

# **EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM UM MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIDOACETATO**

**Victor Tentardini**<sup>1</sup>

**Daniel Tassinari Felber**<sup>2</sup>

**Morgana Duarte Da Silva**<sup>3</sup>

**Eloá Ferreira Yamada**<sup>4</sup>

## **Resumo:**

A osteoartrite (OA) é uma doença de característica multifatorial que envolve as articulações sinoviais, resultando em perda progressiva da cartilagem articular, incapacidade funcional, dor crônica e alterações na qualidade de vida do indivíduo. Estimativas indicam que 4% dos brasileiros com mais de 60 anos sofrem e OA, correspondendo a 65% das causas de incapacidade funcional no Brasil. O conhecimento acerca da OA e sua fisiopatologia é de extrema importância para a busca por recursos terapêuticos que promovam a redução dos sintomas, tornando a indução de monoiidoacetato (MIA) em um modelo animal ferramenta importante para investigação das alterações promovidas pela OA e possibilidade de tratamentos, desta maneira sugere-se que o laser de baixa potência (LBP) seja benéfico em condições agudas e crônicas devido ao seu efeito estimulador na cicatrização de tecidos, porém sua eficácia clínica ainda é pouco esclarecida, divergindo principalmente em relação à dose a ser utilizada na OA. Este trabalho busca investigar os efeitos do LBP sobre os sinais inflamatórios e nociceptivos promovidos pela OA em um modelo animal desta doença induzida por monoiidoacetato (MIA) no joelho. Foram utilizados 40 ratos Wistar (machos,  $\pm$  250g) divididos em 5 grupos: Grupo I: controle - injeção de salina estéril intra-articular (i.a.) no joelho direito; Grupo II - injeção de salina estéril i.a. no joelho direito + tratamento com LBP dose 9J; Grupo III - injeção de MIA i.a. no joelho direito; Grupo IV e V: Injeção de MIA i.a. no joelho direito + tratamento com LBP dose 3J e 9J, respectivamente. Para realização do tratamento com LBP foi utilizado o equipamento Laserpulse (Ibramed®), caneta de 904nm, iniciado 24 horas após a injeção de salina ou MIA. O tratamento foi realizado nos animais dos grupos II, IV e V, com frequência semanal de 3 aplicações, totalizando 9 aplicações. Os testes comportamentais de sensibilidade térmica e edema foram avaliados até uma hora após o tratamento com LBP. O presente estudo demonstrou que o LBP de 9J apresentou efeito positivo na redução do edema e efeito antinociceptivo, enquanto o Laser de 3J não foi efetivo para o mesmo fim. Foi possível observar redução da atividade da mieloperoxidase após a o tratamento com laser 9J. O laser de baixa potência é uma alternativa promissora e eficaz no tratamento da OA de joelho, demonstrando resposta benéfica na redução do edema articular e nocicepção espontânea, além disso reduz o montante de neutrófilos na

articulação.

**Palavras-chave:** Osteoartrite; Terapia a Laser de Baixa Potência; Mediadores da inflamação; Analgesia

**Modalidade de Participação:** Iniciação Científica

## **EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM UM MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIDOACETATO**

<sup>1</sup> Aluno de graduação. victortentardini@gmail.com. Autor principal

<sup>2</sup> Aluno de pós-graduação. danielfelber@unipampa.edu.br. Co-autor

<sup>3</sup> Docente. morganasilva@unipampa.edu.br. Orientador

<sup>4</sup> Docente. eloayamada@unipampa.edu.br. Co-orientador



## **EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM UM MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE INDUZIDA POR MONOIDOACETATO**

### **1. INTRODUÇÃO**

A osteoartrite (OA) é uma doença de característica multifatorial que envolve as articulações sinoviais que através de um processo crônico-degenerativo promove alterações celulares, deformidades estruturais e disfunção dos seguimentos articulares, que compreendem a cartilagem hialina, o osso subcondral, os ligamentos, a membrana sinovial e os músculos periarticulares. Estas alterações resultam em perda progressiva da cartilagem articular, aumento da estrutura óssea nas margens da articulação e proliferação sinovial (Pedersen e Saltin, 2006; Carvalho et al, 2016; Kim e Kim, 2013; Jeong et al 2015).

A OA está entre as doenças degenerativas mais frequentes, em detrimento aos sinais que a doença pode apresentar, como perda da função articular, incapacidade funcional, dor crônica e alterações na qualidade de vida do indivíduo. Estimativas indicam que 4% dos brasileiros com mais de 60 anos sofrem de OA, correspondendo a 65% das causas de incapacidade funcional no Brasil. A OA é mais comum nas articulações do quadril, joelho e mãos, acomete indivíduos a partir da meia-idade, de ambos os sexos, porém com predominância do sexo feminino no período pós-menopausa devido à redução dos níveis hormonais (Rodrigues e De Camargo, 2015; Kim e Kim, 2013).

O conhecimento acerca da OA e sua fisiopatologia é de extrema importância para a busca por recursos terapêuticos que promovam a redução dos sintomas, visto que grande parte da população pode ser acometida pela doença. A indução de monoiodoacetato (MIA) em um modelo animal torna-se ferramenta importante para investigação das alterações promovidas pela OA e possibilidade de tratamentos (Jeong et al, 2015).

Dentre as possibilidades de tratamento da OA, sugere-se que o laser de baixa potência (LBP) seja benéfico em condições agudas e crônicas devido ao seu efeito estimulador na cicatrização de tecidos, capacidade de modular o processo inflamatório e efeitos analgésicos através da redução de mediadores inflamatórios, alterações na neurotransmissão e também pela liberação de endorfinas endógenas, porém sua eficácia clínica ainda é pouco esclarecida, divergindo principalmente em relação à dose a ser utilizada na OA (Coradini et al, 2014; Huang et al, 2015).

Este trabalho busca investigar os efeitos do LBP sobre os sinais inflamatórios e nociceptivos promovidos pela OA em um modelo animal desta doença induzida por monoiodoacetato (MIA) no joelho.

### **2. METODOLOGIA**

Foram utilizados 40 ratos Wistar (machos,  $\pm$  250g) divididos em 5 grupos: Grupo I: controle – injeção de salina estéril; Grupo II – injeção de salina estéril + tratamento com LBP dose 9J; Grupo III – injeção de MIA; Grupo IV e V: Injeção de MIA + tratamento com LBP dose 3J e 9J, respectivamente.

Os grupos controles (I e II) receberam uma injeção intra-articular de salina estéril (50  $\mu$ l) no joelho direito, já os grupos III, IV e V receberam uma injeção intra-articular de MIA (1,5mg/50 $\mu$ l) (Jeong et al, 2015; Arruda et al, 2007).

Para realização do tratamento com LBP foi utilizado o equipamento Laserpulse (Ibramed®), caneta de 904nm, iniciado 24 horas após a injeção de salina ou MIA. O tratamento foi realizado nos animais dos grupos II, IV e V, com frequência semanal de 3 aplicações, totalizando 9 aplicações. Os animais foram posicionados com o membro inferior direito em flexão de 45°, sendo o laser aplicado na linha articular medial e lateral do joelho direito. Os testes comportamentais de sensibilidade térmica e edema foram avaliados até uma hora após o tratamento com LBP.

A avaliação do edema foi realizada utilizando um paquímetro digital (Digimess, modelo 200mm/8”), no qual foi quantificado o diâmetro articular (mm) do joelho. Em cada avaliação foram realizadas três medidas, bilateralmente, colocando-se o paquímetro na linha articular do joelho horizontalmente. O resultado foi expresso pela média da diferença entre o joelho injetado e o membro contralateral (Bressan et al, 2006).

Para análise de um possível efeito antinociceptivo do Laser, os ratos foram colocados em uma plataforma elevada, dentro de caixas de plástico transparentes, adequadas para a avaliação do comportamento do animal. Uma das características da nocicepção espontânea gerada pelo processo inflamatório na articulação do joelho é a postura em flexão do membro lesado. O ato de proteção do animal após a flexão do membro foi classificado em graus, de acordo com a escala comportamental de dor subjetiva (0-5), onde 0 – normal, 1 – dedos retraídos, 2 – pé em eversão, 3 – suporte parcial do peso, 4 – sem suporte de peso e proteção do membro, 5 – sem contato algum do membro no solo (Gopalkrishnan, Sluka, 2000).

Os animais foram submetidos à eutanásia e após este procedimento foram aplicadas duas injeções de 50µl de soro fisiológico na cavidade do joelho direito, com imediata aspiração onde foram recuperados aproximadamente 60µl do lavado intra-articular, sendo armazenado a -80°C para análise posterior. Neste lavado foi verificada a atividade de mieloperoxidase (MPO), no qual foram adicionados 0,08M e 0,22M fosfato de sódio, 18,4mM tetrametilbenzidina em dimetilformamida em solução aquosa, e 0,017% de peróxido de hidrogênio. A mistura foi incubada a 37°C por 3 minutos, e então adicionado acetato de sódio. A atividade foi mensurada espectrofotometricamente com as alterações na absorbância a 630nm e expresso em DO/ml (Cifuentes et al., 2010; da Silva et al., 2011).

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 ± 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).

Todos os experimentos foram iniciados após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unipampa (protocolo número 001/2016).

### **3. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

O presente estudo demonstrou que o LBP de 9J apresentou efeito positivo na redução do edema e efeito antinociceptivo, enquanto o Laser de 3J não foi efetivo para o mesmo fim. Estudos indicam que o edema representa um fator fisiopatológico da doença, presente em um estágio inicial do processo de OA (Assis et al, 2016). Observa-se que os animais dos grupos III, IV e V apresentaram aumento do edema no joelho após 24 horas da injeção do agente flogísticos (Figura 1A). A figura 1A demonstra que o Laser de 9J apresentou resultado significativo

( $p < 0,05$ ) na redução do edema no primeiro dia após aplicação de MIA. Nos dias seguintes não foi observado edema em nenhum dos grupos experimentais. Bertolini et al. (2007) afirmaram que o efeito do laser na redução do edema presente nos tecidos adjacentes à lesão ocorre em função de uma melhora no fluxo linfático.

Os animais que receberam MIA apresentaram aumento do escore da dor espontânea. O grupo tratado com laser 9J apresentou resultado significativo ( $p < 0,05$ ) na redução da dor espontânea somente no 9º tratamento, conforme observado na Figura 1B. O aumento das citocinas e outras substâncias inflamatórias gerado através do processo inflamatório pode levar a uma sensibilização periférica caracterizando-se como hiperalgesia primária, manifestando dor ao movimento, como sugere Garcia (2010), relacionando estes achados as alterações patológicas estruturais da OA.

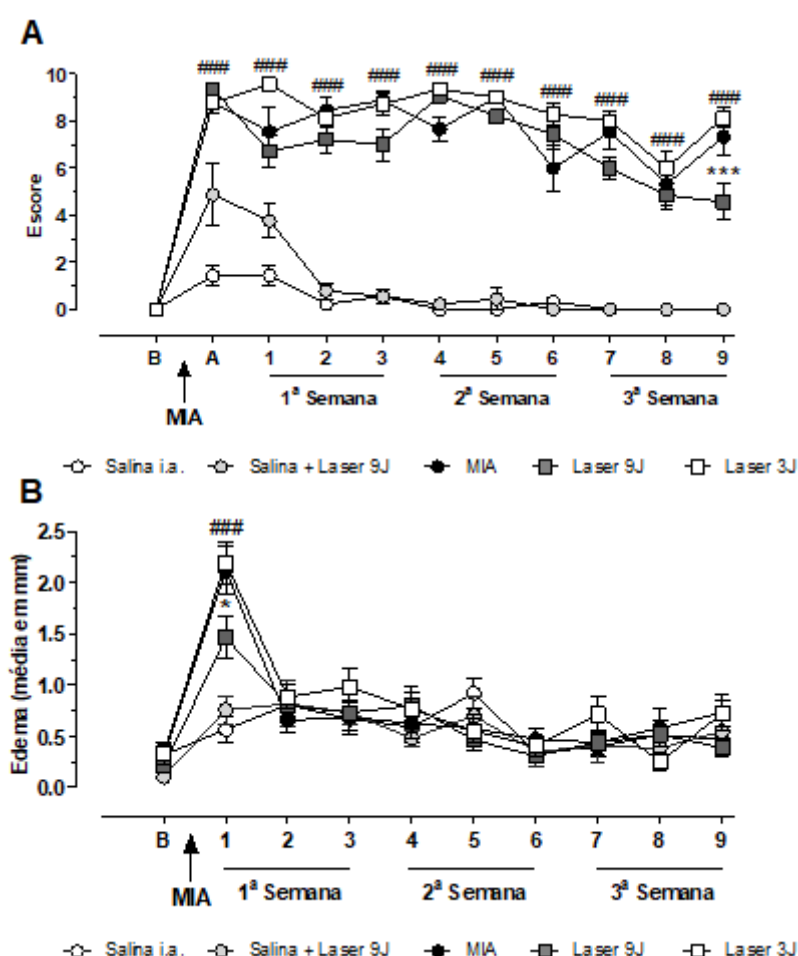


Figura 1. Efeito do Laser de Baixa Potência sobre a dor espontânea e o edema em ratos com OA de joelho induzida por MIA. Avaliação da dor espontânea antes (B – basal) e após (A – após) a injeção de salina ou MIA i.a. e ao longo de três semanas de tratamentos com Laser de 3J e 9J, totalizando 9 aplicações (A). Avaliação do edema de joelho antes (B – basal) e após (A – após) a injeção de salina ou MIA e ao longo de três semanas de tratamentos com Laser de 3J e 9J (B). Os asteriscos (\*) demonstram os níveis de significância quando comparados com o grupo MIA 1,5mg, sendo  $*p < 0,05$ . Hashtag (#) demonstram os níveis de significância do grupo MIA 1,5mg comparado ao grupo Salina i.a, sendo ###  $p < 0,001$ .

No nosso estudo, foi possível observar que após a injeção de MIA intra-articular os animais apresentaram aumento da atividade de MPO, ou seja, possivelmente um aumento da concentração de neutrófilos (Figura 2). No entanto, o

tratamento com Laser de 9J, foi capaz de reduzir esse aumento de neutrófilos no joelho de animais com OA. Marquina et al. (2012) sugerem que o LBP promove eventos que induzem a síntese de proteínas, desencadeando a proliferação e migração celular, modulação de mediadores inflamatórios, aumentando a oxigenação e remodelação tecidual. Corroborando com dados apresentados por dos Santos et al (2014) que induziram OA com papaína a 4% no joelho de ratos e observaram que com apenas uma dose de Laser, com 2J ou 4J, houve redução no montante de neutrófilos no líquido sinovial dos animais.

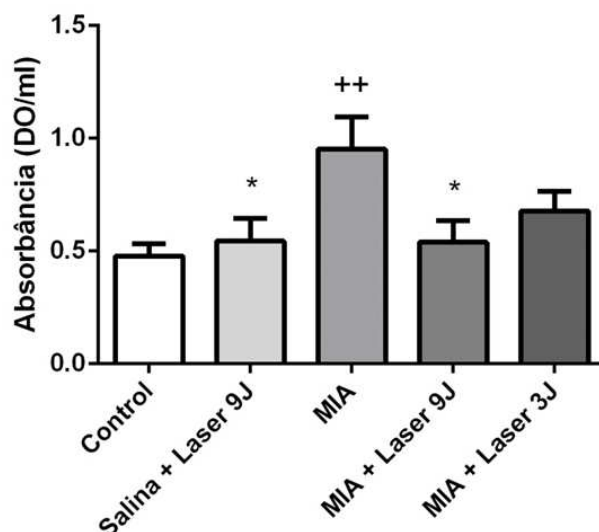


Figura 2. Comparação da absorbância da Mieloperoxidase após a injeção de salina ou MIA e tratamentos com Laser de 3J e 9J. Os asteriscos (\*) demonstram os níveis de significância quando comparados com o grupo MIA 1,5mg, sendo  $*p<0,05$ . Sinais de adição (+) demonstram os níveis de significância do grupo MIA 1,5mg comparado ao grupo Salina i.a, sendo  $++p<0,001$ .

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O laser de baixa potência é uma alternativa promissora e eficaz no tratamento da OA de joelho, demonstrando resposta benéfica na redução do edema articular e nocicepção espontânea, além disso reduz o montante de neutrófilos na articulação. Tornam-se necessárias a continuidade dos estudos para determinar os parâmetros ideais de tratamento através da utilização do LBP.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ARRUDA, E. R. B., RODRIGUES, N. C., TACIRO, C., PARIZOTTO, N. A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendinea do rato após tenotomia. *Rev. bras. Fisioter.* 2007; 11(4): 283-288.
- ASSIS, L., MILARES, L. P., ALMEIDA, T., TIM, C., MAGRI, A., FERNANDES, K. R., RENNO, A. M. Aerobic exercise training and low-level laser therapy modulate inflammatory response and degenerative process in an experimental model of knee osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; 24(1): 169-177.
- BERTOLINI, G. R. F., CIENA, A. P., SILVA, T. S. D., JUNQUEIRA, J. J. O., CUNHA, N. B. Aplicação do laser 808nm na dor articular crônica de ratos Wistar. *Rev. bras. med. esporte*, 2009; 15(4): 264-267.
- BRESSAN, E.; CUNHA, F. Q.; TONUSSI, C. R. Contribution of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LP Induced reactive arthritis. *Cytokine*. 2006; 36: 83-89.

CARVALHO, R. T. D., CANTÉ, J. C. L., LIMA, J. H. S., TAVARES, L. A. B., TAKANO, M. I., TAVARES, F. G. Prevalence of knee arthroplasty in the state of São Paulo between 2003 and 2010. *Sao Paulo Medical Journal* 2016; 134(5): 417-422.

CIFUENTES, D. J., ROCHA, L. G., SILVA, L. A., BRITO, A. C., RUEFF-BARROSO, C. R., PORTO, L. C., PINHO, R.A. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Aug;18(8):1088-95. doi: 10.1016/j.joca.2010.04.004. Epub 2010 Apr 22.

CORADINI, J. G., MATTJIE, T. F., BERNARDINO, G. R., PERETTI, A. L., KAKIHATA, C. M. M., ERRERO, T. K. et al. Comparison of low level laser, ultrasonic therapy and association in joint pain in Wistar rats. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2014; 54(1): 7-12.

DA SILVA, M. D., GUGINSKI, G., WERNER, M. F., BAGGIO, C. H., MARCON, R., SANTOS, A. R. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:217946. doi: 10.1093/ecam/neq036. Epub 2011 Jun 5.

DOS SANTOS, S.A.; ALVES, A.C.; LEAL-JUNIOR, E.C.; ALBERTINI, R.; VIEIRA, R.P.; LIGEIRO, A.P.; JUNIOR, J.A.; DE CARVALHO, Pde. T. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers Med Sci*. 2014 May;29(3):1051-8.

GARCIA, J. B. S. Sociedade brasileira para o estudo da dor, out. 2009-2010. Disponível em: *Anais CIEH*, 2015; 2(1).

GOPALKRISHNAN, P.; SLUKA, K. A. Effect of Varying Frequency, Intensity, and Pulse Duration of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Primary Hyperalgesia in Inflamed Rats. *Arch Phys Med Rehabil*. 2000; 81: 984-90.

HUANG, Z., CHEN, J., MA, J., SHEN, B., PEI, F., KRAUS, V. B. Effectiveness of low-level laser therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Sep;23(9):1437-1444. doi: 10.1016/j.joca.2015.04.005. Epub 2015 Apr 23.

JEONG, J. H., MOON, S. J., JHUN, J. Y., YANG, E. J., CHO, M. L., MIN, J. K. The role of MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis in chondrocyte degradation and disease progress in knee osteoarthritis. *Biological research* 2015; 48(1): 64.

JEONG, J. H., MOON, S. J., JHUN, J. Y., YANG, E. J., CHO, M. L., MIN, J. K. .Eupatilin exerts antinociceptive and chondroprotective properties in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. *PloS one* 2015; 10(6): 130-882.

KIM, G., KIM, E. Analgesic efficacy of low intensity laser therapy in a monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic rat model. *Journal of Physical Therapy Science* 2013; 25( 3): 309-312.

MARQUINA, N., DUMOULIN, W. R., MANDEL, A., LILGE, L. Laser therapy applications for osteoarthritis and chronic joint pain—A randomized placebo-controlled clinical trial. *Photonics & Lasers in Medicine*, 2012; 1(4): 299-307.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, Malden, v. 16 p. 3-63, fev. 2006. Suppl 1.

RODRIGUES, A. J., DE CAMARGO, R. S. Tratamento fisioterapêutico na osteoartrite de joelho: revisão de literatura. *Saúde* 2015; 2(14): 101-114.