

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER
EM MODELO EXPERIMENTAL**

Autora: Flávia Villela Chamusca

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

SALVADOR

2010

FLÁVIA VILLELA CHAMUSCA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER
EM MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Estomatologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

SALVADOR

2010

FLÁVIA VILLELA CHAMUSCA

AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM
MODELO EXPERIMENTAL

Comissão julgadora:

Prof^a. Dr^a. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

Doutora em Patologia Humana – Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Adjunta do Núcleo de Estomatologia do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof^a. Dr^a. Silvia Regina de Almeida Reis

Doutora em Patologia Oral- Universidade Livre de Berlim

Prof^a. Adjunta do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof. Dr. Urbino da Rocha Tunes

Doutor em Imunologia – Universidade Federal da Bahia

Professor Titular do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof^a. Dr^a. Denise Carneiro Lemaire

Doutora em Imunologia – Universidade D’AIX MARSEILLE II da França

Professora Titular da Universidade do Estado da Bahia

Salvador

2010

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS



Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – EBMSP



Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz

Fundação Oswaldo Cruz– FIOCRUZ

**Dedico este trabalho à minha avó Nelly,
por nunca medir esforços para a realização
dos meus sonhos. O colo mais aconchegante
encontrado nos momentos difíceis e o
sorriso mais brilhante diante das minhas
conquistas.**

Agradeço especialmente à minha mãe Patrícia (*in memoriam*), a minha eterna estrela guia. Seu amor pela odontologia foi fundamental na minha escolha por esta profissão maravilhosa. A sua presença, embora não mais de uma forma física, continua a fazer de mim uma pessoa cada dia mais forte.

Agradeço também:

Ao meu pai, João, pelo amor e carinho que só um grande pai é capaz de dar a uma filha.

Ao meu irmão Bruno, único e insubstituível. Este Deus me deu de presente, para que nas estradas da vida, as barreiras e os obstáculos possam ser atravessados com menores impactos.

A toda minha família, por compreender a minha distância nestes últimos anos e ainda assim retribuírem com amor e incentivo.

Ao meu grande amor, amigo, companheiro, cúmplice e marido, Pablo. Paciência em um sentido mais amplo, talvez traduza a importância da sua presença incondicional ao meu lado nestes dois anos de curso.

Às minhas grandes e verdadeiras amigas, por simplesmente existirem na minha vida, fazendo o meu sol brilhar mais e os meus dias sempre mais belos. Amo cada uma de vocês.

Aos meus colegas de mestrado, Carine, Deyla, Faber, Lara, Maybel, Rebeca e Thaís. Uma turma heterogênea, com personalidades marcantes, que possibilitaram um aprendizado bastante enriquecedor, não só do ponto de vista profissional, mas principalmente do ponto de vista pessoal. A partir daqui cada um seguirá sua trajetória, sentirei saudades e desejo a todos vocês muito sucesso.

A toda equipe de professores do mestrado pelas horas dedicadas ao meu crescimento pessoal e profissional, em especial à minha orientadora prof^a Dr^a. Alena Medrado e à prof^a. Dr^a Sílvia Reis, por terem me acolhido com muito carinho, confiando na minha capacidade. Serei eternamente grata pela participação de vocês na concretização deste grande sonho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais uma vitória.

**“ Se quiser que me dane não me inflame!
Se me quer feliz de pele lisa
me repare, mas não cicatriza!
Reconstrua, tenha ação como tecido de granulação
não adie, resolva, não me embroma,
não se feche tal qual granuloma...
... Bom senso, homeostasia, sem transe e vazia
Estímulo e agressão, lesão e reação
Vida, sobe ou desce, aguda ou crônica, sem primazia
Que venha a emoção! Ou a inflamação”**

Alberto Consolaro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT – Alfa-1-antitripsina

ACTH – *Adrenocorticotropic hormone* (Hormônio adrenocorticotrófico)

ADP – Adenosina-di-fosfato

AGA - Alfa-1-glicoproteína-ácida

AMG – Alfa-2-macroglobulina

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

BK – *Bradikine* (Bradicinina)

BS'A – Albumina de soro bovino

Cer – Ceruloplasmina

cm² – Centímetro(s) quadrado(s)

COX – *Cyclooxygenase enzyme* (Enzima ciclooxigenase)

CRF – *Corticotropin-releasing factor* (Fator de liberação da corticotropina)

eNOS – Óxido nítrico produzido por células endoteliais

g – Grama(s)

g/dL – Grama(s) por decilitro(s)

GaAlAs - Arseneto de Gálio e Alumínio

Hap – Haptoglobina

HeNe - Hélio néon

HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

ICAM - *Inter-Cellular Adhesion Molecule* (Molécula de adesão intercelular)

IL-1 – Interleucina 1

IL-12 – Interleucina 12

IL-2 – Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

iNOS – Óxido nítrico produzido pela indução do óxido nítrico sintase (NOS)

IP3 – Inositol trifosfato

J/cm² – Joule(s) por centímetro(s) quadrado(s)

KDa - QuiloDalton

Laser – *Light amplification by stimulated emission of irradiation* (amplificação da luz por emissão estimulada da radiação)

LLLT – *Low-level laser therapy* (Terapia *laser* de baixa potência)
MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)
ml – Mililitro(s)
mW – Miliwatt(s)
mW/cm² – Miliwatt(s) por centímetro(s) quadrado(s)
nm – Nanômetro(s)
nNOS – Óxido nítrico produzido por diferentes genes nos neurônios
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
PBS- Solução de tampão fosfato
PCR – Proteína C reativa
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PGI₂ – Prostaglandina I₂
RFA – Reação de Fase Aguda
TGF- *Transforming growth factor* (Fator de crescimento transformante)
TGF_{β1} – *Transforming growth factor β1* (Fator de crescimento transformante beta um)
TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)
TXA₂ - Tromboxano A₂
W – Watt(s)
W/cm² – Watt(s) por centímetro(s) quadrado(s)
λ – Comprimento(s) de onda(s)
μL – Microlitro(s)

LISTA DE DIAGRAMAS, QUADROS E FIGURAS

Diagrama 1: Vias de ativação do Sistema complemento e suas respectivas funções biológicas.....	19
Diagrama 2: Delineamento experimental com seus grupos e respectivos subgrupos.....	42
Quadro 1: Principais citocinas, seus alvos e efeitos biológicos.....	22
Quadro 2: Propriedades das quimiocinas humanas descritas na literatura	24
Figura 1: Ferida cutânea padronizada.....	44
Figura 2: Aplicação do Laser em um dos pontos.....	44
Figura 3: Pontos de aplicação do laser na ferida cutânea, 4 extremidades.....	44
Figura 4: Tricotomia e Incisão	45
Figura 5: Divulsão tecido muscular e cutâneo.....	45
Figura 6: Localização da glândula adrenal	45
Figura 7: Adrenalectomia propriamente dita.....	45
Figura 8: Incisão e abertura ventral	46
Figura 9: Coleta sanguínea	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal preservada.	48
Gráfico 2: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal preservada.....	49
Gráfico 3: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal removida.....	49
Gráfico 4: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal removida.....	50
Gráfico 5: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo controle, não irradiados, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta.....	51
Gráfico 6: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo controle, não irradiados, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta.....	51
Gráfico 7: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo laser, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta.....	52
Gráfico 8: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo laser, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta.....	53

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Manuscrito I	14
2.2 Introdução	15
2.2 Revisão da Literatura	16
2.2.1 Ação de mediadores químicos naturalmente expressos pelo organismo durante a inflamação	16
2.2.1.1 Cascata da coagulação e cascata fibrinolítica	16
2.2.1.2 Proteínas plasmáticas de fase aguda	17
2.2.1.3 Cascata do sistema complemento	18
2.2.1.4 Cascata das cininas	19
2.2.1.5 Citocinas	20
2.2.1.6 Quimiocinas	23
2.2.1.7 Óxido Nítrico	25
2.2.1.8 Derivados do Ácido Araquidônico	25
2.2.1.9 Eixo Hipófise-adrenal e produção de cortisol endógeno	26
2.2.2 Componentes celulares sanguíneos que participam da resposta inflamatória	27
2.2.2.1 Células polimorfonucleares	27
2.2.2.2 Células monomorfonucleares	28
2.2.2.2.1 Linfócitos	28
2.2.2.2.2 Monócitos	29
2.2.3 Fotobiomodulação laser como agente capaz de modular o processo inflamatório	30
2.2.3.1 Propriedades físicas do laser	30
2.2.3.2 Diferentes protocolos de dosagem	30
2.2.3.3 Efeitos locais da fotobiomodulação	31
2.2.3.4 Efeitos sistêmicos da laserterapia	32
2.3 Considerações Finais	32
2.4 Abstract	33
2.5 Referências Bibliográficas	33
3. Manuscrito II	40
3.1 Introdução	41
3.2 Metodologia	42
3.2.1 Animais	42
3.2.2 Grupos experimentais	43

3.2.3 Procedimentos cirúrgicos.....	45
3.2.3.1 Remoção da Glândula Adrenal	45
3.2.3.2 Ferida Cutânea	46
3.2.3.3 Coleta Sanguínea e Morte dos Animais.....	46
3.2.4 Citometria de Fluxo:	47
3.2.5 Análise Estatística.....	47
3.3 Resultados.....	48
3.3.1 Grupo de Animais com Glândula Adrenal Preservada: Terapia Laser X Controle..	48
3.3.2 Grupo de Animais com Glândula Adrenal Removida: Terapia Laser X Controle...	49
3.3.3 Grupo de Animais submetidos à adrenalectomia X Grupo de animais não adrenalectomizados do grupo controle	50
3.3.4 Grupo de Animais submetidos à adrenalectomia X Grupo de animais não adrenalectomizados irradiados.....	52
3.4 Discussão	53
3.5 Conclusões	58
3.6 Abstract	58
3.7 Referências Bibliográficas	59
3.8 Anexo	63

1. Introdução (*)

A utilização do laser de baixa potência é estudada desde os anos sessenta^{P1} e vários trabalhos atualmente vêm sendo realizados para se verificar e elucidar os seus efeitos sobre os tecidos^{R1,R2}. Alguns estudos demonstram que os efeitos biológicos terapêuticos da fotobiomodulação sobre a cicatrização de feridas são muito amplos, induzindo efeitos como proliferação celular, contração de feridas, acelerando a reepitelização e melhorando o processo de cicatrização^{R80,R81}. Apesar dos numerosos estudos e trabalhos confirmando a atuação do laser de baixa potência como instrumento de potencial efeito local sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desta terapia. Pesquisadores têm sugerido uma possível ação sistêmica do laser, quando este é aplicado localmente^{P9,P37,P38}, porém a literatura contempla pouquíssimos estudos que relatam este possível impacto indireto, bem como sua repercussão sobre o sistema imunológico. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente as subpopulações de linfócitos T no sangue de ratos tratados com laser de baixa potência.

Este trabalho de Dissertação, apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública sob o título “Avaliação do efeito sistêmico da fotobiomodulação laser em modelo experimental“, é composto por dois manuscritos. O Manuscrito I, intitulado “Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório – Revisão de Literatura”, apresenta uma análise das publicações acerca dos efeitos sistêmicos desencadeados pelo processo inflamatório. Adicionalmente, esta revisão se propõe a confrontar alguns estudos que relataram a ação local e sistêmica da fotobiomodulação laser em diferentes modelos experimentais, destacando a escassez de publicações que contemplem o efeito sistêmico indireto desta fototerapia.

O Manuscrito II, intitulado “Avaliação do efeito sistêmico da fotobiomodulação laser em modelo experimental”, representa o trabalho de pesquisa que teve como objetivo verificar se a dosimetria de 4J/cm² é capaz de modular a resposta inflamatória sistêmica em animais tratados com laser, na ausência e presença de cortisol endógeno, especialmente na investigação de células que participam da resposta inflamatória.

(*) As referências bibliográficas apresentadas nesta introdução são as referências do manuscrito I e do manuscrito II. As citações referentes ao manuscrito I- Revisão de literatura, são precedidas pela letra ”R”, e ao manuscrito II- Trabalho de pesquisa, são precedidas pela letra ”P”.

2. Manuscrito I

RESUMO

MEDIADORES DO EFEITO SISTÊMICO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO: REVISÃO DE LITERATURA

A inflamação é um mecanismo de defesa caracterizado como próprio dos tecidos conjuntivos. Após uma lesão, a formação do exsudato ocorre para manter os fenômenos vasculares deste processo e para atuarem contra o agressor. Os mediadores químicos do exsudato têm grande importância farmacológica e terapêutica e podem ser inibidos ou estimulados, permitindo o controle dos sinais e sintomas da inflamação. A presente revisão de literatura objetiva documentar e descrever os efeitos sistêmicos desencadeados pelo processo inflamatório, contextualizando-o no âmbito da cicatrização de ferimentos assim como também confrontar alguns estudos que relataram a ação local e sistêmica da fotobiomodulação laser em diferentes modelos experimentais. De fato, o laser parece amenizar a resposta inflamatória. No entanto, a literatura reporta poucos dados sobre os efeitos sistêmicos da fotobiomodulação laser, principalmente no que se refere às células mononucleares do sangue, sendo necessário o desenvolvimento de mais estudos nesta área.

Palavras Chave: Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Mediadores da inflamação. Células sanguíneas.

2.2 Introdução

O processo inflamatório representa uma fase crítica do reparo tecidual, desencadeada em resposta a um determinado agente etiológico. Sendo um mecanismo de defesa, é orquestrado por um amplo contingente de mediadores químicos capazes de agir no local da agressão ou sistemicamente.

Além dos mediadores químicos já bem documentados na literatura, assim como o papel biológico desempenhado por cada componente celular em particular, alguns agentes provenientes do meio externo podem modular o processo inflamatório durante a cicatrização de ferimentos. Dentre os fatores externos capazes de interferir no reparo tecidual procedem contaminação bacteriana, deficiências nutricionais e alterações hormonais. No entanto, diversos adjuvantes têm sido utilizados no intuito de minimizar os efeitos deletérios do processo inflamatório e otimizar o reparo, entre os quais destacam-se o uso de fármacos e as chamadas terapias fotobiomoduladoras.

As terapias fotobiomoduladoras têm sido consideradas alternativas importantes no tratamento dos processos cicatriciais, por apresentarem ação reguladora sobre a resposta inflamatória, reduzindo a dor e estimulando o reparo tecidual, sem os efeitos adversos induzidos por alguns fármacos, a exemplo dos corticóides. Em especial, a fotobiomodulação laser, representada por exemplo pelo laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), tem sido objeto de estudo de muitos investigadores, os quais têm demonstrado que este tipo de terapia luminosa acelera a fase aguda da inflamação, incrementa os fenômenos proliferativos, aumenta a contração de feridas cutâneas e acelera a reepitelização¹. Outros estudos subsequentes têm ratificado estes achados, utilizando inclusive diferentes comprimentos de onda e outras modalidades de luz^{2,3}.

Alguns autores têm sugerido que o laser de baixa potência pode provocar alterações sistêmicas, a exemplo do aumento do nível de endorfinas⁴. Um dos mecanismos sugeridos para a atividade do laser de baixa potência sobre a inflamação é o estímulo à secreção de cortisol endógeno, hormônio liberado pelas glândulas supra-adrenais que age como anti-inflamatório natural⁵. Todavia, não foram encontrados na literatura relatos de estudo que investigassem a ação indireta do laser de baixa potência sobre as diferentes populações de células sanguíneas e outros tipos de mediadores químicos da inflamação.

A presente revisão de literatura objetiva documentar e descrever os efeitos sistêmicos desencadeados pelo processo inflamatório, contextualizando-o no âmbito da cicatrização de ferimentos. Adicionalmente, esta revisão se propõe a confrontar alguns estudos que relataram a ação local e sistêmica da fotobiomodulação laser em diferentes modelos experimentais, destacando a escassez de publicações que contemplem o efeito sistêmico indireto desta fototerapia sozinha ou conjugada ao uso de fármacos ou outras variáveis.

2.2 Revisão da Literatura

2.2.1 Ação de mediadores químicos naturalmente expressos pelo organismo durante a inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa caracterizado como próprio dos tecidos conjuntivos, por depender dos vasos para levar até as áreas agredidas os agentes de defesa que atuarão contra o agressor. Os agentes efetores da inflamação fazem parte do exsudato e do infiltrado celular. O exsudato representa o infiltrado do plasma composto por um conjunto de substâncias que extravasam pelas paredes dos vasos da microcirculação na área agredida, enquanto o infiltrado é o conjunto de células que chega até a área agredida por atravessar a parede das vênulas e capilares e se “infiltrar” nos espaços teciduais. Os componentes do exsudato inflamatório incluem mediadores de iniciação e manutenção dos fenômenos vasculares e exsudativos, mediadores com ação direta sobre o agressor e mediadores para a manutenção da inflamação e atração dos leucócitos⁶.

2.2.1.1 Cascata da coagulação e cascata fibrinolítica

A maioria das formas de lesão a que os organismos vivos estão sujeitos leva a alterações nas junções das células endoteliais⁷. A coagulação inicia-se imediatamente após o surgimento de uma lesão tecidual com a finalidade de formar o coágulo de fibrina no vaso rompido, que é crucial para a manutenção da integridade vascular^{8,9}. As plaquetas formam a primeira resposta a qualquer situação em que haja ruptura da estrutura endotelial, sendo a sua agregação estimulada por substâncias liberadas pelo próprio endotélio, como por exemplo a ADP¹⁰⁻¹². A agregação plaquetária limita a perpetuação da perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, bloqueando a ruptura dos vasos sanguíneos. A estimulação das plaquetas permite que seja desencadeado o processo final da hemostasia, a saber, ativação dos fatores da coagulação¹¹. Por muitos anos a coagulação foi dividida em duas vias: intrínseca (iniciada

por componentes presentes no espaço intravascular) e extrínseca (envolvendo não só os componentes do sangue, mas também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) que convergem na ativação do fator X, desencadeando a geração de trombina, que por proteólise converte o fibrinogênio solúvel em uma rede de fibrina insolúvel. Atualmente, aceita-se que tal separação é entendida como inadequada do ponto de vista fisiológico, tendo em vista que a divisão não ocorre *in vivo*^{9,13}.

A formação de um coágulo de fibrina atua em seguida, como um escudo temporário que protege a lesão vascular e oferece uma matriz provisória através da qual as células podem migrar durante o processo de inflamação. O coágulo também serve como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento que são fundamentais para iniciar o processo de cicatrização, proporcionando estímulos quimiotáticos para recrutar células inflamatórias circulantes para o local da lesão, iniciando a reepitelização e contração do tecido conjuntivo, e angiogênese^{7,8,11,14}.

Em contrapartida, o sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina é composto por diversas proteínas, que regulam a geração de plasmina, uma enzima ativa que tem por função degradar a fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular. A fibrinólise ocorre como processo altamente específico para a fibrina, cumprindo assim sua função de remover o excesso de fibrina do espaço intravascular de modo equilibrado, promovendo a dissolução do coágulo⁶.

2.2.1.2 Proteínas plasmáticas de fase aguda

A concentração total de proteínas no plasma é de aproximadamente 6,0 a 8,0 g/dL¹⁵. As proteínas plasmáticas são classificadas como proteínas de fase aguda quando apresentam sua síntese elevada, pelas células parenquimatosas do fígado, em resposta a estímulos que caracterizam uma agressão ou estresse ao organismo^{16,17}. A reação de fase aguda (RFA) é uma resposta inespecífica à inflamação ou lesões teciduais, na qual as proteínas de fase aguda positivas são representadas por alfa-1- antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína-ácida (AGA), haptoglobina (Hap), alfa-2-macroglobulina (AMG), ceruloplasmina (Cer), Fibrinogênio, C3, C4 e proteína C reativa (PCR)^{15,18,19}. O início da reação de fase aguda da inflamação geralmente é determinado pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais da região agredida. A liberação de mediadores, especialmente as citocinas, por estas células desencadeia

uma resposta no organismo quase que imediatamente, pelo aumento da síntese hepática destas proteínas, que, por sua vez, irão modular a coagulação sanguínea, a fibrinólise e a função das células do sistema imune. Os principais mediadores indutores da síntese aumentada das proteínas de fase aguda pelo fígado são a interleucina-1, interleucina-6 e o TNF. Entre as reações de fase aguda da inflamação observa-se: febre, neutrofilia, alteração do metabolismo dos lipídios, diminuição do nível sanguíneo de ferro, aumento da glicogênese, aumento do catabolismo muscular e transferência de aminoácidos para o fígado, ativação do sistema complemento e da coagulação sanguínea, alterações hormonais, e síntese de proteínas próprias das reações de fase aguda, especialmente pelo fígado^{6,16}.

2.2.1.3 Cascata do sistema complemento

O sistema complemento é composto por mais de 25 proteínas diferentes, produzidas por diferentes tecidos e células, incluindo hepatócitos, macrófagos e células epiteliais do intestino. Estas proteínas que integram o sistema complemento estão inativas no sangue como parte do plasma em situações de normalidade. A ativação pode acontecer por uma variedade de agentes, e pode ser dividida em três vias – clássica, da lectina e alternativa (Diagrama 1). Todas as vias podem resultar na ativação de C5 e levarem à ativação da via de ataque à membrana (atividade lítica) e a produção de várias moléculas biologicamente ativas que contribuem para a imunidade inata e inflamação²⁰⁻²³.

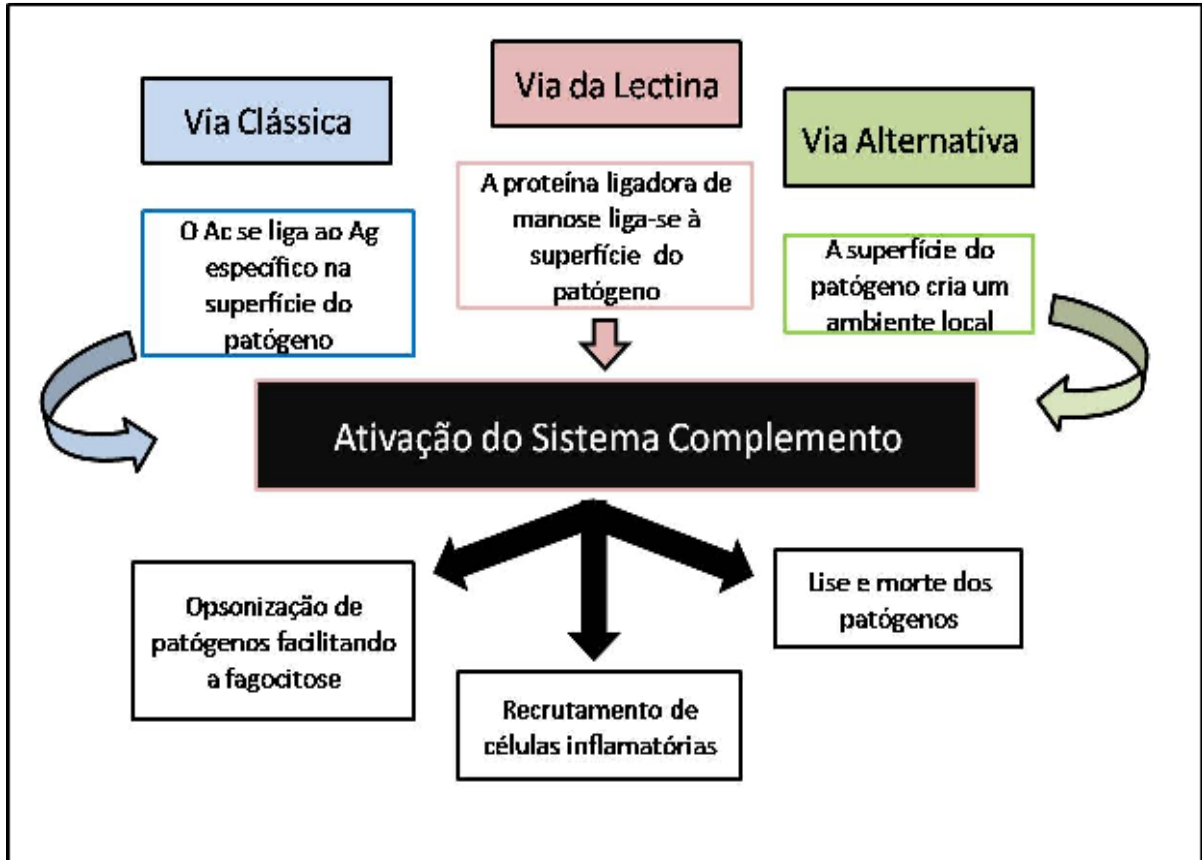


Diagrama 1: Vias de ativação do sistema complemento e suas respectivas funções biológicas.

A ativação do sistema complemento geralmente envolve a hidrólise de suas moléculas, resultando em dois fragmentos. Alguns fragmentos, como por exemplo, o C4a, C3a e C5a são solúveis e ficam livres no exsudato inflamatório onde medeiam fenômenos biológicos, atraindo e induzindo a movimentação dos leucócitos para o local agredido. As atividades biológicas do C5a são mais amplas que as do C3a, atuando como principal mediador quimiotático para os polimorfonucleares. Além disso, possui outras atividades como a de estimular a produção neutrofílica de leucotrienos B4 com prolongamento da permeabilidade vascular aumentada, a de mediar o aumento da permeabilidade vascular, induzir a desgranulação de mastócitos e também estimular a contração dos músculos lisos^{20,24,25}.

2.2.1.4 Cascata das cininas

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos com nove a onze aminoácidos, incluindo a bradicinina (BK), calidina, T-cinina e seus metabólitos ativos, as des-Arg-cininas. Esses peptídeos do sistema renina/caliceína são gerados a partir da ação das caliceínas sobre um precursor presente no plasma e nos tecidos, o cininogênio. A BK é gerada pela ação da caliceína do plasma sobre o cininogênio de alto peso molecular, ao passo que a calidina é

sintetizada pela hidrólise do cininogênio de baixo peso molecular pela calicreína tissular. Após a liberação, as cininas são rapidamente metabolizadas por um grupo diferente de peptidases^{26,27}. Existem diversas evidências indicando que as cininas são rapidamente geradas após a lesão tecidual e parecem modular a maioria dos eventos observados durante os processos inflamatórios, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração celular, dor e hiperalgesia. Além disso, participam da manutenção do processo inflamatório através de inúmeros efeitos sistêmicos, tais como o aumento na migração de leucócitos e a formação do edema tecidual^{28,29}.

A partir de uma a duas horas após a ocorrência da agressão, os receptores das células endoteliais ficam hipersensíveis à ação da histamina. A não substituição da histamina por outros mediadores implicaria involução do processo inflamatório, com graves prejuízos ao hospedeiro, principalmente no que se refere aos fenômenos vâsculo-exsudativos. A partir deste período de tempo, a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular são mediados pelas cininas. O exsudato inflamatório, a partir da ativação do cininogênio plasmático e tecidual, promove a manutenção dos fenômenos vaso-exsudativos, pela ação das cininas sobre as células endoteliais mantendo o aumento da permeabilidade vascular^{6,30}.

2.2.1.5 Citocinas

Entre os mediadores inflamatórios secretados estão as citocinas, capazes de interagir com receptores específicos de membranas celulares. Ao contrário dos hormônios endócrinos, as citocinas não são produzidas por glândulas especializadas e secretadas na circulação, mas são sintetizadas localmente por uma variedade de tecidos e células e possuem fundamental importância no processo de cicatrização, contribuindo para o recrutamento dos subtipos de leucócitos, regulação da epitelização, remodelamento tecidual e angiogênese (O quadro 1 descreve as funções de algumas das principais citocinas que participam do processo inflamatório)³¹⁻³³.

A IL-1 e o TNF são conhecidos como citocinas pró-inflamatórias, por induzirem a expressão de outras citocinas, como por exemplo a IL-2, e de mediadores que promovem a inflamação. Entretanto, sua principal importância na imunidade reside em sua capacidade de intensificar a ativação dos linfócitos T auxiliares por células apresentadoras de antígeno. Adicionalmente, promovem a diferenciação das células B, ativam neutrófilos, macrófagos e estimulam a

hematopoiese^{16,33,34}. São importantes indutores da resposta de fase aguda e estimulam a secreção do fator de liberação da corticotrofina, o qual ativa a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise, induzindo por sua vez, a produção de glicocorticóides pelas glândulas supra-renais²⁴.

A IL-6 proporciona efeitos sinérgicos com a IL-1 e o TNF, porém não induz a produção de qualquer outra citocina e possui efeito direto relativamente pequeno sobre as células imunes em concentrações fisiológicas. Alguns autores sugerem que sua principal função imunológica consiste em potencializar os efeitos de outras citocinas^{35,36}.

A IL-17, citocina produzida pelas células Th17 e pelos neutrófilos, é de fundamental importância na regulação da imunidade inata. Estudos *in vivo* indicam que esta é uma citocina potente ativadora de neutrófilos, além de ser também reguladora da expressão de quimiocinas. Adicionalmente, a IL-17 estimula a expressão de vários genes relacionados com a produção das proteínas de fase aguda³⁷⁻⁴⁰.

Citocina	Células Produtoras	Alvos e Efeitos
TNF	Macrófagos, Células dendríticas Células endoteliais	Vasos (indução da inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caqueixa; morte celular; ativação de neutrófilos
IL-1	Monócitos, Macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasos (indução da inflamação); hipotálamo (febre); fígado (indução de proteínas de fase aguda)
IL-2	Macrófagos, Células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1
IL-6 *	Macrófagos, Células endoteliais, fibroblastos	Fígado (indução de proteínas de fase aguda); promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação das células Treg
IFN- α	Macrófagos	Induz resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17
IL-2	Células T	Induz proliferação das células T e B, ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão de MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos
IL-5*	Células Th2	Promove diferenciação e ativação de eosinófilos
IL-4	Células Th2, mastócitos	Promove a diferenciação de células Th2 e mudança de classe de anticorpos para IgE
IL-17	Células Th17, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF
IL-10	Macrófagos, Células dendríticas, Linfócitos Treg	Inibe a proliferação de células Th1
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe a proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE e diferenciação de células Treg
Eritropoietina	Hepatócitos	Estimula a produção de eritrócitos
IL-11	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Estimula a produção de plaquetas
GM-CSF	Células Th1 e Th2, macrófagos e mastócitos	Estimula a produção de granulócitos e macrófagos, maturação e ativação de células dendríticas
G-CSF	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Estimula a produção de neutrófilos

Quadro 1: Principais Citocinas, seus alvos e efeitos biológicos.

Abreviações: IL, Interleucina; IFN, Interferon; TNF, fator de necrose tumoral; TGF, fator transformador de crescimento; G-CSF, fator estimulador de colônias granulocíticas; GM-CSF, fator estimulador de colônias de granulocíticas e de macrófagos; Th1, células T auxiliares tipo 1; Th2, células T auxiliares tipo 2; Th17, células T produtoras de IL-17; Treg, células T reguladoras; * IL-6 e IL-5, interleucina e interleucina 5, também consideradas citocinas hematopoiéticas. Adaptada de Goldsby et al.⁴¹

2.2.1.6 Quimiocinas

As quimiocinas são pequenos polipeptídeos (90-130 resíduos de aminoácidos) que fazem parte de um subgrupo de citocinas. As quimiocinas controlam a adesão, quimiotaxia e ativação de vários tipos de leucócitos e desempenham papel fundamental na resposta inflamatória, recrutando células inflamatórias para o local da lesão por quimiotaxia. Elas são divididas em quatro subfamílias baseadas nas suas propriedades estruturais e sua sequência primária de aminoácidos: CXC, CC, C ou CX3C (O quadro 2, representa as propriedades de algumas quimiocinas humanas descritas na literatura)^{12,16,42}.

Mais de 50 quimiocinas e pelo menos 15 receptores já foram descritos. A ação das quimiocinas é mediada por receptores transmembranais acoplados à proteína G. A maioria dos receptores se liga a mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um receptor. Após a ligação da quimiocina com seu receptor específico, ocorre a ativação de proteínas G, iniciando uma cascata de transdução de sinais que gera segundos mensageiros como AMPc (adenosina monofosfato cíclico), IP3 (inositol trifosfato) e cálcio. As vias de transdução de sinais ativadas pelas quimiocinas promovem a ativação de integrinas nos leucócitos, levando a adesão à parede do endotélio, geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina dos basófilos, e ativação de proteases de neutrófilos^{31,32,44}.

Quimiocinas	Células Quimioatraídas	Outras Atividades Biológicas
Subfamília C-X-C (α)		
IL-8	N,T,Mc,NK,Ec,Bs,Es,K,Ms	Estimula a desgranulação, adesão e efeitos microbicidas dos neutrófilos.
GRO-α	N,T,Mc, F	Angiogênese
GRO-β ENA 78 GPC-2 NAP-2	N	Ativa neutrófilos
PF-4	N, Ec, F	Antiangiogênica
Mig	T, Ec, F	Efeitos antiangiogênicos e antitumorais
IP-10	T, NK, Ec, M	Efeitos antiangiogênicos e antitumorais Desenvolvimento Cardíaco e das células B
SDF	N, T, B, M	Inibe competitivamente a entrada do HIV-1 nas células T
Subfamília C-C (β)		
MIP-1α	M, T, NK, Bs, Es, Ms, Dc, B	Ativa as células T e a adesão de β -integrina Suprime a formação de colônias mielóides
MIP-1β	M, T, NK, Dc	Ativa as células T e a adesão de β -integrina
MCP-1	M, T, NK, Bs, Ms, Dc	Ativa Macrófagos Ativa a desgranulação de Basófilos
MCP-2	M, T, Es, Ms	Ativa Macrófagos Ativa a desgranulação de Basófilos
MCP-3	M, T, Bs, Es, Dc, N	Ativa Macrófagos Ativa a desgranulação de Basófilos
RANTES	M, T, NK, Bs, Es, Ms, Dc	Ativa as células T e a adesão de β -integrina Ativa a desgranulação de Basófilos Efeitos antitumorais
I-309	M	Ativa macrófagos
Eotaxina	M, T, Es, N	Quimioatração dos eosinófilos

Quadro 2: Propriedades das quimiocinas humanas descritas na literatura.

Abreviações: IL=interleucina; GRO= peptídeo relacionado ao crescimento; ENA =atraente de neutrófilo derivado do epitélio; GCP= proteína quimiotática de granulócito; NAP= peptídeo ativador de neutrófilo; PF= fator plaquetário; Mig=monocina induzida por interferon gama;IP= proteína induzível por interferon γ ; SDF=fator derivado do estroma; HIV= vírus da imunodeficiência humana; MIP= proteína inflamatória de macrófagos; MCP= proteína quimioatraente de monócitos; RANTES= regulado por ativação, expresso e secretado por células T normal; N= neutrófilo; T= célula T; B= célula B; NK= célula natural kiler; Ec= célula endotelial; F= fibroblasto; M= monócito; Mc= célula de melanoma; Bs= basófilo; Ms= mastócito; Es= eosinófilo; DC= célula dendrítica; K= queratinócito. Adaptada de Stites *et al.*²⁴

2.2.1.7 Óxido Nítrico

Dentre os vários agentes produzidos pelas diversas células envolvidas na cicatrização, está o óxido nítrico (NO). Duas isoformas da enzima NO sintase (NOS), produzidas por diferentes genes nos neurônios (nNOS; NOS1) e pelas células endoteliais (eNOS; NOS3) são expressas para a produção de pequenas quantidades de NO, em resposta à inflamação. A maioria das células podem também produzir NO, pela indução da NOS (iNOS; NOS2), estimuladas por citocinas e/ou produtos bacterianos. A expressão inicial da iNOS chega ao pico 48hs após o início da lesão, o que sugere que esta enzima está predominantemente ativa durante a inflamação e como consequência dos efeitos primários promove vasodilatação, atividade antimicrobiana, efeito antiplaquetário e indução da permeabilidade vascular^{44,45}.

Algumas citocinas suprimem a expressão da iNOS, no intuito de favorecer a homeostasia. Por sua vez, o NO é também um modulador da produção de muitas citocinas. A IL-8 é estimulada pela presença de NO, assim como também modula TGF- β 1, o TNF, IL-1 e a IL-6⁴⁶⁻⁵⁰.

2.2.1.8 Derivados do Ácido Araquidônico

O ácido araquidônico é um ácido graxo de 20 carbonos com quatro dupla ligações, que pode ser liberado dos fosfolipídios da membrana através da ação seqüencial da fosfolipase C e diacilglicerol-lipase, ou através da ação direta da fosfolipase A2 sobre os fosfolipídios da membrana. Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela via da cicloxigenase ou da lipoxigenase, produzindo respectivamente as prostaglandinas e os leucotrienos, como metabólitos finais^{24,51}.

As prostaglandinas são pequenas moléculas lipídicas que regulam numerosos processos no organismo, incluindo a função renal, a agregação plaquetária, a liberação de neurotransmissores e a modulação da função imune. São produzidas a partir da degradação do ácido araquidônico pelas enzimas COX-1, COX-2 (Cyclooxygenase enzyme) em PGH₂, que por sua vez é o precursor da síntese de todas as prostaglandinas, como a PGI₂, TXA₂, PGF_{2 α} , PGD₂ e PGE₂. A COX-1 está presente na maioria dos tecidos e está mais relacionada aos processos homeostáticos, como por exemplo, a secreção das mucosas. Ao contrário, a COX-2 é uma enzima induzida por um estímulo externo, como nos processos inflamatórios e estímulos neoplásicos e representa uma enzima de fundamental importância na regulação da permeabilidade vascular, da febre e do fluxo sanguíneo^{51,52}. Recentemente foi descoberta a

COX-3, que em estudos animais revelaram um papel importante no mecanismo da dor e da febre, porém ainda não foi comprovada este mecanismo em humanos⁵³.

Durante a fase inicial da inflamação, a PGE₂ é a mais amplamente produzida e representa a principal causa do eritema observado na inflamação aguda⁵⁴. Muitas são as células do corpo que metabolizam o ácido araquidônico gerando prostaglandinas, a exemplo dos fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e alguns tipos de células malignas. Possui diversos efeitos na regulação das células T, principalmente nas células T CD4⁺, sendo um destes efeitos a diminuição da proliferação. Em relação às células TH1, a PGE₂ inibe drasticamente a produção de interferon γ (IFN γ) e IL-2, por estas células⁵².

Os quatro principais produtos da via da lipoxigenase são os leucotrienos LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Os leucotrienos induzem recrutamento de leucócitos, extravasamento de plasma, secreção de muco, relaxamento vascular, vasoconstrição e broncoconstrição em diferentes processos inflamatórios, infecciosos ou alérgicos⁵⁵. Além disso, os leucotrienos têm importante papel modulador na síntese e liberação de citocinas que participam das respostas imune inata e adquirida, da ativação celular e/ou produção de anticorpos⁵⁶. Também estes mediadores lipídicos modulam a fagocitose de microrganismos por células do sistema imune e são essenciais para a liberação de citocinas, como IL-2, IL-12, IFN γ , e também do óxido nítrico. Tratam-se dos principais metabólitos do ácido araquidônico liberados pelos mastócitos das mucosas. O LTB₄ é um importante agente quimiotático. O LTC₄, LTD₄ e LTE₄ são responsáveis pela reação de anafilaxia, promovendo contração do músculo liso, broncoconstrição, e secreção de muco nas vias aéreas, além de reação de pápula e eritema na pele^{24,57}.

2.2.1.9 Eixo Hipófise-adrenal e produção de cortisol endógeno

As glândulas suprarrenais situam-se nos pólos superiores de ambos os rins, sendo constituídas por duas partes distintas, a medula e o córtex. A medula suprarrenal localiza-se na parte central e secreta os hormônios epinefrina e norepinefrina enquanto o córtex secreta os corticosteróides. Os corticosteróides principais são os mineralocorticóides e os glicocorticóides, existindo, além destes, pequenas quantidades de hormônios sexuais, em particular os androgênicos. Os mineralocorticóides exercem efeitos principalmente sobre os eletrólitos dos líquidos extracelulares, em particular o sódio e o potássio. Aproximadamente

95% dos glicocorticóides, provém das secreções de cortisol, o qual desempenha importantes efeitos anti-inflamatórios frente a diferentes tipos de estresse, como por exemplo, traumatismos, infecções e intervenções cirúrgicas, além de ter um papel fundamental no controle da glicemia e no metabolismo das gorduras e das proteínas^{24,26}.

A secreção de cortisol é controlada quase que exclusivamente pelo hormônio corticotrópico (ACTH), também chamado de corticotropina, secretado pelo lobo anterior da hipófise o qual, por sua vez, é controlado pelo fator de liberação da corticotropina (CRF), secretado no plexo capilar principal do sistema porta-hipofisário. Algumas citocinas ativam o eixo hipófise-adrenal para a liberação de cortisol, entre estas estão incluídas a IL-1 β e IL-6. Os sistemas imune e neuroendócrino estão interligados como mecanismo de regulação recíproca. Após a exposição a citocinas inflamatórias o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) é estimulado a liberar o cortisol, que, por sua vez, irá regular a resposta imune^{58,59}.

É inquestionável o papel do glicocorticóide endógeno no desenvolvimento e manutenção da resposta imune e, conseqüentemente, sua influência na resposta inflamatória. A ativação do Hipotálamo-Pituitário-Adrenal (HPA) resulta na supressão de TNF. Estudos realizados em animais adrenalectomizados demonstraram uma correlação com o aumento das concentrações de TNF além de maior susceptibilidade a infecção bacteriana e à morte⁵⁹⁻⁶¹. Adicionalmente, a insuficiência do cortisol endógeno diminui a quimiotaxia celular e a liberação das enzimas mieloperoxidase e lisozima pelos macrófagos⁵⁹. Cavalcanti *et al.*(2001)⁶² mostraram que o glicocorticóide controla também fisiologicamente a adesão fraca dos neutrófilos, através da modulação das funções endoteliais, afetando sua aderência na parede dos vasos e dificultando a sua transmigração para o local da lesão.

2.2.2 Componentes celulares sanguíneos que participam da resposta inflamatória

2.2.2.1 Células polimorfonucleares

As células polimorfonucleares são representadas pelos neutrófilos, eosinófilos, e basófilos e constituem os agentes mais representativos das inflamações agudas. Os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue sendo as primeiras a serem recrutadas do fluxo sanguíneo para o local da inflamação. Sua diapedese inicia-se precocemente e constitui um evento essencial na resposta aguda do hospedeiro à invasão de agressores^{24,25}. A atividade dos neutrófilos é a fagocitose e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a

IL-17 e a IL-8. Outra propriedade funcional importante refere-se à “regurgitação enzimática”, ou seja, enquanto fagocita, libera também enzimas proteolíticas para o local ^{63,64}.

Os eosinófilos e os basófilos são participantes da inflamação muito especiais como nas respostas induzidas por agentes parasitários ou, no contexto de uma reação imunopatológica como a anafilaxia. Os eosinófilos representam apenas 1-5% dos polimorfonucleares circulantes no sangue, estão mais relacionados a reações de hipersensibilidade imediata. Já os basófilos representam menos de 1% das células circulantes no sangue e o seu papel ainda não foi totalmente esclarecido, embora acredite-se que como os outros leucócitos, participem da defesa do hospedeiro, atuando na resposta inflamatória contra parasitas e contribuindo na inflamação alérgica ^{6,25,65}.

2.2.2.2 Células monomorfonucleares

2.2.2.2.1 Linfócitos

A célula T é caracterizada pela presença do seu receptor de antígeno (TCR). Juntamente com a expressão do TCR, encontra-se a presença de um complexo de moléculas, denominado CD3. O complexo CD3 é formado por cinco diferentes cadeias de proteínas transmembranares e fica adjacente à cadeia alfa do TCR e está envolvido na transdução de sinais de ativação antígeno- específica ^{24,25}. Anticorpos monoclonais para CD3 podem ser usados também para identificar as células T, e usualmente este grupo de moléculas é chamado de “marcador de células T” ⁶⁵.

A população de células T é heterogênea tanto nas suas capacidades funcionais quanto nos fenótipos da superfície celular. De modo geral, as células T são divididas em células auxiliares, que promovem as respostas celulares e humorais, e células citotóxicas que matam as células-alvo que possuem antígenos. As células T auxiliares geralmente expressam CD4, enquanto que as células T citotóxicas expressam CD8 ^{25,66,67}.

As moléculas CD4 e CD8 são as principais moléculas co-receptoras acessórias na função da célula T. CD4 é uma glicoproteína transmembranar de 55KDa, expressa como um monômero, que possui um duplo papel na ativação da célula T: fornece forças adesivas entre as células que interagem e proporciona também um sinal acessório de ativação. Possui afinidade específica pela molécula da classe II do MHC (Complexo principal de histocompatibilidade),

desempenhando um papel crítico no desenvolvimento tímico das células T^{25,66-68}, além de ser um receptor celular para o vírus do HIV⁶⁷. O CD8 difere do CD4 por ser um dímero ligado por ponte dissulfeto de 32KDa. A molécula do CD8 é similar em função ao CD4, porém sua afinidade é específica para a molécula do MHC de classe I^{25,66,68}.

As células efectoras da linhagem T tendem a apresentar uma quantidade ligeiramente maior de citoplasma e cromatina mais frouxa do que as células correspondentes em repouso, mas não podem ser distinguidas com segurança no exame ao microscópio óptico. Entretanto, as células efectoras exibem vários tipos de proteínas de superfície, dentre elas o CD25, que não são encontradas nas células T em repouso⁶⁹.

Os linfócitos B representam 5-10% da população de linfócitos circulantes e são classicamente definidos pela presença de imunoglobulinas na membrana que atuam como receptores específicos de antígenos. Após o reconhecimento específico do antígeno, as células B ativadas diferenciam-se em células de memória e plasmócitos, que são células especializadas na produção de anticorpos (imunoglobulinas) específicos para o antígeno que ativou, previamente, a célula B^{24,25}.

2.2.2.2 Monócitos

São células não muito abundantes na circulação periférica, constituindo apenas 1-6% de todas as células sanguíneas nucleadas. São produzidos na medula óssea e liberados no sangue, onde circulam durante apenas um dia antes de se estabelecerem permanentemente em um tecido^{24,25}. Assim como os outros leucócitos, os monócitos circulantes no sangue podem ser atraídos para um local de lesão, através de um processo de adesão ao endotélio. Uma vez que estas células migram para os tecidos, passam a ser chamadas de macrófagos. Normalmente observa-se a predominância de macrófagos a partir do segundo dia após a lesão. Embora possam ser encontrados macrófagos residentes do próprio tecido, a maior parte dos macrófagos encontrados na ferida é proveniente do sangue. A emigração dos monócitos do sangue para a lesão é regulado pelo complexo CD11/CD18 e ICAMs (moléculas regulatórias do extravasamento primário de células polimorfonucleares) e adicionalmente pela integrina $\alpha 4\beta 1$ e pela molécula de adesão endotelial vascular^{24,25,63,64}.

2.2.3 Fotobiomodulação laser como agente capaz de modular o processo inflamatório

2.2.3.1 Propriedades físicas do laser

A utilização do laser na área de saúde surgiu como consequência natural de suas propriedades e se iniciou com o aproveitamento de seus efeitos térmicos. A palavra laser é um acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, que significa, amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação ⁷⁰. O laser é uma radiação eletromagnética não ionizante que se propaga em movimento ondulatório. As características que diferem a luz laser da luz “branca” de uma lâmpada são: monocromaticidade, colimação e coerência ⁷¹.

A monocromaticidade é a característica do laser de emitir uma radiação com uma linha espectral muito estreita, uma emissão de uma radiação com um comprimento de onda muito bem definido. Esta é a característica considerada como mais importante, pois determina quais moléculas absorverão a radiação e, portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos específicos. Cada comprimento de onda, portanto, terá um tipo diferente de interação segundo o tecido alvo ⁷².

A colimação refere-se ao alto grau de paralelismo do feixe laser, mantendo um pequeno tamanho do feixe em uma distância relativamente grande. O laser é considerado uma radiação coerente, pela sincronicidade das ondas da luz, podendo ser temporal, quando estas se encontram em fase; ou espacial, quando os fótons estão ajustados em planos espaciais paralelos entre si e, portanto, são assim mantidos em grandes distâncias ⁷³.

2.2.3.2 Diferentes protocolos de dosagem

Ao se utilizar os aparelhos de laser, deve-se escolher o comprimento de onda e ajustar alguns parâmetros como densidade de potência, densidade de energia e, para obter os efeitos fisiológicos desejados, esses parâmetros são ajustados de acordo com os objetivos esperados. O comprimento de onda emitido pelo meio laser representa a variável mais pertinente desta modalidade de luz, uma vez que determina o grau de absorvância do tecido irradiado. Esta variável define a profundidade de penetração no tecido alvo ⁷⁴. Existe uma janela óptica terapêutica entre 600 a 1300 nm, permitindo a penetração da radiação até níveis profundos ⁷⁵.

Ademais, a densidade de energia ou fluência se constitui um parâmetro também importante, pois, este determina a energia entregue ao tecido biológico, uma vez que a resposta fisiológica

é dose-dependente⁷⁶.

A densidade de potência ou irradiância é definida como sendo a potência óptica de saída do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm^2 . É através do controle da irradiância que se pode gerar fotobio-ativação ou fotobio-inibição com o laser de baixa potência. Este parâmetro é considerado o mais importante nos trabalhos em culturas de células⁷⁷.

É possível ter o controle sobre o tempo de aplicação. Multiplicando a irradiância pelo tempo de aplicação (em segundos), pode-se obter a fluência ou densidade de energia (DE) em J/cm^2 . A DE é o parâmetro que o clínico deve se ater, uma vez que este determina a quantidade de energia que o tecido está recebendo.

Este amplo espectro de variáveis dificulta as comparações entre os diversos estudos encontrados na literatura. A dosimetria ótima para a terapia com laser de baixa potência vem sendo gradativamente elucidada, mas ainda representa uma questão controversa⁷⁸. Lopes-Martins *et al.* (2005)⁷⁹ demonstraram que a dosimetria de $7,5 \text{ J}/\text{cm}^2$ parece ter um maior efeito na redução do processo inflamatório. Por outro lado alguns autores utilizaram em seus estudos, animais submetidos à dose de $4 \text{ J}/\text{cm}^2$ no tratamento de feridas cutâneas, obtendo resultados mais favoráveis^{2,80,81}.

2.2.3.3 Efeitos locais da fotobiomodulação

Acredita-se que a ação do laser de baixa potência sobre o tecido esteja relacionada à possibilidade desta terapia inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação. Uma característica peculiar da terapia fotobiomoduladora é a capacidade de melhorar e acelerar o processo de cicatrização, reduzir a dor e o edema^{82,83}. Muitos autores já demonstraram que estes benefícios são promovidos por uma série de fenômenos induzidos pelo laser, como por exemplo o aumento local do infiltrado de leucócitos, da atividade dos macrófagos, da neovascularização e da proliferação dos fibroblastos e queratinócitos. Além disso, estimula a regeneração epitelial minimizando as escaras e as infecções oportunistas. Os fatores de crescimento também são estimulados assim como também o aumento do número de miofibroblastos^{1,2,80,81,84,85}.

2.2.3.4 Efeitos sistêmicos da laserterapia

Apesar de muitos estudos com laser de baixa potência, com comprimento de onda situada entre 630nm – 690nm, como os já citados anteriormente, demonstrarem eficiência em cicatrização de feridas cutâneas, poucos estudos relatam os impactos sistêmicos provocados pelas terapias fotobiomoduladoras, e seus efeitos sobre as diferentes populações de células sanguíneas.

Gulsoy *et al.*(2006)⁸⁶ avaliaram, *in vitro*, o efeito do laser de He-Ne (632nm) sobre as células monomorfonucleares do sangue periférico observando um aumento da proliferação celular significativa, porém com ações de curta duração. Outros autores sugerem que a bioestimulação pode comprometer a estabilidade do sistema imune, podendo levar, em casos de uso prolongado, à imunossupressão, sensibilizando diferentemente as populações celulares, principalmente os linfócitos T, por representarem as células mais responsivas⁸⁷.

O aumento da temperatura da microcirculação da pele de pacientes portadores de microangiopatia, irradiados pelo laser de He-Ne (632.8nm) foi interpretado por Schindl *et al.*(2002)⁸⁸ como consequência do efeito sistêmico desta terapia. Mais recentemente, Albertini *et al.* (2007)⁸³ verificaram a diminuição da expressão de RNAm para a COX-2 após a terapia com laser de baixa potência em tecido subplantar de ratos submetidos ao modelo de inflamação aguda induzida por carragenina.

2.3 Considerações Finais

A terapia a laser de baixa potência (LBP) mostra-se capaz de interferir em distintos níveis celulares. Evidências clínicas têm mostrado a eficácia do laser em diferentes processos de indução da inflamação, aliviando a dor e reduzindo o edema. De fato, o laser parece estabilizar a resposta inflamatória e acelerar os eventos iniciais da inflamação, possibilitando o rápido estabelecimento dos fenômenos proliferativos no tecido.

No entanto, a literatura relata poucos dados sobre os efeitos sistêmicos da fotobiomodulação laser, principalmente no que se refere às células monomorfonucleares do sangue, sendo necessário o desenvolvimento de mais estudos nesta área. De fato, muito pouco se sabe sobre o mecanismo de ação sistêmica do LBP. Sua possível relação com a ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal e conseqüentemente com os níveis de cortisol endógeno que

atuam como anti-inflamatórios naturais urge ser investigada. Por esse motivo, é relevante a necessidade do conhecimento dos processos biológicos desencadeados pela inflamação e a possível interferência do laser nestes.

2.4 Abstract

MEDIATORS OF THE SYSTEMIC EFFECT OF INFLAMMATION: A REVIEW

Inflammation is a defense mechanism characterized as inherent of connective tissue. After an injury, the formation of the exudate occurs to maintain the vascular phenomena of this process and to act against the aggressor. The chemical mediators of the exudates are of great pharmacological and therapeutic importance and can be inhibited or stimulated, allowing the control of the signs and symptoms of inflammation. The present review aims to document and to describe the systemic effects triggered by the inflammatory process, contextualizing them in the wound healing process as well as confronting some studies that have reported local and systemic action of laser photobiomodulation in different experimental models. In fact, the laser seems to relieve the inflammatory response. However, the literature reports little data on the systemic effects of laser photobiomodulation, especially in relation to blood mononuclear cells, making the development of further studies in this area necessary.

Key words: Laser therapy, Low-Level. Inflammation Mediators. Blood Cells.

2.5 Referências Bibliográficas

1. Medrado ARAP, Soares AP, Santos E, Reis SRA, Andrade Z. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.* 2008, 92: 144-52.
2. Reis SRA, Medrado A, Marchionni AM, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670 nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomedicine & Laser Surgery.* 2008,26:305-10.
3. Pinheiro ALB, Pozza DH, Oliveira MG, Weissmann R, Ramalho LMP. Polarized Light(400-2000 nm) and Non-ablative Laser(685nm): A description of the Wound Healing Process using Immunohistochemical analysis. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2005, 23(5):485-92.
4. Barros FC, Antunesi AS, Figueiredo CMS, Fischer RG. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. *Rev. Ci. Méd. Biol.*2008, 7(1):85-89.
5. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Lopes-Martins PSL, Carvalho FAZ, Neto HCCF, Iversen VV, et al. Steroid Receptor Antagonist Mifepristone Inhibits the Anti-inflammatory Effects of Photoradiation. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2006, 24(2): 197-201.

6. Consolaro A. *Inflamação e Reparo*. 1 ed. Maringá: Dental Press Editora, 2009
7. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science* 2005;41(1):27-51.
8. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. *Clin Plastic Surg* 2003, 30:1-12.
9. Franco RF. *Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise*. Medicina, Ribeirão Preto, 2001, 34:229-37.
10. Laurens N, Koolwijk P, Maat MPM. Fibrin Estructure and Wound healing. *J Thromb Haemost* 2006, 4:932-9.
11. Siqueira C. *Fisiologia da Coagulação: artigo de revisão*. Rev SOCERJ XIV. 2001,1:15-20.
12. Slavin J. The Role of Cytokines in Wound Healing. *J Pathol* 1996,178:5-10.
13. Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: A modern view of hemostasis. *Hamatol Oncol Clin N Am* 2007,21:1-11.
14. Martin P. Wound Healing- Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997, 276:75-81.
15. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz: Fundamentos da Química Clínica*. 6 ed. São Paulo: Editora Elsevier, 2008.
16. Bilate AMB. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. *Temas de Reumatologia Clínica*.2007, 8(3):86-90.
17. Lehninguer AL, Cox N, Yarborough K. *Princípios de Bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2007.
18. Andriolo A, Costa RP, Novo NF. Pró-calcitonina e proteína C reativa em processos infecciosos graves. *J Bras Patol Med Lab*. 2004, 40(3):169-74.
19. Silva DGKC, Teodoro GM, Sena LV, Sousa M,Rezende AA. Eletrophoretic profile of plasmatic proteins: study in children assisted at the pediatric hospital – HOSPED/UFRN in Natal city.*RBAC* 2005, 37(4):239-42.
20. Carrol MC. Complement and humoral immunity. *Vaccine* 2008,265:128-133.
21. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mollecula Immunology* 2004, 41:1089-98.
22. Nonaka M, Yoshizaki F. Evolution of the complement system. *Molecular Immunology* 2004, 40:897-902.

23. Iturri-Yamamoto GR, Portinho CP. Sistema Complemento: Ativação, Regulação e Deficiências Congênitas e Adquiridas. *Rev Ass Méd Brasil* 2001, 47(1):41-51
24. Stites D, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2001.
25. Peakman M, Vergani D. *Imunologia Básica e Clínica*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999.
26. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed. São Paulo:Editora Elsevier, 2006.
27. Schulze-Topphoff U, Prat A, Bader M, Zipp F, Aktas O. Roles of the kallikrein/kinin system in the adaptative immune system. *International immunopharmacology* 2008, 8:155-160.
28. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Biorregulation of Kinins:kalikreins,kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992,44(1):1-80.
29. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes FS, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 2004,143(7):803-18.
30. La Cadena RA, Laskin KJ, Pixely RA, Sartor RB, Scwab JH, Back N, et al. Role of kallikrein-kinin system in pathogenesis of bacterial cell wall-induced inflammation. *Am J Physiol* 1991,9:267-4.
31. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *Journal of leukocyte Biology* 2001,69:513-520.
32. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines:Key players in Innate and Adaptative Immunity. *J Invest Dermatol*, 2005, 125:615-628.
33. Werner S, Grose R. Regulation of Wound healing by growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev* 2003,83:835-870.
34. Baker EA, El-Gaddal S,Williams L, Leaper DJ. Profiles of inflammatory cytokines following colorectal surgery: Relationships with wound healing and outcome. *Wound Rep Reg*. 2006, 14:566-72.
35. Stevens CD. *Clinical Immunology and Serology: A laboratory Perspective*. 2 ed. Philadelphia:F.A.DAVIS COMPANY; 2003.
36. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Science* 1997, 6:929-955.
37. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and sinaling. *Cytokine*. 2008, 43:402-07.

38. Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunological Rev.* 2008, 226:80-86.
39. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Rev.* 2008, 226:57-79.
40. Lemos HP, Grespan R, Vieira SM, Cunha TM, Verri, Jr. WA, Fernandes KSS, et al. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. *PNAS.* 2009, 106:5954-59.
41. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology.* W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2000. 4 ed. 670p.
42. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. *TRENDS in immunology.* 2004, 25:201-09.
43. Viola A, Contento RL, Molon B. T cells and their partners; the chemokine dating agency. *TRENDS in immunology.* 2006, 27(9):421-27.
44. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric Oxide and wound repair: role of cytokines?. *Nitric Oxide.* 2002, 7:1-10.
45. Rawlingson A. Nitric Oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns.* 2003,29:631-640.
46. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric Oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide.* 2009,21:157-63.
47. Vodovotz Y, Geiser AG, Chesler L, Latterio JJ, Campbell A, Lucia MS, et al. Spontaneously increased production of nitric oxide and aberrant expression of the inducible nitric oxide synthase in vivo in the transforming growth factor- β 1 null mouse. *J. Exp. Med.* 1996,183:2337-42.
48. Eigler A, Moeller J, Endress S. Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264.7. *J Immunol.* 1995, 154: 4048-54.
49. Hill JR, Corbett JA, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML. Nitric oxide regulates interleukin 1 bioactivity released from murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 1996,271:22672-78.
50. Opal SM, De Palo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 2000, 111:1167-72.
51. Lee JL, Mukhtar H, Bickers DR, Kopelovich L, Athar M. Cyclooxygenases in the skin; pharmacological and toxicological implications. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2003,192:294-06.
52. Harris SG, Phipps RP. The nuclear receptor PPAR- γ is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR- γ agonist induce apoptosis. *Eur. J. immunol.* 2001,31:1098:1105.

53. Dinchuck JE, Liu RQ, Trzaskos JM. COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol. Lett.* 2003;86:121.
54. Kapoor M, Clarkson AN, Sutherland BA, Appleton I. The role of antioxidants in models of inflammation: emphasis on L-arginine and arachidonic acid metabolism. *Inflammopharmacology.* 2005;12(5-6):505-19.
55. Gásquez MC. Acido araquidônico y radicales libres: su relación con El proceso inflamatório. *Rev Cubana Invest Bioméd.* 1995, 14(1).
56. Feltenmark S, Gautam N, Brunnstrom A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, et al. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008, 105(2):680-5.
57. Belanger C, Elimam H, Lefebvre J, borgeat P, Marleau S. Involvement of endogenous leukotriene B4 and platelet-activating factor in polymorphonuclear leucocyte recruitment to dermal inflammatory sites in rats. *Immunology.* 2008;124(3):295-303.
58. Ruzek MC, Pearce BD, Miller AH, Biron CA. Endogenous Glucocorticoids Protect Against Cytokine-Mediated Lethality during Viral Infection. *The Journal of Immunology.* 1999;162:3527-33.
59. Bishayi B, Ghosh S. Immunobiological changes of in vivo glucocorticoid depleted male Swiss albino rats. *Immunobiology.* 2007; 212:19-27.
60. Guerra-Lopes ES, Caldeira JC, Santos CD, Toldo MPA, Faccioli LH, Sá-Nunes A, et al. *Trypanosoma cruzi*: Effects of adrenalectomy during the acute phase of experimental infection. 2008;120:10-14.
61. Papasian CJ, Qureshi N, Morrison DC. Endogenous and Exogenous Glucocorticoids in Experimental Enterococcal Infection. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2006;13(3):349-355.
62. Cavalcanti DMH, Lotufo CMC, Borelli P, Ferreira ZS, Markus RP, Farsky SHP. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *British Journal of Pharmacology.* 2007;152:1291-1300.
63. Eming AS, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007;127:514-25.
64. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery* 2004, 187:11S-16S.
65. Stevens CD. *Clinical Immunology and Serology: A laboratory Perspective.* 2 ed. Philadelphia:F.A.DAVIS COMPANY; 2003.

66. Leahy DJ. A structural view of CD4 and CD8. *The FASEB Journal* 1995;9:17-25.
67. Romagnani S. Th1/Th2 Cells. *Inflammatory Bowel Diseases*. 1999;5(4):285-294.
68. Davis AP, Corless DJ, Aspinall R, Wastell C. Effect of CD4+ and CD8+ cell in wound healing. *British Journal of Surgery* 2001;88:298-304.
69. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 2003;4(4):330-36.
70. Túner RJ, Holde L. *Low Level Laser Therapy. Clinical Practice and Scientific Background*. Prima Books: Suécia, 1999.
71. Schawlow AL. *Principle of Laser*. *J Clin Laser Med. Surgery* 1995,13(3).
72. Posten W, Wone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. *Low-Level laser therapy*, 2005.
73. Lucas C, Criens-Poublon LJ, Cockrell CT, Haan RJ. Would Healing in cell studies and animal model by experiments by low level laser therapy; Were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers Med Sci* 2002,17:110-134.
74. Fuller AT. *Fundamental of lasers in sugery and medicine*. IN:Dixon JA.*Surgical applications of lasers*. Chicago: Year Book medical Publishers,1983:11.
75. Brugnera Jr.A, Pinheiro AL. *Laser na Odontologia Moderna*, São Paulo: Pancast, 1998.
76. Basford JR. *Low-intensity laser therapy: controversies and new research findings*. *Lasers Surg Med* 1989;9:1-5.
77. Karu T. *The science of low power laser therapy*. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.
78. Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter D. *Low-Level Laser Therapy Facilities Superficial Wound Healing in Humans: a Triple-Blind, Sham-Controlled Study*. *J Athl Train* 2004;39:223-29.
79. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Lopes Martins PSL, Bjordal JM, Neto HCCF. *Spontaneous Effects off Low-Level Laser Therapy (650nm) in Acute Inflammatory mouse Pleurisy Induced By Carrageenan*. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005;23(4)2005.
80. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. *Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts*. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003;32:239-244.
81. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. *The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers*. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):307-13.

82. Martin P. Wound Healing- Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997, 276:75-81.
83. Albertini R, Aimbire F, Villaverde AB, Silva Jr. JA, Costa MS. Cox-2 mRNA expression decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. *Inflamm. Res.* 2007;56:228-229.
84. Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Stefan Mozes DVM, Frantisek Longauer MD. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery* 2006;24(4):480-88.
85. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Expression of Growth Factors in Early Wound Healing in Rat Skin. *Lasers in Surgery and Medicine* 1994;15:281-289.
86. Gulsoy M, Ozer GH, Bozkulak O, Tabakoglu HO, Aktas E, Deniz G, et al. The biological effects of 632.8nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2006;82:199-202.
87. Novoselova EG, Glushkova OV, Cherenkov DA, Chudnovsky VM, Fesenko EE. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2006;22:33-38.
88. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on Skin Microcirculation in Patients with Diabetic Microangiopathy. *Microvascular Research* 2002;64:240-246.

3. Manuscrito II

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO SISTÊMICO DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM MODELO EXPERIMENTAL.

[Objetivos] Avaliar quantitativamente as subpopulações de linfócitos T, no sangue periférico de ratos submetidos ou não à adrenalectomia e tratados com laser de baixa potência. [Materiais e Métodos] 54 ratos foram divididos em três grupos. Grupo I (GI): 24 animais não adrenalectomizados; Grupo II (GII): 24 animais adrenalectomizados. Cada um dos grupos GI e GII foram ainda divididos em dois subgrupos: Subgrupo irradiado: 12 animais com feridas cutâneas irradiadas com o Laser de GaAlAs (670 nm, 9mW, 4J/cm²) e Subgrupo controle: 12 animais com feridas cutâneas não irradiadas. Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos de seis animais cada, os quais foram mortos 24hs e 72hs após o ferimento cutâneo. O grupo III (GIII) compreendeu 6 animais, não submetidos a intervenção. A coleta sanguínea foi realizada, utilizou-se marcadores anti CD4, CD8, CD3 e CD25, para a contagem de células T e suas subpopulações através da citometria de fluxo. Testes estatísticos paramétricos ANOVA e T-Student foram utilizados, com o nível de significância $p < 0,05$. [Resultados] Não foram encontradas diferenças estatisticamente significante na contagem de células T entre os subgrupos irradiados e controle, tanto em GI como em GII. No subgrupo controle, no tempo de 72hs, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) para a contagem dos linfócitos totais e a subpopulação TCD4. Na comparação entre os animais irradiados com glândula e sem glândula, observou-se diferença estatística apenas no grupo de 24hs ($p < 0,05$), na contagem dos linfócitos totais e na subpopulação TCD8. [Conclusão] Os níveis de células T no sangue periférico não se alteraram significativamente com a fotobiomodulação laser local de ferimentos cutâneos na dosimetria estudada. A presença ou ausência da glândula adrenal pouco interferiu na contagem das células T.

Palavras Chave: Terapia a Laser de Baixa Intensidade. Sistêmico. Linfócitos T. CD4. CD8.

3.1 Introdução

A terapia com laser de baixa potência é uma modalidade terapêutica que foi primordialmente introduzida por Mester e colaboradores, os quais notaram uma melhora na cicatrização de feridas com a aplicação do laser de rubi¹. Desde então vários lasers com diferentes comprimentos de onda, potência e densidades de energia têm sido utilizados na área de saúde com finalidades terapêuticas.

Estudos com os lasers terapêuticos, a exemplo do laser de arseneto de gálio e alumínio, demonstraram que esta terapia exerce um efeito fotobiológico e acelera o processo de cicatrização²⁻⁶. O processo de cicatrização tecidual envolve inúmeros eventos biológicos locais como alterações vasculares e celulares, proliferação epitelial e fibroblástica, síntese de colágeno, elastina, proteoglicanos, revascularização e contração de ferida. Tem sido sugerido na literatura que o laser de baixa potência pode modular estes processos que se desenrolam durante o reparo tecidual. GÁL *et al.*(2006)⁷ verificaram que a fotobiomodulação com laser diminuiu a fase inflamatória assim como também acelerou a fase proliferativa do reparo, estimulando a regeneração da epiderme lesada e a fibrogênese no músculo estriado. Ainda com ênfase nos efeitos locais da terapia fotobiomoduladora, Medrado *et al.*(2008)⁸, comprovaram que o laser de baixa potência reduziu a reação inflamatória, induzindo o aumento da deposição de colágeno e uma maior proliferação dos miofibroblastos em modelo experimental de ferida cutânea.

Com relação aos efeitos sistêmicos oriundos da fotobiomodulação laser, Albertini *et al.*(2004)⁹ sugeriram que o laser estimularia as glândulas suprarrenais a produzirem cortisol endógeno, o qual auxilia na atenuação do processo inflamatório. De fato, sabe-se que a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal desencadeada por lesões de natureza diversa aumenta os níveis de glicocorticóides circulantes, podendo modular os eventos locais e sistêmicos observados durante a cicatrização de ferimentos.

A literatura contempla poucos estudos que relatem os efeitos sistêmicos do laser. Em particular, existe uma escassez de estudos científicos que caracterizem a possível ação indireta desta terapia sobre as diferentes populações celulares sanguíneas. Sendo assim, o presente estudo objetiva investigar a ação sistêmica do laser de baixa potência na presença e na ausência das glândulas adrenais em ratos albinos Wistar e verificar a sua influência sobre a

população de células monomorfonucleares no sangue destes animais.

3.2 Metodologia

Todos os procedimentos de manipulação animal adotados neste trabalho foram realizados de acordo com as normas e diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, aprovados através do parecer número 015/2009 (Anexo).

3.2.1 Animais

Quarenta e cinco ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 200 gramas, foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e dieta balanceada. Estes animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais. O grupo I e o grupo II contendo vinte e quatro ratos cada, e o grupo III com 6 ratos. Em cada grupo, uma nova divisão aleatória foi realizada, resultando em quatro subgrupos compostos de seis animais conforme a ilustração do Diagrama 2.

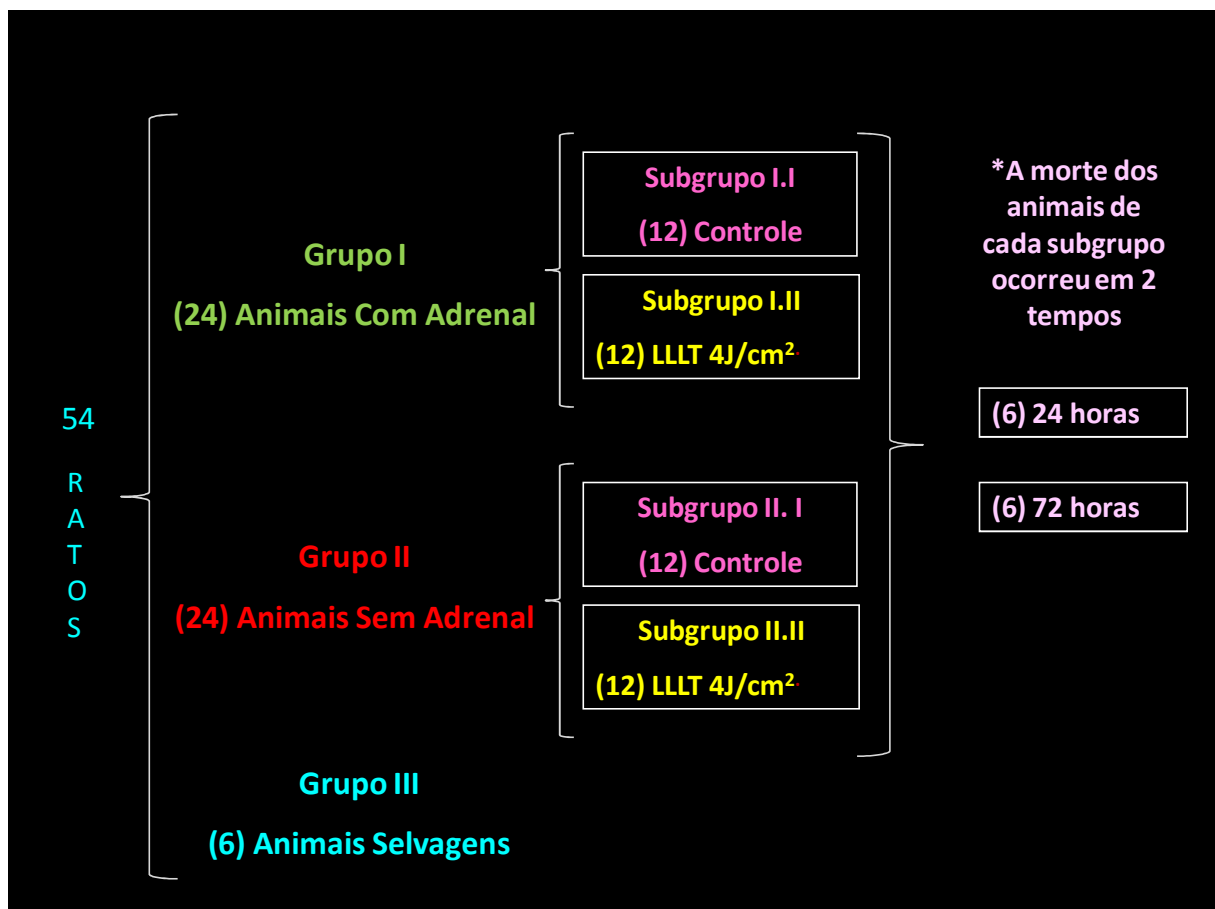


Diagrama 2: Ilustração do delineamento experimental com seus grupos e respectivos subgrupos

3.2.2 Grupos experimentais

Grupo I – *Animais com adrenal preservada*: Os animais deste grupo foram submetidos à intervenção cirúrgica, mimetizando a adrenalectomia, porém a glândula adrenal foi preservada. Após três dias foi realizada uma nova intervenção, para a realização da ferida cutânea circular dorsal, em um local mais superior às incisões feitas anteriormente. Este grupo experimental foi constituído por dois subgrupos de doze animais, sendo que seis animais de cada subgrupo foram mortos 24 horas após a ferida cutânea e os outros seis foram mortos 72 horas após a ferida cutânea.

Subgrupo I.I *Controle*. Os animais foram submetidos ao contato da ponteira laser, desligada, sobre a ferida a fim de simular o mesmo estresse dos animais do grupo laser.

Subgrupo I.II *Laser*. Os ferimentos cutâneos dos animais deste subgrupo receberam a terapia fotobiomoduladora.

Grupo II – *Animais sem a adrenal*. Os animais deste grupo foram submetidos à intervenção cirúrgica para remoção da glândula adrenal de acordo com protocolo estabelecido no Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. A ferida circular padronizada, no dorso do rato foi realizada três dias após a adrenalectomia, seguindo o mesmo padrão do Grupo I. Este grupo experimental foi constituído por dois subgrupos:

Subgrupo II.I *Controle*. Obedecendo as mesmas especificações do Subgrupo I.I do Grupo I.

Subgrupo II.II *Laser*. Obedecendo as mesmas especificações do Subgrupo I.II do Grupo I.

Grupo III – *Animais selvagens*. A fim de ser observado os valores basais da contagem de células sanguíneas destes animais, este grupo foi composto por seis animais, os quais não passaram por nenhuma modalidade de procedimento cirúrgico, nem foram submetidos a nenhum estímulo de estresse. Este grupo esteve condicionado sob as mesmas condições dos grupos anteriores, no mesmo ambiente, em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimentação.

Aplicação do Laser

O aparelho utilizado foi um diodo semiconductor de GaAlAs, emissão contínua (9mW, 670nm, 0,031W/cm²) área de saída do raio de 0,28cm² (Laser VR-KC-610 – Dentoflex, Brasil). Os animais foram mortos 24 e 72 horas após a cirurgia cutânea. Para os animais mortos com 24 horas, foi aplicado o laser descrito utilizando-se uma dose total de 4 J/cm² em 4 aplicações pontuais de 1 J/cm² (124 segundos) correspondentes aos vértices diametrais da ferida circular, de forma que o laser atingisse o tecido sadio e o leito da ferida (Figura 1-3). A aplicação do laser ocorreu imediatamente após a realização da ferida cutânea. Os animais mortos com 72 horas receberam uma dose total de 8 J/cm², sendo este procedimento realizado imediatamente após a cirurgia cutânea (4J/cm², 124 segundos) e em 48 horas pós-operatórias (4J/cm², 124 segundos), perfazendo um tempo total de 248 segundos.

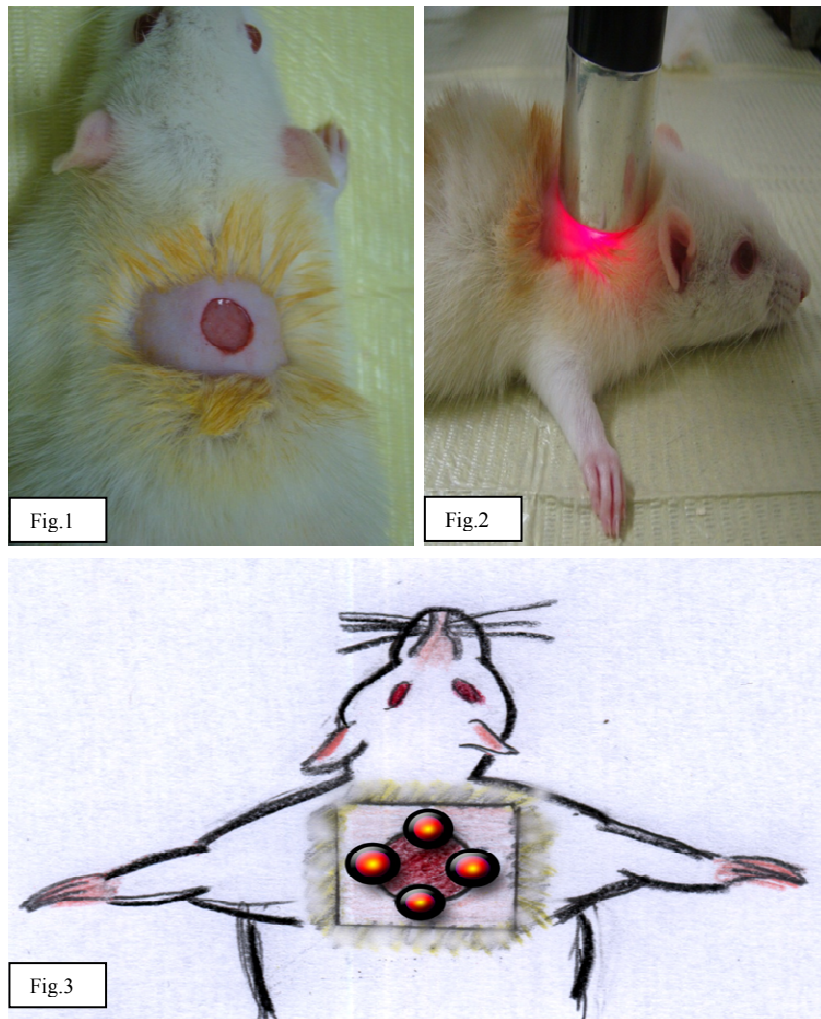


Figura 1: Ferida cutânea padronizada/ Figura 2: Aplicação do Laser em um dos pontos/ Figura 3: Pontos de aplicação do laser na ferida cutânea, 4 extremidades.

3.2.3 Procedimentos cirúrgicos

3.2.3.1 Remoção da Glândula Adrenal

Sob anestesia com solução anestésica resultante da associação de quetamina 5% (2,5 ml) (Vetanarcol – Konig – lote 007 07, Brasil) e xilazina 2% (0,5 ml) (Sedomin – Konig – lote 002 08, Brasil) diluídas em solução salina (1,0 ml) na proporção de 0,2 ml da solução para cada 100g de peso dos animais por via intra peritoneal. Foi realizada a tricotomia no dorso dos ratos e, em condições assépticas duas incisões paralelas medindo 3 cm cada, na região de dorso inferior para acesso aos rins. Os tecidos subcutâneos e muscular foram divulsionados para visualização das adrenais. Em seguida, procedeu-se a remoção das glândulas (Figuras 4-7).

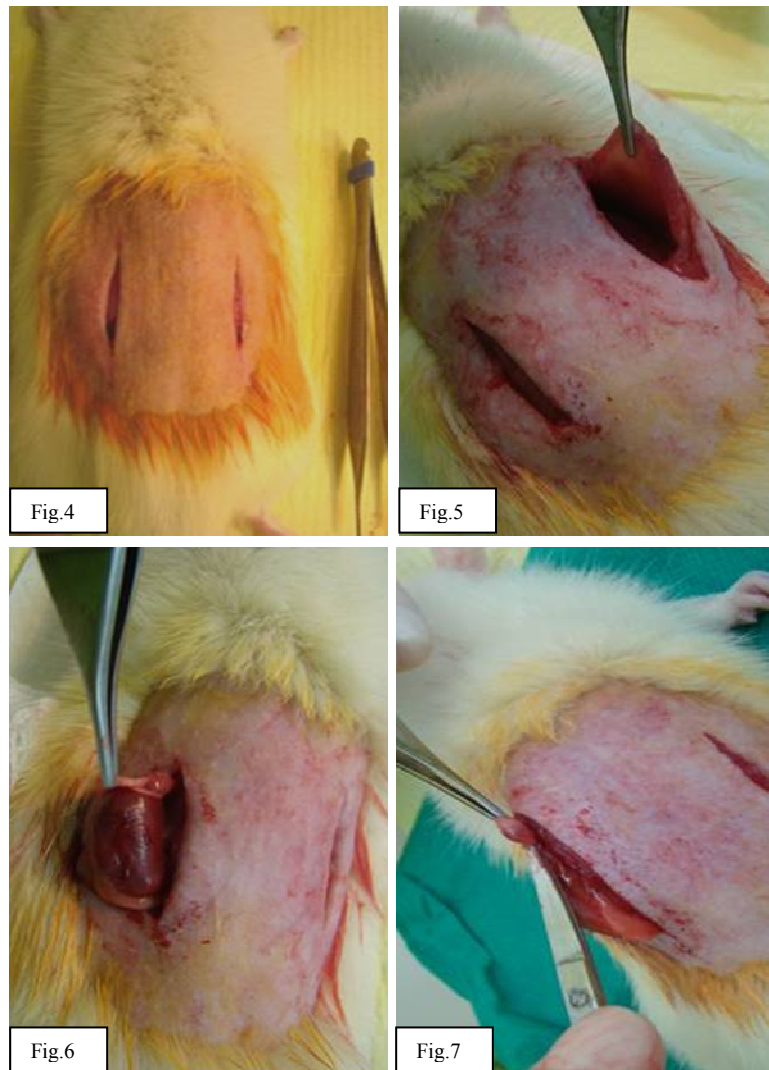


Figura 4: Tricotomia e Incisão / Figura 5: Divulsão tec. Muscular e cutâneo / Figura 6: Localização da glândula adrenal / Figura 7: Adrenalectomia propriamente dita.

3.2.3.2 Ferida Cutânea

Sob sedação com solução anestésica especificada no item anterior, foi realizada a tricotomia no dorso dos ratos na região mais superior, próxima a área cervical e, em condições assépticas foi realizada uma ferida circular no tecido cutâneo.

O instrumento cirúrgico para a realização desta ferida padronizada, foi um bisturi circular (punch) de 6 mm de diâmetro (Stiefel Tabe, São Paulo, Brasil). O punch foi posicionado perpendicularmente ao tecido previamente tricotomizado e movimentos circulares foram realizados para facilitar a penetração do instrumento, não ultrapassando a profundidade de 1mm (Figura 1).

3.2.3.3 Coleta Sanguínea e Morte dos Animais

Os animais foram anestesiados para a realização da coleta sanguínea. Uma incisão na região ventral que se estendeu do peritônio até à região torácica, na linha média, foi realizada após a tricotomia da região ventral, sob condições assépticas. Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba foi feito um corte no osso externo, para a abertura da caixa torácica. A punção sanguínea foi realizada na região do ventrículo direito, com uma seringa descartável esteril de 3ml, marca BD[®](Curitiba, Brasil), contendo 50µL de EDTA à 10%. Foi removido no total 2ml de sangue de cada animal (Figuras 8 e 9). Os animais foram mortos por anestesia profunda posterior à coleta sanguínea.



Fig.8:Incisão e abertura ventral /Fig.9:Coleta sanguínea

3.2.4 Citometria de Fluxo:

Foram utilizados 50 μL do sangue total coletado previamente para a realização da citometria de fluxo. Os anticorpos anti CD4, CD8, CD3 e CD25 foram adicionados ao sangue homogeneizados mecanicamente e incubados por 30 minutos a 4⁰C. Foram acrescentados solução de lise e PBS (pH 7,4) à mistura precedendo a agitação mecânica. Em seguida foi realizada nova incubação por mais 10 minutos a 4⁰C. O material foi submetido à centrifugação (1000 rpm, 5 seg, 4⁰C), com descarte do sobrenadante. Logo após, foi acrescentado 1 ml de solução de PBS+BSA+Azida e nova centrifugação. A leitura automatizada pelo citômetro foi realizado no mesmo dia do preparo, após o acréscimo de 200 μL de solução PBS+/Azida à mistura. A concentração de linfócitos no sangue foi calculada através dos resultados obtidos após a leitura automatizada do citômetro de fluxo.

3.2.5 Análise Estatística

Após a coleta de dados foi elaborada uma planilha em Excel e os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes paramétricos ANOVA e Teste-T para determinar as diferenças entre os grupos. O nível de significância estatística considerado foi $p < 0,05$.

3.3 Resultados

3.3.1 Grupo de Animais com Glândula Adrenal Preservada: Terapia Laser X Controle

A) Contagem de Células T realizadas 24hs após a cirurgia cutânea

As contagens de linfócitos TCD4 realizadas neste período evidenciaram um discreto aumento no número destas células no grupo Laser, embora não tenha sido observada significância estatística ($p > 0,05$). No que diz respeito à população de linfócitos TCD8, os resultados demonstraram uma tendência semelhante (Gráfico 1).

A contagem total dos linfócitos foi maior no grupo submetido à fotobiomodulação laser, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

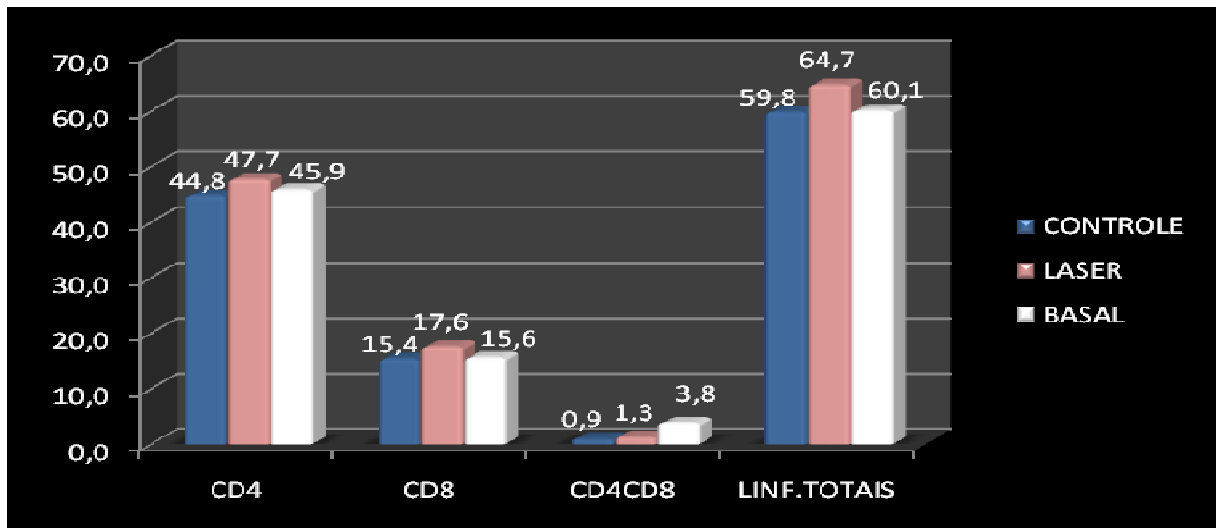


Gráfico 1: Contagem de Células T realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal preservada. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS.: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B.

B) Contagem de Células T realizada 72hs após a cirurgia cutânea

Neste período do estudo foi observado que os números de linfócitos TCD4, TCD8 e linfócitos totais, apresentaram uma discreta diminuição no grupo de animais tratados com a laserterapia, quando comparados aos valores descritos no grupo controle (Gráfico 2).

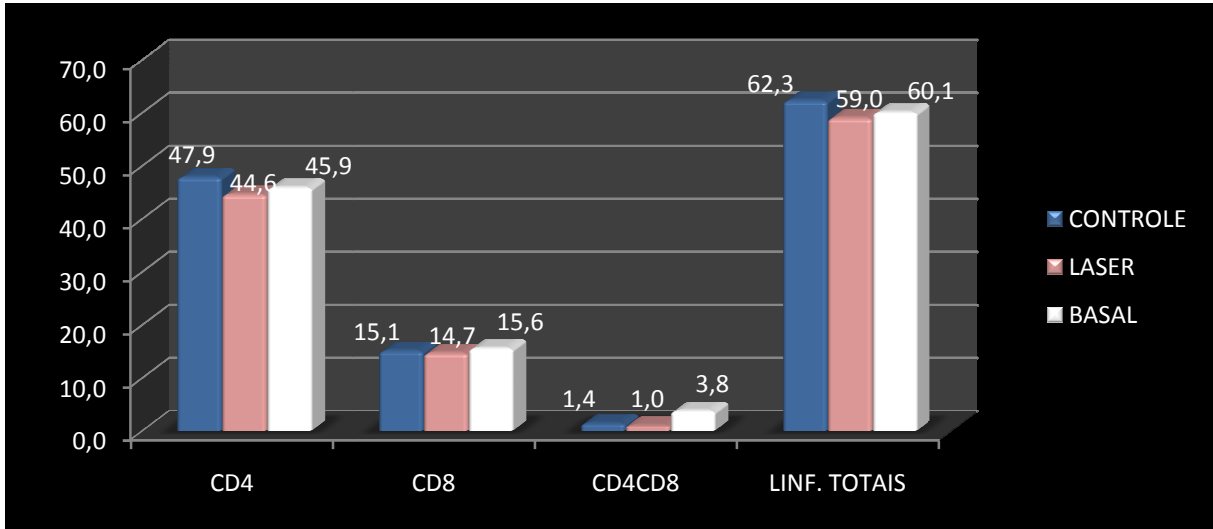


Gráfico 2: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal preservada. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B.

3.3.2 Grupo de Animais com Glândula Adrenal Removida: Terapia Laser X Controle

A) Contagem de células T realizada 24hs após a cirurgia cutânea

O número de células TCD4 apresentou-se maior no sangue dos animais submetidos à laserterapia em comparação ao seu respectivo controle não irradiados. Em contrapartida, as contagens numéricas de células TCD8 evidenciaram um discreto decréscimo ($p > 0,05$) (Gráfico 3).

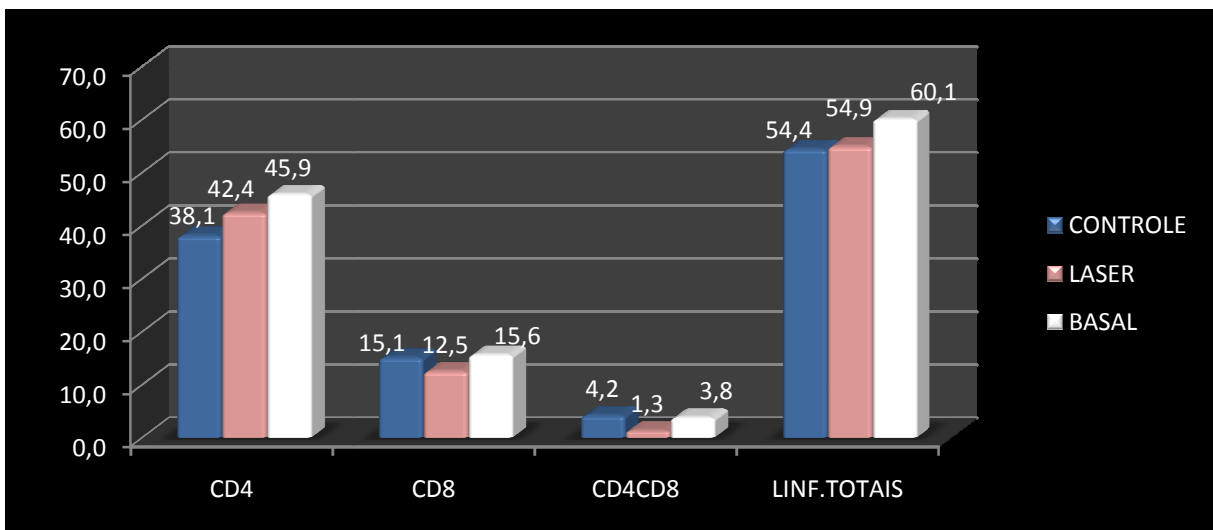


Gráfico 3: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal removida. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B.

B) Contagem de células T realizada 72hs após a cirurgia cutânea

O grupo de animais que recebeu a fotobiomodulação laser demonstrou um aumento do número de células em todos os tipos celulares, com exceção do CD4CD8 que mantiveram-se mais baixos neste mesmo grupo experimental, quando comparado ao controle. As diferenças não foram estatisticamente significativas (Gráfico 4).

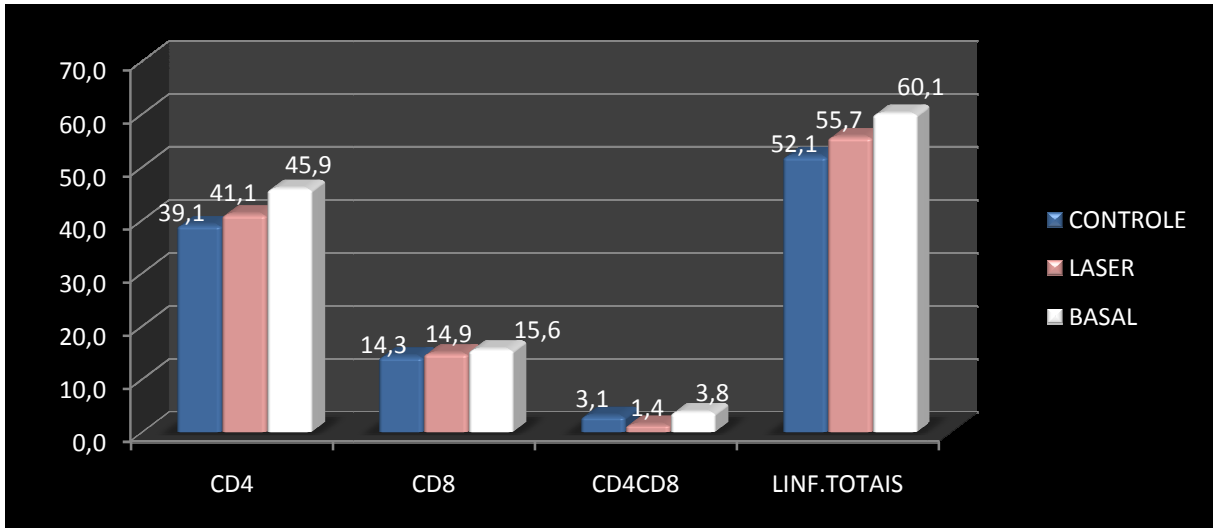


Gráfico 4: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais com a glândula adrenal removida. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS.: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B.

3.3.3 Grupo de Animais submetidos à adrenalectomia X Grupo de animais não adrenalectomizados do grupo controle

A) Contagem de células T realizada 24hs após a cirurgia cutânea

Nos animais com a glândula preservada, neste período, houve um aumento do número de células TCD4, TCD8, assim como também na contagem dos linfócitos totais, sendo que o aumento mais significativo foi observado em relação aos LTCD4. Por outro lado, a contagem de células duplamente marcadas, CD4CD8, demonstrou uma tendência a aumento nos animais adrenalectomizados, embora sem significância estatística (Gráfico 5).

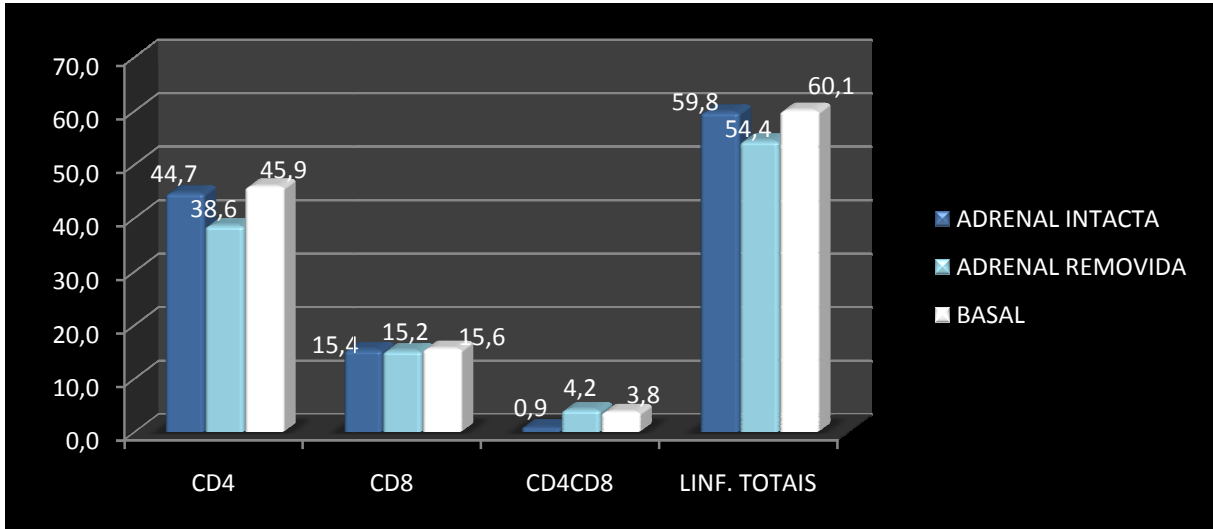


Gráfico 5: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo controle, não irradiados, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B.

B) Contagem de Células T realizada 72hs após a cirurgia cutânea

Os animais com a glândula preservada apresentaram uma contagem maior de células TCD4 e linfócitos totais, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). O mesmo achado foi encontrado na população de células TCD8, porém sem relevância estatística ($p > 0,05$). Com relação às populações TCD4CD8, foi percebido um discreto aumento nos animais adrenalectomizados ($p > 0,05$) (Gráfico 6).

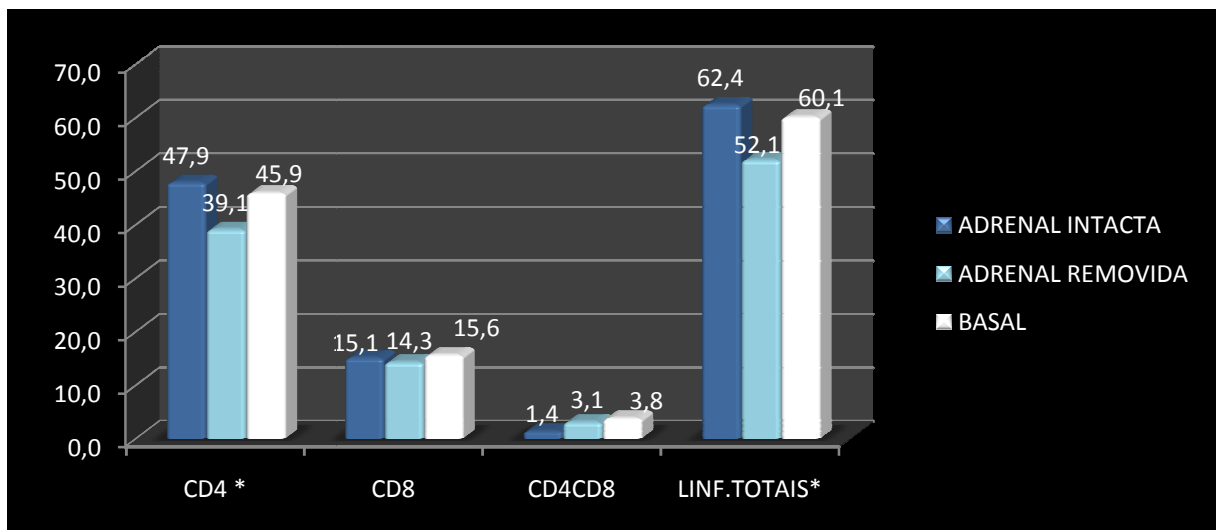


Gráfico 6: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo controle, não irradiados, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B. (*) Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

3.3.4 Grupo de Animais submetidos à adrenalectomia X Grupo de animais não adrenalectomizados irradiados

A) Contagem de células T realizada 24hs após a cirurgia cutânea

O grupo de animais submetido à laserterapia com a glândula adrenal preservada, apresentou um aumento significativo das células TCD8 e linfócitos totais ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo de animais irradiados sem a glândula. A população de linfócitos TCD4 foi discretamente menor nos animais irradiados com a glândula removida ($p > 0,05$) (Gráfico 7).

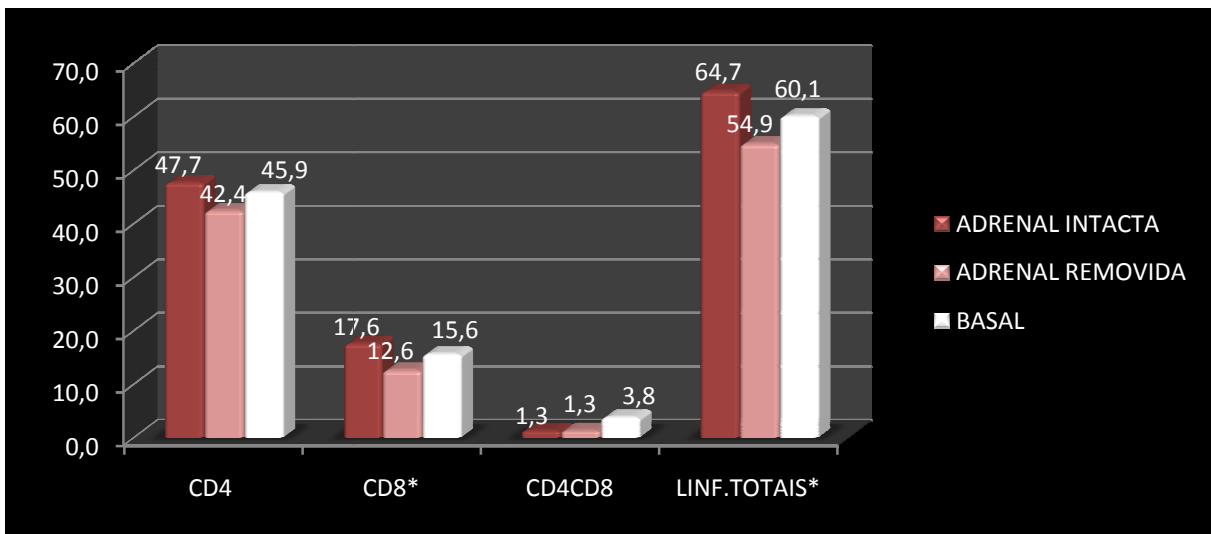


Gráfico 7: Contagem de Células realizadas 24hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo laser, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente; LINF.TOTAIS: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B. (*) Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

B) Contagem de células T realizada 72hs após a cirurgia cutânea

Os animais adrenalectomizados tratados com a laserterapia apresentaram menores números na contagem celular em geral, com exceção dos linfócitos TCD8, que permaneceram equivalentes e os linfócitos duplamente positivos (CD4CD8) quando comparados aos animais com a glândula intacta ($p > 0,05$) (Gráfico 8).

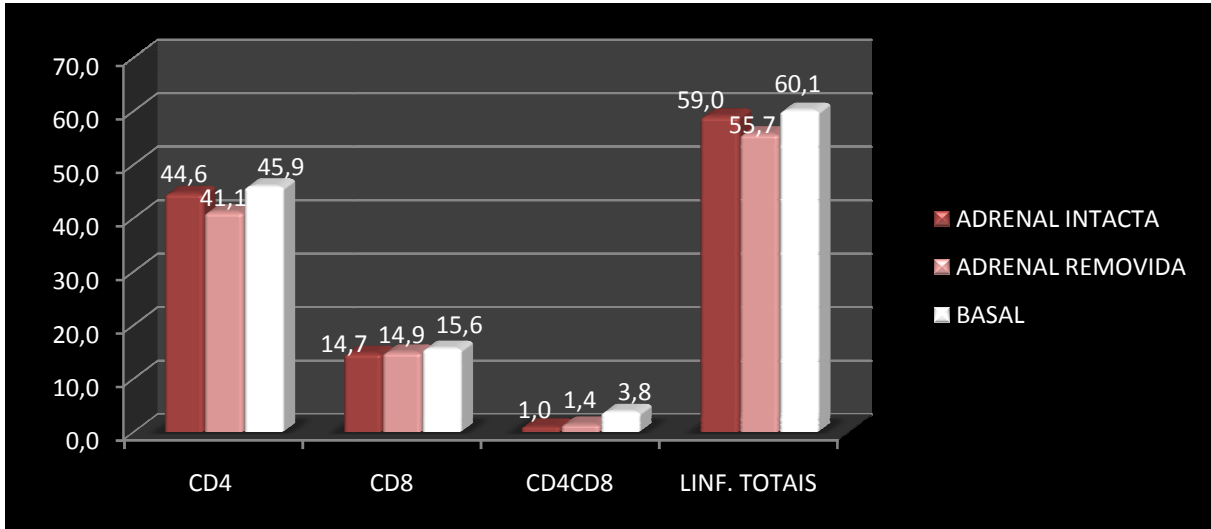


Gráfico 8: Contagem de Células realizadas 72hs após a cirurgia cutânea dos animais do grupo laser, com a glândula adrenal removida X glândula adrenal intacta. CD4: Linfócitos TCD4; CD8: Linfócitos TCD8; CD4CD8: Linfócitos T duplamente positivos, ou seja, ao CD4 e ao CD8 simultaneamente LINF.TOTAIS: população total de linfócitos, incluindo os TCD4, TCD8 e linfócitos B.

3.4 Discussão

Um considerável número de estudos tem demonstrado que os sistemas imune e neuroendócrino estão interligados através de mecanismos que possibilitam uma regulação recíproca¹⁰⁻¹⁴. A glândula suprarrenal é constituída por duas partes distintas, a medula e o córtex. A medula está relacionada ao sistema nervoso simpático, sendo responsável pela secreção das catecolaminas, ao passo que as células presentes na região cortical secretam os hormônios esteroidais e os mineralocorticóides. A zona fasciculada do córtex adrenal é a principal camada responsável pela produção do cortisol endógeno do organismo. O cortisol atua como anti-inflamatório natural e em doses mais elevadas suprime o sistema imune, determinando acentuada redução da produção dos linfócitos, especialmente os linfócitos T^{15,16}.

Os linfócitos são células responsáveis pela imunidade específica, capazes de serem sensibilizados por uma grande variedade de antígenos. Representam 20-30% dos leucócitos circulantes no sangue periférico. As células T, principalmente a subpopulação TCD4 são consideradas as maiores produtoras de citocinas^{17,18}. Durante os processos de infecção e cicatrização de feridas, estas células são transferidas para os tecidos, através da circulação sanguínea a tornam-se ativadas. Neste caso, elas regulam a resposta imune. Segundo o estudo de Rappl *et al.*¹⁹, os linfócitos influenciam na proliferação dos fibroblastos, células de fundamental importância na cicatrização de feridas cutâneas. No presente estudo, a contagem

dos linfócitos dos animais adrenalectomizados foi comparada àquela observada nos animais com a glândula preservada em dois tempos, a saber, 24hs e 72hs. Os animais sacrificados no período de 24hs e 72hs após o ferimento cutâneo, passaram 4 e 6 dias respectivamente, sem a presença da glândula supra-adrenal. No período de 24horas após a ferida cutânea, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Por outro lado, no tempo de 72hs, observou-se diferença estatística na contagem de linfócitos totais e na subpopulação dos linfócitos TCD4, onde os animais adrenalectomizados apresentaram as menores médias, quando comparados aos animais com a glândula preservada.

Com relação à diferença estatística encontrada no tempo de 72horas, observamos que a modificação ocorreu nos animais que apresentaram a glândula preservada, pois a média dos linfócitos dos animais adrenalectomizados praticamente não foi alterada com o tempo. Embora os níveis plasmáticos de cortisol endógeno não tenham sido aferidos neste estudo, o aumento encontrado na população de linfócitos totais e na subpopulação de células TCD4 no tempo de 72hs dos animais com glândula preservada sugere que o nível de cortisol plasmático talvez não tenha sido suficiente para induzir a migração das células para os tecidos ou levar a morte celular programada das células T, fato este que justificaria o aumento da contagem destas células na circulação sanguínea.

Ao analisarmos as médias dos valores basais celulares, ou seja, dos animais que não foram submetidos a nenhum tipo de intervenção cirúrgica, verificamos que os valores encontrados são muito próximos dos valores observados nos animais dos grupos experimentais. Estes dados mostram que os procedimentos cirúrgicos de remoção da glândula e o ferimento cutâneo, não foram capazes de modificar a contagem de células T no sangue periférico significativamente. Existem alguns estudos que relatam a possível síntese de cortisol endógeno por tecidos extra-adrenais como, por exemplo, o cérebro²⁰, células intestinais²¹ e o coração²². Freel *et al.*²³ avaliaram a síntese de cortisol endógeno, em 10 pacientes submetidos à adrenalectomia bilateral. Após 3 dias de suspensão da reposição hormonal, foram coletadas as amostras de urina para a dosagem dos níveis de cortisol. Os dados demonstraram que o cortisol produzido usualmente pelo córtex adrenal, puderam ser detectados nos pacientes que foram submetidos à adrenalectomia. Desta forma, os autores sugeriram que a síntese de cortisol pode estar ligada a outros tecidos extra-adrenais.

O timo é o principal órgão linfóide onde ocorre o desenvolvimento das células T. Embora a sua regressão ocorra com a idade, sendo virtualmente ausente nos indivíduos após a puberdade, algum desenvolvimento de célula T continua a ocorrer durante a vida adulta²⁴. Existem muitas controvérsias a respeito da produção de cortisol pelos timócitos com o objetivo de manter a homeostasia tímica, quando os níveis de glicocortisol produzido pela glândula adrenal encontram-se baixos, em animais adrenalectomizados. Alguns autores descreveram que após a adrenalectomia existe um aumento considerável do número de timócitos²⁵⁻²⁷. Além disso, Johnson *et al.*²⁸ verificaram a expressão de MCR2 (melanocortin receptor type 2) nos timócitos. O MCR2 é um receptor específico para ACTH na glândula adrenal, que desencadeia as sinalizações necessárias para a produção do cortisol endógeno. Por outro lado, Pruett *et al.*²⁹ avaliaram o efeito da adrenalectomia, na população de células tímicas e concluíram que o glicocorticóide derivado do timo é insuficiente para manter a homeostasia normal tímica em ratos adultos, o que corrobora com os achados de Qiao *et al.*³⁰. Sendo assim, os resultados observados no presente estudo indicaram fortemente que outras vias de produção do cortisol podem ter sido ativadas, numa tentativa de suprir a carência deste hormônio nos animais adrenalectomizados.

As células T duplamente positivas (DP), TCD4+CD8+ encontradas no sangue, são células imaturas que não completaram a total diferenciação no timo. Embora os dados não tenham demonstrado diferenças estatisticamente significantes entre os animais adrenalectomizados e os não-adrenalectomizados, os dados revelam que a média das células DP dos animais adrenalectomizados, permaneceram muito próximas aos valores basais. Estes resultados nos levam a crer que os timócitos podem de fato compensar a ausência da glândula adrenal, produzindo cortisol endógeno e mantendo a homeostasia tímica.

Há cerca de 40 anos, a fotobiomodulação laser tem sido objeto de estudo no meio científico. Atualmente são indiscutíveis seus efeitos benéficos no processo de cicatrização e reparo de ferimentos cutâneos, através das suas inúmeras propriedades bioestimuladoras que atuam localmente³¹. A dosimetria empregada nos estudos com o laser de baixa potência varia de 0,2 - 30J/cm². Estudos mais recentes utilizando a dosimetria de 4J/cm², tem demonstrado que esta dosagem é suficiente para exibir resultados expressivos na melhora da cicatrização de feridas, estimulando o aumento da síntese de colágeno e das fibras elásticas, melhorando sua organização, redução da formação de edema e do infiltrado inflamatório, acelerando o

processo de reparo^{8,32-36}. Além dos efeitos locais, alguns autores sugerem que os possíveis efeitos sistêmicos provocados pelo laser atuam como coadjuvantes no processo de cicatrização^{9,37,38}. No entanto, estes estudos não avaliaram os níveis sanguíneos de componentes característicos da resposta sistêmica inflamatória, como por exemplo, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, células polimorfonucleares e monomorfonucleares.

No presente estudo, os animais que tiveram os ferimentos cutâneos irradiados com o laser diodo semiconductor de GaAlAs (670nm nas dosimetrias de 4J/cm² e 8J/cm²), não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na contagem das populações de linfócitos, quando comparado com seus respectivos grupos controles. Porém, foi observado que o grupo irradiado apresentou um discreto aumento dos linfócitos CD4, CD8 e totais, quando comparado ao grupo controle, no grupo com a glândula adrenal preservada, em especial no período de 24 horas. Essa tendência também foi ratificada no grupo de animais adrenalectomizados. A amostra utilizada neste estudo, previamente adotada por vários outros pesquisadores, limitou a análise estatística. Provavelmente amostras maiores poderiam confirmar a tendência do laser em estimular as populações de linfócitos, mesmo na ausência das glândulas adrenais.

Rodrigo *et al.*³⁷, avaliaram os efeitos sistêmicos do laser de GaAlAs (830nm, 20J/cm²), em um modelo experimental em ratos, nos quais foram realizados três ferimentos cutâneos na lombar de cada animal e apenas o primeiro ferimento foi irradiado. Em seguida, foi realizada análise através de cortes histológicos dos três ferimentos, no intuito de verificar a possível melhora dos ferimentos não irradiados pela ação sistêmica do laser. A melhora das feridas não irradiadas, quando comparadas ao grupo controle, levaram os autores a concluir que o laser possui efeito sistêmico no processo de reparo e cicatrização de feridas cutâneas. Embora este estudo tenha sugerido uma possível modulação sistêmica, seus dados não podem ser comparados com nossos resultados, uma vez que neste estudo não foi realizada nenhum tipo de avaliação das contagens de células no sangue, nem tampouco sobre os níveis de cortisol ou quaisquer outros hormônios no plasma. Outras pesquisa demonstrou forte evidência da ação sistêmica do laser. Schindl *et al.*³⁹ avaliaram os efeitos sistêmicos da terapia laser de HeNe(632,8nm, 30J/cm²) em úlceras e gangrenas de pacientes diabéticos e os dados mostraram que houve uma melhora significativa da microcirculação local.

Com relação à ação do laser sobre a população de células monomorfonucleares, Gulsoy *et al.*⁴⁰, realizaram um estudo *in vitro*, no qual culturas destas células foram irradiadas em doses fracionadas, utilizando o laser de HeNe (632,8nm, com dosimetria de 2,55J/cm², 5,10J/cm² e 7,64J/cm²). Os resultados demonstraram um significativo aumento na proliferação destes tipos celulares. Similarmente Stadler *et al.*⁴¹, demonstraram um aumento da proliferação das culturas de linfócitos irradiados pelo laser de baixa potência (660nm) *in vitro*. Levando-se em consideração os diferentes modelos experimentais utilizados, torna-se difícil qualquer tipo de analogia aos resultados encontrados na presente pesquisa.

Os mecanismos de ação do laser de baixa potência ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns autores afirmam que uma das possibilidades do mecanismo de ação do laser de baixa potência está relacionada ao efeito modulador dose-dependente no metabolismo dos fibroblastos e na deposição de colágeno^{42,43}. Uma segunda hipótese foi levantada por Sakurai *et al.*⁴⁴, na qual o laser reduz o processo inflamatório através da redução dos níveis de PGE-2 e da inibição da cicloxigenase 2 (COX-2) em culturas celulares. Albertini *et al.*⁹, utilizaram um modelo experimental, no qual foi induzido um edema na pata de ratos pela infiltração de carragenina, em animais adrenalectomizados. O laser de GaAlAs (650nm, 2,5J/cm²) foi utilizado com a finalidade de verificar os efeitos antiinflamatórios na ausência da glândula supra-renal. Os autores verificaram que a terapia fotobiomoduladora não desenvolveu uma resposta antiinflamatória eficiente nos animais adrenalectomizados e sugeriram que os efeitos benéficos do laser estão relacionados à integridade da glândula adrenal. Desta forma, o mecanismo de ação do laser proposto por estes autores, está diretamente relacionado à estimulação indireta da glândula na produção do cortisol endógeno, e este por sua vez atuaria de forma sistêmica reduzindo o edema local.

Ao realizarmos a comparação da contagem de células, do grupo de animais com glândula preservada que receberam a laserterapia com o grupo de animais adrenalectomizados irradiados, verificou-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) na contagem de linfócitos totais e no subgrupo dos linfócitos TCD8, no tempo de 24hs. Os menores valores encontrados corresponderam aos animais adrenalectomizados. Estes dados sugerem que a ausência da glândula adrenal pode influenciar nos efeitos fotobiomoduladores do laser de baixa potência, sobre as populações de células T no sangue. Como não foi feita a dosagem dos níveis de cortisol endógeno, outros estudos precisam ser elaborados para que se possa esclarecer o

papel da glândula adrenal no mecanismo de ação do laser de baixa potência.

3.5 Conclusões

Diante dos dados descritos neste estudo, pode-se concluir que o laser de GaAlAs (632nm), na dosimetria de $4\text{J}/\text{cm}^2$, não interferiu significativamente na contagem das células T, independentemente da presença ou ausência da glândula adrenal.

A presença da glândula adrenal pode influenciar a resposta anti-inflamatória exercida pelas terapias fotobiomoduladoras, porém os mecanismos de ação ainda encontram-se pouco esclarecidos, necessitando de mais estudos sobre a ação do laser nos sistemas imune e neuroendócrino.

3.6 Abstract

EVALUATION OF THE SYSTEMIC EFFECT OF LASER PHOTOBIMODULATION IN EXPERIMENTAL MODEL.

[OBJECTIVES] To quantify the subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood of mice treated or not treated with adrenalectomy and with low power laser. [Methods] 54 rats were divided into three groups. Group I (GI): 24 non-adrenalectomized animals, Group II (GII): 24 adrenalectomized animals. Each of the groups GI and GII were also divided into two subgroups: Laser-irradiated Subgroup: 12 animals with skin wounds irradiated with GaAlAs laser (670 nm, 9 MW, $4\text{J}/\text{cm}^2$) and the Control Subgroup: 12 animals with non-irradiated wounds. Each group was divided into two subgroups of six animals each, which were killed 24 hours and 72 hours after skin injury. Group III (GIII): 6 animals, that had not been subjected to intervention. The blood samples were collected and anti-CD4, CD8, CD25 and CD3 markers were used for T-cell count and its subpopulations by flow cytometry. The ANOVA Parametric statistical tests and the T-Student test were used, with the significance level $p < 0.05$. [Results] No differences in T-cell count were found between the laser-irradiated and the control subgroups, both GI and GII. In the control subgroup statistic differences were noticed after the 72-hour time ($p < 0.05$) for counts of total lymphocytes and the CD4 subpopulation. In the comparison between the irradiated animals with no gland and with an intact gland, there was a statistical difference only in the 24-hour group ($p < 0.05$), considering the count of total lymphocytes and the CD8 subpopulation. [Conclusion] The levels of T cells in peripheral blood do not change with the local laser photobiomodulation within the studied dosimetry. The presence or absence of the adrenal gland barely interferes with the T cell count.

.Key Words: Laser therapy, Low-level. Systemic. T-Lymphocyte. CD4. CD8.

3.7 Referências Bibliográficas

1. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*, 1971; 122:532-5.
2. Brosseau L, Welch V, Tugwell P, Bier R, Gam A, Harman K, et al. Low level laser therapy of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A metaanalysis. *Journal of Rheumatology*, 2000;27(8):1961-69.
3. Gur A, Cosut A, Sarac AJ. Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers Surg Med*, 2003;33:330-38.
4. Aimbire F, Bjordal JM, Inversen VV, Albertini R, Frigo L, Pacheco MT, et al. Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. *Lasers Surg Med*, 2006;38(8):773-78.
5. Dourado DM, Favero S, Baranauskas V, Da Cruz-Hofling MA. Effects of the Ga-As laser irradiation on myonecrosis caused by Bothrops moojeni snake venom. *Lasers Surg Med*, 2003;33(5):352-57.
6. Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol*, 2001;187(1):73-80.
7. Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S, Longauer F, et al. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2006;24(4):480-88.
8. Medrado ARAP, Soares AP, Santos E, Reis SRA, Andrade Z. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*. 2008, 92: 144-52.
9. Abertini R, Aimbire FSC, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminium-arsenate (Ga-Al-As) laser irradiation (650nm) on carragenan induced rat paw oedema. *J Photochem Photobiol B*, 2004;74:101-07.
10. Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous Systems. *Nat. Immunol*, 2004;5:575–581.
11. Butts CL, Sternberg EM. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell. Immunol*, 2008;252:7–15.

12. Taub DD. Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cellular Immunology*,2008;252:1-6.
13. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity, *Annu. Rev. Immunol*,2002;20:125–163.
14. Bishay B, Ghosh S. Immunobiological changes of in vivo glucocorticoid depleted male Swiss albino rats. *Immunobiology*,2007;212:19-27.
15. Jannete I, Marketon W, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology*,2008;252:16-26.
16. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed. São Paulo:Editora Elsevier, 2006.
17. Schaffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *British Journal of Surgery*. 1998,85:444-60
18. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cells subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in Immunology*.1997,9:87-92.
19. Rappl G, Kapsokefalou A, Heuser C, Röbler M, Ugurel S, Tilgen W, et al. Dermal fibroblasts sustain proliferation activated T cells via membrane-bound interleukine-15 upon long-term stimulation with tumor necrosis factor- α . *The Journal of Investigative Dermatology*. 2001,116(1):102-09.
20. Stoffel-Wagner B. Neurosteroids biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann NY Acad Sci*,2003;1007:64-78.
21. Cima I, Corazza N, Divk B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med*,2004;200:1635-46.
22. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mousas C, Moalic JM, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*,1998;273:4883-91.
23. Freel EM, Bernhard M, Ingram R, Wallace AM, Fraser R, Davies E, et al. Endogenous corticosteroid biosynthesis in subjects after bilateral adrenalectomy. *Clinical Endocrinology*,2007;66:659-65.
24. Stites D, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2001.
25. Padgett EL, Sibley DA, Jerrells TR. Effect of adrenalectomy on ethanol-associated changes in lymphocyte cell numbers and subpopulations in Thymus, spleen, and gut-associated lymphoid tissues. *International Journal of Immunopharmacology*,2000;22:285-298.
26. Jondal M, Pazirandeh A, Okret S. A role for glucocorticoids in the thymus? *Trends Immunol*, 2001;22:185-186

27. Pazirandeh A, Jondal M, Okret S. Conditional expression of a glucocorticoid receptor transgene in thymocytes reveals a role for thymic-derived glucocorticoids in thymopoiesis in vivo. *Endocrinology*,2009;146(6):2501-07.
28. Johnson EW, Hughes Jr TK, Smith EM. ACTH receptor distribution and modulation among murine mononuclear leukocyte populations. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2001;15:156-162.
29. Pruett SB, Padgett EL. Thymus-derived glucocorticoids are insufficient for normal thymus homeostasis in the adult mouse. *BMC Immunol*,2004;5:24
30. Qiao S, Okret S, Jondal M. Thymocytes-Synthesized Glucocorticoids Play a Role in Thymocyte Homeostasis and Are Down-Regulated by Adrenocorticotrophic Hormone. *Endocrinology*,2009;150(9):4163-69.
31. Martin R. Laser-accelerated inflammation/pain reduction and healing. *Practical Pain Management*. 2003,nov/dec:20-25.
32. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):307-13.
33. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2003;32:239-244.
34. Reis SRA, Medrado A, Marchionni AM, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670 nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomedicine & Laser Surgery*. 2008,26:305-10.
35. Gonçalves WLS, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JGP, et al. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.2007,40:877-84.
36. Markovic A, Todorovic LJ. Effectiveness of dexamethasone and low-power laser in minimizing oedema after third molar surgery:a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007,36:226-29
37. Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JBB, et al. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomedicine and Laser Surgery*.2009,27(6):929-35.
38. Lopes-Martins RAB, Albertini R, Lopes Martins PSL, Bjordal JM, Neto HCCF. Spontaneous Effects off Low-Level Laser Therapy (650nm) in Acute Inflammatory mouse Pleurisy Induced By Carrageenan. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005;23(4)2005.

39. Schindl A, Heinze G, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Systemic effects of low-intensity laser irradiation on Skin Microcirculation in Patients with Diabetic Microangiopathy. *Microvascular Research* 2002;64:240-246.
40. Gulsoy M, Ozer GH, Bozkulak O, Tabakoglu HO, Aktas E, Deniz G, et al. The biological effects of 632.8nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2006;82:199-202
41. Stadler I, Evans R, Kolb B, Naim JO, Narayan V, Buehner N, et al. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. *Lasers Surg Med.*2000, 27:255-61.
42. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med.*1997,20:56-63.
43. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS.Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendon. *Lasers Med Surg.*1998,22:281-87.
44. Sakurai N, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.*2000,108:29-34.

3.8 Anexo

