	58
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

Artrite é a desordem da articulação mais comum no mundo. Nas populações ocidentais ela é uma das mais freqüentes causas de dor, perda da função e afastamento das atividades laborativas em adultos (ARDEN, 2006). Tem grande importância epidemiológica devido à alta prevalência na população (cerca de 1%), associada ao caráter incapacitante da patologia. É uma desordem crônica degenerativa de etiologia multifatorial caracterizada pela perda progressiva da cartilagem articular, hipertrofia e deformação do osso subcondral e por inflamação secundária da membrana sinovial (SALTER, 2001; MAHAJAN; VERMA; TANDON, 2005). Os sintomas clínicos são dor, limitação da amplitude de movimentos articulares, edema, crepitação articular (LIANZA, 2001).

Apesar do grande progresso no tratamento da artrite reumatóide (A.R.), a falta de conhecimentos mais precisos sobre sua etiopatogenia tem dificultado o encontro de uma terapêutica que possa alterar significativamente o curso da doença (HARRIS, 1990).

1.1 CLASSIFICAÇÃO

Para Golding (2001), a artrite pode ser classificada em primária e secundária. A artrite é dita primária quando sua etiologia ou é desconhecida ou tem um mecanismo genético. Salter (2001), afirma que a secundária é aquela que ocorre devido a diversos fatores: degeneração da cartilagem (osteoartrite – OA) relacionada à idade; originária de alguma lesão traumática, inflamatória, metabólica ou decorrente de defeitos congênitos e/ou adquiridos. As causas traumáticas incluem as fraturas, sobrecargas intensas e repetitivas, lesões ligamentares, ruptura do menisco. Entre as causas metabólicas encontram-se a gota, acronose, pseudogota. São consideradas causas inflamatórias a artrite séptica e artrite reumatóide (AR). Quanto aos defeitos congênitos ou adquiridos consideram-se causas a luxação congênita do quadril, pés tortos congênitos e o efeito da compressão contínua de superfícies articulares durante o tratamento ortopédico de deformidades.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A artrite possui significativa prevalência na população geral e é a causa mais comum de comprometimento articular, afetando cerca de 28 milhões de indivíduos nos Estados Unidos. A distribuição é universal, acometendo ambos os sexos. Acomete todas as raças e áreas geográficas. Anormalidades histológicas e bioquímicas podem estar presentes a partir da segunda década de vida e alterações radiológicas são comuns a partir da terceira década. Os sintomas, porém tornam-se mais freqüentes com a progressão da idade (LIANZA, 2001).

As articulações mais comumente afetadas pela osteoartrite são em ordem decrescente o joelho, quadril, mão, coluna e pés, com os punhos, ombros e tornozelos menos frequentemente desenvolvem a doença (ARDEN, 2006; DELISA *et al*, 2002). Dessa forma vamos enfatizar neste estudo a artrite de joelho, pois até a sexta hora de inflamação induzida por zymosan não é possível observar degeneração da cartilagem articular (OA).

OA aparece em 35% nos joelhos de pessoas com trinta anos de idade ou mais e chega a afetar quase todos os indivíduos a partir dos cinquenta anos, embora nem todos os acometidos tenham sintomas desse envolvimento. Pelo menos 85% das pessoas com idade entre 70 - 79 anos apresentam diagnóstico radiológico desta doença (LAROCCA, 1999).

Estudos mais recentes relatam que erosões na cartilagem, reação subcondral e osteófitos estão presentes nos joelhos de 60% dos homens e 70% das mulheres que morrem na sétima e oitava décadas de vida. Dos pacientes com dor no joelho, aproximadamente 50% terão alterações radiográficas de OA e podem dessa forma ser classificados como OA sintomática (ARDEN, 2006).

Segundo Salter (2001), o tipo primário é mais comum nas mulheres, desenvolve-se espontaneamente durante a meia idade e progride lentamente como uma acentuação do processo de envelhecimento normal da articulação. O tipo secundário, mais comum nos homens, se desenvolve em qualquer idade como resultado de alguma lesão traumática, deformidade ou doença que tenha provocado danos à cartilagem articular.

Oliveira *et al.* (1995) fizeram um estudo da incidência de OA em joelho, mão e quadril de indivíduos de idade e sexo feminino e masculino padronizados e

encontraram para joelho a razão de 240 por 100.000 pessoas, mão 100 por 100.000 e quadril 88 por 100.000. A incidência dessa doença aumenta com a idade, e mulheres têm proporções maiores que homens, especialmente depois dos 50 anos de idade.

Portanto, a OA é mais comum em mulheres e nos joelhos. O fato de mulheres usarem saltos altos suscitou a hipótese de que seu uso poderia aumentar a prevalência de OA nessa população. Para essa avaliação, foram estudadas as forças sobre as articulações de membros inferiores de 20 mulheres que usavam de forma confortável saltos altos. Os dados obtidos mostraram um aumento médio maior que 23% na articulação femuropatelar, assim como um aumento de forças compressivas no compartimento medial dos joelhos das mulheres durante o uso dos saltos altos. A conclusão que chegaram é de que o uso de saltos altos pode predispor a alterações degenerativas dos joelhos (KERREGAN; TODD; RILEY, 1998).

1.3 FATORES DE RISCO

A etiologia é desconhecida e fatores múltiplos interagem para causar esta doença:

- a) Idade - Todos os estudos indicam que a prevalência e incidência da OA radiográfica e sintomática aumentam severamente com a idade (FELSON *et al.*, 1995; FELSOL *et al.*, 1987; LAWRENCE, 1998; SAASE *et al.*, 1989; KALLMAN; WIGLEY; SCOTT, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1995). Este aumento ocorre principalmente nas articulações mais afetadas como o joelho devido ao excesso de peso na articulação, diminuição dos mecanismos protetores articulares neuromusculares (ex: diminuição da função muscular e respostas neurológicas periféricas) (NEWMAN *et al.*, 2003; HURLEY, 1999; SHARMA, 1999) e aumento da instabilidade articular (ex: frouxidão ligamentar) (SHARMA *et al.*, 1999). A elasticidade e capacidade reparativa da cartilagem pode diminuir com a idade devido à redução das respostas anabólicas, perda de condrócitos, e estreitamento da cartilagem (LOESER; SHAKOOR, 2003).

-
- b) Endócrinos – quase todos os hormônios agem direta ou indiretamente em células do tecido conjuntivo: fibroblastos, osteoblastos e condrócitos. O hormônio de crescimento regula o condrócito maduro, amitótico; a insulina aumenta a síntese de proteoglicanas e por este motivo, pacientes diabéticos têm maior incidência de OA; diminuição da tiroxina produzida pela tireóide provoca o hipotireoidismo que aumenta a incidência de OA quando comparada à população controle normal; receptores de estrógenos têm sido vistos em condrócitos (LAROCCA, 1999). Os sintomas da OA se iniciam com freqüência na menopausa, o que se deve a queda de estrogênio. Existem muitos estudos examinando o uso do estrogênio pós menopausa e OA, e muitos (SAMANTA *et al.*, 1993; HANNAN *et al.*, 1990; NEVITT *et al.*, 1994; SPECTOR *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1998; HART; DOYLE; SPECTOR, 1999) mas nem todos (SOWERS *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996) encontraram uma queda na prevalência ou incidência da OA no joelho e quadril com uso de estrogênio.
- c) Étnicos e raça – Relatos mostram que chineses e japoneses parecem estar protegidos contra a OA primária (LAROCCA, 1999). O baixo risco de OA do quadril e mão é consistente com a baixa susceptibilidade para OA em chineses, possivelmente ligados a fatores genéticos (ZHANG *et al.*, 2004).
- d) Genéticos - Existem evidências indicando a contribuição genética na suscetibilidade de OA de joelho, mão e quadril nas mulheres (MACGREGOR *et al.*, 2000; SPECTOR *et al.*, 1996; KAPRIO *et al.*, 1996; FELSON *et al.*, 1998; LANYON *et al.*, 2000) e OA em quadril nos homens (LANYON *et al.*, 2000). Esses estudos sugerem que genes múltiplos estão envolvidos na susceptibilidade da OA, e que fatores ambientais também têm importante influência na expressão da doença.
- e) Mecânicos – em caso de deformidades articulares, congênitas ou adquiridas (pela diminuição da área de contato articular); em casos de perturbação da dinâmica articular (ex: lesões de ligamentos ou menissectomias) e pelo uso repetitivo e exagerado de uma articulação (ex: joelhos de jogadores de futebol) também parece estar relacionado com a ocorrência de OA (LAROCCA, 1999).

1.4 QUADRO CLÍNICO

Segundo Golding (2001), os sintomas relacionam-se com: desgaste articular; episódios de inflamação sinovial; degeneração e inflamação dos ligamentos ao redor das articulações e possivelmente, deposição de apatita ou outros sais de cálcio, na sinóvia.

Os sintomas clínicos são:

- a) Dor – a princípio sutil e mais tarde intensa, é intermitente, agravada pelo movimento articular e aliviada pelo repouso. Evolui para dor inclusive em repouso (SALTER, 2001). Segundo Larocca (1999) a dor tem origem em estruturas articulares e periarticulares porque a cartilagem é desprovida de raízes nervosas. Dentre as estruturas articulares, o osso pode apresentar dor por aumento da pressão intramedular, ou pela lesão subcondral, elevação do perióstio pelos osteófitos, fibrose na cápsula articular. Enquanto que os tecidos periarticulares distendidos são: tendões, ligamentos, bursas e outras estruturas de partes moles (LIANZA, 2001; DELISA *et al.*, 2002).
- b) Rigidez – matinal ou após períodos de imobilidade, com duração menor que 20 minutos (LAROCCA, 1999).
- c) Limitação do movimento - o grau de mobilidade apresenta-se diminuído pela fibrose capsular, osteofitose, irregularidade das superfícies articulares. Pode ocorrer crepitação (sensação de atrito de osso contra osso) (GOLDING, 2001).
- d) Tumefação - a tumefação sinovial ou derrame ocorre em episódios de OA aguda, principalmente em joelhos. Os cistos sinoviais podem ser a causa de tumefações palpáveis (ex: cistos de Baker na face posterior do joelho) (GOLDING, 2001).
- e) Atrofia muscular – os músculos que atuam sobre as grandes articulações afetadas tornam-se atrofícos ou hipotônicos (GOLDING, 2001).
- f) Deformidade - um alinhamento defeituoso da articulação (ex: genu valgo) pode ser conseqüência das irregularidades das superfícies articulares (GOLDING, 2001).
- g) Nódulos – proliferação ósseo-cartilaginosa nos bordos dorso-mediais e dorsos laterais de interfalanganas distais e proximais (GOLDING, 2001).

1.5 FISIOPATOLOGIA

O processo patológico da artrite degenerativa (OA) nos seus estágios iniciais é similar tanto na primária quanto na secundária (SALTER, 2001).

1.5.1 Cartilagem articular

A cartilagem é constituída por um tecido conjuntivo formado por células (condrócitos) e matriz extracelular. Sua função é “absorver” as forças aplicadas sobre a articulação e distribuí-las sobre a cartilagem articular. O bom desempenho da cartilagem depende da produção e arranjo tridimensional adequados dos componentes da matriz (principalmente colágeno tipo II, IX, XI e glicosaminoglicanas). Fatores inerentes ao condrócito ou externos a ele resultam em modificação da composição e estrutura dessa matriz, com prejuízo de sua função biológica. A cartilagem evolui com ruptura de sua integridade física, desenvolvendo fissuras, fibrilação e ulcerações (GOLDMAN; BENNETT, 2001).

A OA se inicia com degeneração na cartilagem articular. A matriz demonstra perda em conteúdo proteoglicano, os quais têm sua capacidade de agregação alterada e um aumento no teor de água. As cadeias de condroitinossulfato estão encurtadas e a composição das glicosaminoglicanas é anormal. O condrócito, que normalmente é uma célula amitótica, divide-se para formar clones celulares. Estas células aumentam a sua produção de colágeno tipo II e de proteoglicanos, numa tentativa de reparar o processo destrutivo da matriz. Quando a capacidade de síntese da matriz é menor do que a destruição, predomina o processo catabólico e a superfície da cartilagem perde sua textura lisa, torna-se fibrilar, desenvolvendo fendas e erosões (LAROCCA, 1999). A superfície articular, normalmente branco-azulada, lisa e brilhante, torna-se amarelada, granulosa e opaca (SALTER, 2001).

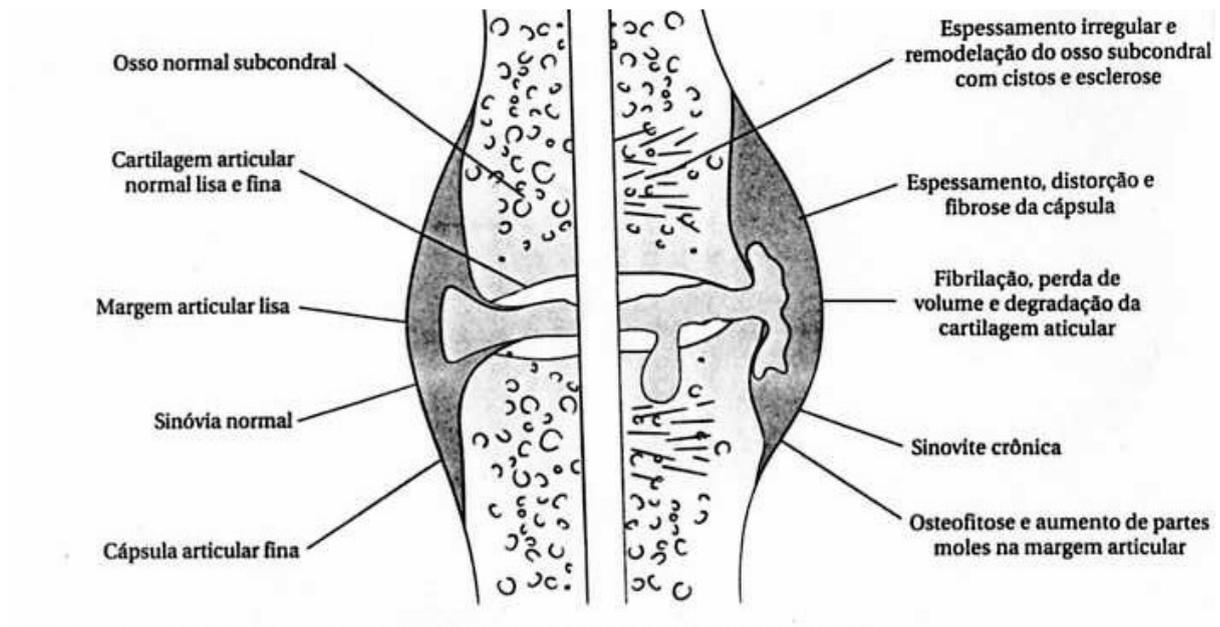


Figura1: Articulação sinovial e artrósica. Adaptado de Salter (2001)

Os condrócitos sintetizam proteoglicanas e colágeno em ritmo acelerado, entretanto, esta produção é deficiente devido à progressiva destruição efetuada pelas enzimas lisossômicas (SALTER, 2001).

Na área periférica da articulação, a cartilagem responde com a hipertrofia e a hiperplasia, formando uma engrossada borda cartilaginosa (condrófito) subsequentemente sofrerá ossificação endocondral, tornando-se uma protuberância óssea (osteófito). Os osteófitos podem tornar-se suficientemente grandes a ponto de restringir o movimento articular (SALTER, 2001).

1.5.2 Osso subcondral

O osso subcondral esponjoso normal é mais duro do que a cartilagem, mas bem mais flexível do que o osso cortical denso. Assim sendo, como a cartilagem, também serve como um amortecedor. Na área central, onde a fricção e o stress são máximos, o osso subcondral se torna eburnificado; além disso, se hipertrofia em toda a sua extensão, a ponto de se tornar mais denso radiograficamente (esclerótico). Nas áreas periféricas, ao contrário, onde ocorre estresse mínimo, o osso subcondral atrofiado se torna menos denso radiograficamente (rarefeito). A redistribuição dos estresses biomecânicos na articulação conduz a uma remodelação do osso subcondral (SALTER, 2001).

Essa proliferação aparenta ser uma tentativa de aumentar a superfície de suporte de peso, mas acaba por comprometer a elasticidade e aumentar a rigidez do osso, o qual se torna mais sensível ao desenvolvimento de microfraturas. As microfraturas cursam com formação de calos e mais rigidez óssea. Surgem osteófitos, luxações e instabilidade articular (LAROCCA, 1999).

1.5.3 Membrana sinovial e cápsula fibrosa

A membrana sinovial normal reveste as articulações, exceto na região de cartilagem articular. A superfície interna dessa membrana é composta por dois tipos de células: sinoviócitos do tipo A, que se assemelham estrutural e funcionalmente a macrófagos, e os do tipo B, os quais têm características de fibroblastos. Estas células repousam sobre um tecido conjuntivo que pode ser frouxo, denso ou adiposo. A artrite reumatóide caracteriza-se por sinovite intensa com aumento do influxo celular tanto na membrana como no líquido sinovial. No líquido sinovial, as células na fase aguda ou nas crises de agudização são principalmente neutrófilos, enquanto na sinovite crônica reumatóide predominam células linfomononucleares. Ocorre intensa proliferação linfóide devido, possivelmente à produção local de citocinas a partir de células residentes uma vez que, como dito acima, as células sinoviais do tipo A são semelhantes a macrófagos e, portanto, uma vez estimuladas, podem liberar citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória. Além do aumento do número e da hiperplasia de sinoviócitos, ocorre migração de monócitos do sistema periférico para a sinóvia (HARRIS,1990) o que aumenta a população de células imunocompetentes na fase crônica da sinovite reumatóide. Acrescentem-se as células endoteliais dos vasos da membrana sinovial, que é ricamente irrigada, e os condrócitos da cartilagem articular, e teremos um conjunto de células capazes de potencializar uma reação inflamatória a partir de um estímulo inicial (SEKI et al.,1988; CANNON et al.,1996).

Todos os elementos da articulação sofrem hipertrofia: cápsula, ligamentos, tendões e músculos. O líquido sinovial é empurrado pelas fendas da cartilagem até o osso subcondral nos pontos de microfraturas, e a medula reage à sua presença, levando a formação de pseudocistos (LAROCCA, 1999).

A cápsula fibrosa se torna muito engrossada e fibrótica, limitando ainda mais o movimento articular (GOLDING, 2001).

1.5.4 Músculos

Os músculos que controlam as articulações afetadas demonstram espasmo em resposta à dor. Eventualmente os músculos flexores sofrem contratura, provocando deformidade na articulação e maior restrição ao movimento articular. Nos casos em que o movimento articular é limitado, excessivos estresses são aplicados a áreas limitadas da cartilagem articular, sendo isto outro fator no processo da degeneração (SALTER, 2001).

1.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A INFLAMAÇÃO

A reação inflamatória é uma resposta do tecido vascularizado a estímulos lesivos (físicos, químicos ou mecânicos), com a finalidade de eliminar o agente agressor e restaurar o tecido à sua forma e função normais. Essa resposta compreende fenômenos vasculares, teciduais e linfáticos e manifesta-se de maneira estereotipada, de modo que os sinais clínicos de inflamação são: calor, rubor, tumor, dor e perda da função (GARCIA-LEME, 1989).

Os fenômenos vasculares se iniciam com breve vasoconstrição, seguida de vasodilatação e aumento do fluxo local, seguido de aumento de permeabilidade vascular (PV), com conseqüente extravasamento do fluido e material protéico, do plasma para o interstício, levando à formação do edema (GARCIA-LEME *et al.*, 1993). O componente celular da reação é representado, principalmente, por leucócitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (MN) (monócitos e linfócitos) que migram para o tecido adjacente. A migração de leucócitos circulantes para o tecido é o evento central da resposta inflamatória e depende da expressão de moléculas de adesão para o acúmulo dessas células no local (GARCIA-LEME *et al.*, 1993). Nos primeiros estágios de uma resposta aguda, há predomínio de neutrófilos (FLOREY, 1970). Uma vez no foco de lesão, os leucócitos eliminam os agentes lesivos por meio de fagocitose. Concomitantemente a esse fenômeno, ocorre um aumento do metabolismo oxidativo

dos leucócitos, resultando na produção de agentes microbicidas como o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BABIOR, 1984; ISCHIROPOULOS *et al.*, 1992). Além destes agentes, os leucócitos, ativados por citocinas, como o $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ e IL-1, podem produzir óxido nítrico que, na forma de radical livre, atua também como agente microbicida (HIBBS *et al.*, 1989).

Acredita-se que a natureza sensivelmente padronizada da reação inflamatória é a expressão de fenômenos estruturais e funcionais que ocorrem na microcirculação e no tecido intersticial adjacente, com a participação da inervação sensitiva local. Esses fenômenos são desencadeados pela ação de mediadores químicos, liberados nos estágios iniciais da resposta. Basicamente, os mediadores são de origem celular (histamina, serotonina, eicosanóides, óxido nítrico - NO - fator ativador de plaquetas - PAF – substância P, citocinas e outras proteínas leucocitárias) ou plasmática (cininas e sistema do complemento) (GARCIA-LEME *et al.*, 1993; BUCKLEY; BRAIN, 1994).

Dentre os diversos mediadores envolvidos no processo inflamatório, encontram-se os eicosanóides e as citocinas. Os eicosanóides são formados após a ativação de complexos enzimáticos. Destes, as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) originam produtos oxigenados como as prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXAs), leucotrienos (LTBs); as lipoxigenases (5, 12 e 15 lipoxigenases) geram os ácidos hidroperoxi- e hidroxi-eicosatetraenóicos e o citocromo P450, origina os epóxidos e as lipoxinas (SMITH, 1992; APPLETON; TOMLINSON; WILLOUGHBY, 1996). Dentre as PGs, deve-se ressaltar a PGE_2 , que promove vasodilatação, potencia o aumento da PV causado pela histamina e a bradicinina e está envolvida no fenômeno da dor (CIRINO, 1998).

As citocinas, por sua vez, são uma família de mediadores protéicos, importantes em interações intercelulares e na indução e modulação de um grande número de processos inflamatórios e metabólicos. Além disso, participam ativamente da resposta imune, principalmente na ativação e proliferação dos linfócitos; estão envolvidas também na resposta pirogênica e de fase aguda. As citocinas são produzidas por vários tipos celulares. As citocinas mais intimamente relacionadas ao processo inflamatório são a interleucina-1, -6, -8 e o fator de necrose tumoral- α ($TNF-\alpha$) (HOFSLI *et al.*, 1989; PENNICA; NEDWIN; HAYFLICK, 1984).

A reação inflamatória aguda, de modo geral, acarreta fenômenos de regeneração e reparo, com resolução do processo, a partir da eliminação dos leucócitos em apoptose por macrófagos, ou podem ocorrer modificações marcantes de suas características, com cronificação da reação. À fase inicial, segue-se uma fase que adquire um caráter proliferativo, em que predominam as células mononucleares (AUGER ; ROSS, 1992).

1.7 A INFLAMAÇÃO ARTICULAR

Os processos inflamatórios em articulações, também denominados artrites, diferem entre si pela etiologia, quadro clínico, natureza da resposta inflamatória, proporção da destruição do tecido da articulação e progressão da doença (CASSIM; MODY; BHOOLA, 2002).

A articulação é constituída por duas superfícies ósseas, recobertas pela cartilagem articular, ligamentos e membrana sinovial (cápsula fibrosa), a qual delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. A membrana sinovial é constituída por sinoviócitos do tipo A (macrófagos sinoviais) e do tipo B (fibroblastos sinoviais), além de vasos sanguíneos e nervos sensoriais. A cartilagem articular é composta, predominantemente, pela matriz extracelular (colágenos, proteoglicanos e ácido hialurônico) e pelos condrócitos (NAGASE; KASHIWAGI, 2003).

Até o presente, os processos inflamatórios articulares foram melhor caracterizados em modelos experimentais que induzem a artrite reumatóide (AR). A AR é uma doença inflamatória crônica caracterizada por lesão de células endoteliais, deposição de fibrina, migração/invasão de células polimorfonucleares e hiperplasia celular (SCHUMACHER; KITRIDOU, 1972), nos estágios iniciais. Estes eventos culminam no espessamento da membrana sinovial por um tecido proliferativo – pannus articular - constituído, predominantemente, por macrófagos e fibroblastos. Adicionalmente, ocorre o aumento da PV, que resulta em aumento do fluido sinovial (DREIER *et al.*, 2001; CASSIM; MODY; BHOOLA, 2002).

Ainda, a dor é um evento importante na AR, assim como nos demais tipos de inflamação em articulações e resulta em incapacitação. Com a progressão do processo, há invasão do osso subcondral e, em alguns casos, há presença de hemorragia e necrose (HARRIS, 1990; DREIER *et al.*, 2001). A literatura mostra que

essa doença afeta cerca de 1% da população mundial e causa perdas sócio-econômicas graves. Até o presente, nenhum dos fármacos testados foi eficaz para a resolução da AR (CHOY ; PANAYI, 2001).

A causa primária da AR ainda é desconhecida, porém, acredita-se que a ativação da resposta imunológica por diferentes estímulos, em indivíduos geneticamente susceptíveis, seja um fator importante. Vários estudos sugerem a participação de agentes infecciosos, substâncias endógenas e imunoglobulinas alteradas nesta ativação (GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; HARRIS, 1990; BLÄß; ENGEL; BURMESTER, 1999). Inicialmente, há ativação de linfócitos T, que por sua vez, estimulam monócitos, condrócitos, macrófagos e fibroblastos sinoviais a produzirem citocinas e metaloproteinases (ISLER *et a.*, 1993), que promovem a infiltração de diferentes tipos de leucócitos para a articulação (CHOY; PANAYI, 2001) amplificando o processo inflamatório articular. Além disso, os linfócitos T estimulam os linfócitos B a produzirem o fator reumatóide, uma imunoglobulina que parece estar associada ao aumento da morbidade e amplificação da AR (CHOY; PANAYI, 2001).

Em modelos experimentais de inflamação articular, verificou-se que as primeiras células que migram para a articulação são os neutrófilos (ROCHA; ANDRADE; JANCAR, 1996). Estas células fagocitam os imunocomplexos formados durante o processo indutor e liberam espécies reativas de oxigênio, eicosanóides e PAF no local da inflamação (ROCHA *et al.*, 1997). Estes mediadores, por sua vez, ativam células residentes e infiltradas na articulação que interagem entre si e liberam outros mediadores, como citocinas (IL-1, -2, -6, TNF- α), interferon- α e - γ (INF - α e - γ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de transformação de crescimento β (TGF- β) e o óxido nítrico (NO) (HARRIS, 1990; FARRELL *et al.*, 1992; CANNON *et al.*, 1996).

Outros mediadores importantes na inflamação articular estão representados pelos derivados do sistema caliceína-cinina, principalmente a bradicinina, por prostanóides (PGE₂) e neuropeptídeos (substância P). Sabe-se que estes mediadores estão intimamente relacionados ao desenvolvimento da dor articular e incapacitação (LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987; CASSIM; MODY; BHOOLA, 2002). Ademais, interagem entre si, modulando a sua liberação em um sistema de cascata. Assim, foi demonstrado que a substância P induz a liberação de

prostaglandina E2 e metaloproteinases por células sinoviais, contribuindo para o desencadeamento da dor articular . Vários autores demonstraram a participação da bradicinina e substância P na regulação da produção de citocinas inflamatórias em humanos e em modelos experimentais (LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987). Rocha *et al.*, (1997), demonstraram o aumento da concentração de PGE2 na cavidade articular de ratos, 6 horas após a indução da AR. Ainda, foi demonstrado que a inibição da iNOS diminui a dor durante o processo inflamatório articular (ROCHA *et al.*, 2002). Apesar de relevante, o fenômeno da dor na inflamação articular necessita de estudos adicionais para o seu esclarecimento.

1.8 DOR - Conceitos gerais

A **IASP** (Associação Internacional do Estudo da Dor) define a dor como uma "experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano", demonstrando que a dor sempre apresenta um componente subjetivo. A dor contém um fator cognitivo e emocional e, é mediada pelo sistema nervoso, no entanto, clínica e experimentalmente se faz necessário a distinção entre a dor percebida e a resposta ao dano tecidual ou nocicepção (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003; MERKE ; BOGDUK, 2007).

A nocicepção é um termo aplicado aos mecanismos neurológicos que detectam o estímulo lesivo (FERREIRA, 2008). Os nociceptores são receptores sensitivos presentes em alguns tecidos (MACHADO, 2000). Nem sempre a estimulação dos nociceptores leva à percepção da dor, uma vez que a percepção da dor é dependente da facilitação central, além da modulação descendente de estruturas do sistema nervoso supra-segmentar envolvidos com a discriminação, localização e com reações emocionais, afetivas e neurovegetativas (SERRANO, 2002; MAYER; PRICE, 1976; HUGHES, 1975; PERT; SNYDER, 1973; REYNOLDS, 1969).

Em Kandel; Schwartz; Jessel, 2003, encontra-se a divisão da dor em duas grandes classes: a dor nociceptiva, que é resultante da ativação direta dos nociceptores em resposta a danos teciduais, na maioria da vezes mediada pelo processo inflamatório, e a dor neuropática resultado da lesão direta do sistema nervoso periférico ou central.

1.8.1 Sistemas de neuromodulação envolvidos no processo doloroso

A transmissão dolorosa é um mecanismo que envolve interações de estruturas do sistema nervoso central e periférico desde a superfície da pele até o córtex cerebral (BESSION, 1999; GOZZANI, 2003; VALE, 2003). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Na dor nociceptiva o fenômeno sensitivo-doloroso é originado pela transformação dos estímulos ambientais em potenciais de ação. Esses estímulos ambientais são percebidos por terminações nervosas livres, presentes nas fibras nervosas periféricas. Os neurônios aferentes nociceptores são diferenciados dos outros tipos de receptores mecânicos e térmicos por possuírem um limiar mais alto, e são ativados apenas por estímulos de intensidade nociva, em potencial para causar dano tecidual (GOZZANI, 2003).

As fibras de condução dos impulsos nociceptivos são do tipo Ad (aferentes mielinizadas de baixo calibre) e C (fibras de condução aferente desmielinizadas) (MACHADO, 2000). As fibras Ad possuem maior velocidade de condução. Estão presentes nos tecidos musculares ou viscerais, e são responsáveis pela sensação de dor aguda (AZEVEDO *et al.*, 2003). As fibras C possuem baixa velocidade de condução, causam uma dor tipo queimação e estão distribuídas nos tecidos e na pele (GOZZANI, 2003).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas medulares estão localizados nos gânglios das raízes dorsais; as fibras penetram na medula espinhal, terminando na substância cinzenta do corno dorsal (PLEUVRY; LAURETTI, 1996). Estes nociceptores primários fazem sinapse na medula espinhal com os neurônios de segunda ordem. Estes neurônios cruzam a medula e ascendem pelo trato espinotalâmico, terminando no tálamo (Figura 02). No tálamo ocorre a sinapse com os neurônios de terceira ordem, e estes irão emitir seus axônios ao córtex somato-sensorial, local onde ocorre a somatização deste estímulo ou, estes neurônios de terceira ordem mandam seus axônios para o giro do cíngulo anterior, onde a dor irá sofrer as influências do componente emocional e ser modulada via liberação de

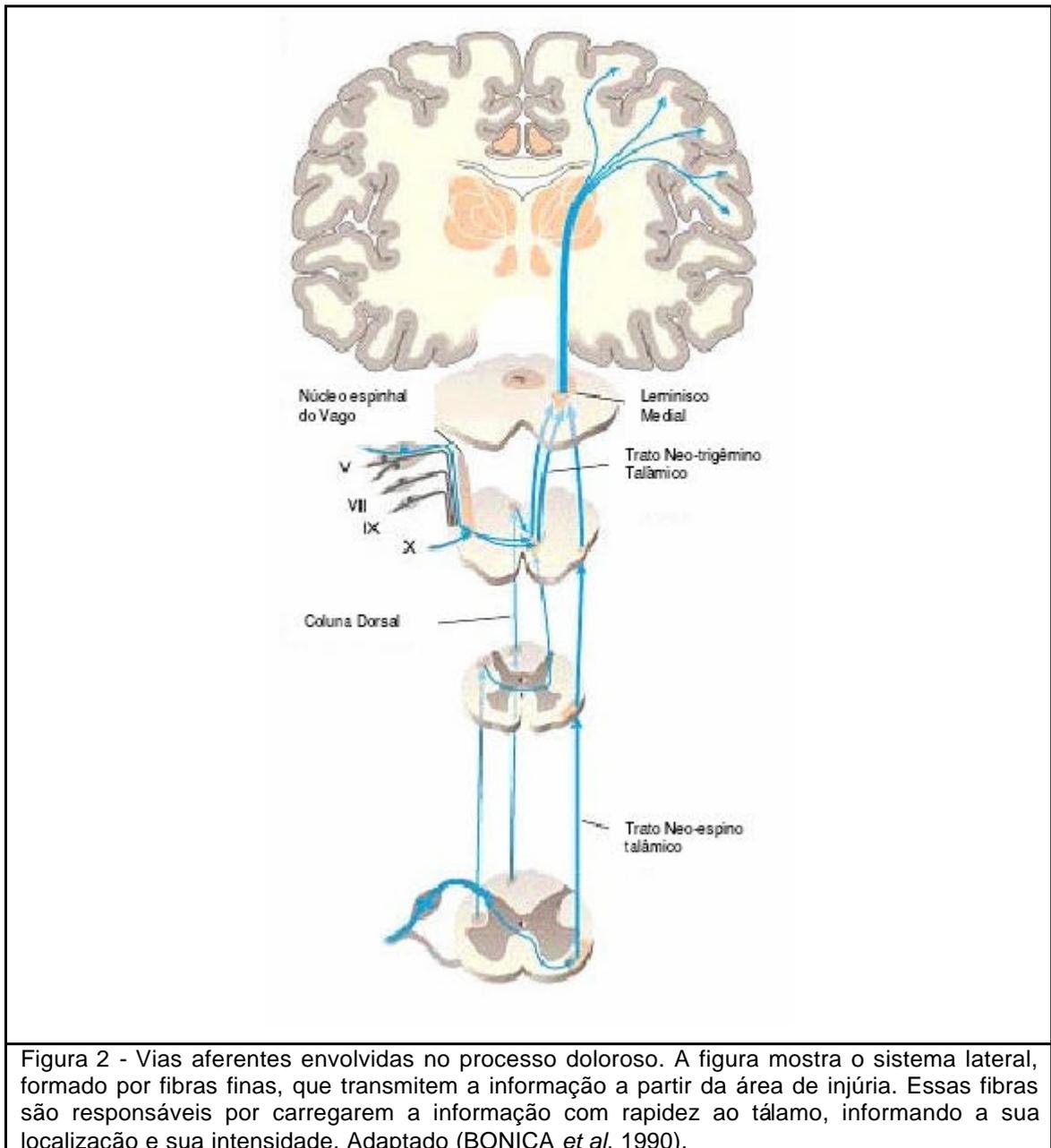
neurotransmissores específicos (BESSON, 1999; JABBUR; SAADÉ, 1999). As fibras eferentes completam o circuito nervoso retornando à periferia, provocando a nocicepção (BONICA; YAKSH; LIEBESKIND, 1990; BESSON, 1999).

1.8.2 Classificação da dor

Embora a dor seja uma experiência particularizada, independente dos estímulos que a condicionam, sua classificação na clínica é de particular importância para o diagnóstico de várias patologias, e serve de base para a adequada terapêutica.

A dor aguda ou crônica é uma modalidade sensorial e emocionalmente desagradável que desempenha, entre outros, o papel de alerta para o organismo, embora a dor crônica não tenha qualquer função de alerta e gere acentuado estresse. Na essência, é uma manifestação subjetiva que varia de acordo com a experiência individual (BESSON; CHAOUCH, 1987; CODERRE *et al.*, 1993; SCHAIBLE ; GRUBB, 1993).

Na dependência do tipo de lesão associada e/ou dos mediadores envolvidos podemos classificar a dor como: Neuropática, aquela em que está presente uma disfunção de nervo; Neurogênica, aquela em que o nervo apresenta uma lesão real; Nociceptiva, aquela em que há uma estimulação excessiva dos nociceptores; Psicogênicas, aquela em que os fatores psicológicos são preponderantes, a hiperalgia, que é uma sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso, e como hiperestesia, definida como uma sensibilidade alterada, anormal, a um dado estímulo sensorial (BESSON, 1999; OLIVEIRA, 2003).



O critério mais simples de classificação da dor continua sendo aquele que relaciona o tempo de duração da mesma. Assim, teremos a dor aguda, que se caracteriza por uma lesão real com conseqüente ativação dos nociceptores, sendo findada quando o processo de reparação tecidual ocorre. A dor crônica é aquela que persiste depois de terminado o processo causal do estímulo nociceptivo. (LOOSER; MELZACK, 1999; CARR; GOUDAS, 1999).

1.8.3 Hiperalgisia

Durante o processo inflamatório a liberação dos mediadores químicos é capaz de modular a resposta inflamatória e interferir com a atividade de fibras nervosas sensitivas aferentes. Essa interferência é mediada pela ligação dessas substâncias em receptores específicos expressos nas fibras sensitivas, e/ou ativação de mensageiros secundários, induzindo a hiperalgisia (FERREIRA; LOURENZENTI; POOLE, 1993).

A hiperalgisia é causada pela sensibilização dos receptores da dor (nociceptores), ela envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas, pela ação de mediadores químicos, quanto facilitação central (corno dorsal da medula e tálamo) da transmissão nervosa (DRAY, 1994). No sistema nervoso periférico os mediadores químicos agem sobre as terminações nervosas enquanto no sistema nervoso central ocorre facilitação da transmissão sináptica.

Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual representa a causa imediata da dor. Esta lesão resulta da liberação local de diversos mediadores químicos que irão agir sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente, ou exarcebando sua sensibilidade para outras formas de estímulos (hiperalgisia) (RANG; URBAN, 1991).

É importante salientar que, além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores “silenciosos” ou “adormecidos” (*silent nociceptors/ sleeping nociceptors*), são ativados durante processos inflamatórios, contribuindo para a hiperalgisia. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988; SCHEMELZ *et al.*, 1994).

Em danos teciduais e/ ou inflamação, ocorre a liberação de muitas substâncias químicas tais como: bradicinina (BK), histamina, eicosanóides, substância P (SP), serotonina (5-HT), adenosina trifosfato (ATP), íons de hidrogênio (H⁺), óxido nítrico (NO) e peptídeos opióides. Todas estas substâncias participam na modulação da hiperalgisia associada com dano tecidual (BIRCH, 1997).

A amina vasoativa histamina é o mediador dos primeiros eventos da inflamação aguda, responsável pelo aumento da permeabilidade. A extensão da

liberação de outros mediadores como prostaglandinas e NO é determinada pela liberação primária de histamina. A histamina exerce ação biológica pela ativação de receptores H1 expressos, também, em neurônios sensitivos. A ativação desses receptores, no terminal periférico sensitivo permite o aumento do cálcio intracelular, acarretando na liberação de neuropeptídeos, capazes de ativar os nociceptores e promover a síntese de prostaglandinas (CLOUGH, 1999).

A serotonina é uma amina derivada do aminoácido triptofano, assim como a histamina, a serotonina possui propriedades vasoativas. Está presente apenas nos mastócitos de certas espécies, como o rato e o camundongo. No homem, está localizada nas plaquetas e é ativada pelo PAF (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994).

Em receptores periféricos, a serotonina produz excitação e em receptores do sistema nervoso central promove analgesia, embora ainda não se conheça detalhes deste mecanismo, sabe-se que durante um processo inflamatório, a serotonina se liga a receptores periféricos 5HT-3, causando a ativação dos nociceptores (BAÑOS; NAVARRO, 1996).

Nos eventos inflamatórios a bradicinina é considerada um importante mediador para a gênese da dor, ele atua pela ligação em receptores podendo tanto estimular diretamente os nociceptores ou desencadear os mecanismos hiperalgésicos (FERREIRA; LOURENZENTTI; POOLE, 1993).

Um dos radicais livres mais evidenciados na pesquisa científica atual é o NO. Ele atua em condições fisiológicas e patológicas (MOILANEN ; VAPAATALO, 1995). Em processos inflamatórios possui ação vasodilatadora (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994).

As prostaglandinas e leucotrienos são cadeias longas de gorduras ácidas solúveis em lipídeos que ocorrem em todos os tecidos. São derivados do ácido aracônico e sintetizados, rapidamente, em resposta a uma variedade de estímulos. Na inflamação, os neutrófilos e macrófagos são importantes fontes de origem (PAIRET; ENGELHARDT, 1996).

Podemos dizer que a lesão tecidual ativa os nociceptores desencadeiam uma reação de defesa com a liberação de mediadores químicos como prostaglandinas 1 (PG1) e prostaglandinas E₂ (PGE₂). Estes mediadores químicos, além das alterações vasculares típicas do processo inflamatório, reduzem o limiar de excitabilidade e sensibilizam os nociceptores, dando origem a chamada hiperalgisia

primária, facilitando assim a estimulação destes nociceptores aos estímulos lesivos (BESSON, 1999; AZEVEDO *et al.*, 2003).

O glutamato e a substância P são os responsáveis pela mediação da transmissão excitatória a nível medular. O glutamato gera potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos, sendo responsável pela ativação dos neurônios pós-sinápticos espinotalâmico, funcionando como neurotransmissor, enquanto a substância P determina o aparecimento de potenciais pós-sinápticos lentos, de baixa intensidade e de longa duração, funcionando como neuromoduladora de excitabilidade pós-sináptica (BROMM; LORENZ, 1998).

Além da estimulação das fibras sensitivas pelos mediadores químicos, a liberação de radicais livres, o edema e a alteração do pH local, proporcionados pela inflamação, são fatores de interferência na atividade das fibras nervosas (DRAY, 1995).

1.9 ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOZAN (ZY)

Zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância indutora de fenômenos flogísticos sistêmicos, largamente empregada em estudos farmacológicos (KEYSTONE *et al.*, 1977; GADÓ; GLIGER, 1991).

O Zy tem a propriedade de induzir inflamação quando injetado na articulação de ratos, com subaguda e persistente proliferação da sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo a maioria dos achados da artrite reumatóide (KEYSTONE *et al.*, 1977; GADÓ; GLIGER, 1991; GEGOUT; TERLAIN; NETTER, 1995).

Segundo Rocha *et al.* (1999) a inflamação articular induzida por Zy no joelho de ratos é caracterizada por acentuada migração celular, liberação de mediadores inflamatórios, assim como por desenvolvimento de hiperalgesia. Como resultado da artrite induzida por Zy ocorre alteração da marcha dos animais, que foi denominada incapacitação articular (IA). Após a injeção do Zy, os animais desenvolvem progressiva IA que se inicia na segunda hora e é máxima entre a terceira e quarta horas de inflamação. Há ainda aumento da permeabilidade vascular levando a formação de edema local e ainda acentuado influxo celular, que é máximo na sexta hora, com predomínio de polimorfonucleares.

1.10 DEXAMETASONA

A dexametasona pertence à classe dos corticosteróides, como outros hormônios esteróides, que atuam controlando a velocidade de síntese de proteínas. Seu principal efeito se refere a uma profunda alteração na resposta imune linfocitária, representada pela ação antiinflamatória e imunossupressora, podendo prevenir ou suprimir processos inflamatórios de várias naturezas, inclusive resultantes de radiações, mecânicos, químicos e infecciosos (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Os corticosteróides inibem manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação, ou seja, não só o rubor, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparo das feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica (RANG; DALE; RITTER, 2001).

As ações sobre as células inflamatórias são: menor saída de neutrófilos dos vasos sanguíneos e redução da atividade dos neutrófilos e dos macrófagos; diminuição da ação das células T auxiliares e proliferação clonal reduzida de células T; diminuição da ação dos osteoblastos e maior atividade dos osteoclastos (tendência ao desenvolvimento de osteoporose) (RANG; DALE; RITTER, 2001).

As ações sobre os mediadores das respostas inflamatórias e imunes são: diminuição na produção de prostaglandinas; redução na síntese de citocinas; redução na concentração de componentes do complemento, redução na produção de óxido nítrico induzido; menor liberação de histamina dos basófilos; diminuição na síntese de IgG (RANG; DALE; RITTER, 2001).

1.11 LASER

A palavra laser “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, ampliação da luz por emissão estimulada de radiação, a qual não é ionizante. As características que diferenciam a luz laser das outras fontes luminosas são monocromaticidade, colimação, coerência espacial e temporal. A monocromaticidade significa que a luz laser emitida apresenta apenas um único comprimento de onda, o qual é definido pelo meio ativo e pela refletividade dos espelhos do laser. A maioria dos lasers apresenta feixes colimados, isto é, com um

mínimo ângulo de divergência. A coerência é a sincronicidade das ondas de luz, onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 2002).

A interação da luz laser com o tecido é determinada pelo comprimento de onda da emissão laser e pelas características ópticas do tecido alvo (DEDERICH, 1991 *apud* MISERENDINO; PICK, 1995). E também pela densidade de potência (irradiância); energia total entregue sobre a área da superfície irradiada (densidade de energia ou fluência); duração da exposição e o modo de entrega da energia para o tecido alvo (isto é, contínuo x pulsado; contato x não contato) (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; MISERENDINO; PICK, 1995; BAXTER, 1997; TUNER; HODE, 2002).

Por ser uma radiação óptica, o laser está incluído no espectro eletromagnético, tendo como intervalo espectral, mais usado na prática clínica e laboratorial, os comprimentos de onda de 630 a 1300 nm, incluindo a luz visível e a parte próxima do espectro infravermelho, chamado de “janela terapêutica” para tecidos biológicos (BAXTER, 1997). O espectro eletromagnético pode ser observado na figura 3.

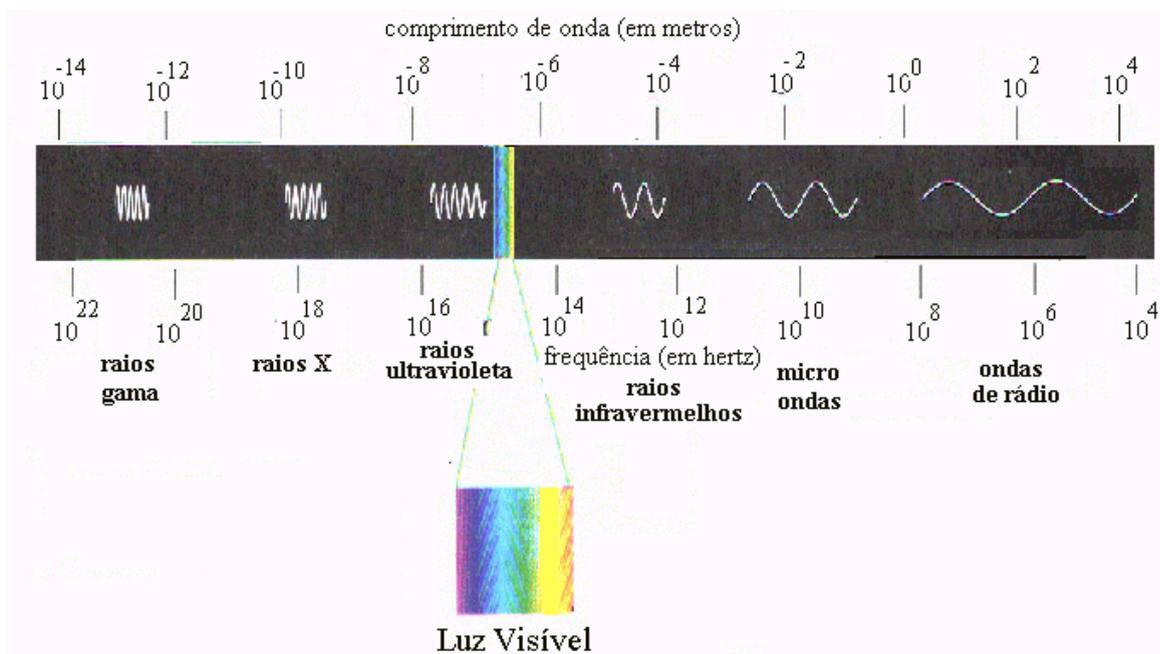


Figura 3 Espectro Eletromagnético

Fonte: <http://educar.sc.usp.br/optica/espectro.gif>

Os lasers situados na região do vermelho e do infravermelho próximo do espectro eletromagnético são utilizados na terapia de baixa potência, os quais

emitem radiações com potência inferior a 1 W, sendo assim, não vão induzir efeitos térmicos, nem ablação (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998; GENOVESE, 2000).

O laser arseneto de gálio (GaAs) é uma radiação obtida através da estimulação de um diodo semiconductor, formado por cristais de arseneto de gálio, também conhecido como laser semiconductor ou laser diodo.

Quando ocorre a passagem de corrente elétrica através deste diodo, são produzidas sucessivas combinações eletro-lacunas com emissão de fótons. A intensidade da corrente elétrica tem de ser suficiente para a estimulação do diodo (BAXTER, 1997).

O comprimento da onda define a profundidade de penetração dos fótons no tecido. As radiações emitidas na região ultravioleta e infravermelha médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na pele, enquanto que na região infravermelha próximo (820 nm e 840 nm) constata-se baixo coeficiente de absorção implicando em máxima penetração no tecido (KARU, 1987).

A primeira interação da luz com a pele acontece na superfície do estrato córneo, onde cerca de 5 a 7% da radiação incidente é refletida. A aplicação em contato perpendicular do aparelho laser com a superfície do tecido tegumentar durante a irradiação irá aumentar a profundidade de penetração em razão da redução da reflexão e dispersão (BAXTER, 1997).

Dessa forma a absorção e a dispersão são dependentes do tipo de tecido por meio do qual a luz está passando, assim como o comprimento da luz incidente (BAXTER, 1997).

O laser fornece uma quantidade elevada de fótons que em parte são refletidos, dispersos e transmitidos ao atingir tecido biológico e o restante é absorvido em diferentes camadas da epiderme e da derme, de acordo com os constituintes de cada camada. Para que a radiação laser produza um efeito terapêutico no corpo humano, é necessário que ela seja absorvida para que ocorra a interação com as estruturas moleculares e celulares (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998; GENOVESE, 2000; LOW; REED, 2001; MAILLET, 1987; VEÇOSO, 1993).

O estudo da interação entre luz laser e a matéria viva é bastante complexo; a energia depositada nos tecidos sofre fenômenos de absorção, reflexão, deflexão e transmissão. A pele é extremamente heterogênea do ponto de vista óptico e à

medida que se distancia da superfície, menor é a energia absorvida (LOW; REED, 2001; TATARUNAS; MATERA; ZAIDAN, 1998) (Ver figura 4)

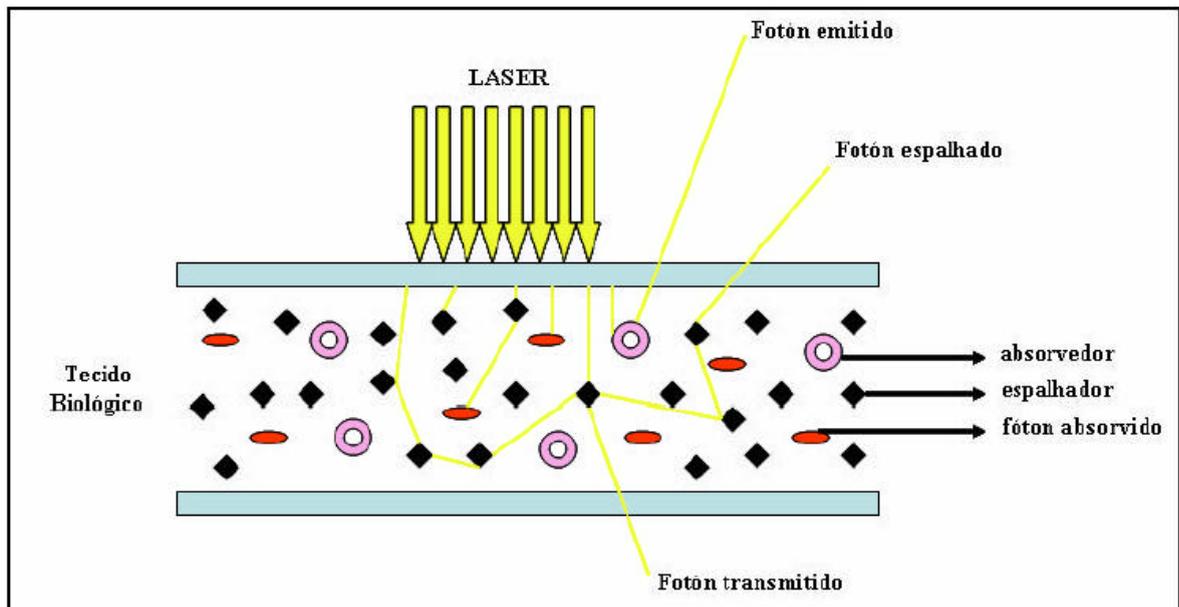


Figura 4 Efeitos físicos da interação laser-tecido biológico
Fonte: Reis (2003, p.34)

Assim que a luz é absorvida e dispersada pelos tecidos do corpo, ocorre uma redução no efeito da radiação em relação à penetração atenuando a luz em diferentes frequências e graus. Por isso, a penetração da luz nos tecidos é determinada especialmente pelo comprimento de onda e pela potência, além dos fenômenos de dispersão e absorção (BAXTER, 1997).

Elementos teciduais que apresentam alto coeficiente de absorção para um comprimento de onda específico ou espectro de energia são chamados de cromóforos, por exemplo, hemoglobina, melanina, água, os quais exercem uma influência significativa sobre a interação laser-tecido (MISERENDINO; PICK, 1995; BAXTER, 1997).

Segundo Baxter (1997), os aminoácidos e os ácidos nucleicos têm alta absorção na faixa intermediária do espectro Vermelho-Visível; já os cromóforos absorvem a luz na região visível do espectro.

O laser gera efeitos fotoquímicos, fotofísicos, fotobiológicos, afetando não só a área de atuação, mas também regiões circundantes (TUNER; HODE, 2002).

1.11.1 Efeitos diretos da radiação

O princípio básico da laserterapia é a capacidade de alterar o comportamento celular, na ausência de aquecimento (SCHINDL *et al.*,2000).

As modificações ou efeitos que ocorrem na zona irradiada ou zona circundante são chamados de efeitos primários e compreendem efeitos bioquímicos e bioelétricos. Esses efeitos desencadeiam outros efeitos indiretos sobre órgãos, ou mesmo efeitos terapêuticos gerais.

Efeito bioquímico – A irradiação laser exerce um estímulo sobre as mitocôndrias celulares provocando um aumento na produção de adenosina trifosfato (ATP) no interior das células e conseqüentemente aceleração da mitose. Assim, ocorrerá um aumento do consumo de oxigênio e ativação da respiração celular, eliminando as atividades anaeróbicas ocorridas em um processo inflamatório (KARU; PYATIBRAT; KALENDO, 1995; PASSARELA *et al.*,1984; WILDEN; KARTHEIN, 1998).

Estudos mostram que as células absorvem os fótons e transforma sua energia em ATP, a forma de energia utilizada pela célula. O ATP resultante é então utilizado para gerar processos metabólicos, sintetizar DNA, RNA, proteínas, enzimas e outros produtos necessários para reparar ou regenerar os componentes celulares e restaurar a homeostase (ENWEMEKA, 2007).

Lubart *et al.*(1992), sugerem que a mudança no estado redox celular, o qual desempenha papel fundamental na manutenção das atividades celulares, levam aos processos fotobiomoduladores. Segundo os autores, os cromóforos (porfirinas endógenas, mitocôndrias e citocromos membranosos, além de flavoproteínas), são fotossensibilizadores, e geram espécie de oxigênio reativo após a irradiação podem ter importante papel na ativação celular.

Karu (1999) sugere que a absorção da luz realizada pelos componentes (fotorreceptores) da cadeia respiratória, tais como as flavinas e os citocromos, resultando em uma aceleração da transferência de elétrons em partes da cadeia respiratória ocorrendo assim a produção de ATP.

Uma pequena quantidade de radicais livres ou formas de oxigênio reativo é produzido como parte desse processo, e o íons cálcio (Ca^{+2}) e as enzimas da cadeia respiratória também desempenham importantes funções (Figura 5).

O incremento de ATP favorece o aporte energético para funções importantes como o transporte da membrana, síntese de proteínas e contração muscular (PASSARELA *et al.*, 1984).

Em decorrência da energia absorvida, pode haver liberação de substâncias, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, relacionadas com a dor, bem como pode modificar atividades celulares e enzimáticas, inibindo-as ou estimulando-as (BASFORN, 1995; CAMPANA; MOYA, 1999).

Outro efeito é a ação fibrinolítica, que auxilia na redução do edema já instalado (RICCI, 2003).

Efeito bioelétrico – O principal efeito bioelétrico é a manutenção do potencial de membrana celular, o que impede que os estímulos dolorosos se propagem a centros nervosos, isso devido à eficiência da bomba de sódio e potássio ocasionada pela maior disponibilidade de ATP resultante do efeito bioquímico (RICCI, 2003).

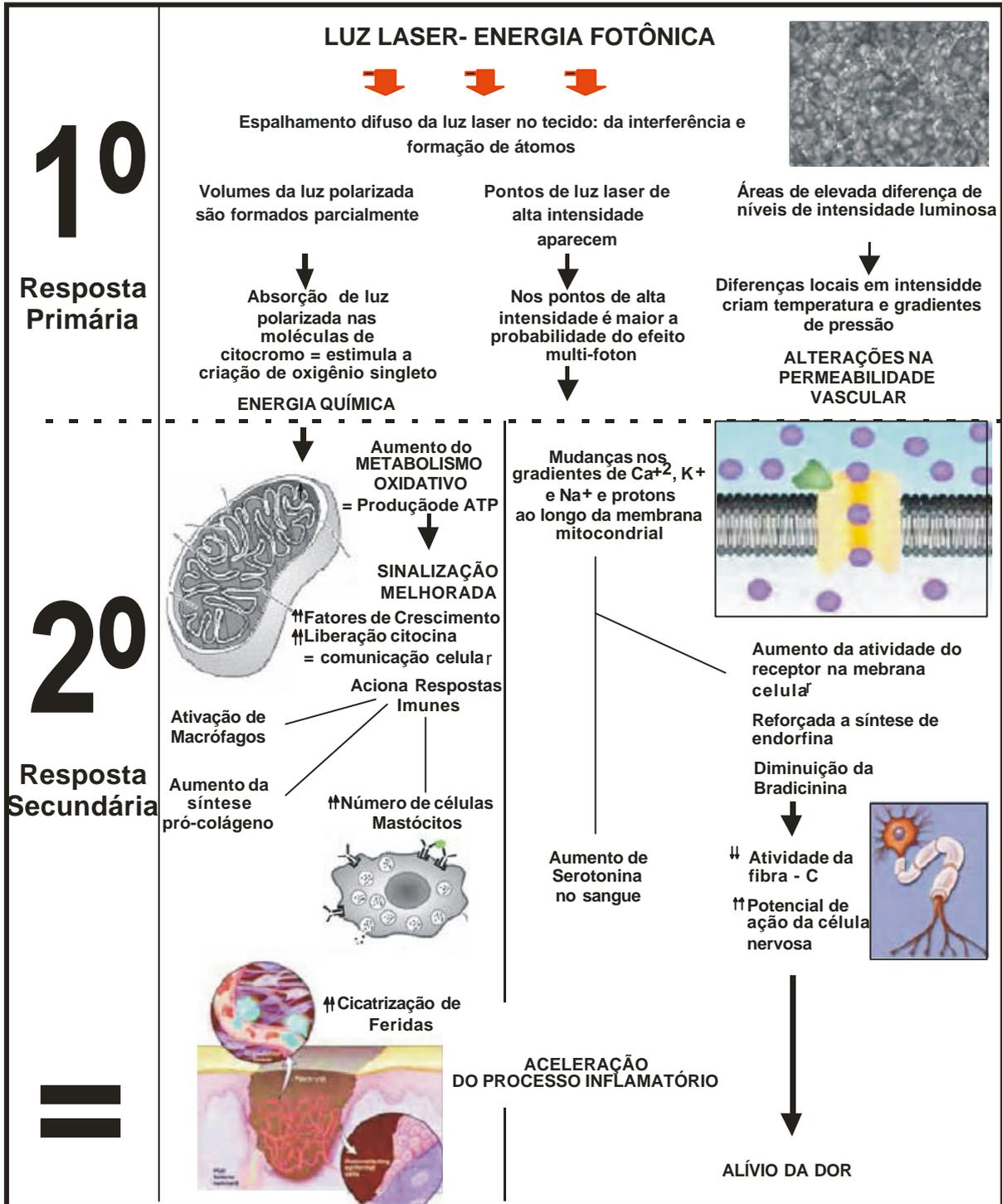


Figura 5 - Os mecanismos primários dizem respeito à interação entre os fótons e moléculas em tecido, enquanto que os mecanismos secundários referem-se ao efeito das alterações químicas induzidas pelos efeitos primários. A estimulação da produção de ATP celular tem sido apontada como um dos efeitos mais importantes da terapia a laser. Os mecanismos secundários incluem efeito sobre a dor, efeito sobre a circulação sanguínea, efeito sobre mecanismos estimuladores e reguladores e os efeitos sobre o sistema imunitário. Adaptado e modificado a partir do texto original de Tuner e Hode (2002).

1.12 LED

O LED (Light Emitting Diode) é um diodo emissor de luz, que quando energizado emite luz não coerente. É uma luz que permite a sua utilização sem que haja a necessidade de filtros ópticos coletores. São dispositivos semicondutores, apresentam grande eficiência de conversão de energia elétrica em óptica, dissipando pouca potência. Tem como característica principal, conduzir a corrente elétrica em um único sentido, apresentando duas regiões distintas, sendo a primeira receptora de elétrons denominada por “p” é a segunda doadora de elétrons, denominada “n” (MEDEIROS, 2001). Quando polarizados adequadamente esses dispositivos semicondutores emitem luz na faixa visível ou invisível, dependendo de seus componentes (ZANIN *et al.*, 2005).

O processo de emissão de luz pela aplicação de uma fonte elétrica é denominado “eletroluminescência”. A luz emitida se dá devido ao diodo (junção de P-N) energizado (REBELLO, 2005).

Segundo alguns autores, a terapia com LED em baixa potência pode gerar efeitos semelhantes aos obtidos com a TLBP (Terapia a Laser de Baixa Potência). O aumento da atividade celular, tanto em divisão como em síntese, têm sido relacionados ao comprimento de onda e com a dose, e não especificamente à fonte de luz. O processo de absorção luminosa por um cromóforo tecidual está relacionado ao comprimento de onda do fóton. Este deve possuir uma energia suficiente para produzir reações moleculares. Quando ocorre a absorção de fótons por um cromóforo, um estado molecular eletronicamente excitado se estabelece, resultando em aumento ou redução de atividade celular. A fotobiomodulação tem como característica a possibilidade de aplicação em vários métodos terapêuticos empregando diferentes fontes emissoras de luz (KARU; PYATIBRAT; RYABYKH, 2003).

Atualmente os LEDs estão sendo investigados na área biológica como uma alternativa para as terapias que utilizam laser de baixa potência (LBP), tendo em vista o seu baixo custo, praticidade e baixo consumo de energia (KARU, 2006; ANDRADE *et al.*, 2001).

Em estudos recentes, alguns autores como Pöntinen (2000) concluem que a coerência da luz não é responsável pelos efeitos da TLBP, já que esta propriedade se perde nas primeiras camadas do tecido biológico. Discordando, o estudo de

Boulton e Marshall (1986) atribuíram os efeitos acima mencionados à coerência do laser o que o diferencia do LED.

Ainda que vários estudos atestem o efeito benéfico da terapia com LED, nenhum estudo sobre OA de joelho, tratada com LED, foi publicado até o momento. O desenvolvimento desta terapia poderia contribuir nos sistemas de saúde públicos e particulares, otimizando o processo de reabilitação de pacientes através de uma terapia de baixo custo.

2 OBJETIVO

Estudar os efeitos dos lasers de baixa potência 685 nm, 830 nm e LED 639 nm na artrite de joelho, induzida por zymosan, no que se refere:

- a incapacitação articular;
- ao aumento da permeabilidade vascular;
- a formação de edema e
- ao recrutamento leucocitário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 120 ratos machos da linhagem Wistar, com aproximadamente 200 – 250 g, provenientes do Biotério da ANILAB (Animais de Laboratório) – Paulínia, São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com três a quatro ratos por cada, abastecidas com ração Purina® e água *ad libitum*, em um ciclo claro-escuro 12-12 horas (ciclo claro das 6:00 AM às 6:00 PM) em uma temperatura ambiente controlada (26°C).

O protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética para utilização de Animais do Instituto, nº A027/2006/CEP, de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram divididos em 5 grupos com 6 animais para cada grupo:

- Grupo 01- Zymosan
- Grupo 02- Zymosan + Laser 685 nm
- Grupo 03- Zymosan + Laser 830 nm
- Grupo 04- Zymosan + LED 639 nm
- Grupo 05- Zymosan + Dexametasona
- Grupo 06 – Salina

Estes grupos foram divididos em 4 subgrupos experimentais:

- A. Incapacitação articular;
- B. Alterações da permeabilidade vascular;
- C. Formação de edema e
- D. Recrutamento leucocitário.

3.3 INDUÇÃO DA ARTRITE POR ZYMOSAN

Os animais foram submetidos à anestesia com Ketamina (80 mg/Kg) associada à Xilazina (5 mg/Kg) por via intraperitoneal. Após tricotomia a reação inflamatória foi induzida por uma injeção intra-articular de Zy de 1 mg em 50 μ L de solução salina estéril a 0,9% no joelho direito dos ratos. (ROCHA *et al.*, 1999). Apenas o subgrupo D recebeu no grupo 06, 50 μ L de salina estéril a 0,9% no joelho esquerdo dos ratos devido a presença de macrófagos residentes na sinóvia.

3.4 DEXAMETASONA

A dexametasona foi utilizada como principal droga antiinflamatória, administrada na dose de 4 mg/kg (OSLON *et al.*, 1985; ROGERS ; JEFFREY, 1986), via i.p., uma hora antes de induzir a reação inflamatória no grupo 05.

3.5 IRRADIAÇÃO DO LASER

O tratamento foi realizado com a utilização do LBP (Laser de Baixa Potência) semiconductor (DMC Theralaser, São Carlos, SP Brasil), comprimento de onda 685 nm (vermelho), 830 nm (infra vermelho) e LED (SANSEN Tecnologia, SP Brasil), comprimento de onda 639 nm (vermelho).

O aparelho de laser e LED foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Carlos José de Lima do laboratório de Instrumentação Optobiomédica do Instituto de Pesquisa da Univap.

A irradiação foi realizada imediatamente, primeira e segunda hora após a indução da artrite por Zy (ALBERTINI *et al.*, 2002).

Os grupos de animais foram posicionados em uma mesa em decúbito dorsal e o joelho imobilizado manualmente onde os lasers e o LED foram aplicados perpendicularmente (90°) na pele tricotomizada do joelho. Sendo os lasers aplicados a uma distância de 15 mm e o LED de 7 mm do joelho dos ratos. O grupo controle recebeu injeção de Zy e o mesmo procedimento experimental, porém com o aparelho de laser desligado.

Tabela 1 – Protocolo de irradiação laser diodo

PARÂMETROS	VALORES
Densidade de Energia (DE)	2,5 J/cm ²
Potência	20 mW
Tempo	100 s
Área Irradiada	0,8 cm ²

Tabela 2 – Protocolo de irradiação LED

PARÂMETROS	VALORES
Densidade de Energia (DE)	2,5 J/cm ²
Potência	20 mW
Tempo	100 s
Área Irradiada	0,8 cm ²

3.6 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg de Xilazina (Virbaxyl 2% injetável; 0,1 mg/kg i.p.) + 100 mg/kg de Ketamina (Dopalen injetável; 1 ml/Kg i.p.). (FLECKNELL, 2000).

3.7 REGISTRO DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

3.7.1 Descrição do sistema

O modelo de incapacitação articular foi adaptado por Rocha *et al.*, (2002). O sistema consiste de um cilindro metálico giratório de 30 cm x 50 cm (diâmetro x largura), que gira a uma velocidade de 3 rpm. O cilindro é dividido em três pistas e ligado a um fio terra (Figura 6). Os animais são calçados com sapatilhas metálicas, que são colocadas nas patas posteriores, permitindo-se um período de 30 minutos de deambulação para que os animais se habituem. A seguir, conecta-se a sapatilha

direita à porta de entrada de dados de um microcomputador, mantendo-se a sapatilha esquerda para o equilíbrio do animal. O tempo em que o animal deambula sem tocar a superfície do cilindro é tomado como o Tempo de Suspensão da Pata (TSP), que é registrado no microcomputador, durante um período de 60 segundos, por um programa de aquisição de dados que foi desenvolvido no laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Dessa forma, um aumento no TSP, em relação ao registro basal, é tomado como refletindo incapacidade do animal para deambular normalmente (incapacitação articular), o que refletiria dor inflamatória articular.

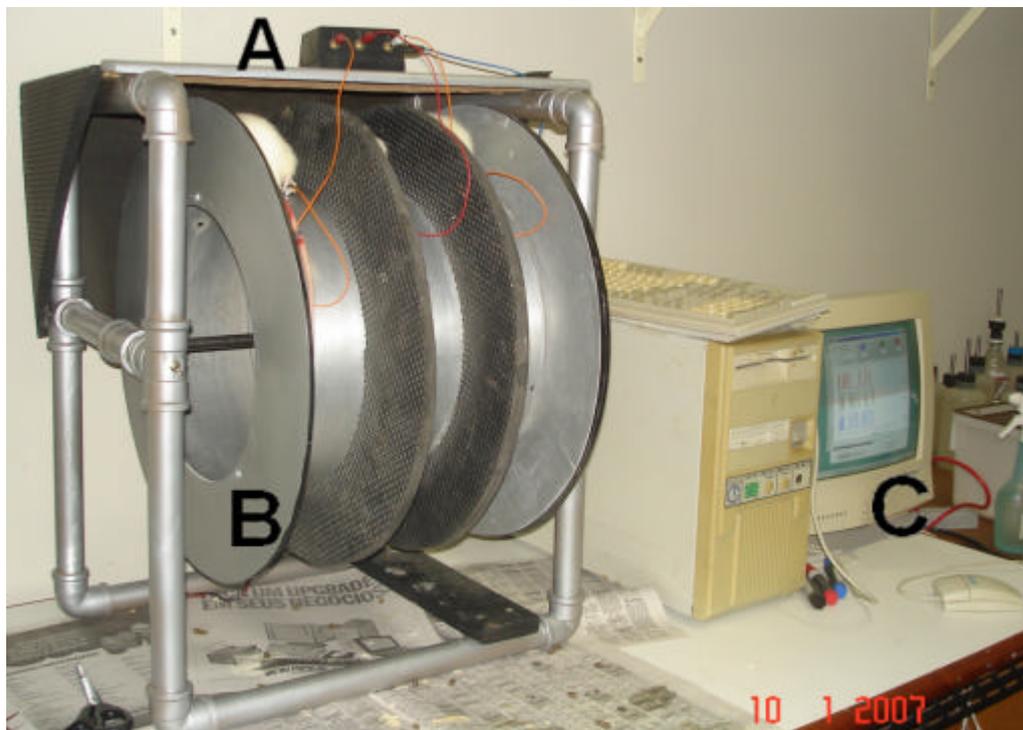


Figura 6 - Fotografia do sistema de registro da incapacitação articular. Os animais (A) são postos a deambular, isoladamente, sobre o cilindro giratório (B) conectado a um microcomputador (C), que registra o Tempo de Suspensão da Pata para cada animal.

Fonte: Núbia Cristina Rodrigues de Morais

Neste experimento o tempo de suspensão da pata (TSP) foi avaliado 0, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a horas após a indução da IA, durante um período de 60 segundos em cada hora.

3.8 DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA PERMEABILIDADE VASCULAR (PV)

As alterações da P.V. na cavidade articular foram avaliadas pela determinação do extravasamento do corante azul de Evans (AE) do joelho dos ratos, 3 horas após a injeção i.a. de zy conforme Rocha *et al.* (1999), como descrito no item 3.3. Após 2 h e 40 min da indução da inflamação os animais receberam injeção intravenosa caudal do corante AE (25 mg/kg). Após 3 horas da injeção de zymosan, os animais foram sacrificados por exposição a concentrações tóxicas de anestésicos e ensanguinados. A cavidade articular foi osteotomizada entre a porção distal do fêmur e a tuberosidade da tíbia e imersa em 2 ml de formamida (5%) durante 24 h. A concentração de AE no sobrenadante foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems Multiscan) a 620 nm. Os resultados foram expressos como $\mu\text{g AE/mL}$ e a concentração de AE foi estimada a partir de uma curva padrão de AE.

3.9 AVALIAÇÃO DO EDEMA LOCAL

Grupos de animais foram sacrificados após 3 horas da indução da inflamação (conforme item 3.3), sob anestesia, quando o edema nesse modelo é máximo, conforme descrito por Rocha *et al.* (1996). Em seguida, procedeu-se a remoção cirúrgica da sinóvia, cujo peso úmido foi registrado. O material foi incubado em estufa à 80° C por 24 horas, sendo então obtido o peso seco. A diferença entre peso úmido e peso seco desse material, medida em miligramas (mg), foi tomada como refletindo edema articular.

3.10 COLETA E CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Os leucócitos recrutados para a cavidade articular, foram quantificados após a indução da reação inflamatória, como descrito no item 3.3. Após 6 horas da injeção

do Zy ou salina, os animais foram sacrificados sob anestesia e exsanguinados. Foi realizada a dissecação dos joelhos com a retirada do ligamento patelo-tibial para a exposição da superfície externa da membrana sinovial. O lavado articular foi coletado da cavidade da articulação do joelho após duas injeções totalizando 400 μ L de tampão fosfato- salina, pH 7,2 (PBS), contendo 5 UI/mL de heparina. A seguir, o lavado articular foi centrifugado a 800 rpm por 6 minutos. Depois disso, o precipitado celular foi ressuspenso em PBS para determinação das células totais em hemocítmetro de Neubauer, em microscópio de luz, após diluição em líquido de Turk. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em lâminas feitas em citocentrífuga e coradas com Instant-Prov. Foram contadas pelo menos 100 células, classificadas como polimorfonucleares ou mononucleares, com base em critérios de morfologia convencional.

3.11 SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.11.1 Tampão Fosfato-Salina (PBS)

Solução estoque de Salina

NaCl	81,82 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Solução Salina (0,9 %)

Solução estoque de Salina	100 mL
Água destilada	900 mL

Solução estoque de Fosfato

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	3,58 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{12H}_2\text{O}$	26,5 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Solução Fosfato-Salina

Solução estoque de Fosfato	100 mL
Solução estoque de Salina	100 mL
Água destilada	800 mL

3.11.2 Solução de Turk

Ácido acético glacial	1 mL
Violeta genciana 1%	1 mL
Água destilada	q.s.p.100 mL

3.11.3 Solução de Azul de Evans

Azul de Evans	2,5 g
Água destilada	q.s.p. 100 mL

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos dados foi feita através da Análise de Variância (ANOVA) para médias independentes. Quando a Análise de Variância mostrou significância, aplicou-se o teste de contraste entre médias de Tukey nas comparações múltiplas. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE A INCAPACIDADE ARTICULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY EM RATOS

A injeção de Zy 1 (mg) no joelho direito de ratos produz incapacitação articular tempo dependente (Figura 7A).

O zymosan causa incapacitação articular com pico na 4ª hora após a indução da artrite, com o Tempo de Suspensão da Pata (TSP) de 43,8 segundos (s) em comparação ao grupo tratado com dexametasona 1 hora antes da indução da artrite cujo TSP foi de 9,3 s (Figura 7B).

Com a aplicação do laser 685 nm na dose de 2,5J/cm² imediatamente, 1ª e 2ª hora após induzida a inflamação do joelho dos ratos, o TSP foi de 18s, inibindo de forma significativa ($p < 0,05$) a incapacitação articular, sendo 59% mais eficaz em relação ao grupo não tratado. Enquanto o laser 830 nm, na mesma dosagem, apresentou um TSP de mesma porcentagem de diminuição. Dessa forma, a eficácia dos lasers foi a mesma (Figura 7B).

Com a aplicação do LED 639 nm na dose de 2,5J/cm² imediatamente, 1ª e 2ª hora após induzida a inflamação do joelho dos ratos, o TSP foi de 26,3 s, porém não significativo ($p > 0,05$) (Figura 7B).

A administração da dexametasona na dose de 4 mg/kg, via ip, na 1ª hora antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a incapacitação articular (TSP= 9,3s) medida na 4ª hora, de artrite, sendo 79% mais eficaz em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$). A dexametasona foi aproximadamente 20% mais eficaz que os lasers 685 nm e 830 nm (Figura 7B).

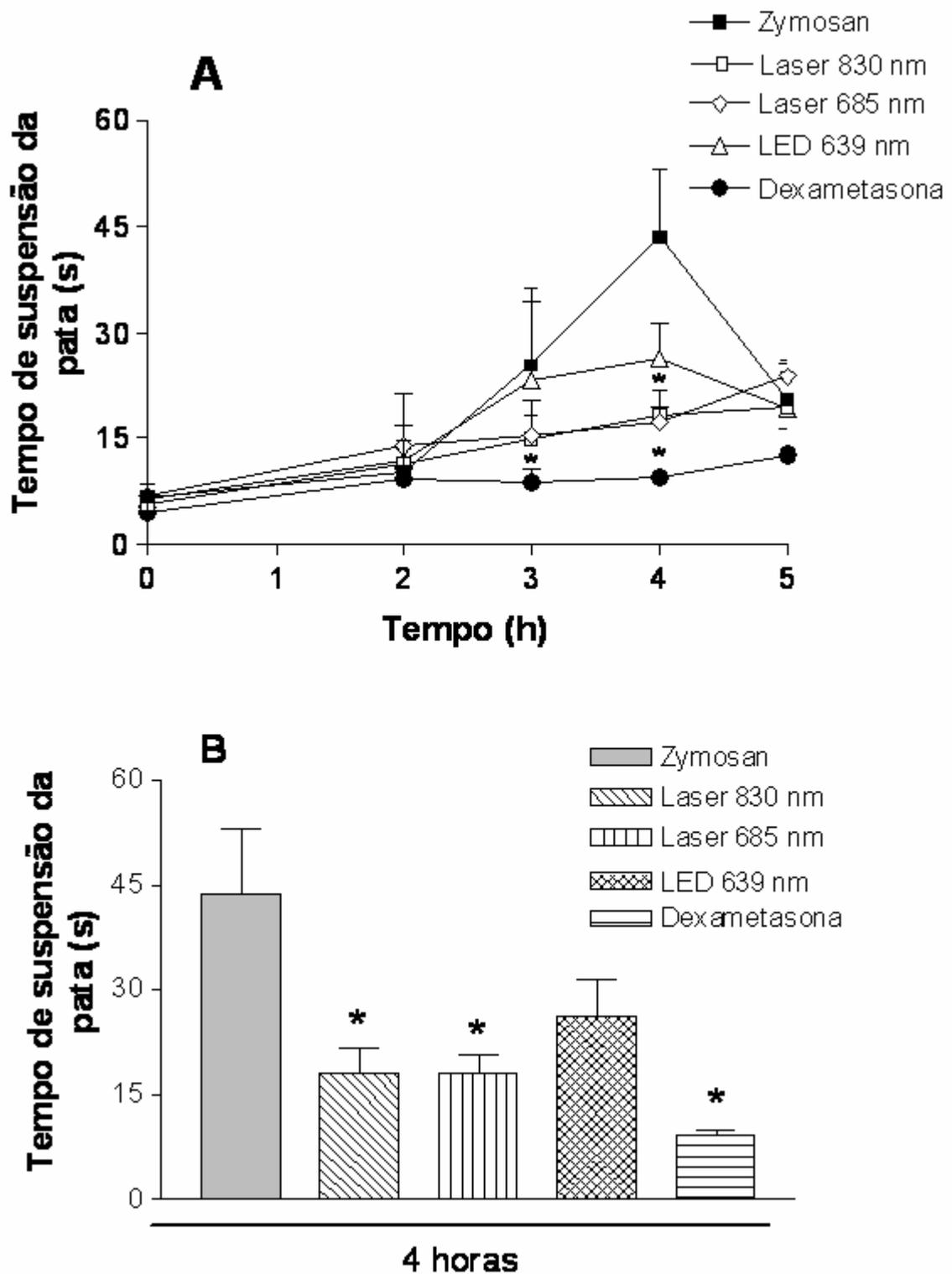


Figura 7 Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na incapacidade articular na artrite experimental induzida por Zy em ratos. A incapacitação articular foi avaliada 0, 2, 3, 4 e 5 h (A) e 4 h (B) após a injeção de Zy. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais/grupo. * $p < 0.05$ comparado com o grupo Zy. A dexametasona foi utilizada como controle antiinflamatório.

4.2 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE O AUMENTO DA P.V. NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY.

O tratamento com laser 685 nm na dose de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a e 2^a hora após induzida a inflamação do joelho dos ratos, reduziu significativamente ($p < 0,05$) o aumento da P.V., tendo 18 % de diminuição em relação ao grupo não tratado. Enquanto o laser 830 nm na mesma dosagem apresentou uma redução do aumento da P.V. em 20 % comparado ao grupo não tratado, não havendo diferença significativa entre os dois lasers utilizados (Figura 8).

A aplicação do LED 639 nm na mesma dose e tempo de aplicação que os lasers apresentaram 15 % na redução da P.V. comparado ao grupo não tratado, no entanto esse valor não é significativo ($p > 0,05$) na formação da P.V. causada por Zy (Figura 8).

A administração da dexametasona na dose de 4 mg/kg, via i.p., na primeira hora antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) o aumento da P.V., medida na 3^a hora após a indução da artrite, em 25% em relação ao grupo não tratado (Figura 8).

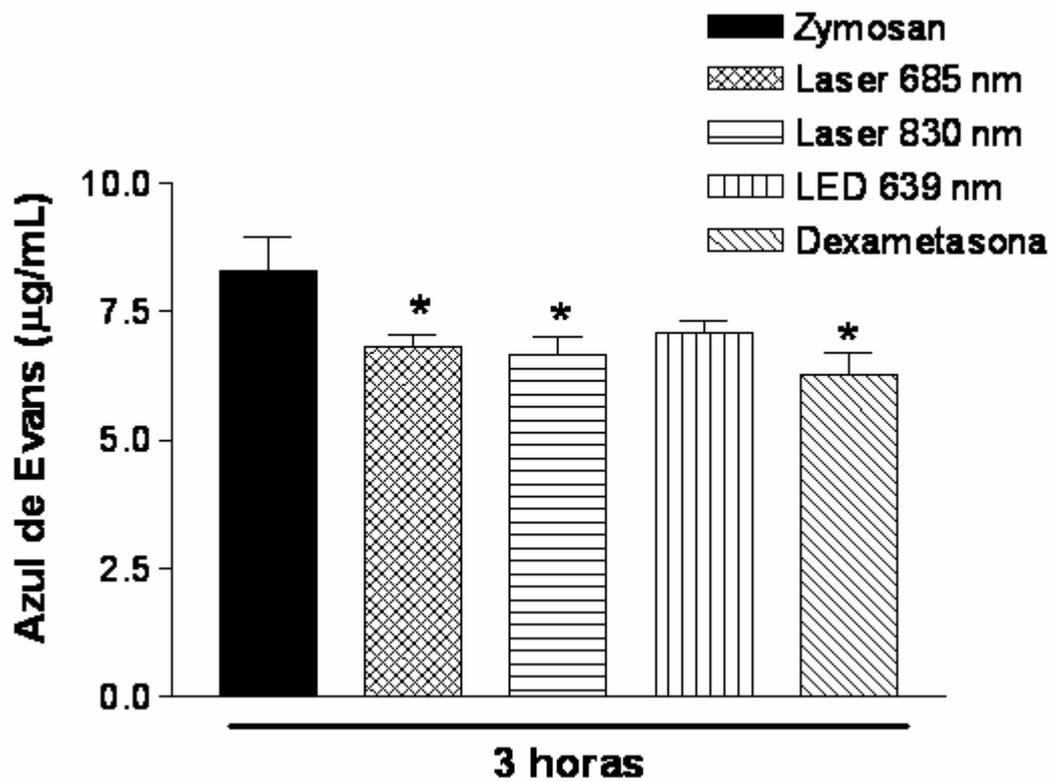


Figura 8 Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na redução do aumento de P.V. causado por Zy. O aumento da P.V. foi avaliado 3 h após a injeção de Zy. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 6 animais/grupo. * $p < 0.05$ comparado com o grupo Zy. A dexametasona foi utilizada como controle antiinflamatório.

4.3 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE O AUMENTO DE EDEMA NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY.

O tratamento com laser 685 nm na dose de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a e 2^a hora após induzida a inflamação no joelho dos ratos, reduziu significativamente ($p < 0,05$) o edema, em 27 % comparado ao grupo não tratado. Enquanto o laser 830 nm na mesma dosagem também apresentou uma redução do edema em 26% comparado ao grupo Zy. Dessa forma, a eficácia dos lasers na redução do edema induzido pelo Zy foi a mesma (Figura 9).

A aplicação do LED 639 nm na dose de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a e 2^a horas após induzida a inflamação no joelho dos ratos, apresentou 9 % de diminuição do edema comparada ao grupo não tratado, porém sem diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 9).

A administração da dexametasona na dose 4 mg/kg, via i.p., na primeira hora antes de induzir a reação inflamatória, inibiu o edema de forma significativa ($p < 0,05$), medido na 3^a hora da indução da artrite. A dexametasona apresentou uma redução de 52% quando comparado ao grupo Zy. A dexametasona foi 25% mais eficaz na redução do edema que os lasers 685 nm e 830 nm (Figura 9).

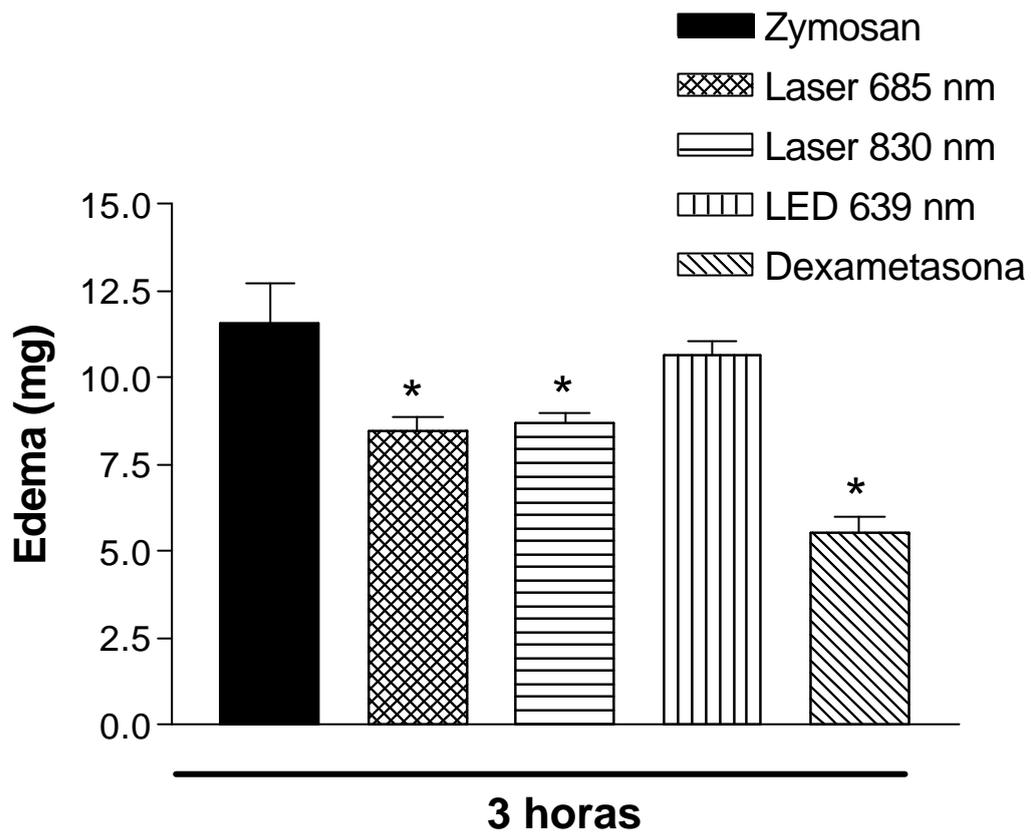


Figura 9 Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na redução do edema causado por Zy. O edema foi avaliado 3 h após a injeção de Zy. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 6 animais/grupo. * $p < 0.05$ comparado com o grupo Zy. A dexametasona foi utilizada como controle antiinflamatório.

4.4 EFEITO DA APLICAÇÃO DOS LASERES 685 NM, 830 NM E LED 639 NM SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZY

O infiltrado leucocitário na cavidade articular foi avaliado no tempo de 6 h após a injeção de 1 mg/kg de Zy. O tratamento com os lasers na dose de 2,5 J/cm² imediatamente, 1^a e 2^a hora após induzida a OA inibiu, de forma significativa (p< 0,05) o influxo de leucócitos medido na 6^a hora de artrite, sendo o influxo causado pelo zymosan de 2156 ± 504 x 10³/mL e os lasers de 685 nm de 451 ± 131 x 10³/mL, e o 830 nm de 900,6 ± 236 x 10³/ml nas mesmas dosagens (Figura 10A), sendo 79% e 58 % menor em relação ao grupo não-tratado, respectivamente.

A aplicação do LED 639 nm na mesma dose usada para os lasers inibiu significativamente (p< 0,05), o influxo de leucócitos sendo de 615 ± 116 x 10³/mL na artrite induzida por Zy (Figura 10A) sendo 71% menor em relação ao grupo não tratado.

A administração da dexametasona na dose de 4 mg/kg, via i.p., na primeira hora antes de induzir a reação inflamatória, inibiu de forma significativa (p< 0,05) o influxo de leucócitos, medido na 6^a hora de artrite, sendo de 513 ± 80 x 10³/mL, (Figura 10), sendo 76% menor em relação ao grupo não tratado.

Quanto à contagem diferencial de leucócitos observou-se uma diminuição significativa (p<0,05) de células polimorfonucleares com o tratamento dos lasers 685 nm e 830 nm na dose de 2,5J/cm², imediatamente, primeira e segunda hora após induzida a OA, sendo de 564 ± 245 x 10³/mL (61% comparado ao grupo zymosan) e 633 ± 165 x 10³/mL (56% comparado ao grupo zymosan), respectivamente, enquanto o grupo zymosan apresentou 1.457 ± 347 x 10³/mL. Houve uma diminuição das células mononucleares de 178 ± 73 x 10³/mL (70% que o grupo zymosan) e 264 ± 84 x 10³/mL (55% que o grupo zymosan) comparado ao grupo zymosan 598 ± 150 x 10³/mL (Figura 10).

A aplicação do LED 639 nm na mesma dose usada para os lasers, inibiu significativamente (p<0,05), as células PMN (337,9 ± 80 x 10³/mL) e as células MN (263,7 ± 44 x 10³/mL) na artrite induzida por Zy (Figura 10), sendo 77% e 56% menores que o grupo zymosan.

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

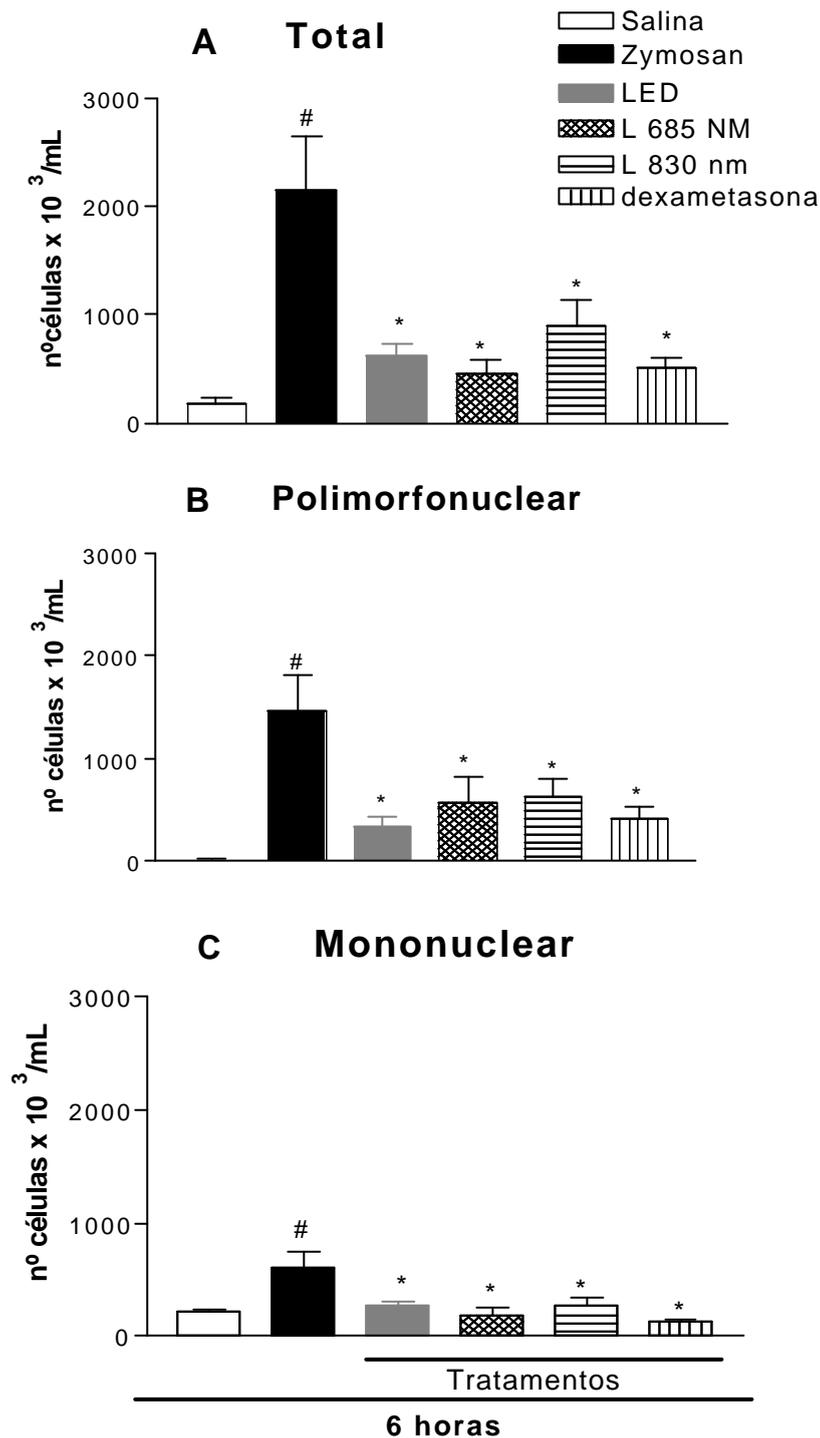


Figura 10 Efeito do laser 685 nm, 830 nm, LED 639 nm e dexametasona na redução do Influxo de leucócitos para a cavidade articular de ratos induzido pela injeção de Zy. Os animais receberam injeção i.p. de 1 mg/kg de Zy. A dexametasona foi utilizada como controle antiinflamatório. A: leucócitos totais, B: polimorfonucleares (PMN) e C: mononucleares (MN). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. de 6 animais. [#]p < 0,05 em relação a salina e ^{*}p < 0,05 em relação ao grupo Zy (ANOVA)

5 DISCUSSÃO

A OA de joelho é uma doença inflamatória articular muito comum e recentemente foi associada com significante incapacidade física (TASCIOGLU *et al.*, 2004). Os pacientes com OA que tipicamente têm dor pioram com aumento de peso e atividade física. As causas da OA não foram totalmente elucidadas, embora forças biomecânicas que afetam a cartilagem articular e osso subcondral, alterações bioquímicas na cartilagem articular e membrana sinovial, e fatores genéticos parecem ser de grande importância (HOLDERBAUM *et al.*, 1999). O osso subcondral, periósteo, sinóvia, ligamentos e a cápsula articular contêm todas as terminações nervosas que podem ser fontes de estímulos nociceptivos (HEPPELMANN, 1997; MACH *et al.*, 2002). Além da sensibilização da dor periférica, a sensibilização da dor central pode ocorrer na OA (SCHAIBLE *et al.*, 2002). Embora drogas anti-inflamatórias (NSAIDs) sejam freqüentemente usadas para tratar a dor e fraqueza associada com OA de joelho, a alta incidência de sérios efeitos colaterais gastrointestinais com NSAIDs podem limitar seu uso (TASCIOGLU *et al.*, 2004). A terapia a laser foi introduzida como uma alternativa de tratamento não invasivo para OA cerca de 20 anos atrás, mas a sua eficácia ainda é controversa. Ademais, os mecanismos envolvidos no efeito antiinflamatório induzido pela terapia laser não estão estabelecidos.

Neste trabalho, investigamos o uso da terapia a laser utilizando dois comprimentos de onda e o LED de baixa potência para o tratamento da artrite induzida por Zy, em ratos, enfocando aspectos da fase aguda.

A terapia a laser de baixa potência (TLBP) tem sido usada para controlar a dor em diferentes condições musculoesqueléticas. Entretanto, poucos estudos clínicos controlados de aplicação do LBP têm sido relatados (TASCIOGLU *et al.*, 2004).

Utilizamos o teste de incapacitação articular (ROCHA *et al.*, 1999) para o estudo do tratamento com laser e LED da hiperalgesia que ocorre na artrite induzida por Zy, nossos resultados demonstraram significativa melhora funcional e redução da dor inflamatória após aplicação da terapia a laser, para ambos os grupos de lasers, mas não no grupo tratado com LED na mesma dosagem do laser.

O exato mecanismo de redução da dor pela terapia a laser não está completamente elucidado. Alguns estudos têm sugerido que a irradiação laser poderia produzir analgesia agindo nos canais de K^+ (JAMES *et al.*, 2001), outro estudo mostrou que a irradiação laser não induz um efeito fotofísico, agindo diretamente sobre as mitocôndrias sem qualquer efeito sobre o mecanismo celular (KARU, 1988). Além disso, estudos têm sugerido que a inibição da atividade neuronal poderia ser responsável pelo efeito terapêutico e que a irradiação laser inibe de forma seletiva sinais nociceptivos dos nervos periféricos (TASCIOGLU *et al.*, 2004). Também Honmura *et al.* (1993), sugeriram que os efeitos anti-inflamatórios, em inflamação aguda de patas de ratos induzida por carragenina, dos lasers (Ga-Al-As 780 nm, 10 mW, 31,8 J/cm², 30s cada ponto irradiado durante 3 minutos) sejam induzidos pelo menos parcialmente por certos mecanismos que não envolvam a secreção de opióides endógenos. Adicionalmente, Ferreira *et al.* (2005), utilizando um modelo de hiperalgesia induzida por carragenina demonstrou que o efeito analgésico causado pelo laser (HeNe 632,8 nm, 2,5 J/cm² não envolve um receptor opióide periférico, mas envolve tardiamente eventos de liberação de PGE₂ durante a inflamação aguda. A PGE₂ é um mediador chave da dor em OA (JARVIS *et al.*, 1990). Devido a importância das prostaglandinas no processo inflamatório, a interferência em sua síntese determina sensível redução nas alterações proporcionadas pela inflamação, inclusive a dor (BAKLE; BOTTING, 1996; VANE, 1971). A inibição da síntese de prostaglandinas é o mecanismo de ação de muitos anti-inflamatórios não hormonais existentes (VANE, 1971). É possível que em nosso modelo, o efeito analgésico de ambos os lasers seja devido à inibição da liberação de PGE₂. Neste sentido, foi mostrado, em modelo experimental de artrite induzida com hidroxiapatita e tratado com laser He-Ne (densidade de energia 8J/cm² nas 24, 48 e 72 horas após a indução da artrite) que houve uma redução significativa dos níveis de PGE₂ em tecidos sinoviais de ratos (CAMPANA, 1998).

A inflamação causada pela administração de Zy em articulações, além de provocar incapacitação articular também causa a formação de edema e influxo de células (ROCHA *et al.*, 1999). O aumento de P.V. é a primeira alteração que ocorre na microvasculatura durante a inflamação, levando ao extravasamento de fluido rico em proteínas para o interstício, e à formação de edema. Estes eventos são iniciados e mantidos através da liberação seqüencial de mediadores inflamatórios, originados no plasma ou em células.

Neste trabalho a densidade de energia e o tempo de aplicação do laser adotados foram baseados nos estudos de Albertini *et al.*(2002), sendo os melhores parâmetros para inibição de edema de pata induzido por carragenina. A radiação do LBP foi aplicada na primeira, na segunda e na terceira hora após a indução da inflamação segundo Albertini *et al.*(2002).

Os dados do presente estudo demonstraram que a injeção de Zy(1 mg), no joelho de animais, causou aumento de P.V. e edema, corroborando dados da literatura (ROCHA *et al.*, 2003). O tratamento com LBP foi eficaz na redução do aumento da P.V. diminuindo em 18% e reduziu a formação de edema em 26%, para os dois lasers. De forma similar, a redução do efeito edematogênico, induzido por carragenina, em tecido de pata de ratos avaliada após TLBP, foi relatada por outros autores (VANE, 1993; ALBERTINI *et al.*, 2007). No entanto, o LED na mesma dosagem do tratamento que utilizamos para o laser não teve qualquer efeito na dor, redução da P.V. ou edema, na artrite induzida por Zy, em ratos.

A literatura mostra que a TLBP age reduzindo os níveis PGE_2 e inibindo a expressão da ciclooxigenase-2 (HONMURA *et al.*, 1993; SHIMIZU *et al.*, 1995). No processo inflamatório, a prostaglandina 2 (PGE_2) é um potente dilatador de músculo liso vascular resultando vasodilatação e eritema. A vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo no tecido inflamado e age como a bradicinina e histamina, que aumentam a P.V., ocasionam extravasamento de fluido. Ou seja, PGE_2 age em sinergismo com outros mediadores para produzir edema, dor, etc. não produzindo dor diretamente, a qual é mediada pela produção de óxido nítrico (NO) e de prostaglandinas (PG), pelas células endoteliais vasculares. (WILLIAMS; HIGGS, 1988; WILLIAMS; MORLEY,1973; WILLOUGHBY, 1968; MONCADA;VANE, 1979).

No nosso modelo experimental, a inibição da PGE_2 pelo laser poderia ser um importante mecanismo através do qual o laser reduz o aumento da P.V.e formação de edema, uma hipótese que precisa ser abordada em estudos futuros.

Lasers diferentes podem ter eficácia em diagnósticos e parâmetros diferentes tais como comprimento de onda, duração do tratamento, densidade de energia, número de tratamentos, área irradiada, modo contínuo ou pulsado podem ser importantes (PARK *et al.*, 2006). Na avaliação de uma terapia, muitas vezes é difícil determinar a dosagem ideal e o esquema de tratamento. Para a terapia a laser, a dosagem efetiva mínima na maioria dos casos é desconhecida. Outra questão importante seria o comprimento de onda ótimo (BECKERMAN *et al.*,1992).

Há pouca evidência na literatura dando pistas para a dosagem ideal da energia laser no que diz respeito à intensidade, frequência, comprimento de onda e pico de pulso para as diversas condições patológicas (VASSELJEN *et al.*, 1992). Em nosso estudo, os dois tratamentos com lasers de comprimentos de onda: 685 nm e 830 nm foram eficazes na redução do aumento da P.V., formação de edema e incapacitação articular, quando a dose foi de 2,5J/cm². Embora, não encontramos diferença estatística significativa entre o LED e o grupo que recebeu apenas Zy, não podemos excluir a possibilidade de eficácia do LED utilizando-se outros parâmetros.

Outro evento importante da resposta inflamatória é a migração de leucócitos para o foco inflamatório. Leucócitos circulantes – neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos – migram, seletivamente e em número significativo, para o tecido inflamado (ALBELDA *et al.*, 1994). Nos estágios iniciais de uma resposta inflamatória aguda, há acúmulo predominantemente de neutrófilos (ISSEKUTZ *et al.*, 1980). Estas células representam a primeira linha de defesa do organismo e apresentam uma alta capacidade fagocitária e microbicida para a eliminação e/ou neutralização do agente agressor. Os leucócitos mononucleares são observados na fase mais tardia dessa resposta e em processos crônicos (ISSEKUTZ *et al.*, 1981). A infiltração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) em tecidos inflamados é um sinal da reação inflamatória aguda e também reflete uma resposta imunológica primária a invasão de patógenos (BEZERRA *et al.*, 2007).

Os efeitos da TLBP e LED de baixa potência foram avaliados quanto à migração celular para a articulação do joelho do rato. Vale ressaltar que, a maioria dos estudos avalia o influxo celular na sinóvia, ao passo que nós o fizemos no lavado articular. Ademais, as células presentes na sinóvia da artrite por ZY são predominantemente linfomononucleares, enquanto que os polimorfonucleares predominam no lavado articular (ROCHA *et al.*, 2003).

Para verificar se o laser e o LED eram capazes de reduzir a migração de leucócitos para a cavidade articular, avaliamos esse efeito no tempo de 6 h após a injeção de Zy, período em que ocorre o pico de influxo de neutrófilos para a cavidade articular (ROCHA *et al.*, 2003). Nossos resultados demonstraram claramente que a radiação laser e LED na mesma dosagem diminuem a migração de leucócitos na sexta hora de inflamação, quando aplicados imediatamente, 1^a e 2^a hora após a indução da OA em joelho de ratos.

O fato de o LED ter apresentado melhora significativa na migração de neutrófilos e não na incapacitação articular ou edema, pode ser devido ao fato de que o influxo celular na artrite induzida por Zy inicia-se na terceira hora e atinge o pico por volta da sexta hora enquanto a incapacitação articular atinge o pico entre a terceira e quarta hora, anteriormente ao pico da migração de neutrófilos. Neste sentido, foi proposto que a incapacitação articular na artrite induzida por Zy independe da participação de neutrófilos polimorfonucleares e se deve à estimulação de nociceptores localizados em estruturas periarticulares (ROCHA *et al.*, 2003). O segundo ponto a ser destacado é que não há controvérsia em inibir o influxo celular e não inibir a incapacitação articular e o edema. Já foi demonstrado que o edema não é responsável pela incapacitação, pois a administração de uma substância edematogênica, como dextran, não causou incapacitação articular (TONUSSI; FERREIRA, 1992). Castro *et al.*, (2006) sugerem que a infiltração celular não contribui para dor articular no modelo de OA em ratos. Eles consideram que a sensibilização de estruturas periarticulares acontece para este mecanismo. A estimulação direta de receptores não-adrenérgicos/não-colinérgicos presentes na sinóvia também podem contribuir para dor articular. Dessa maneira o comprimento de onda do LED utilizado pode ter sido otimizado pelos cromóforos das células anti-inflamatórias presentes no tecido sinovial do joelho dos ratos, pois segundo Karu (2006), a resposta tecidual ao tipo de luz terapêutica (comprimento de onda, coerente ou não coerente) a ser aplicada depende da reação dos cromóforos e centros espalhadores de radiação presentes nos tecidos.

A literatura mostra que os efeitos antiinflamatórios da terapia a laser de baixa potência utilizando dois comprimentos de onda (660 nm e 684 nm), potência de 30 mW e dose de 7,5J/cm² aplicada 1 hora após a injeção de carragenina em pata de ratos causa uma inibição tanto da formação do edema de pata quanto da migração de células inflamatórias em tecido muscular e tecido conjuntivo adjacente plantar (ALBERTINI *et al.*, 2007). Interessante notar que esses autores defendem que apenas uma única dose de laser aplicada na primeira hora após a indução da inflamação é capaz de diminuí-la.

Amano *et al.*, (1994) trataram 14 pacientes com OA de joelho utilizando laser (780 nm; 10 mW de potência; 80 s por ponto irradiado em 6 pontos do joelho, uma vez ao dia, durante 6 dias). Ao analisarem a membrana sinovial histologicamente, observaram diminuição do infiltrado inflamatório. Em outro estudo também

observaram uma redução do influxo leucocitário na fase inicial de pleurisia induzida por carragenina em ratos após três aplicações do LBP-660 nm, com dose de 2,1J/cm² mais eficaz que as doses 0,9 e 4,2J/cm² (BOSCH *et al.*, 2008). Ainda, foi demonstrado leve edema intersticial, aumento de mitocôndrias, aumento de fibroblastos e ativação do sistema imunológico cutâneo após irradiação da pele da face lateral da perna sã humana com LED 630±3 nm, irradiância 105 mW/cm², com 8 sessões de 15 min cada semana, fluxo: 94 J/cm², área 22-18cm² (TAKEZAKI *et al.*, em 2006).

Não existem relatos na literatura quanto ao uso da terapia a laser e LED na OA. Nós encontramos que não existiam padrões nos programas de terapia com relação a dose e duração da aplicação do laser, e as publicações atuais são discrepantes. Conseqüentemente, neste estudo, nós aplicamos três diferentes terapias (laser visível, infravermelho e LED) quanto ao comprimento de onda com a mesma dose e duração e comparamos os resultados destas terapias.

Considerando os resultados obtidos através deste estudo, novas investigações podem ser realizadas, visando, estudo do LED 639 nm com doses de irradiação maiores que o laser, diferentes comprimentos de onda e outras formas de tratamento para que seja possível o emprego desse tipo de terapia em aplicações clínicas.

6 CONCLUSÃO

A radiação LBP 685 nm e 830 nm, operando com 2,5 J/cm² administrados na primeira, segunda e terceira hora após a indução da inflamação por Zy em joelho de ratos, é efetiva na reversão da hiperalgesia e capaz de inibir a evolução do edema, da P.V. e influxo de leucócitos na OA de joelho induzida por Zy.

O efeito anti-inflamatório do LED 639 nm na mesma dosagem do laser pode ser observado na diminuição do influxo leucocitário para o foco inflamatório.

Os resultados deste estudo indicam que a TLBP, aplicada em dois diferentes comprimentos de onda 685 nm e 830 nm, desempenha um papel significativo na redução da inflamação e dor na OA.

Portanto, os fisioterapeutas passam a ter um parâmetro dos lasers 685 nm e 830 nm na dosagem de 2,5 J/cm² para aplicação em pacientes com artrite de joelho na fase aguda, pois confirmamos a eficácia analgésica e anti-inflamatória desses lasers.

REFERÊNCIAS

ALBELDA, S.M.; WAYNE, S.; WARD, P. Adhesion molecules and inflammatory injury. **FASEB J.**, v.8, p.514-512, 1994.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.C.; BJORDAL, J.M.; ALVES, L.P.; MUNIN, E.; COSTA, M.S. Anti-inflammatory effects os low-level laser therapy (LLLTT) with two different red wavelengths (660 e 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of photochemistry and Photobiology**,v.89, p.50-55, 2007.

ALBERTINI, R; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S.; NUCCI, G.; FARIA NETO, H.C.C.; AIMBIRE, F. S.C.; ZANGARO, R.A.; MARTINS, R.A.B.L.. Análise do efeito do laser de baixa potência (ASGAAL) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. **Fisioterapia Brasil**, v.3, n. 1, p. 5-15, 2002.

AMANO, A.; MIYAGI, K.; AZUMA, T.; ISHIHARA, Y.; KATSUBE, S.; AOYAMA,, I.; SAITO, I. Histological studies on the rheumatoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. **Laser in Surgery and Medicine**, v.15, p.290-294, 1994.

ANDRADE, M. F.; RASTELLI, A. N. S; SAAD, R. S; SAAD, J. R. C. Avaliação de capacidade de polimerização de um novo dispositivo a base de LED à bateria. **J Am Dent Assoc**, v.4, p.372-376, 2001.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. - Induction of ciclo-oxigenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Adv. Pharmacol.**, v. 35, p. 27-79, 1996.

ARDEN, N; NEVITT, M.C. Osteoarthritis: Epidemiology. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.20, n.1, p. 3- 25, Fev,2006.

AUGER, M.J. ; ROSS, J.A. **The biology of the macrophage. In natural immune system**: The macrophage. Oxford, New York, Tokio: IRL Press, 1992. p.1 -57,

AZEVEDO, M.P.; NUNES, B. C.; PEREIRA, A. C.; LACERDA, M. A.; OEST, F. Dor aguda. In: CAVALCANTI, I.L. MADDALENA, M. L. **Dor**.Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, 2003. p. 95-166.

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v.73, p. 599-551, 1984.

BAKLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Ciclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. **Mediator of Inflamm.**, v. 5, p.305-326, 1996.

- BAÑOS, D. J. E.; NAVARRO, A. Aspectos actuales de la transmisión nociceptiva: mecanismos periféricos e modulación espinal. **Rev. Neurol.**, Barcelona. v.24, p.769-778, 1996.
- BASFORD, J.R. Low level laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.16, p. 331-342, 1995.
- BAXTER, G. D. **Therapeutic laser: Theory and practice**. [s.l.]:Churchill Livingstone, 1997. p.1-19,
- BECKERMAN, H.; DE BIE, R. A.; DE CUYPER, H.J.; OOSTENDORP, R.A.B. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria-based meta-analysis of randomised clinical trials. **Phys, Ther.**, v.7, p.483-491, 1992.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p, 1610- 1615, 1999.
- BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, v. 67, p.971-979, 1987.
- BEZERRA, M. M.; BRAIN, D. S.; GIRÃO, C. C. V.; GREENACRE, S.; KEEBLE, J.; ROCHA, A. C. F. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Arch Pharmacol**. v.374, p.265-273, 2007.
- BIRCH, P.J. Tachykinins central and peripheral effects. In *The pharmacol. In: DICKENSON, A. ; BESSON, J.M, ed. Pain*, Berlin: Spring, 1997. p. 117-134.
- BLÄß, S.; ENGEL, J. M.; BURMESTER, G. R. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 2499-2506, 1999.
- BONICA, J. J.; YAKSH, T.; LIEBESKIND, J. C. *et al.*, Biochemistry and modulation of nociception and pain. **Bonica management of pain**, 2nd [s.l.]: Malven, Lea & Febiger, , 1990. v.1, p. 95-121.
- BOSCH, E.S.; LEITE, E.C.; SACIURA, C.V.; CABERLON, E.; LUNARDELLI, A.; BITENCOURT, S.; MELO, D.A.S.; OLIVEIRA, R.J. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. **Laser Surg Med.**, v.25, n.7,p.:500-508, Aug, 2008.
- BOULTON, M.; MARSHALL, J. He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. **Lasers in the Life Sciences**, v.1, p.125-134, 1986.
- BROMM, D. B.; LORENZ, J. Neurophysiological evaluation of pain. **Electroencephalogr. Clin. Neurophys.**, v. 107, p. 227-253, 1998.
- BRUGNERA, A.; PINHEIRO, A. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. p.356.
- BUCKLEY, T.L; BRAIN, S.D. Functional interactions between inflammatory mediators, in the microcirculation and relevance of neurogenic components. - In:

BRAIN, S.D. ed. **The Handbook of Immunopharmacology, Immunopharmacology of the Microcirculation**. San Diego, Academic Press, 1994.. p.63-76.

CAMPANA, V.; MOYA, M. The relative effects of He Ne laser and meloxicam on experimentally induced inflammation. **Laser Therapy**, v.11, n.2, p. 36-43, 1999.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J. A. Effects of diclofenac sodium and He:Ne laser irradiation plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 16, n.6, p. 317-320, 1998.

CANNON, G. W.; OPENSHAW, S.J.; HIBBS JR., J.B.; ROIDAL, J.R.; HUECKSTEADT, T.P.; GRIFFITHS, M.M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 39, p. 1677-1684, Oct., 1996.

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, v.353, p.2051-2058, 1999.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória, Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev. Br. Anesthesiol.**, v. 48, n.2, p. 137-158, 1998.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. D. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol. Ther.**, v.94, p.1-34, 2002.

CASTANO, A. P.; DAI, T.; YAROSLAVSKY, I.; COHEN, R.; APRUZZESE, W. A.; SMOTRICH, M. H.; HAMBLIN, M.R. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 39, p.543-550. 2007.

CASTRO, R.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA JR., F.S., ROCHA, F.A.C. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis – evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis and cartilage**. v.14, p.769-776, 2006.

CHOY, E. H. S.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A₂, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p.105-11, 1998.

CLOUGH, G. Experimental models of skin inflammation. **Clinical and Exp. Allergy**. v.29, Sup. 3, p.105-108, 1999.

CODERRE, T. J.; KATZ, J.; VACCARIANO, A. L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: Review of clinical and experimental evidence. **Pain, Amsterdam**, v.52, n.3, p.259-285, 1993.

COTRAN, C.; KUMAR, T.; ROBBINS, A. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1994, p.35-71.

DE LISA, J.A.; GANS, B.M. **Tratado de Medicina de Reabilitação – Princípios e Prática**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2002. v.2. p.1576.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DRAY, A. Tasting the inflammatory soup role of peripheral neurons. **Pain Rev.**, v.1, p.153-171, 1994.

DREIER, R.; WALLACE, S.; FUCHS, S.; BRUCKNER, P.; GRASSET, S. Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro gelatinase B (pro-MMP9). **J. Cell Sci.**, v. 114, n. 21, p.3813-3822, 2001.

ENWEMEKA, S. C. **Therapeutic Light. Rehab Management**. Jan/Feb, 2007. Disponível em: [HTTP://www.rehabpub.com/features/1022004/2.asp](http://www.rehabpub.com/features/1022004/2.asp).

FARRELL, A. J.; BLAKE, D.R.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, p.1219-1222, 1992.

FELSON, D.T.; COUROPMITREE, N.N.; CHAISSON, C.E.; HANNAN, T.M.; ZHANG, Y.; MCALINDON, E.T.; LAVALLEY, M.; LEVY, D.; MYERS, H.R. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. **Arthritis and Rheumatism**, v.41, p.1064-1071, 1998.

FELSON, D.T.; NAIMARK, A.; ANDERSON, J.; KAZIS, L.; CASTELLI, W.; MEENAN, R.F. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly, **Arthritis and Rheumatism**, v.30, p. 914-918, 1987.

FELSON, D.T.; ZHANG, Y.; HANNAN, M.T.; NAIMARK, A.; WEISSMAN, B.N.; ALIABADI, P.; LEVY, D. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly, **Arthritis and Rheumatism**, v.38, p.1500-1505, 1995.

FERREIRA, D. M.; ZANGARO, R. A.; VILLAVERDE, A. B.; CURY, Y.; FRIGO, L.; PICOLO, G.; LONGO, I.; BARBOSA, D. G. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomed. Laser Surg.**, v.23, p.177-181, 2005.

FERREIRA, S.H. Entre a compreensão e a confusão: alodínia e hiperalgesia, *In: DOR ON LINE*. Disponível em <http://www.dol.inf.br> Acesso em 23 nov. 2008.

FERREIRA, S.H.; LORENZENTTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hiperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p.1227-1231, 1993.

FLECKNELL, P. **Animal Anaesthesia**, 2ª ed. [s.l.]:Academic Press. 2000.

FLOREY, H.W. **Inflammation**. In: General Pathology, 4th ed. H.W.Florey Ed., Philadelphia, Saunders, p.1-174, 1970.

GADÓ, K.; GLIGER, G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new anti-inflammatory drugs. **Agents Actions**, v. 32, p.-119-121, 1991.

GARCIA-LEME, J. M. D. Cellular functions in inflammation. In: **Hormones and Inflammation**. Florida, CRC Press, Inc.,1989.p.165.

GARCIA-LEME, J.; HARMAMURA, 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 by heating. **Br. J. Pharmacol.**, v. 48, p.88-96, 1993.

GEGOUT, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymosan induced arthritis in rats II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sci**, v. 56, n.20, p.389-394, 1995.

GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade**. Aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Lovise, 2000.

GOLDING, D. N. **Reumatologia em Medicina de Reabilitação**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.p.161- 165.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 21 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan,. 2001.v. 2, p. 1728-1729.

GOZZANI, J.L. Fisiopatologia da dor. In: CAVALCANTI, I.L. MADDALENA, M. L. **Dor**.Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, 2003.p.13-51.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis: na approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.30, p.1205-1213, 1987.

HANNAN, M.T.; FELSON, D.T.; ANDERSON, J.J.; NAIMARK, A.; KANNEL, W. B. Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. **Arthritis and Rheumatism**, v.33, p. 525-532, 1990.

HARRIS, E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n.18, p.1277-1289, 1990.

HART, D.; DOYLE, D.; SPECTOR, T. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. **Arthritis and Rheumatism.**, v.42, p. 17-24, 1999.

HEPPELMANN, B. Anatomy and histology of joint innervation. **J Peripher Nerv Syst.**, v.2, p.5 –16,1997.

HIBBS Jr., J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.30, p. 87-94, 1989.

HOFSLI, E.; BAKKE, O.; NONSTAD, U.; ESPEVIK, T. A flow cytometric and immunofluorescence microscopic study of tumor necrosis factor production and localization in human monocytes. **Cell. Immunol.**, v.122, p. 405-415, 1989.

HOLDERBAUM, D.; HAGGI, T.M.; MOSKOWITZ, R.W. Genetics and osteoarthritis: exposing the iceberg. **Arthritis Rheum.**, v.42, p.397-405, 1999.

HONMURA, A.; ISHII, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 13, p. 463-469, 1993.

HUGHES, J. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, p. 577-579, 1975.

HURLEY, M.V. The role of muscle weakness in the pathogenesis of osteoarthritis, **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v.25, p. 283-298, 1999.

ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; CHEN, J.; TSAI, M.; MARTIN, J. C.; SMITH, C. D.; BECKMAN, J. S. Peroxynitrite-mediate tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.298, p. 431-437, 1992.

ISLER, P.; VEY, E.; ZHANG, J.H.; DAYER, J.M. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. **Eur. Cytokine Netw**, v. 4, p.15-23, 1993.

ISSEKUTZ, A.C. & MOVAT, H. Z. The *in vivo* qualification and kinetics of rabbit neutrophil leucocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. **Lab. Invest**, v.42, p.310, 1980.

ISSEKUTZ, T. B.; ISSEKUTZ, A.C.; MOVAT, H. Z. The *in vivo* qualification and kinetics of monocyte migration into acute inflammatory tissue. **Am. J. Pathol.**, v.103, p.47, 1981.

JABBUR, S.J.; SAADÉ, N. E. From aletrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. **Pain**, v. 87, p. 87-92, 1999.

JAMES, M.J., PENGLIS, P.S., CAUGHEY, G.E., DEMASIL, M.; Cleland, L.G. Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? **Inflamm. Res.**,v.50, p.249-253, 2001.

JARVIS, D.; MACLVER, B.; TANELIAN, D.L.. Electrophysiologic recording and thermodynamic modeling demonstrate that helium neon laser irradiation does not affect peripheral Ad- or C-fiber nociceptors. **Pain**, v.43, p.235-242, 1990.

KALLMAN, D.; WIGLEY, F.; SCOTT, W. The longitudinal course of hand osteoarthritis in a male population, **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, p. 1323-1332, 1990.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4. ed. São Paulo. Manole. 2003.p. 473-491.

KAPRIO, J.; KUJALA, U.M.; PELTONEN, L.; KOSKENVUO, M. Genetic liability to osteoarthritis may be greater in women than men. **British Medical Journal**, v.313, 1996.

KARU, T. Cellular mechanisms of low-power laser therapy. *Advanced Energy Medicine*. 2006. Disponível em <http://www.tinnitus.us/tinakarupresentation.html> Acesso em 22 ago. 2007.

KARU, T. I. Photobiological fundamental of low power laser therapy. **Journal Qwantum Electronics**, v. 23, n. 1704- 1707, 1987.

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

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; RYABYKH, T. P. Melatonin modulates the action of near infrared radiation on cell adhesion. **J. Pineal Res.**, v.34, p.167-172, 2003.

KARU, T.; PYATIBRAT, I.; KALENDO. G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, p. 219-223, 1995.

KARU, T.I. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low power intensity laser radiation. **Laser Life Sci.**, v.2, p.53-74, 1988.

KERREGAN, D.; TODD, M.; RILEY, P. Knee osteoarthritis and high-heeled shoes. **Lancet**, v.35, p.1399-1401, 1998.

KEYSTONE, E.C.; SCHORLEMMER, H.U.; POPE, C.; ALLISON, A.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum**, v. 20, p. 1397-1401, 1977.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C. H. A review of low level laser therapy parts I: Background, Physiological effects and hazards. **Physiotherapy**, v. 77, n.3, p.161 – 163, 1991.

LANYON, P.; MUIR, K.; DOHERTY, S.; DOHERTY, M. Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling. **British Medical Journal**, v.321, p. 1179-1183, 2000.

LAROCCA, T.S. **Reumatologia**: Princípios e Prática. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 269-272.

LAWRENCE, R.C.; HELMICK, C.G.; ARNETT, F.C.; DEYO, R.A.; FELSON, D.T.; GIANNINI, E.H.; HEYSE, S.P.; HIRSCH, R.; HOCHBERG, M.C., HUNDER, G.G.; LIANG, M.H.; PILLEMER, S.R.; STEEN, V.D.; WOLFE, F. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States, **Arthritis an Rheumatism**, v.41, p. 778-799,1998.

LIANZA, S.A. **Medicina de Reabilitação**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.p. 197 – 198.

LOESER, R.F.; SHAKOOR, N. Aging or osteoarthritis: which is the problem?, **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v.29, p.653-673,2003.

LOOSER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v.53. p.1607-1609, 1999.

LOTZ, M.; CARSON, D. A.; VAUGHAN, J. H. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. **Science**, v. 235, p. 893-895, 1987.

LOW, J.; REED. A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2001.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J Photochem Photobiol B: Biol.**, v.12, p.305-310, 1992.

MACGREGOR, A.J.; ANTONIADES, L.; MATSON, M. M; ANDREW, T.; SPECTOR, D.T. The genetic contribution to radiographic hip osteoarthritis in women: results of a classic twin study. **Arthritis and Rheumatism**, 43, p. 2410-2416, 2000.

MACH, D. B., ROGERS, S.D.; SABINO, M. C.; LUGER, N. M.; SCHWEI, M. J.; POMONIS, J. D.; KEYSER, C. P.; CLOHISY, D. R.; ADAMS, D. J.; O'LEARY, P.; MANTYH, P. W. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervations of the mouse femur. **Neuroscience**, v.3,p.155 –166, 2002.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. São Paulo: Atheneu, p.101-130, 2000.

MAHAJAN, A.; VERMA, S.; TANDON, V. Osteoarthritis. **J. Assoc. Physicians India**, v. 53, p. 634-641, jul 2005.

MAILLET, H.O. **Laser, princípios e técnicas de aplicação**. São Paulo: Manole, 1987.

MAYER, D.J., PRICE, D.D. Central Nervous System Mechanism of Analgesia. **Pain**. v. 2,p.379-404, 1976.

MEDEIROS, I. S. **Dispositivos LED para polimerização de resinas compostas dentais: comparação com outra fonte de luz**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Inter-unidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, 2001.

MERKE, H.; BOGDUK, N. Definitions. **IASP-International Association for the Study of Pain** IASP Pain Terminology. Disponível em <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>. Acesso em jan. 2007.

MISERENDINO, L. J.; PICK, R. M. **Lasers in Dentistry**. Chicago: Quintessence Publishing, 1995.p.39-54.

MOILANEN, S.; VAPAATALO, H. Nitric Oxide In Inflammation and Immune Response. **Annals of Medicine**, v. 27, p. 359-367, 1995.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. **The New England Medicine**, v. 300, p. 1142-1147, 1979.

NAGASE, H. ; KASHIWAGI, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res. Ther.**, v. 5, p. 94-103, 2003.

NEVITT, M.C.; CUMMING, S.R.; LANE, N.E. HOCHBERG, M. C.; SCOTT, J. C.; PRESSMAN, A. R.; GENANT, H. K.; CAULEY, J. A. Current use of oral estrogen is associated with a decreased prevalence of radiographic hip AO in elderly White women, **Arthritis and Rheumatism**,v. 37, (supplement), p. S212, 1994.

NEWMAN, B.A.; HAGGERTY, L.C.; GOODPASTER, B.; HARRIS, T.; KRITCHEVSKY, S.; NEVITT, M.; MILES, P.T.; VISSER, M. Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: the health, aging and body composition study, **Journal of the American Geriatrics Society**, v.51, p.323-330, 2003.

OLIVEIRA, L. F. Farmacologia da dor. In: ALCANTI, I.L. MADDALENA, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, p.13-51,2003.

OLIVEIRA, S.A.; FELSON, D.T.; KLEIN, R.A.; REED, J.I.; WALKER, A.M. Estrogen replacement therapy and the development of osteoarthritis. **Epidemiology**, v.7, p. 415-419, 1996.

OLIVEIRA, S.A.; FELSON, D.T.; REED, J.I., CIRILLO, P.A., WALKER, A.M. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. **Arthritis and Rheumatism**, v.38, n.8, p.1134-1141,1995.

OSLON, N.C.; BROWN, J.T.T.; ANDERSON, D.L. Dexametasone and Indomethacin modify endotoxin-induced respiratory failure in pigs. **J. Appl. Physiol.**, v. 58, p. 274-284, 1985.

PAIRET, M. ENGELHARDT, G. Distinct isoform (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. **Fundam Clin. Pharmacol.** v.10, p. 1-15, 1996.

PARK, J.Y.; PILLINGER, M.H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clin. Immunol.**, v.119, p.229-240, 2006.

PASSARELA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIALIELLO, E.; CATALANO, J. M.; CINGOLANO, A. Increase of próton electrochemical and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-néon laser. **FEBS Letters**. v. 175, n. 01, p.95-99, 1984.

PENNICA, D.; NEDWIN, G.E.; HAYFLICK, J.S. Human Tumor Necrosis Factor: Precursor structure, expression mology to lymphotoxin. **Nature**, p. 312-724, 1984.

PERT, C.B.; SNYDER, S.H. Opiate receptor-demonstrative in nervous tissue. **Science**. v.179, p.1011-1014, 1973.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol. Therap.**, v.71, p. 313-324, 1996.

PONTINEN, P. Laseracupunture. In: SIMUNOVIE Z (Ed.) **Lasers in Medicine and Dentistry**. Part One Science, and Up-to-date Clinical Application of Low Energy-Laser Therapy LLLT. 1ed. Rijeka: Vitgraf, 2000.p.455-475.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia** . 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2001. p. 703.

RANG, H.P.; URBAN, L. New molecules in analgesia. **Br.J. Anaesth.**, v.75, p, 145-156, 1991.

REBELLO, M. L. **Estudo comparativo de três sistemas de cura da resina composta para colagem de bráquete: resina ativada quimicamente, luz alógena e luz emitada por diodo (LED's), quando submetidas ao teste de resina a tração**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba 2005.

REIS, F. A. **Análise da influência da irradiação do laser de baixa potência arsenieto de gálio e alumínio (660 nm) sobre a recuperação funcional e morfológica do nervo ciático de ratos após lesão por neurotmesa seguida de anastomose epineural**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation in the rat. **Science**. v. 164, p.444-445, 1969.

RICCI, R. **Estudo *in vitro* da bioestimulação de células endoteliais em resposta a diferentes dosemetrias do laser de semiconductor fosfeto de índio-gálio-alumínio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

ROCHA, F. A. C.; ANDRADE, C.E.L.; RUSSO, M.; JANCAR, S. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J. Lipid Mediators Cells Signalling**, v.16, p.1-10, 1997.

ROCHA, F. A. C.; ANDRADE, L. E. C.; JANCAR, S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediators on cell infiltration. **Med. Inflamm.**, v..5, p.104-109, 1996.

ROCHA, F. A. C.; ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RINEIRO, R. A. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória

articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 43, n. 4, p. 206-217. Jul/ago, 2003.

ROCHA, F.A.C.; ARAGÃO, A.G.M.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A. Periathritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, v. 48, p. 485-490, 1999.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, E.B. M.; JANCAR, S.; CUNHA, Q. F.; RIBEIRO, A.R.; ROCHA, A. C.F. Dual effect of nitric in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 163, p.588-596, 2002.

ROGERS, D.F.; JEFFREY, P.K. Inhibition of cigarette smoke-induced airways secretory cell hyperplasia by indomethacin, dexametasone, prednisolone, or hydrocortisone in rat. **Exp. Lung. Res.**, v. 10, n.3, p. 285-298, 1986.

SAASE, J.L.; ROMUNDE, L.K.; CATS, A. *et al.*, Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations, **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.48, p. 271-280, 1989.

SALTER, R.B. **Distúrbios e Lesões do Sistema Músculoesquelético**. 3 ed. São Paulo: Medsi, 2001. p. 259 – 264.

SAMANTA, A.; JONES, A.; REGAN, M.; WILSON, S.; DOHERTY, M. Is osteoarthritis in women affected by hormonal changes or smoking?, **British the Journal of Rheumatology**, v.32, p.366-370, 1993.

SCHAIBLE, H. G.; GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, v.55, p.5-54, 1993.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **Journal of Neurophysiology**, v.60, p.2180-2195, 1988.

SCHAIBLE, H. G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann NY Acad Sci.**, v.966, p.343–354, 2002.

SCHEMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWERKER, H.O.; TOREBJORK, H.E. Sensitization of intensive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiology**, v.480, p.389-394, 1994.

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHON, H.; SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy: a review. **Journal of investigative medicine**, v. 48, n. 05, p. 312-326, 2000.

SCHUMACHER, H. R.; KITRIDOU, R. C. Synovitis of recent onset. A clinicopathologic study during the first month of disease. **Arthritis Rheum.**, v. 15, p. 465- 485, 1972.

SEKI, N.; SUDO, Y.; YOSHIOKA, T.; SUGIHARA, S.; FUJITSU, T.; SAKUMA, S.; OGAWA, T.; HAMAOKA, T.; SENOH, H.; FUJIWARA, H. Type II collagen-induced

murine arthritis. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. **The Journal of Immunology**, v.140, n.5, p. 1477-1484, 1988.

SERRANO, A. Modulacion descendene de la informacion nociceptiva (I). **Rev. Soc. Esp. Dolor**, v.9, p.382-390, 2002.

SHARMA, L. Proprioceptive impairment in knee osteoarthritis, **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v.25, p. 299-314, 1999.

SHARMA, L.; LOU, C.; FELSON, D.T.; DUNLOP, D.D.; KIRWAN-MELLIS, G.; HAYES, W.K.; WEINRACH, D.; BUCHANAN, S.T. Laxity in health and osteoarthritic knees, **Arthritis Rheumatism**, v.42, p. 861-870, 1999.

SHIMIZU, N. ; YAMAGUCHI, M. ; GOSEKI, T. ; SHIBATA, Y. ; TAKIGUCHI, H. ; IWASAWA, T. ; ABIKO, Y. Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.**, v.74, p.1382-1388, 1995.

SMITH, W.L. - Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. 181-191, 1992.

SOWERS, M.F.; HOCHBERG, M.; CRABBE, J.P.; MUHICH, A.; CRUTCHFIELD, M.; UPDIKE, S. Association of bone mineral density and sex hormone levels with osteoarthritis of the hand and knee in premenopausal women. **American Journal of Epidemiology**, v.143, p. 38-47, 1996.

SPECTOR, T.D.; CICUTTINI, F.; BAKER, J.; HART, DEBORA, H. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. **British Medical Journal**, v.312, p. 940-943, 1996.

SPECTOR, T.D.; NANDRA, D.; HART, D.J.; DOYLE, D.V. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women?. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.56, p. 432-434, 1997.

TAKEZAKI, S.; OMI, T.; KAWANA, S. Light emitting diode phototherapy at 630 nm increases local levels of skin-homing T-cells in humans subjects. **Journal Nippon Med. Such.**, v.73, n.2, p.75-81, 2006.

TASCIOGLU, F.; ARMAGAN, O.; TABAK, Y.; CORAPCI, I.; ONER, C. Low power laser treatment in patients with knee osteoarthritis. **Swiss Med WKLY**, v.134, p.254-258, 2004.

TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M. D.; ZAIDAN, M. L. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta cirúrgica brasileira**. v. 13, n. 02, abr. 1998.

TONUSSI, C. A.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: An objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v.48, p.421-427. 1992.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy: Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books, 2002.

VALE, F. M. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e conseqüentes estratégias farmacológicas. **RFML**, v.5 p. 291-304, 2003.

VANE, J. Control of the circulation by endothelial mediators. Inaugural G.B. West Memorial Lecture. **Int. Arch. Allergy Immunol**, v.101, 333–345, 1993.

VANE, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. **Nature New Biol**. v. 31, p. 34-69, 1971.

VASSELJEN, O.; HOEG, N.; KJEDSTAD, B.; JOHNSON, A.; LARSEN, S. Low level laser versus placebo in the treatment of tennis elbow. **Scand. J. Rehabil. Med.**, v. 24, p.37–42, 1992.

VEÇOSO, M. C. **Laser em fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.

WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of clinical laser medicine and surgery.**, v.16, n.03, p.159-165, 1998.

WILLIAMS, K. L.; HIGGS, G. A. Eicosanoids and inflammation. **J. Pathol.**, v. 156, p. 101-10, 1988.

WILLIAMS, T. J.; MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, v.246, p. 215-217, 1973.

WILLOUGHBY, D. A. Effects of prostaglandins PGF_{2a} and PGE₁ on vascular permeability. **J. Pathol. and Bacter.**, v.96, n.2p. 381-387, 1968.DOI: <http://www.10.1002/path.1700960216>

ZANIN, I. C. J.; GONÇALVES, R. B.; BRUGNERA, A. JR.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: in vitro study. **J Antimicrob Chemother**. v.56, n.2,p.324-330, 2005.

ZHANG, Y.; HUNTER, D.J.; NEVITT, M.C.; XU, L.; NIU, J.; LUI, L.; YU, W.; ALIABADI, P; FELSON, D.T. Association of squatting with increased prevalence of radiographic tibiofemoral knee osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.50, p. 1187-1192, 2004.

ZHANG, Y.; MACALINDON, T.E.; HANNAN, M.T.; CHAISSON, C.E.; KLEIN, R.; WILSON, P.W.; FELSON, D.T. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. **Arthritis and Rheumatism**. v.41, p. 1867-1873, 1998.

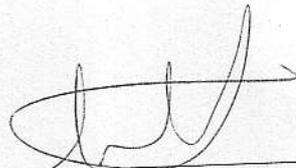
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A027/2006/CEP, intitulado “*Estudo do efeito do laser de baixa potência (HeNe) na artrite induzida por zymosan*”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Stella Regina Zamuner, 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 Vivissecção 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, 07 de novembro de 2006.



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