

LASER DE BAIXA POTÊNCIA REDUZ NOCICEPÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO JOELHO DE RATOS COM OSTEOARTROSE

Caroline Cadore Ramires¹

Morgana Duarte Da Silva²

Rafael Tamborena Malheiros³

Eloá Ferreira Yamada⁴

Resumo:

A osteoartrite (OA) é uma doença crônico-degenerativa, caracterizada por dano ao tecido cartilaginoso hialino, inflamação local, alterações ósseas e fraqueza da musculatura periarticular. Os locais de principal acometimento são quadril, joelho e mãos. Dentre as terapêuticas para o tratamento, a terapia por diodo de LASER é amplamente utilizada e possui resultados eficazes na prática clínica. Porém, poucos estudos realizaram a comparação da aplicação do LASER em diferentes dosagens, a fim de verificar seus efeitos na analgesia e modulação oxidativa em pacientes com OA. Portanto, objetivamos investigar o efeito analgésico e antioxidativo do LASER de baixa potencia em um modelo animal de OA induzida por monoiodoacetato (MIA) no joelho. Os experimentos foram aprovados em Comitê de Ética institucional e realizados em 40 ratos Wistar, divididos em 5 grupos, conforme os tratamentos: Grupo I (solução salina estéril); Grupo II (solução salina e LASER 9 Joules/ponto); Grupo III (MIA, sem tratamento); Grupo IV e V (MIA e LASER 3J e 9J, respectivamente). O tratamento dos grupos II, IV e V, iniciou depois de 24 horas da injeção de salina ou MIA, sendo realizado por 3 vezes, durante 3 semanas. Os animais tiveram o membro inferior posicionado em flexão de 45 graus, o laser foi aplicado em dois pontos. Os testes comportamentais de sensibilidade mecânica e térmica, nocicepção espontânea e edema foram avaliados até uma hora após o tratamento com Laser. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado através dos filamentos de von Frey, a atividade da enzima superóxido dismutase, foi medida por espectrofotometria a 480nm e a peroxidação lipídica (TBARS) foi realizada com o sobrenadante das estruturas do joelho com tampão de ácido e absorbância mensurada a 545nm. A análise estatística entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls, ou análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), seguida de teste post hoc de Bonferroni, quando necessário. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e o valor de p

Palavras-chave: Osteoartrose; laser; nocicepção.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

**LASER DE BAIXA POTÊNCIA REDUZ NOCICEPÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO JOELHO
DE RATOS COM OSTEOARTROSE**

¹ Aluno de graduação. carolc_45@hotmail.com. Autor principal

² Docente. morganasilva@unipampa.edu.br. Orientador

³ Aluno de pós-graduação. rafaeltmalheiros@gmail.com. Co-orientador

⁴ Aluno de pós-graduação. eloayamada@unipampa.edu.br. Co-orientador



LASER DE BAIXA POTÊNCIA REDUZ NOCICEPÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO JOELHO DE RATOS COM OSTEOARTROSE

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença crônico-degenerativa, caracterizada por gerar dano ao tecido cartilaginoso hialino, inflamação local, alterações ósseas e fraqueza da musculatura periarticular. As articulações afetadas por essa doença são sinoviais, sendo as mais comuns quadril, joelho e mãos. Os principais sintomas da OA são dor, rigidez articular e limitação do movimento. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a OA está presente em 9,6% dos homens e 18% das mulheres acima de 60 anos. O Ministério da Saúde estima que 12 milhões de brasileiros possuem doenças reumatóides, sendo esta a segunda causa de benefícios de auxílio-saúde na Previdência Social (WHO, 2017; Brasil, 2011; Pereira *et al*, 2011).

Dentre as terapêuticas disponíveis para o tratamento de doenças reumáticas, a terapia por diodo de LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) é amplamente utilizada na prática clínica, com resultados que demonstram a sua eficácia na OA. O LASER de baixa potência apresenta efeitos fisiológicos diretamente relacionados a biomodulação devido a irradiação que estimula a proliferação celular, atuando sobre o sistema imune e estimulando a síntese de colágeno (Enwemeka, 2005; Lan *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2005).

Apesar dos efeitos benéficos da fototerapia, poucos estudos realizaram a comparação da aplicação do LASER em diferentes dosagens, a fim de verificar seus efeitos na analgesia e modulação oxidativa em pacientes com OA. Este trabalho objetiva investigar o efeito analgésico e antioxidativo do LASER de baixa potência, em um modelo animal de OA induzida por monoiodoacetato (MIA) no joelho.

2. METODOLOGIA

Os experimentos iniciaram após aprovação do Comitê de Ética da Unipampa (CEUA) (protocolo número 001/2016), sendo utilizados 40 ratos Wistar machos (aproximadamente 3 meses de idade e 250 gramas). Para indução da OA os animais receberam uma injeção intra-articular no joelho direito de monoiodoacetato (MIA - 1,5mg/50µl). Os ratos foram divididos em 5 grupos: Grupo I: foi injetado solução salina estéril; Grupo II: recebeu injeção de salina e foi tratado com LASER 904nm dose 9 Joules/ponto (J) no joelho direito; Grupo III: submetido à injeção de MIA intra-articular no joelho direito, sem tratamento; Grupo IV e V: receberam injeção de MIA intra-articular no joelho direito e foram tratados com LASER 904nm em doses de 3J e 9J, respectivamente.

O tratamento dos grupos II, IV e V, iniciou depois de 24 horas da injeção de salina ou MIA, sendo realizado 3 vezes, durante 3 semanas (9 aplicações). Os animais tiveram o membro inferior posicionado em flexão de 45 graus, o laser foi aplicado em dois pontos, na linha articular medial (1 ponto) e lateral (1 ponto) do joelho direito. Os testes comportamentais de sensibilidade mecânica foram avaliados até uma hora após o tratamento com Laser.

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado através dos filamentos de von Frey (Chaplan *et al.*, 1994). O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos ratos. Foram analisadas as respostas (retirada ou não da

pata) em relação à tensão aplicada através dos filamentos calibrados para produzir forças (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 gramas). As avaliações iniciaram com a aplicação do filamento de 0,4 g, no caso de resposta afirmativa com retirada da pata foi utilizado um filamento com menor valor em gramas. Em caso de estímulo inócuo, ou seja, quando o animal não retirava a pata, foi testado o filamento com maior valor subsequente em gramas. Foram realizadas no máximo seis aplicações em cada animal, após a primeira resposta de retirada positiva (Dixon, 1980).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável por retardar a geração de ânion superóxido, foi medida por espectrofotometria em 480 nm. Os valores foram expressos em mmolMDA/mg, ou seja, em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do cromóforo.

A peroxidação lipídica (TBARS) foi realizada com o sobrenadante das estruturas do joelho que, após homogeneizado e centrifugado, foi incubado a 100°C por 1h, com tampão de ácido acético e ácido 2-tiobarbitúrico, em seguida foi adicionado duodecil sulfato de sódio a 8,1%, e então a absorbância foi mensurada a 545nm (Ohkawa *et al.*, 1979).

A análise estatística entre os grupos foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls, ou análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), seguida de teste post hoc de BonFerroni, quando necessário. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e o valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância. Para a realização das análises foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 5.0 (San Diego, CA: 2008).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

De acordo com a Figura 1.A, mostramos que os animais dos grupos III, IV e V apresentaram aumento do limiar de retirada da pata aos filamentos de von Frey, 24 horas após a injeção de MIA intra-articular, isso significa que o MIA produziu nocicepção nos ratos. Além disso, o tratamento com laser não foi capaz de reduzir a sensibilidade mecânica dos animais no primeiro dia de tratamento (Figura 1A) nem ao longo da primeira semana de tratamento (Figura 1B). Contudo, o grupo tratado com laser de 9J apresentou efeito significativo na redução da sensibilidade mecânica da pata a partir do quinto tratamento (Figura 1B), que perdurou até o décimo sexto dia de avaliação. Ou seja, o laser de 9J reduziu a nocicepção dos animais com OA induzida por MIA no quinto, sexto, sétimo, oitavo e nono tratamentos. Ainda pode-se observar que o laser 9J não modificou a resposta dos animais com salina intra-articular (Grupo II).

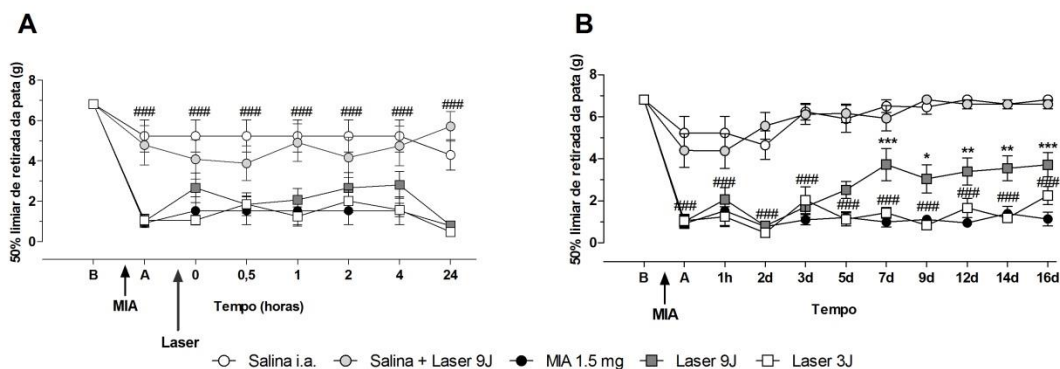


Figura 1. Limiar nociceptivo mecânico da pata. A) Avaliação basal (B), 24h após injeção de MIA ou salina i.a. (A) e ao longo de 24 horas após o tratamento com laser de 3J ou 9J. B) Avaliação basal (B), 24h após injeção de MIA ou salina i.a. (A) e ao longo de 16 dias de tratamento com laser de 3J ou 9J. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparação do grupo MIA com grupo laser 9J, #### $p<0,001$ comparação do grupo salina i.a. e do grupo MIA 1,5 mg.

Também mostramos que o MIA aumenta a concentração de malonaldeído (MDA) no joelho (Figura 2A) e que não foi capaz de modificar significativamente a concentração de SOD no joelho dos animais (Figura 2B). Isso deve-se ao fato que, a injeção de MIA causa a doença articular através do estímulo de condrócitos inativos, juntamente com as células sinoviais que, respondem ao excesso de carga mecânica através de sinais intracelulares induzidos também pelo estresse, que por sua vez é um mediador da produção de células pró-inflamatórias como citocinas e proteinases presentes na cartilagem e a SOD é uma enzima antioxidante que atua na proteção contra a degeneração da membrana celular. No entanto, o tratamento com laser de 3 ou 9J foi capaz de modificar a resposta de TBARS no joelho dos animais com salina i.a. ou com MIA i.a. (Figura 2A e B).

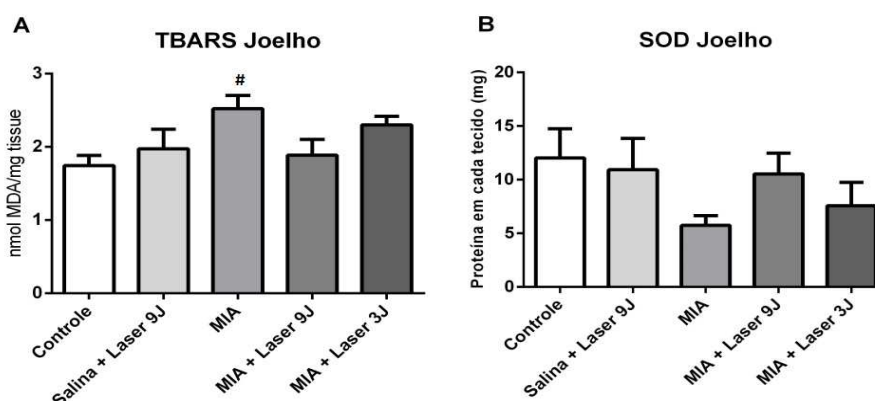


Figura 2. A) Níveis de TBARS no joelho de animais que receberam salina e MIA i.a. B) Valores de SOD no joelho de animais que receberam salina e MIA i.a.. Sendo # $p<0,05$, comparação do grupo salina i.a. e do grupo MIA 1,5 mg.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como demonstrado o efeito antinociceptivo da terapia com laser de 9J foi comprovado pela redução da sensibilidade mecânica da pata. A partir disso, nossas perspectivas são a combinação dessa terapia com uma terapia farmacológica convencionalmente utilizada para tratamento de osteoartrite e comparação de seus resultados.

5. REFERÊNCIAS

- BRASIL, Ministério da Saúde. Saúde alerta para prevenção às doenças reumáticas 2011. [Acesso em 16 ser. 2017]; Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/819>.
- CHAPLAN, S.R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods*, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.
- DIXON, W.J. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev PharmacolToxicol*. 1980; 20: 441-462.
- ENWEMWKA, S. Light is Light. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 23, n. 2. p. 159-160, 2005.

LAN, C.E. et al. Low-Energy Helium-Neon Laser Induces Locomotion of the Immature Melanoblasts and Promotes Melanogenesis of the More Differentiated Melanoblasts: Recapitulation of Vitiligo Repigmentation In Vitro. *J. Invest. Dermatol.* v.126. p. 2119–2126, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. ***Anal Biochem.*** v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PEREIRA, D. *et al.* The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 19, n. 11, p. 1270-85, 2011.

ROSA F.M. et al. Utilização do laser de baixa potencia na prevenção e tratamento da mucosite oral. *Somatos, Canoas*, v.11, n.21. p.41- 47, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chronic rheumatic conditions: Osteoarthritis. [Acesso em 16 set. 2017]; Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en>.