



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**MARIANA DE SOUZA COSTA**

**DIFERENTES EFEITOS DE DUAS DOSES DE LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO**

**PARNAÍBA-PI**

**JUNHO-2017**

**MARIANA DE SOUZA COSTA**

**DIFERENTES EFEITOS DE DUAS DOSES DE LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras**

**PARNAÍBA-PIAUI**

**JUNHO-2017**

**MARIANA DE SOUZA COSTA**

**DIFERENTES EFEITOS DE DUAS DOSES DE LASER DE BAIXA  
INTENSIDADE EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras  
Universidade Federal do Piauí-UFPI

---

Prof. Dr. Fuad Ahmad Hazime  
Universidade Federal do Piauí-UFPI

---

Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros  
Universidade Federal do Piauí-UFPI

*À Deus, toda minha gratidão pela força concedida nessa árdua caminhada. À meu orientador, que sempre me apoiou nas minhas escolhas . Aos meus pais, Francisco e Joana, pelo apoio e dedicação. À minha filha, Cecília, que é a luz de toda minha inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS toda minha gratidão pela vida, força, coragem e saúde de continuar esse projeto de vida acadêmica, com garra e fé acreditando na docência.

Ao meu Orientador, Marcelo de Carvalho Filgueiras, que desde a graduação me acompanha e acredita nos meus projetos, desde a Iniciação Científica até a Dissertação de Mestrado.

Aos meus pais, Francisco e Joana, por me apoiarem na ideia de seguir a vida nos estudos e me ajudarem na criação da minha filha nesse processo de vida estudantil.

À minha filha, Cecília, que é simplesmente minha fonte de inspiração, meu grande amor, meu coração fora de mim e que em nada me atrapalhou nessa caminhada e sim, foi minha força para continuar crescendo e aprendendo.

A Cleriston Calaça, que me deu a pessoa mais importante na vida e me incentivou sempre nos estudos.

Aos meus amigos do LAMFIM (Laboratório de Morfologia e Fisiologia Muscular), que me repassaram o conhecimento adquirido em anos de laboratório, me auxiliaram e ajudaram na caminhada coletiva em busca de resultados para a dissertação.

Aos amigos do LAFEX (Laboratório de Fisiologia Experimental), que sempre foram prestativos na troca de conhecimentos e na busca de resultados nos experimentos, nos guiaram e ensinaram caminhos mais objetivos na pesquisa. Em especial Beatriz, Luan e Irismara, toda minha gratidão pelo apoio, paciência e tempo disponibilizados.

Ao José Junior, pelo apoio emocional e farmacêutico nesse período importante de nossas vidas.

Aos amigos, Yago, Ramon, José Carlos, Tarcísio, Saul e Isabela que em meio a estágios e estudos, se dispuseram a participar de experimentos diários, os quais se estendiam além da universidade.

Ao Prof. Jand e Fuad pela solicitude com nosso grupo e pela disponibilidade em contribuir com a evolução de nosso projeto.

## RESUMO

**Introdução:** A Terapia a Laser de Baixa Intensidade (LBI) é um procedimento terapêutico amplamente utilizado no meio clínico, tendo em vista seus efeitos biológicos no tecido de maneira não térmica e sendo uma opção terapêutica eficaz e com menos efeitos colaterais em comparação à terapia convencional com anti-inflamatórios. Apesar dos efeitos clínicos já relatados em diversos estudos, seu mecanismo de ação e parâmetros dosimétricos não são totalmente compreendidos, havendo grande divergência sobre dose e efeito. Assim, estudos sobre dosimetria são importantes e necessários para formar subsídios para um tratamento eficaz. **Objetivos:** Descrever o efeito de duas doses diferentes do Laser de Baixa Intensidade em modelos experimentais de inflamação. **Metodologia:** Camundongos Swiss foram distribuídos em 4 grupos em diferentes experimentos, Grupo Salina (recebeu apenas injeção de solução salina a 0,9%); Grupo que recebeu agente flogístico (Cg, dextrana, serotonina, histamina ou bradicinina); Grupo Laser 1 (recebeu a injeção de agente flogístico e tratamento com Laser 1J/cm<sup>2</sup> (L1) e Grupo Laser 5 (L5- recebeu agente flogístico e tratamento com Laser 5J/cm<sup>2</sup>). Foram avaliados variação de volume de pata, ação da mieloperoxidase (MPO) e análise histológica. Ainda foi realizado experimento com indução de peritonite por carragenina. Foram avaliados Permeabilidade vascular, ação da mieloperoxidase (MPO), dosagem de glutatona (GSH), dosagem de malondialdeído (MDA) e migração neutrofílica. **Resultados:** Obtivemos redução em todos os edemas com tratamento laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> e redução de escores histológicos. Além de diminuição na migração neutrofílica e níveis de Malondialdeído (MDA), bem como preservação nos níveis de Glutaciona (GSH). Porém, o mesmo não foi obtido com a dose de 5J/cm<sup>2</sup> para os edemas de caráter vascular (dextrana e histamina), permeabilidade vascular e edema de Carragenina. **Conclusão:** Estes resultados nos sugerem que o laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> tem ação de caráter celular e vascular, já que foi capaz de reverter todos os edemas e análises da peritonite; e o Laser na dose de 5J/cm<sup>2</sup> possivelmente tem ação apenas de caráter celular na inflamação aguda.

**Palavras-chave:** Laser de Baixa Intensidade. Dosagem. Anti-inflamatório. Inflamação.

## ABSTRACT

**Introduction:** The Low-intensity laser therapy (LBI) is a widely used therapeutic procedure in the clinical setting, considering its biological effects on the tissue in a non-thermal way and being an effective therapeutic option and with fewer side effects compared to conventional therapy With anti-inflammatory drugs. Despite the clinical effects already reported in several studies, its mechanism of action and dosimetric parameters are not fully understood, with great divergence on dose and effect. Thus, studies on dosimetry are important and necessary to form subsidies for effective treatment. **Objectives:** To describe the effect of two different doses of Low Intensity Laser on experimental models of inflammation. **Method:** Swiss mice were distributed in 4 groups in different experiments, Salina Group (received only 0.9% saline injection); Group that received phlogiston agent (Cg, dextran, serotonin, histamine or bradykinin); Laser Group 1 (received the injection of flogistic agent and treatment with Laser 1J / cm<sup>2</sup> (L1) and Group Laser 5 (L5 received flogistic agent and treatment with Laser 5J / cm<sup>2</sup>). Paw volume variation, myeloperoxidase action (MPO) and histological analysis were evaluated. An experiment with induction of carrageenan peritonitis was also carried out. Vascular permeability, myeloperoxidase action (MPO), glutathione dosage (GSH), malondialdehyde dosage (MDA) and neutrophil migration. **Results:** We obtained reduction in all edemas with laser treatment at the dose of 1J / cm<sup>2</sup> and reduction of histological scores. In addition to decreased neutrophil migration and Malondialdehyde levels (MDA), as well as preservation in Glutathione (GSH) levels. However, the same was not obtained with the 5J / cm<sup>2</sup> dose for vascular edema (dextran and histamine), vascular permeability and carrageenan edema. **Conclusion:** These results suggest that laser at the dose of 1J / cm<sup>2</sup> has a cellular and vascular character, since it was able to revert all edema and analysis of peritonitis; and the Laser at a dose of 5J / cm<sup>2</sup> possibly only has a cellular character in acute inflammation.

**Keywords:** Low Intensity Laser. Dosage. Anti-inflammatory. Inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

PG- Prostaglandinas  
NO- Óxido Nítrico  
AINES- Anti-inflamatórios Não Esteróides  
COX- Ciclooxigenase  
LBP- Laser de Baixa Potência  
LBI- Laser de Baixa Intensidade  
AsGa- Arseneto de Gálio  
PAF-Fator de Agregação Plaquetária  
IL-1 Interleucina-1  
TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral Alfa  
EROS- Espécies Reativas de Oxigênio  
DNA- Ácido Desoxirribonucléico  
ERN- Espécies Reativas de Nitrogênio  
LASER- Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação  
HeNe- Hélio Neon  
NAALT- Associação Norte Americana para Terapia com Laser  
WALT- Associação Mundial de Laserterapia  
GaAIs- Laser Gálio Alumínio Arseneto  
Nm- Nanômetro  
ATP- Trifosfato de Adenosina  
Ph- Potencial Hidrogeniônico  
Cco- Citocromo C Oxidase  
HIF-1- Fator Induzido por Hipóxia 1  
J- Joules  
mW- Miliwatt  
Hz- Hertz  
AP-1- Ativador de Proteína 1  
NF-KB- Fator Nuclear Kappa B  
MPO- Mieloperoxidase  
MDA- Malondialdeído  
GSH- Glutathiona  
Dx- Dextrana  
Cg- Carragenina  
Hist- Histamina  
5-HT- Serotonina  
BK- Bradicinina



## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1-** Parâmetros utilizados na Terapia com LBI.....32

**Quadro 2-** Avaliação dos escores microscópicos das lesões inflamatórias de animais com edema de pata induzido por carragenina.....36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Comprimento de onda ( $\lambda$ , nm) e potência máxima de saída (mW) de Lasers e LEDs utilizados na terapia laser de baixa Intensidade.....	17
<b>Figura 2</b>	Profundidades de penetração de tecidos de acordo com variado comprimento de onda.....	18
<b>Figura 3</b>	Mecanismos Celulares do LBI.....	21
<b>Figura 4</b>	Evolução da inflamação aguda. Alterações vasculares e celulares induzida pelo processo inflamatório.....	25
<b>Figura 5</b>	Recrutamento de leucócitos dependente de integrinas.....	27
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática do delineamento experimental.....	29
<b>Figura 7</b>	Indução de edema na pata traseira direita do camundongo de acordo com o grupo.....	31
<b>Figura 8</b>	Aplicação pontual do Laser de Baixa Intensidade na pata traseira direita do camundongo.....	32
<b>Figura 9</b>	Avaliação do edema de pata no Pletismômetro.....	33
<b>Figura 10</b>	Aplicação pontual do Laser de Baixa Intensidade no peritoneo do camundongo.....	37
<b>Figura 11</b>	Edema Agudo de pata induzido por carragenina.....	42
<b>Figura 12</b>	Efeito do Laser de baixa Intensidade nas doses de 1J/cm <sup>2</sup> e 5J/cm <sup>2</sup> na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina em tecido de pata.....	43
<b>Figura 13</b>	Efeito do LBI na dose de 1 e 5J nos escores microscópicos histológicos da pata.....	44
<b>Figura 14</b>	Microfotografia representando o efeito do laser nas doses de 1 e 5 J/cm <sup>2</sup> sobre os danos microscópicos da lesão tecidual provocada pelo edema de pata induzido por carragenina.....	45
<b>Figura 15</b>	Avaliação do efeito do laser na dose de 1 e 5J no edema de pata induzido por Dextrana.....	48
<b>Figura 16</b>	Avaliação do efeito do laser na dose de 1 e 5J no edema de pata induzido por Hiistamina.....	49
<b>Figura 17</b>	Avaliação do edema de pata induzido por Serotonina.....	50
<b>Figura 18</b>	Avaliação do edema de pata induzido por Bradicinina.....	51
<b>Figura 19</b>	Avaliação da permeabilidade vascular.....	52
<b>Figura 20</b>	Contagem total de leucócitos (A) e contagem diferencial de neutrófilos(B) no líquido peritoneal.....	53
<b>Figura 21</b>	Avaliação do Laser na atividade da Mieloperoxidase induzida por carragenina na peritonite.....	54

<b>Figura 22</b>	Avaliação do Laser na concentração de Glutathione (GSH) na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	55
<b>Figura 23</b>	Avaliação do Laser na concentração de Malondialdeído (MDA) na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	56
<b>Figura 24</b>	Diagrama esquemático representativo do efeito do LBI (1 e 5J/cm <sup>2</sup> ) na resposta inflamatória.....	65

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
	2.1 Laserterapia de Baixa Intensidade.....	16
	2.1.1 Características Gerais da LBI.....	16
	2.1.2 Laser e seus Efeitos Biológicos.....	19
	2.2 Inflamação.....	22
	2.2.1 Eventos vasculares da Inflamação.....	24
	2.2.2 Eventos celulares da Inflamação.....	26
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
	3.1 Objetivos gerais.....	28
	3.2 Objetivos específicos.....	28
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	29
	4.1 Delineamento experimental.....	29
	4.2 Animais.....	30
	4.3 Edema de pata induzido por Carragenina, dextrana e Mediadores Inflamatórios.....	30
	4.3.1 Grupos Experimentais.....	30
	4.3.2 Tratamento com Laser.....	31
	4.3.3 Avaliação do edema de pata.....	32
	4.3.4 Avaliação da MPO no edema de pata induzido por Carragenina.....	34
	4.4 Avaliação Histológica dos escores microscópicos de lesão Inflamatória.....	34
	4.5 Avaliação da Permeabilidade vascular.....	36
	4.6 Modelo de peritonite induzida por carragenina.....	37
	4.6.1 Grupos experimentais.....	37
	4.6.2 Administração do Laser.....	37
	4.6.3 Contagem total de células.....	38
	4.6.4 Contagem diferencial.....	38
	4.6.5 Ação da MPO.....	38
	4.6.6 Dosagem de MDA.....	39
	4.6.7 Dosagem de GSH.....	39
	4.7 Análise Estatística.....	40
5	<b>RESULTADOS</b> .....	41

5.1	Edema de pata induzido por carragenina.....	41
5.1.1	Avaliação do edema de pata induzido por carragenina.....	41
5.1.2	Atividade de MPO.....	43
5.2	Análise Histológica.....	44
5.3	Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios.....	47
5.3.1	Edema de pata induzido por Dextrana.....	47
5.3.2	Edema de pata induzido por Histamina.....	49
5.3.3	Edema de pata induzido por Serotonina.....	50
5.3.4	Edema de pata induzido por Bradicinina.....	51
5.4	Avaliação da Permeabilidade vascular.....	52
5.5	Modelo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	53
5.5.1	Migração neutrofílica para cavidade peritoneal.....	53
5.5.2	Ação da MPO.....	54
5.5.3	Dosagem de GSH.....	55
5.5.4	Dosagem de MDA.....	56
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
8	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta, nos anos de 1960, o Laser de Baixa Intensidade (LBI) tem sido usado no tratamento de diversas doenças (DE LIMA et al., 2011), nos principais campos de aplicação como na redução da duração da inflamação aguda, na estimulação do reparo tecidual e na diminuição da sensação dolorosa (BARATTO et al., 2011). Diferentemente de outras aplicações médicas, o Laser de Baixa Intensidade, também chamado fotobiomodulação, ou de Laser de Baixa Potência (LBP) é um tipo especial que causa efeitos biológicos de maneira não térmica e sua densidade de energia é baixa em relação a outras modalidades de laser capazes de cortar, ou cauterizar tecidos (FARIVAR et al., 2014; SONIS et al., 2016).

Os efeitos biológicos da laserterapia incluem a modulação da dor e inflamação (LARAIA et al., 2012; PALLOTTA et al., 2012), melhoria de condições isquêmicas (DE LIMA et al., 2011), redução de edema (ALBERTINI et al., 2007), incremento do metabolismo mitocondrial, regeneração muscular (CARVALHO et al., 2015) e diminuição da sensação dolorosa (ENWEMEKA, 2009), podendo os efeitos anti-inflamatórios do laser serem comparados com o efeito do fármaco diclofenaco de sódio (ALBERTINI et al., 2004; DE ALMEIDA et al., 2014). Assim, estudos tem sugerido que o Laser de Baixa Intensidade (LBI) apresenta um potencial que permita uma terapia alternativa ao uso de drogas anti-inflamatórias (ALVES, 2013) e o mostram também sendo mais eficaz como tratamento isolado do que exercícios e anti-inflamatórios em terapias combinadas (TOMAZONI et al., 2017), trazendo benefícios ao paciente, uma vez que sua administração é não invasiva e não gera efeitos sistêmicos indesejados.

No entanto, apesar de sua ampla utilização, ainda não são totalmente esclarecidos os conhecimentos acerca dos efeitos e mecanismos biológicos produzidos pelo laser, sendo necessários estudos que contribuam para um melhor entendimento e aplicação terapêutica, sobretudo nos parâmetros dosimétricos e protocolos ideais de aplicação (CARVALHO et al., 2015). Apesar de não haver consenso sobre os parâmetros de dose ideal, uma condição bastante tratada com o laser é a inflamação provocada por diferentes fatores (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005).

O processo inflamatório pode ser definido como um complexo de reações em resposta a um estímulo agressor interno ou externo cujo principal objetivo é livrar o organismo do fator causador da lesão celular bem como das consequências dessa agressão (BISWAS, 2016). É caracterizado por eventos como a liberação de mediadores incluindo a histamina, serotonina, bradicinina, Prostaglandinas E2 (PGE2), citocinas, quimiocinas, aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos para o sítio da injúria (SILVA et al., 2015). No entanto, se a destruição alvo e a reparação assistida não são progressivas, a inflamação pode ser desregulada ou exacerbada podendo levar a danos persistentes nos tecidos causados por células inflamatórias (NATHAN, 2002). A intensa ação dos leucócitos no sítio da inflamação causa liberação de espécies reativas de oxigênio ocasionando estresse oxidativo, consequentemente levando ao aumento da lesão (BISWAS, 2016).

As atuais opções terapêuticas pro tratamento de desordens inflamatórias em sua maioria estão associadas ao desenvolvimento de efeitos adversos graves, dentre elas os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os glicocorticóides, que constituem duas das classes de fármacos mais prescritas para o tratamento de desordens inflamatórias (ESCH, 2013; AKRAM et al., 2016). Os AINES atuam inibindo as enzimas COX1 e/ou COX2 envolvidas na biossíntese das prostaglandinas. No entanto, o uso contínuo destes fármacos pode levar ao aparecimento de efeitos adversos no trato gastrintestinal como hemorragias e ulcerações além de distúrbios renais (ESCH, 2013;SILVA et al., 2015).

Em função de tais efeitos adversos se faz necessária a busca por novas opções terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Justificando-se assim o uso do laser Arseneto de Gálio (AsGa) de Baixa Intensidade no nosso estudo, pois o mesmo além de acessível e comum na prática clínica, possui poucos estudos sobre padronização de parâmetros de dosagem no tratamento da inflamação aguda.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE**

#### **2.1.1 Características Gerais do LBI**

A invenção de um novo dispositivo (LASER - Amplificação da Luz por Emissão Estimulada da Radiação) trouxe uma atenção renovada para o campo tecnológico. Foi um trabalho disseminado por Albert Einstein em 1917, que postulou o fenômeno da emissão estimulada de fótons, porém levou mais de 40 anos para que o primeiro laser fosse construído por Theodore Maiman em 1960. Evidenciou-se então, que esta nova descoberta poderia servir como uma excelente ferramenta de precisão cirúrgica (ARANY, 2016).

Por volta de 1967, na Hungria, Endre Mester observou que a aplicação do laser no dorso de ratos que haviam sido raspados, poderia ter sido o motivo para que o crescimento de pelos tivesse sido mais rápido do que nos ratos que não haviam sido tratados com laser. Ele também demonstrou que o laser HeNe estimulou a cicatrização de feridas em ratos (CHUNG et al.,2012).

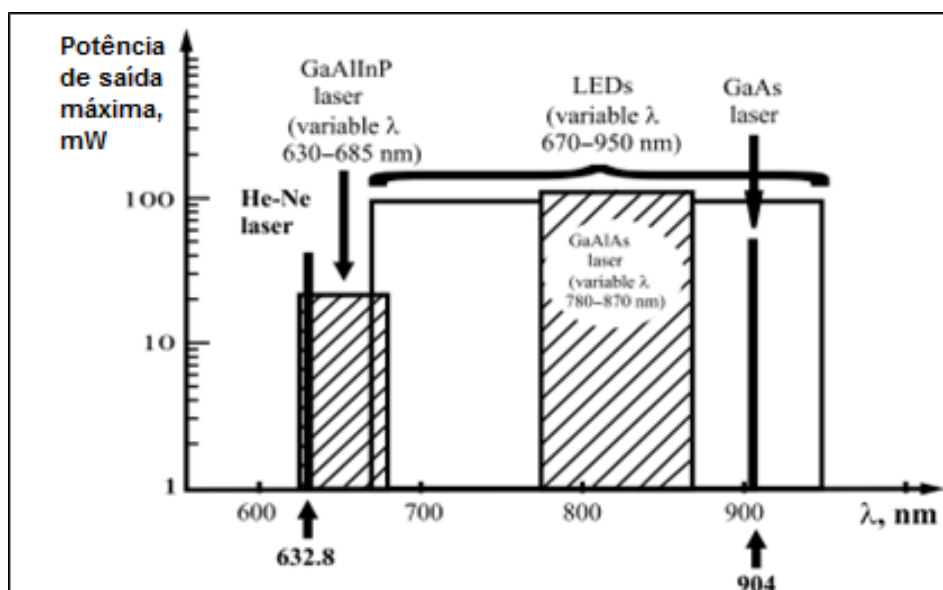
Em 2014, em uma conferência conjunta da Associação Norte-Americana para terapia com Laser (NAALT) com a Associação Mundial de Laserterapia (WALT) foi aceito também o termo Fotobiomodulação, tendo a seguinte definição: “O uso terapêutico de luz (por exemplo visível, próximo infravermelho, infravermelho) absorvida pelos cromóforos endógenos, desencadeando as reações biológicas não-térmicas e não citotóxicas, por meio de eventos fotoquímicas ou fotofísicas, levando a mudanças fisiológicas.”

Desde o início de sua aplicação terapêutica, tem se observado inconsistências nos seus resultados clínicos. Deve-se isso a duas variáveis principais. Em primeiro lugar, a complexidade das interações biofotônicas com sistemas biológicos e em segundo, a uma falta de compreensão dos mecanismos moleculares precisos que medeiam as suas respostas terapêuticas (ARANY, 2016).

Aplicações clínicas de LBI são diversas. Este campo é caracterizado por uma variedade de metodologias e usa várias fontes de luz, LED (Diodo



Emissor de Luz) e Lasers com diferentes parâmetros. Para a emissão do Laser também se considera o material que compreende o diodo, sendo ele composto de vários elementos químicos; assim sendo, alguns comprimentos de onda utilizados por fisioterapeutas são HeNe (632.8nm), Ga-Al-As (780-870 nm) e Ga-As (904nm). A figura a seguir apresenta esquematicamente os tipos de dispositivos terapêuticos de luz, possíveis comprimentos de onda e a potência de saída máxima (KARU, 2003)

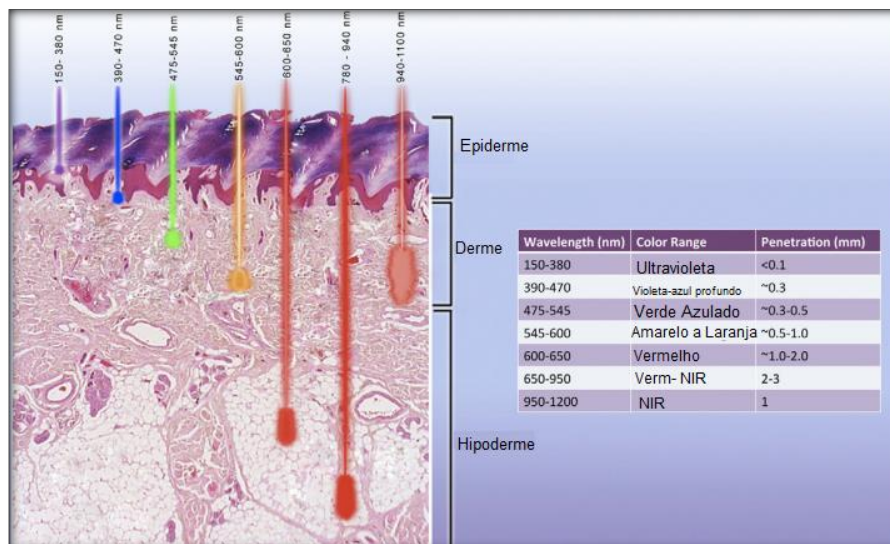


**Figura 1-** Comprimento de onda ( $\lambda$ , nm) e potência máxima de saída (mW) de Lasers e LEDs utilizados na terapia Laser de Baixa Intensidade. Fonte: KARU, 2003.

O principal efeito se baseia no mecanismo de absorção de luz. Os comprimentos de onda que variam entre 600 e 750 nm (luz vermelha) são escolhidos para o tratamento superficial de tecidos e os comprimentos de onda entre 750 e 1000 nm (Próximos do infravermelho) são escolhidos para tratar tecidos mais profundamente (MELIS, 2012; CHUNG, 2012).

Já segundo Avci et al. (2013), a fototerapia utiliza comprimentos de onda de luz entre 390 e 1100 nm e pode ser contínua ou pulsada. Em circunstâncias normais, utiliza fluências (0,04-50 J / cm<sup>2</sup>) e densidades de potência (<100 mW / cm<sup>2</sup>) relativamente baixas. Segundo Huang et al. (2011) em relação a fluência ou dose, esta pode variar de 1 a 20 J/cm<sup>2</sup>.

Os Comprimentos de onda descritos são de 390-600 nm usados para tratar tecido superficial, e comprimentos de onda mais longos na faixa de 600-1100 nm, que penetram mais, são usados para tratar tecidos mais profundos (Figura 2).



**Figura 2-** Profundidades de penetração de tecidos de acordo com variados comprimentos de onda. Fonte: Adaptado AVCI, 2013.

Os efeitos do laser também podem diferir de acordo com o comprimento de onda utilizado. Em um estudo recente, Gupta et al. avaliaram o tratamento com diferentes comprimentos de onda (635, 730, 810, 980 nm) e dose constante de 4 J/cm<sup>2</sup>, no qual foram avaliados modelo de abrasão dérmica em ratos. O mesmo mostrou diferentes resultados nos efeitos do laser de acordo com o comprimento de onda, sendo o de 635 e 810 nm os comprimentos de onda com melhor resultado na cura da ferida. Evidenciando-se uma diminuição significativa da área da ferida ( $p < 0,05$ ), acumulação de colágeno melhorada e completa reepitelização em comparação com outros comprimentos de onda e os controles não tratados (GUPTA et al., 2014).

A resposta bifásica em relação à dose, que pode ser explicada pela lei de “Arndt-Schulz”, tem seu princípio afirmando que um fraco estímulo acelera ligeiramente a atividade, e estímulos mais fortes aumentam ainda mais essa atividade, até que um pico seja atingido e um estímulo mais forte ainda poderá suprimir a atividade, ou seja se a luz aplicada não é de irradiância suficiente ou o tempo de irradiação é demasiado curto, então não há nenhuma resposta. Se a

irradiância é muito alta ou tempo de irradiação é muito longo, em seguida, a resposta pode ser inibida (MARTIUS, 1923). Então, por meio dessa dosagem bifásica, foi demonstrado que não existem parâmetros de irradiação e dose ideais ainda estabelecidos, estes provavelmente ainda irão variar de acordo com a patologia, superfície da mucosa ou pele (variando nas camadas celulares e profundidades a partir da superfície de aplicação) e fatores individuais associados ao paciente (HUANG, 2011).

Há dificuldade muitas vezes de interpretação da curva dose-resposta bifásica em relação ao LBI, devido ao desacordo existente da definição de “dose”. Muitos pesquisadores definem a fluência ou densidade de energia ( $J/cm^2$ ) como principal métrica de dose, enquanto outros utilizam a energia (Joules) para defini-la. O que se percebeu de fato na curva dose-resposta é que “mais” não significa necessariamente “melhor”. Com os avanços feitos sobre a compreensão mecanicista de atuação do laser em nível celular, pode-se sugerir que uma pequena luz pode ser benéfica e ao mesmo tempo, muita luz pode ser prejudicial (HUANG et al., 2011).

### **2.1.2 Laser e seus efeitos biológicos**

O Laser é uma onda eletromagnética, constituída por um feixe de fótons, envolvendo a exposição de células e tecidos a baixos níveis de luz vermelha e próximo do Infravermelho, sendo denominado como de Baixa Intensidade (LBI) devido à utilização de sua luz ser em densidades de energia mais baixa do que em comparação a outras formas de laser, como os Lasers de Alta Intensidade (LAI), que são utilizadas para ablação, corte e cauterização de tecidos. O LBI também é conhecido como uma terapia não térmica devido as densidades e potências utilizadas serem inferiores as necessárias para produzir aquecimento de tecidos (CHUNG et al., 2012).

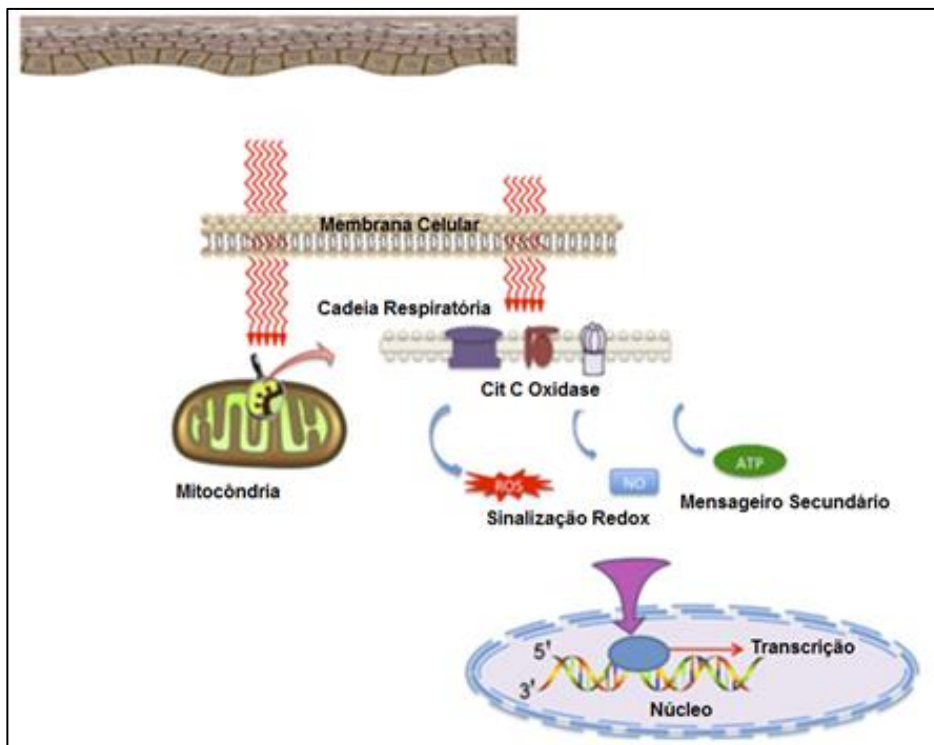
As diferenças entre os vários tipos de lasers são dadas em parte pela variação entre os comprimentos de onda, além dos efeitos biológicos intimamente relacionados com a dose. Os lasers podem ser contínuos ou pulsados e sua potência é expressa em Watts (W), sua densidade de energia medida em Joules

por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ), sendo igual à potência multiplicada pelo tempo de aplicação (ZECHA et al., 2016).

Os mecanismos envolvidos com a fotobiomodulação por LBI ainda não são totalmente compreendidos e esclarecidos. A falta de consistência nos dados históricos de dosagem tem sido um empecilho na interpretação detalhada da atividade do laser. Porém, sabe-se que tem uma ampla variedade de efeitos nos mais diversos níveis, como moleculares, celulares e tissulares (CHUNG, 2012).

O mecanismo biológico diretamente envolvido com os efeitos do laser é proposto pela absorção da luz vermelha e infravermelha por cromóforos, em particular, o Citocromo C Oxidase (CCO), o qual é unidade da cadeia respiratória localizado no interior das mitocôndrias (KARU, 2005). A hipótese é que esta absorção de energia luminosa leva a fotodissociação do óxido nítrico inibitório de CCO, levando ao aumento da atividade enzimática, transporte de elétrons, favorecendo a respiração mitocondrial e produção de trifosfato de adenosina (ATP). Por sua vez, a Terapia com laser altera o estado redox da célula, que induz a ativação de inúmeras vias de sinalização intracelular e altera a afinidade dos fatores de transcrição relacionados à proliferação celular, à sobrevivência, ao reparo tecidual e à regeneração (CHUNG, 2012; AVCI, 2013).

A figura 3 mostra um esquema representando a absorção da luz infravermelha ou próxima do vermelho por cromóforos ou fotoreceptores celulares específicos localizados na mitocôndria. Durante esse processo na mitocôndria, ocorre na cadeia respiratória, produção de ATP aumentada, geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e liberação ou geração de Óxido Nítrico (NO). Estas respostas, por sua vez, podem alterar a transcrição através da ativação dos fatores de transcrição.



**Figura 3-** Mecanismos Celulares do Laser Baixa Intensidade (LBI). Fonte: Adaptado de AVCI, 2013

O LBI influencia alguns parâmetros de Estresse Oxidativo, como mudanças na atividade enzimática antioxidante e na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A dosagem, o tempo de exposição e a intensidade podem alterar a produção excessiva de EROs (ERTHAL et al., 2016). Segundo Schneider e Oliveira (2004), as EROs são produzidas naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos, sendo importantes em situações de necessidade de ativação do sistema imunológico. Por outro lado, a produção excessiva de EROs pode levar a situação de estresse oxidativo com efeitos prejudiciais ao organismo, tais como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e agressão ao DNA.

As EROs podem ser benéficas e prejudiciais. Em condições fisiológicas normais, sua produção é rigidamente controlada e existe uma participação tanto de defesa do patógeno quanto de sinalização celular (WAGENER et al., 2013).

Os efeitos desencadeados pela Fototerapia são diversos por conta da variação da luz emitida em diferentes comprimentos de onda, no qual sabe-se que entre 600-1000nm correspondem a região espectral eletromagnética

vermelha e infravermelha e que a energia pode ser absorvida por componentes do ciclo respiratório, os fotorreceptores (LIMA et al., 2010; LIMA et al. 2014).

Em uma lesão tecidual há um processo inflamatório que torna o microambiente alterado, resultando em diminuição de pH, diminuição da concentração de oxigênio celular, aumento de ATP livre, expressão e liberação de mediadores (HOUK et al., 2011). Derivado dessas modificações há adaptações nas células íntegras que se encontram nesse meio em reparo, um dos principais processos se dá na mitocôndria, a qual na presença de baixas concentrações de oxigênio libera o Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF1) que promove ligações irreversíveis com subunidades no Citocromo C-Oxidase (Cco) (TAYLOR; MONCADA, 2010). A Fototerapia quebra essas ligações e permite a respiração mitocondrial desencadeando várias funções, as quais resultam na melhora do quadro inflamatório (BARATTO et al., 2011).

## **2.2 INFLAMAÇÃO**

A inflamação é uma resposta adaptativa do organismo desencadeada por estímulos e condições nocivas, bem como lesões teciduais, sendo dinâmica e desenvolvida ao longo da evolução para defender o hospedeiro contra a invasão dos patógenos. Portanto, independentemente da causa, a inflamação presumivelmente evoluiu como uma resposta adaptativa do organismo para restaurar a homeostase (MEDZHITOV, 2008).

Os sinais clássicos da resposta inflamatória são descritos como calor, rubor, edema, dor e perda de função. Esses sinais são consequência de alterações nos vasos sanguíneos como a contração da musculatura lisa endotelial, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular levando a um consequente extravasamento de fluido, o qual é rico em proteínas, para o tecido, seguido de infiltração celular (NATHAN, 2002; SERHAN, 2004).

De acordo com o tempo de duração e as características patológicas, a inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica. A aguda apresenta curta duração (de horas a dias) e é uma resposta imediata e inicial a um agressor (CRUVINEL et al., 2010). Durante esse processo, diversos mediadores como o

óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas promovem principalmente vasodilatação, que é uma das principais características desta fase, causando aumento da permeabilidade vascular e exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (eventos vasculares), migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos para o foco inflamatório (eventos celulares) e alterações sistêmicas tais como dor, febre e elevação nos níveis de proteínas como fibrinogênio, componentes C3 e C5 do sistema complemento, proteína C reativa, entre outras (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Já a progressão para a fase crônica é de duração prolongada estendendo-se de semanas a meses e caracteriza-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos, ocorrendo simultaneamente: a presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008).

Uma resposta aguda controlada tem papel benéfico para o organismo (FULLERTON et al., 2016). Os mediadores que regulam o processo inflamatório são moléculas solúveis oriundas de células, do plasma ou de proteínas da matriz que agem em células inflamatórias alvo através de receptores específicos (LUSTER et al., 2005). O efeito principal e mais imediato destes mediadores é gerar um exsudato inflamatório local: proteínas do plasma e leucócitos (sobretudo neutrófilos) que são normalmente restritos aos vasos sanguíneos, agora obtêm acesso através das vénulas pós-capilares, para os tecidos extra vasculares no local da lesão (POBER; SESSA, 2007).

No entanto, esta resposta pode tornar-se prejudicial quando o processo é desregulado e exacerbado. Inflamação descontrolada está subjacente a muitas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, artrite, asma, além de está muitas vezes ligada ao desenvolvimento do câncer (LALRINZUALI et al., 2016). Há um progresso considerável na compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na resposta inflamatória aguda a uma infecção e à lesão tecidual. Além disso, ainda são mal compreendidos os eventos que levam a uma inflamação crônica localizada, particularmente nos casos de infecções crônicas e doenças autoimunes (MEDZHITOV, 2008; KOTAS, 2015).

Assim, na evolução do processo inflamatório, após o reconhecimento do agente lesivo, o qual levará a ativação do sistema imune com consequente ativação de células e liberação de diversos mediadores, os mesmos terão sua ação centrada principalmente sobre eventos celulares e vasculares (TAKASA, 2006).

### **2.2.1 Eventos vasculares da inflamação**

Os eventos vasculares que ocorrem no processo inflamatório incluem a quebra do fluxo laminar sanguíneo, ocorrendo formação de edema, que é um sinal precoce da inflamação aguda, devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas dos compartimentos intravasculares para o interstício ocasionado pelo aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, aumentadas através de mediadores, sendo um resultado da liberação de aminas vasoativas como histamina, bradicinina, serotonina, leucotrienos, produtos da ativação do complemento e da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no local inflamado (CRUVINEL et al., 2010).

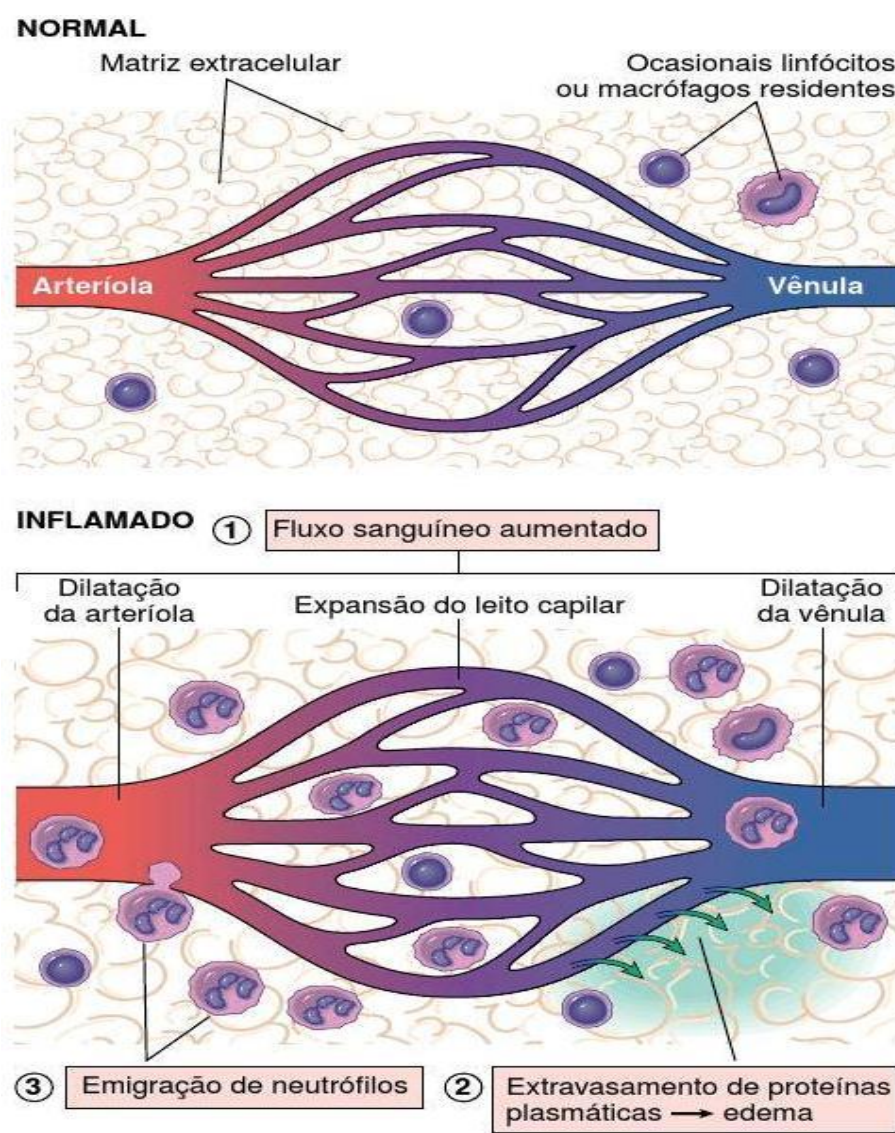
O aumento da permeabilidade vascular é decorrente de diferentes mecanismos, dependendo dos receptores ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso sanguíneo. Sabe-se que a histamina e os leucotrienos causam contração endotelial; interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) participam da reorganização do citoesqueleto endotelial; leucócitos e agentes invasores provocam lesão vascular direta e extravasamento de fluidos; fator de crescimento endotelial vascular gera aumento da transcitose e neovascularização, que também provoca extravasamento de fluidos (MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Inicialmente, extravasam do leito capilar eletrólitos e pequenas moléculas, constituindo o transudato; posteriormente, moléculas maiores como albumina e fibrinogênio, constituindo o exsudato. A saída de proteínas para o espaço extravascular é acompanhada de água, e marginalização dos leucócitos, que passam a circular junto ao endotélio. O endotélio local toma-se ativado, expressando moléculas de superfície que favorecem a aderência dos leucócitos e a eventual migração destes para os tecidos. Macrófagos residentes no tecido



lesado liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

A figura 4 mostra as principais manifestações locais da inflamação aguda comparadas ao estado normal, sendo elas: (1) dilatação vascular e aumento do fluxo sanguíneo (causando rubor e calor), (2) extravasamento de líquido e proteínas plasmáticas (edema), (3) emigração e acúmulo dos leucócitos (principalmente os neutrófilos) no local da lesão (KUMAR et al., 2008).



**Figura 4-** Evolução da inflamação aguda. Alterações vasculares e celulares induzida pelo processo inflamatório. Fonte: KUMAR et al., 2008.

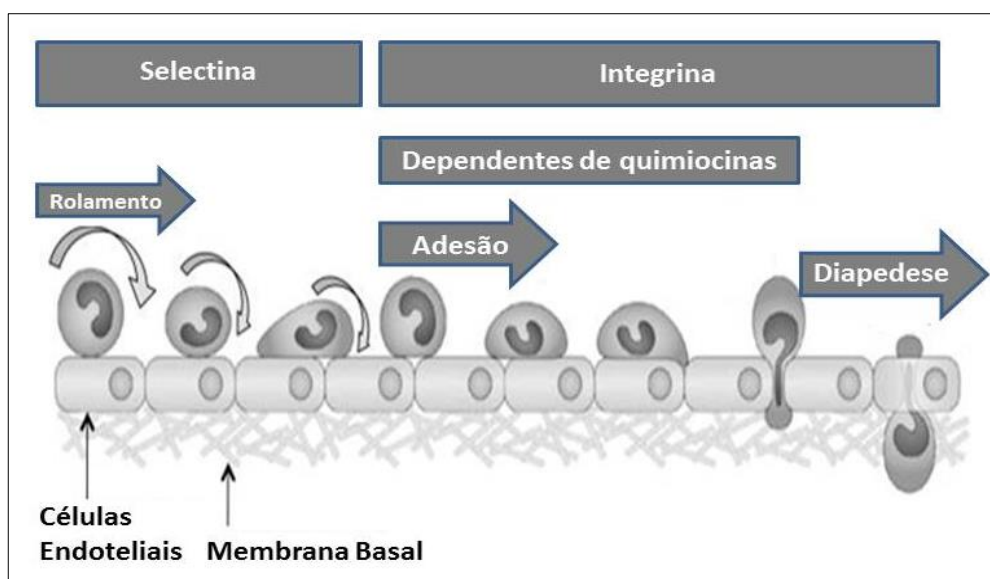
### 2.2.2 Eventos celulares da inflamação

O processo inflamatório é constituído, além de eventos vasculares, da ação de células de defesa, se destacando na fase aguda os neutrófilos. A função dos neutrófilos é essencial como uma primeira linha de defesa contra patógenos invasores (THOMAS; SCHRODER, 2013). Utilizam-se vários mecanismos efetores para destruir patógenos, tais como fagocitose, liberação de enzimas antimicrobianas ou fatores tóxicos, geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais induzem danos no tecido pelo estresse oxidativo, além de liberação ativa de material nuclear (DNA, histonas e outras proteínas de cromatina) agregando armadilhas extracelulares dos neutrófilos (PACHER et al., 2007; OSTUNI et al., 2016).

Sendo os Neutrófilos as primeiras células recrutadas para o local da lesão, eles desempenham um papel fundamental em diferentes tipos de inflamação, sendo sua ação condicionada por citocinas inflamatórias e alterações teciduais características, bem como alterações inflamatórias do endotélio e, possivelmente, outros tecidos subendoteliais. Um processo com várias etapas é desencadeado no ambiente inflamatório do tecido, levando a transmigração de neutrófilos através da parede do vaso, também chamada de extravasamento (MÓCSAI, 2015). Como a maioria das células envolvidas nas respostas imunes, os neutrófilos não são estáticos em um determinado local. Normalmente, fluem livremente no sangue circulante, ao longo do endotélio vascular. No local da inflamação, os neutrófilos passam por processos de vários passos envolvendo mediadores pró-inflamatórios, moléculas de adesão, quimioatraentes e quimiocinas (PARKIN; COHEN, 2001).

Nos eventos celulares do processo inflamatório, os leucócitos, principalmente os neutrófilos, começam a migrar para a região vascular periférica, devido a ativação do endotélio que permite um extravasamento seletivo, fenômeno esse chamado de marginação (POBER; SESSA, 2007). Posteriormente, essas células interagem com moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas), de natureza proteica, importante na modulação da migração, pois possibilitam a adesão do leucócito ao endotélio (MCEVER, 1991).

No esquema da figura abaixo (Figura 5), observa-se as etapas de rolamento de leucócitos, adesão e diapedese para o exterior dos vasos sanguíneos. Os passos iniciais de rolamento e rolamento lento são em grande parte mediados pela selectina, no entanto, um número de integrinas contribui para eventos de rolamento. Após a ativação celular, leucócitos tornam-se firmemente aderidos ao endotélio e começam o processo de migração através das células endoteliais vasculares (diapedese) (LOWELL; MAYADAS, 2012).



**Figura 5-** Recrutamento de leucócitos dependente de Integrinas. Fonte: Adaptado de LOWELL; MAYADAS, 2012.

Após a migração para o sítio da lesão, ocorre a liberação de vários mediadores, em especial componentes do sistema complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas. Ocorre ação dos neutrófilos em eliminar os agentes invasores, liberando o conteúdo tóxicos de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; HEADLAND; NORLING, 2015).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Descrever o efeito de duas doses diferentes do Laser de Baixa Intensidade em modelos experimentais de inflamação.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito de diferentes doses do LBI nos edemas de pata induzidos experimentalmente;
- Analisar o efeito do LBI na concentração de neutrófilos em modelos experimentais de inflamação;
- Avaliar os efeitos do LBI sobre os parâmetros histológicos na inflamação induzida experimentalmente;
- Descrever a ação do LBI no controle do estresse oxidativo inerente à inflamação através da dosagem de MDA e GSH.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Representação esquemática do delineamento experimental realizado.

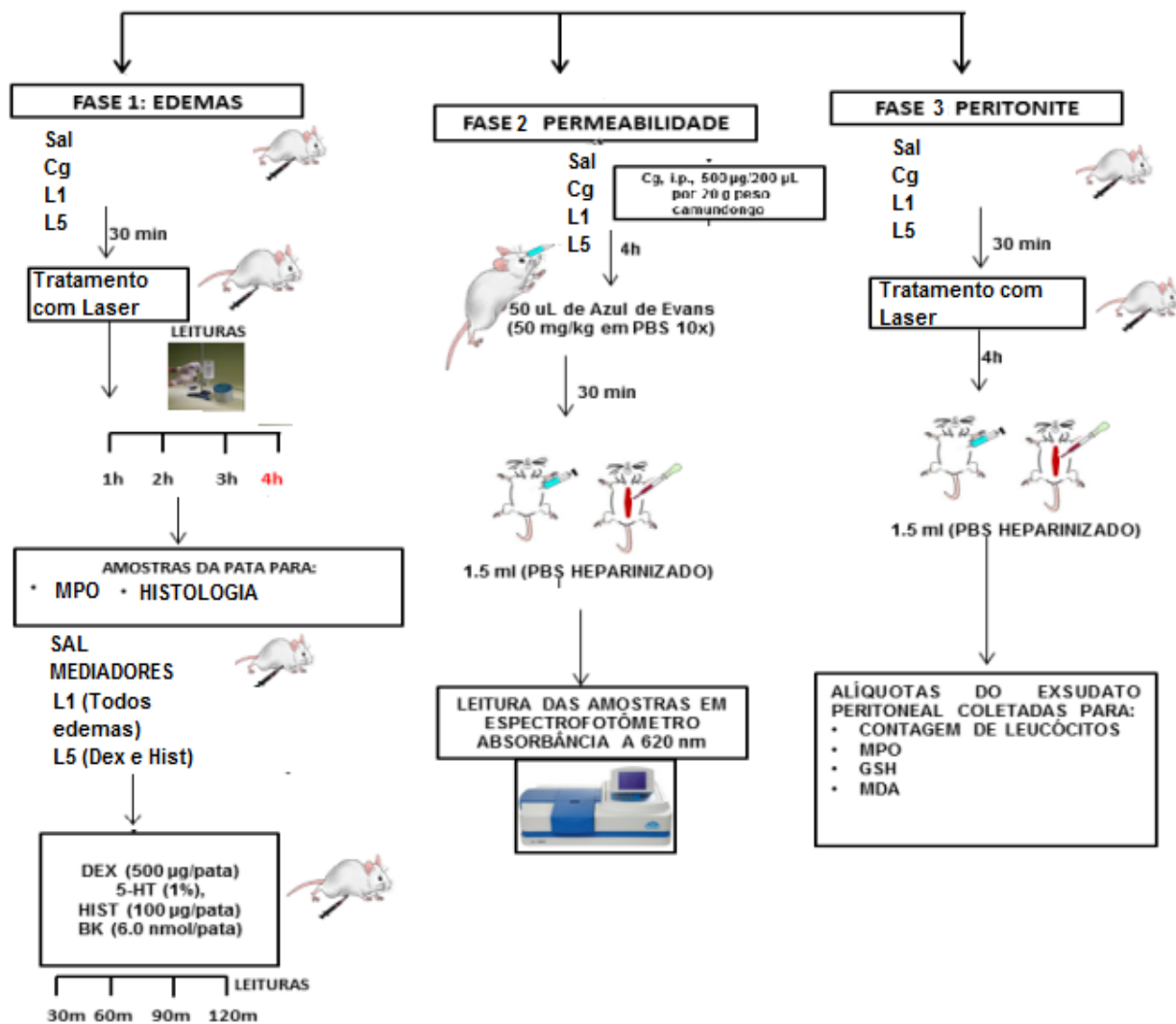


Figura 6- Representação esquemática do delineamento experimental.

## 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 25 e 30g fornecidos pelo Biotério de Manutenção de animais destinados a Experimentação do departamento de Morfofisiologia Veterinária CCA/UFPI. Foram alocados em ambiente sob temperatura controlada de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  com ciclo claro/escuro 12/12h com comida e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí sob protocolo n°. 038/15 (ANEXO1).

## 4.3 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA, DEXTRANA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

### 4.3.1 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 7 e 8 animais cada. No primeiro grupo (controle) foi administrado 0,9% de salina estéril; o segundo grupo (lesão) recebeu indução por injeção subplantar de 50  $\mu\text{l}$  de uma suspensão de carragenina (500  $\mu\text{g/pata}$ , 100 $\mu\text{l}$ ) em salina estéril a 0,9% na pata direita traseira, mas não recebeu qualquer tratamento; o terceiro (LBI 1J/cm<sup>2</sup>) e quarto grupos (LBI 5J/cm<sup>2</sup>) foram submetidos a indução de edema pela carragenina como descrito anteriormente, e após 30 minutos tratados com LBI com dose de 1J/cm<sup>2</sup> e 5J/cm<sup>2</sup>, assim como nas primeiras quatro horas foi utilizado o tratamento com laser terapêutico de baixa potência AsGa de comprimento de onda de 904 nm.

Para induzir edema de pata com mediadores inflamatórios, foram utilizados as mesmas quantidades de animais do experimento com carragenina em grupos experimentais semelhantes, sendo para indução de inflamação aplicadas injeções (50 $\mu\text{l}$  cada) de dextrana (500  $\mu\text{g/pata}$ ), Serotonina (1% w/v), Histamina (1%, w/v) e Bradicinina (6 nmol) na pata traseira direita como adaptado por Barbosa et al. (2009) e Vasconcelos et al. (2011). No experimento com a bradicinina, os animais foram pré-tratados com captopril (5mg/kg, ip) 1 hora antes da indução da bradicinina para evitar a degradação desse mediador inflamatório.

Um grupo recebeu 50 $\mu$ l de 0,9% de solução salina estéril e serviu como grupo controle não tratado. O volume da pata foi medido imediatamente antes (Volume zero) e em intervalos de tempo de 30 minutos até completar 2 horas.



**Figura 7-** Indução de edema na pata traseira direita do camundongo de acordo com o grupo.

#### 4.3.2 Tratamento com Laser

Um equipamento Laser AsGa de baixa intensidade (Gallium Arsenium, KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda., Brasil; Modelo LLT 0107), operando em comprimento de onda em 904nm foi usado por todo o experimento para irradiação das patas dos animais. Os parâmetros do laser são os seguintes: frequência de 80 Hz, potência de 50mW, tempo de irradiação de 12 e 60s, área irradiada de 0,01cm<sup>2</sup>; o qual corresponde a dose de 1J/cm<sup>2</sup> e 5J/cm<sup>2</sup>, energia total do tratamento foi de 0,078J na dose de 1J/cm<sup>2</sup> e de 0,384J na dose de 5J/cm<sup>2</sup>. A potência óptica do laser foi calibrada usando um Medidor Óptico Multifuncional Newport (modelo 1835-C).

Para o experimento com a carragenina, as aplicações ocorreram 30 minutos antes das medidas de edema de pata, sendo um total de 4 aplicações do tratamento a cada hora. Nos grupos com inflamação induzido por mediadores, a irradiação foi dada em 4 momentos: meia hora após a indução com os mediadores inflamatórios; 60, 90 e 120 minutos após a indução. A aplicação do laser foi realizada na pata traseira direita com aplicação pontual do laser nas

doses de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  e repetido o tratamento a cada hora ou meia hora, dependendo do experimento realizado.

**Quadro 1-** Parâmetros utilizados na Terapia com o Laser de Baixa Intensidade

PARÂMETROS	GRUPO 1 J	GRUPO 5 J
Comprimento de Onda (nm)	904	904
Tipo de Laser Diodo	AsGa	AsGa
Frequência (Hz)	80	80
Potência (mW)	50	50
Tempo de Irradiação (s)	12	60
Área irradiada ( $\text{cm}^2$ )	0,01	0,01
Dose ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	1	5



**Figura 8-** Aplicação pontual do Laser de Baixa Intensidade na pata traseira direita do camundongo.

#### 4.3.3 Avaliação do edema de pata

O volume das patas dos animais foi mensurado com um pletismômetro (PanLab LE 7500) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via sub-plantar nos animais nessa mesma pata. O volume da pata foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da



carragenina. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido por carragenina ocorre na 3ª h após a injeção desse estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

Então, meia hora depois de cada mensuração, os grupos experimentais foram tratados com Laser, com os parâmetros já citados. Depois da quarta hora, os animais foram sacrificados por meio de sedação e deslocamento cervical.

No edema induzido pelos mediadores, o volume da pata foi medido imediatamente antes (Volume zero) e em intervalos de tempo de 30 minutos até completar 2 horas. Então, foram sacrificados meia hora após o último tratamento. A avaliação da variação de volume do edema foi calculado como a inibição percentual relativa do volume da pata dos controles tratados com salina usando a fórmula seguinte (CHAVES, 2013):

%inibição do edema =  $\frac{(Vt-V0)control-(Vt-V0)tratado}{(Vt-V0)controle} \times 100$  . Em que Vo é o volume basal e Vt é o volume final mensurada nos tempos já indicados.



**Figura 9-** Avaliação do edema de pata no Pletismômetro

#### **4.3.4 Avaliação da ação da mieloperoxidase (MPO) no edema de pata induzido por Carragenina**

Foram retiradas amostras do tecido da pata dos camundongos e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , em microtubos de 1,5ml, para posterior dosagem da atividade de MPO no tecido. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e é um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos em processos inflamatórios em vários tecidos (BRADLEY et al.,1982). Para tanto, as amostras serão suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. Posteriormente sendo centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ ; o sobrenadante é, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO serão determinados por meio da técnica descrita por Bradley e Cols (1982). O sobrenadante foi então recolhido. Foram determinados os níveis de atividade da MPO no tecido usando 1% de peróxido de hidrogênio como um substrato para MPO. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade capaz de converter um umol de peróxido de hidrogênio em água, em 1 min a  $22^{\circ}\text{C}$ . O teste mede a degradação do peróxido de hidrogênio e a produção de ânion superóxido, a qual é responsável pela conversão de o-dianisidina a um composto castanho. A alteração na densidade óptica das amostras seguindo a adição de O-dianisidina foi medida pelo espectrofotômetro a 450 nm como uma função da reação de tempo. Os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO) / miligrama de tecido.

#### **4.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS ESCORES MICROSCÓPICOS DE LESÃO INFLAMATÓRIA**

Foi induzido edema pela injeção intraplantar de  $50\mu\text{L}$  de suspensão de carragenina ( $500\mu\text{g/pata}$ ) em solução salina estéril 0.9% na pata direita traseira dos animais. Dois outros grupos também receberam administração de carragenina e 30 minutos após foram tratados com LBI nas doses de 1 e  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , bem como nas primeiras quatro horas de experimento. Um grupo de animais não

recebeu estímulo inflamatório e recebeu 50 $\mu$ L de salina estéril 0,9%. Em seguida foram retirados segmentos da região sub-plantar dos animais dos grupos em estudo, que foram usados na avaliação histológica.

Os fragmentos de tecido da pata foram analisados quanto aos escores microscópicos de lesão inflamatória, sendo os segmentos de tecido fixados em solução de formaldeído tamponado com fosfatos a 10% (pH=7), lavados e submetidos à desidratação gradual crescente com soluções alcoólicas ascendentes de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de uma hora cada e por fim no álcool absoluto por uma hora e meia. O processo de diafanização foi feito em xilol I por 45 minutos e em xilol II por mais 45 minutos, inclusão em parafina líquida para banho I durante 15 a 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Quando derretida e resfriada a parafina, a mesma foi aparada em um bloco posteriormente cortado com lâmina de aço pelo micrótomo (LUPETEC®, MRP09). A desparafinização foi feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Seguiu-se a hidratação com álcool absoluto por 7 minutos, álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e água destilada II por dois minutos cada. A coloração foi feita com hematoxilina por 2 minutos, banho em água corrente por 3,5 minutos, seguido da coloração eosina por 5 minutos e banho em água corrente, foi secado em temperatura ambiente e seguido para a montagem das lâminas para visualização em microscópio de luz (NOVA®). Foram obtidas uma lâmina para cada animal. Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a severidade da inflamação pela técnica descrita por Appleyard e Wallace (1995) de acordo com o Quadro 2 a seguir.

**Quadro 2-** Avaliação dos escores microscópicos das lesões inflamatórias de animais com edema de pata induzido por carragenina

<b>Critério</b>	<b>Escore</b>
Tecido conjuntivo e epitelial saudáveis sem células inflamatórias visíveis	0
Tecido conjuntivo e epitelial com edema leve e células inflamatórias visíveis	1
Tecido conjuntivo e epitelial com edema moderado e células inflamatórias visíveis	2
Tecido conjuntivo e epitelial com edema intenso e células inflamatórias, ocorrência de congestão de vasos sanguíneos visível	3
Tecido conjuntivo e epitelial com edema grave e presença intensa de células inflamatórias, ocorrência de congestionamento vascular e vasodilatação vascular	4

Fonte: Modificado de Appleyard e Wallace, 1995.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR**

Foram administrados via intraperitoneal salina ou estímulo inflamatório (Cg, ip, 500 µg/200 µL por 20 g de peso do camundongo) após 30 minutos foi realizado o tratamento com laser na dose 1 e 5J/cm<sup>2</sup>, bem como a cada hora do experimento totalizando 4 aplicações de laser. A permeabilidade vascular foi analisada em camundongos através da mensuração do extravasamento de Azul de Evans, substâncias com elevada capacidade de ligação à albumina sérica. Após administração de 50 µL de Azul de Evans (50 mg/kg em PBS 10x) via plexo ocular, os animais foram eutanasiados 4 horas após a injeção de carragenina e a lavagem peritoneal foi realizada com 1,5 ml de PBS mais EDTA, e a quantidade de extravasamento de azul de Evans foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro a 620 nm após a realização de curva padrão. O veículo (solução salina estéril a 0,9% (p/v) foi utilizado como controle (THURSTON et al., 2000).

## 4.6 MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

### 4.6.1 Grupos Experimentais

28 animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 7 animais cada: grupo salina, foi injetado 250  $\mu\text{L}$  de solução salina 0,9%; grupo carragenina, foi injetado (i.p) 250  $\mu\text{L}$  de carragenina (500 $\mu\text{g}$ /cavidade) diluídos em 1 mL de salina estéril como indutor da inflamação; grupo laser 1 e grupo laser 5, receberam a mesma indução do grupo carragenina, mas foram irradiados com 1J/cm<sup>2</sup> e 5J/cm<sup>2</sup> de laser respectivamente. Após 30min, iniciou-se a administração do laser como descrito a seguir. Passadas quatro horas da indução da inflamação, sob sedação e por deslocamento cervical, os animais foram eutanasiados e então a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL da solução de PBS heparinizado, massageada e incisada com bisturi para coleta do líquido peritoneal.

### 4.6.2. Administração do Laser

A administração do laser seguiu o mesmo protocolo anterior, sendo a irradiação (1 e 5J/cm<sup>2</sup>) aplicada 30 minutos após a indução com a carragenina, e a cada hora seguinte até 4 horas de experimento. A aplicação do laser foi realizada na região abdominal em quatro quadrantes, os quais foram tricotomizados para a aplicação pontual do laser em cada uma das doses estudadas (Modificado de CORREA et al.,2007).



**Figura 10-** Aplicação pontual do Laser de Baixa Intensidade no peritoneo do camundongo.

#### **4.6.3 Contagem Total de Células**

Dos exsudatos peritoneais advindos do ensaio de peritonite foram realizadas as contagens total e diferencial dos leucócitos. Estas foram realizadas conforme metodologia descrita previamente por Souza e Ferreira (1985).

Para a contagem do número total de células presentes no lavado peritoneal foi utilizado 20 $\mu$ L do lavado após ser diluído em líquido de Tukey (380 $\mu$ L). A contagem foi realizada em uma câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico sob aumento de 40x. Os resultados são apresentados como o número de células por mililitros de exsudato peritoneal.

#### **4.6.4 Contagem Diferencial**

As contagens diferenciais (total de 100 células) foram realizadas sobre lâminas citocentrífugas coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados são apresentados como o número de células por mililitros de exsudato peritoneal.

#### **4.6.5 Ação da Mieloperoxidase (MPO)**

Foram retiradas amostras do líquido da cavidade peritoneal dos camundongos e armazenadas a -70°C, em microtubos de 1,5ml, para posterior dosagem da atividade de MPO no líquido peritoneal. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão). Posteriormente sendo centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley e Cols (1982). O sobrenadante foi então recolhido. Foram determinados os níveis de atividade da MPO no líquido usando 1% de peróxido de hidrogênio como um substrato para MPO. Uma unidade de MPO é definida como a quantidade capaz de converter um umol de peróxido de hidrogênio em água, em 1 min a 22 ° C. O teste mede a degradação do peróxido de hidrogênio e a produção de ânion superóxido, a qual é responsável pela conversão de o-dianisidina a um composto castanho. A alteração na densidade óptica das amostras seguindo a adição de O-dianisidina foi medida pelo espectrofotômetro a 450 nm como uma função da reação de tempo. Os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO) / mililitro de líquido peritoneal.

#### 4.6.6 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

Um dos produtos finais da peroxidação lipídica e que contribui para a reação inflamatória é o MDA. Para mensurar os níveis desse metabólito, amostras do líquido peritoneal foram coletadas e homogeneizadas separadamente em um *Homogenizer workcenter IKA® T10 basic* junto à uma solução de KCl (1ml da solução para 100mg de tecido). Foram colocados 250µl do homogenato de cada em tubos de ensaio, junto com 1,5ml de ácido fosfórico a 1% e 500ul de solução /de ácido barbitúrico a 0,6%. Os tubos com a mistura foram colocados em banho Maria *Quimis®* por 45min a 100°C e posteriormente, foram resfriados instantaneamente em um recipiente contendo água e gelo. Após esse processo, foram adicionados às amostras 2ml de n-butanol e em seguida, as mesmas foram agitadas em vórtex por 1min e centrifugadas (2500rpm durante 15min à 25°C). Após a centrifugação, retirou-se apenas a fase butanólica que foi colocada em tubos de ensaio e levada para um espectrofotômetro, onde foram feitas duas leituras em comprimentos de onda distintos, a primeira à 535nm e a outra à 520nm. A diferença de densidade óptica entre as duas mensurações foi calculada e as concentrações de MDA foram expressas em milimoles por ml de líquido (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

#### 4.6.7 Dosagem de Glutathiona (GSH)

O principal mecanismo de defesa antioxidantes do corpo é o tripeptídeo de aminoácidos Glutathiona (GSH) e para a sua mensuração, as amostras de líquido peritoneal foram separadas em 5 ml de solução de EDTA 0,02 M frio (1 mL 100 mg / tecido) em um *Homogenizer workcenter IKA® T10 basic*. As alíquotas (400 ul) do homogenato do tecido foram misturadas com 320 mL de água destilada e 80 mL de 50% (w / v) de ácido tricloroacético em tubos de vidro e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min. Em seguida, 400 ul de cada sobrenadante foi misturado com 800 uL de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e 20 mL de 0,01 M de 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico). Subsequentemente, as amostras foram agitadas durante 3 minutos e lidas num espectrofotômetro à 412 nm. A Concentração de GSH foi determinada através de uma curva padrão

reduzida gerada em paralelo e os resultados foram expressos em microgramas de GSH por mililitro de líquido peritoneal (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. As análises foram determinadas através do teste de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Student-Newman-Keuls para determinar significância estatística das diferenças entre os grupos e para os escores histopatológicos foi realizado por meio de teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism.

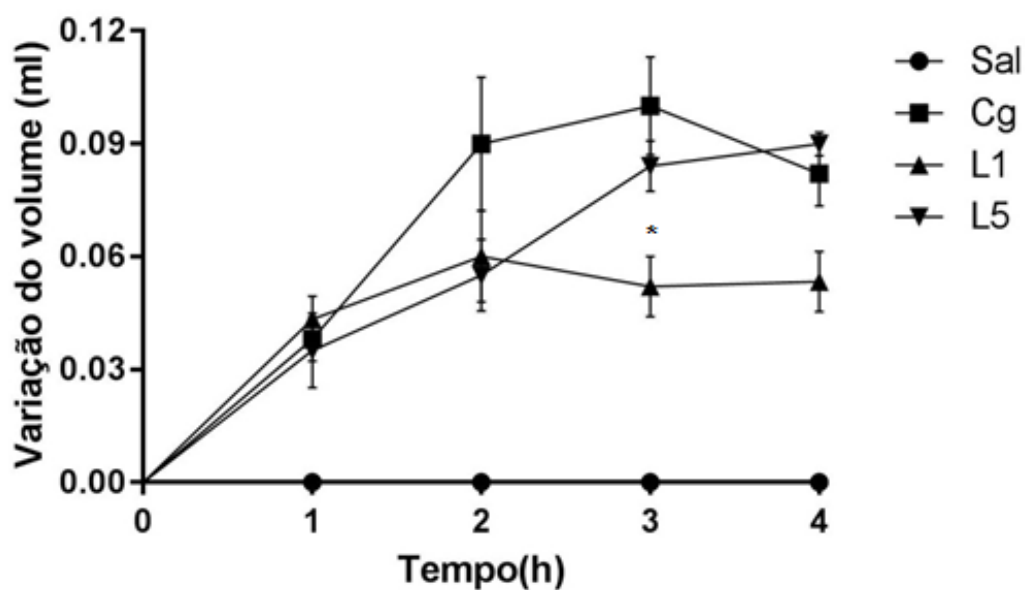


## 5 RESULTADOS

### 5.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

#### 5.1.1 Avaliação do edema de pata induzido por Carragenina

A administração de carragenina aumentou o volume da pata por um período de aproximadamente 4 horas. A formação do edema se deu rapidamente depois da injeção de carragenina e o volume da pata aumentou significativamente em todos os três grupos dentro da primeira hora em relação ao grupo salina. No grupo controle carragenina o edema continuou aumentando linearmente até a terceira hora e logo após diminuiu. Na primeira hora, ambos grupos Laser 1J e 5J mostraram medidas similares de volume do edema. No pico do edema que se dá na terceira hora, o grupo controle carragenina apresentou variação de volume de edema em  $0,1\pm 0,013$  ml; nos grupos L1 foi de  $0,052\pm 0,008$  ml e L5 de  $0,084\pm 0,006$  ml, equivalentes, respectivamente a uma redução de 48% e 16% em comparação ao grupo carragenina. Observa-se que o edema no grupo L5 foi crescente no decorrer das 4 horas.

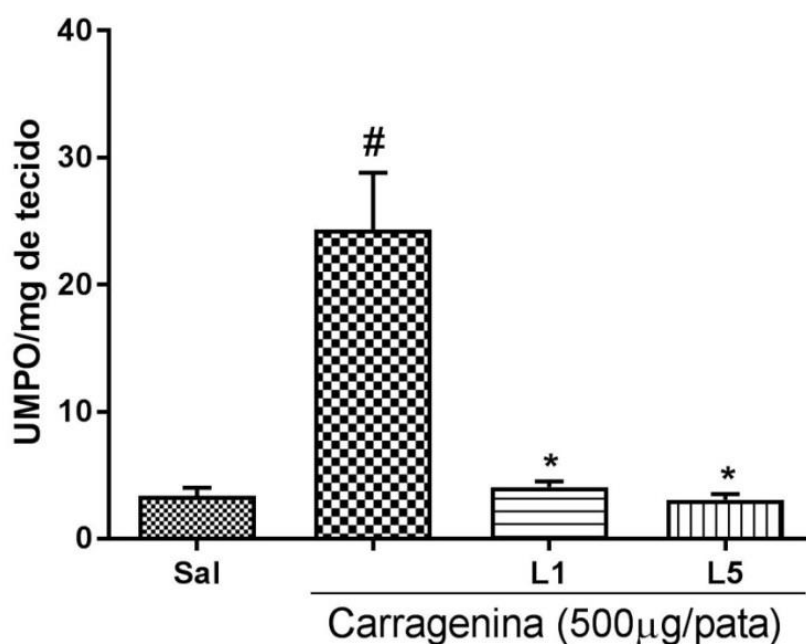


**Figura 11-** Avaliação do Edema Agudo de pata induzido por carragenina.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5 J/cm<sup>2</sup> após a administração de Carragenina na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 1, 2, 3 e 4 horas seguintes no pletoimetro. O tratamento com laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> foi mais eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo carragenina no pico da terceira hora. Os resultados são expressos com média +/- S.E.M. \*P<0,05 comparado com controle carragenina.

### 5.1.2 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A figura 12 mostra que ambas as doses de Laser diminuíram a concentração de neutrófilos a qual foi evidenciado pela mensuração da atividade de MPO no tecido da pata dos animais. O grupo controle carragenina apresentou concentração da atividade de MPO em  $24,35 \pm 4,46$  UMPO/mg; Nos grupos L1  $4,072 \pm 0,42$  UMPO/mg e L5  $3,062 \pm 0,45$  UMPO/mg, equivalentes respectivamente a uma redução de 83,2% e 87,4% em comparação ao grupo Carragenina.

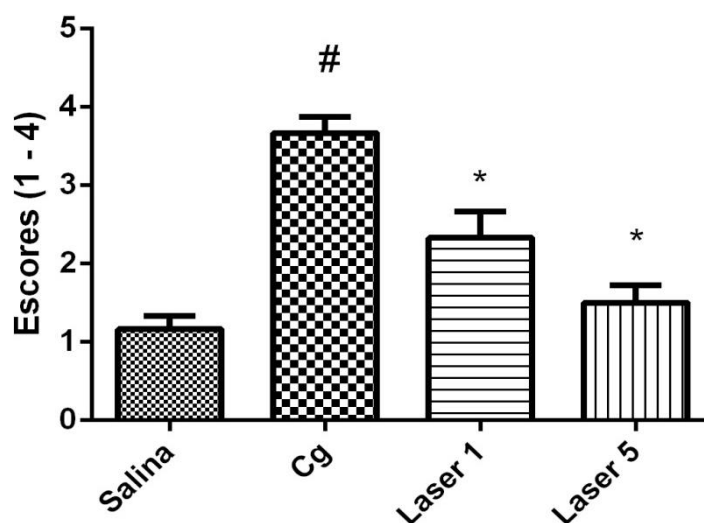


**Figura 12-** Efeito do LBI nas doses de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina em tecido de pata.

Legenda: Solução salina ou carragenina foi injetada na superfície plantar de animais, os quais foram tratados com LBI na dose de 1 e  $5\text{J}/\text{cm}^2$ . Atividade da mieloperoxidase (MPO) foi detectado no tecido das patas após 4 h. Os dois grupos tratados reduziram a concentração de neutrófilos em comparação ao grupo não tratado (Carragenina). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  SEM. \*Indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo Cg. # $P < 0,05$  comparado com o grupo da solução salina.

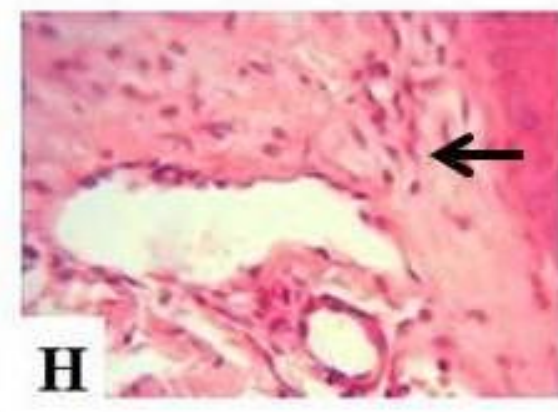
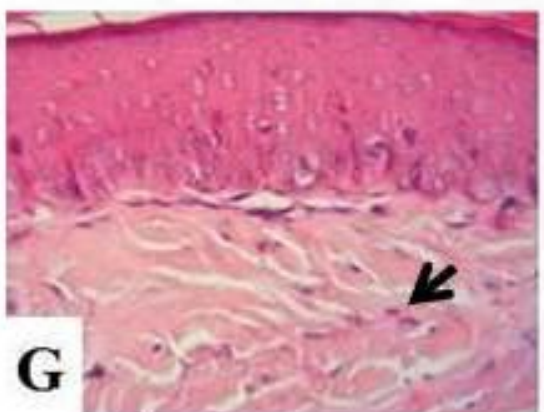
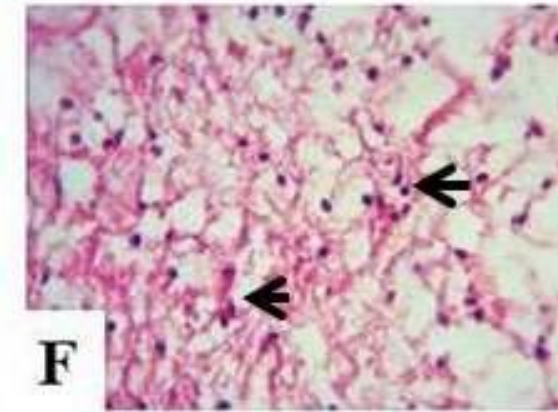
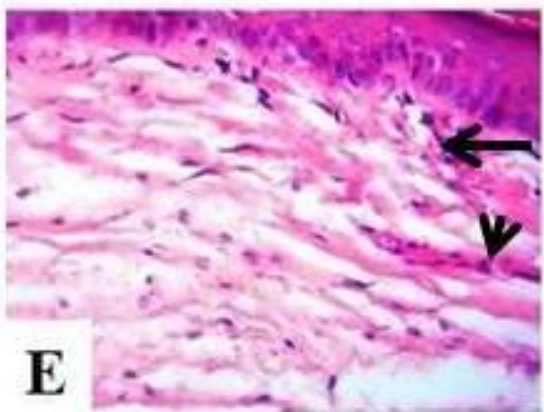
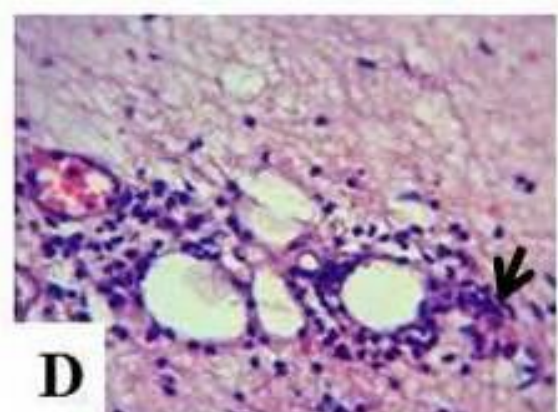
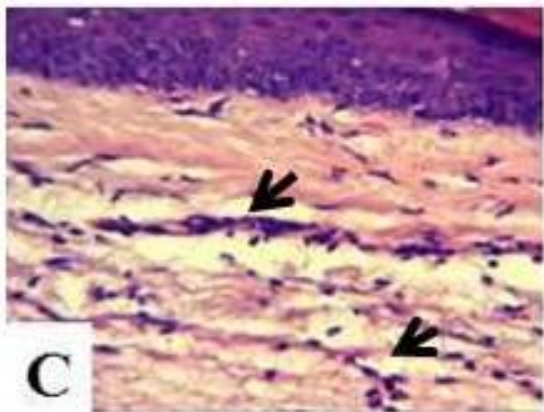
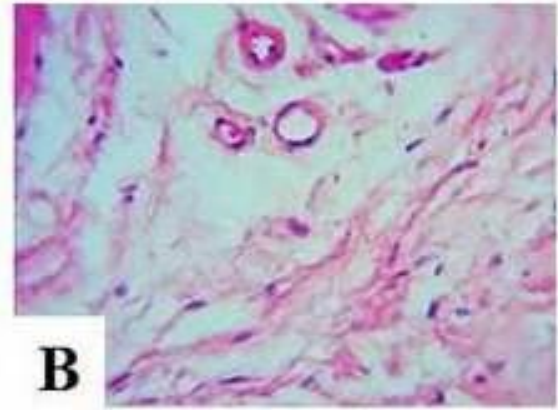
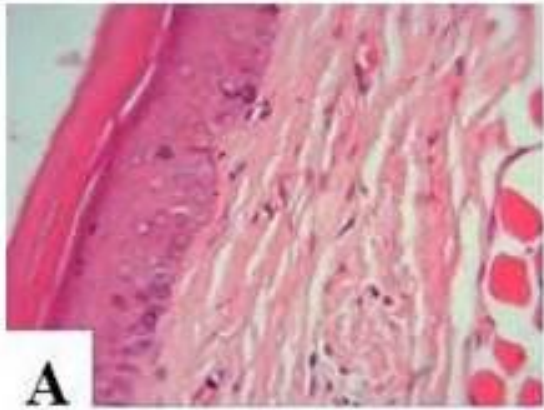
## 5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após submetidos ao edema de carragenina, o tecido da pata dos animais foi coletado para análise histológica. Os resultados mostram que os animais do grupo salina apresentaram menores pontuações de escores microscópicos para parâmetros avaliados (Figura 13), através da análise da fotomicrografia fica evidente a manutenção da arquitetura tecidual e o baixo número de células inflamatórias no tecido. Em contraste, o grupo que recebeu a injeção de carragenina apresentou significativa mudança no aspecto tecidual com alta infiltração de células inflamatórias, atingindo uma pontuação de escores com média de  $3,66 \pm 0,210$  (representado na figura 13 e figura 14.C e 14.D). O laser mostrou diminuição dos parâmetros em comparação ao grupo carragenina quando tratados nas duas doses de 1 e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  (Figura 13 e Figura 14.E/14.F/14.G/14.H) e os escores tiveram médias  $2,33 \pm 0,33$  e  $1,5 \pm 0,22$  respectivamente, caracterizando uma diminuição de 36,3% no L1 e 59% no L5 quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento.



**Figura 13.** Efeito do Laser na dose 1 e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  nos escores de lesão microscópica histológica da pata.

Legenda: Os escores de lesão foram mensurados após edema de pata induzido por Carragenina ( $500\mu\text{g}/\text{pata}$ ). A avaliação de escores microscópicos foi realizada conforme proposto por Apleyard e Wallace, 1995. O grupos laser 1 e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  mostraram diminuição dos parâmetros avaliados em comparação ao grupo carragenina. \*Indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo Cg. # $P < 0,05$  comparado com o grupo da solução salina.



**Figura 14-** Microfotografia representando o efeito do laser nas doses de 1 e 5 J/cm<sup>2</sup> sobre os danos microscópicos da lesão tecidual provocada pela indução por carragenina. Setas indicam infiltrado inflamatório.

Legenda: **A)** Mostra epiderme e derme papilar (superficial) do grupo salina. **B)** Tecido conjuntivo da derme reticular (profunda) do grupo salina com tecidos normais. **C)** Indica a epiderme e a derme papilar (superficial) do grupo carragenina com edema e células inflamatórias intensas. **D)** Tecido conjuntivo da derme reticular (profunda) do grupo carragenina com edema, células inflamatórias intensas e vasodilatação vascular. **E)** Tecido conjuntivo da derme reticular (profunda) do grupo laser 1 com edema e células inflamatórias leves. **F)** Tecido conjuntivo da derme reticular (profunda) do grupo laser 1 com edema e células inflamatórias leves. **G)** Indica a epiderme e a derme papilar (superficial) do grupo laser 5 com edema leve e células inflamatórias. **H)** Tecido conjuntivo da derme reticular (profunda) do grupo laser 5 com edema leve e redução de células inflamatórias.

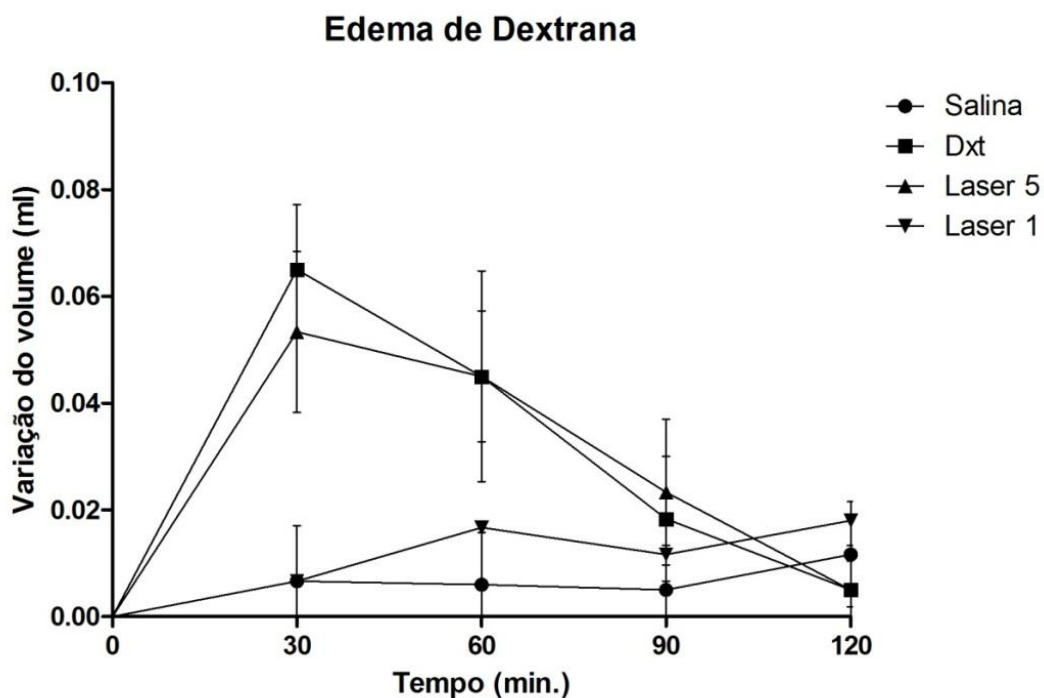
### **5.3 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

A administração dos mediadores inflamatórios aumentou o volume da pata por um período de aproximadamente 120 minutos. A formação do edema ocorreu de maneira significativa nos primeiros 30 minutos após a injeção com todos os estímulos inflamatórios, onde é o tempo de pico do edema (SANTIAGO et al., 2015).

#### **5.3.1 Edema de pata induzido por dextrana**

A administração de dextrana aumentou o volume da pata por um período de aproximadamente 120 minutos. A formação do edema ocorreu principalmente nos primeiros 30 minutos após a injeção com dextrana, onde é o tempo de pico do edema (SANTIAGO et al., 2015).

A dose laser de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  mostrou uma redução significativa no volume da pata ( $0,006\pm 0,002$  ml) depois de 30 minutos de indução do edema com Dextrana ( $0,076\pm 0,011$  ml), equivalente, a uma redução de 92,1%. Já a dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  não mostrou redução significativa no volume da pata ( $0,053 \pm 0,006$  ml) depois de 30 minutos de indução da inflamação com Dextrana.



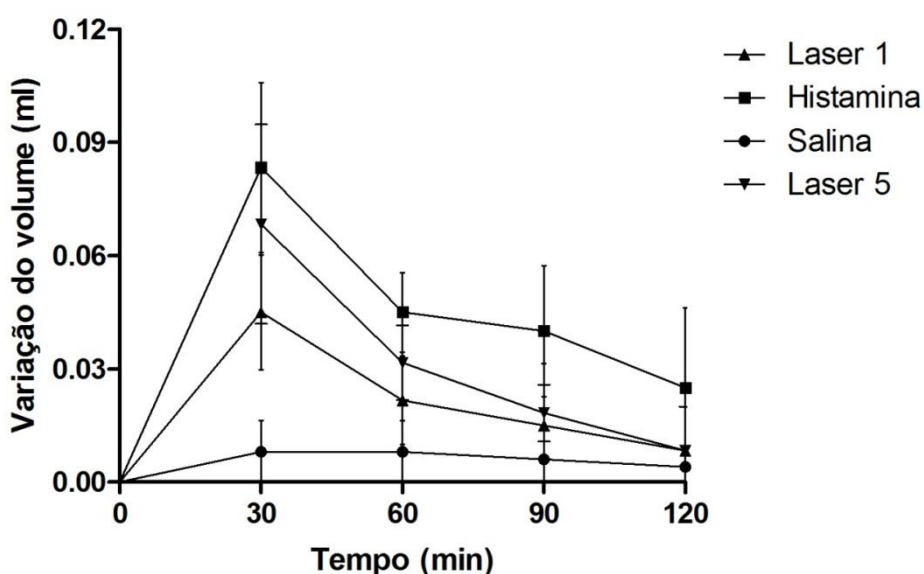
**Figura 15-** Avaliação do edema de pata induzido por Dextrana e tratado com laser na dose de  $1e\ 5J/cm^2$ .

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e  $5\ J/cm^2$  após a administração de Dextrana na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min. O tratamento com laser na dose de  $1J/cm^2$  foi mais eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo dextrana no pico de 30 minutos. O grupo L5 não reduziu significativamente o edema no pico de 30 minutos. Os resultados são expressos com média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0,05$  comparado com controle Dextrana.



### 5.3.2 Edema de pata induzido por Histamina

O tratamento com laser na dose 1 J/cm<sup>2</sup> reduziu o edema em comparação ao grupo Histamina. No pico do edema (30 minutos) o grupo controle Histamina apresentou variação de volume do edema em 0,083±0,009 ml; no grupo L1 foi de 0,045±0,006 ml, equivalente a uma redução de 45,7% em comparação ao grupo Histamina. Já a dose de 5J/cm<sup>2</sup> não mostrou redução significativa no volume da pata (0,068 ±0,01 ml) depois de 30 minutos de indução da inflamação com Histamina (0,081 ±0,007 ml).

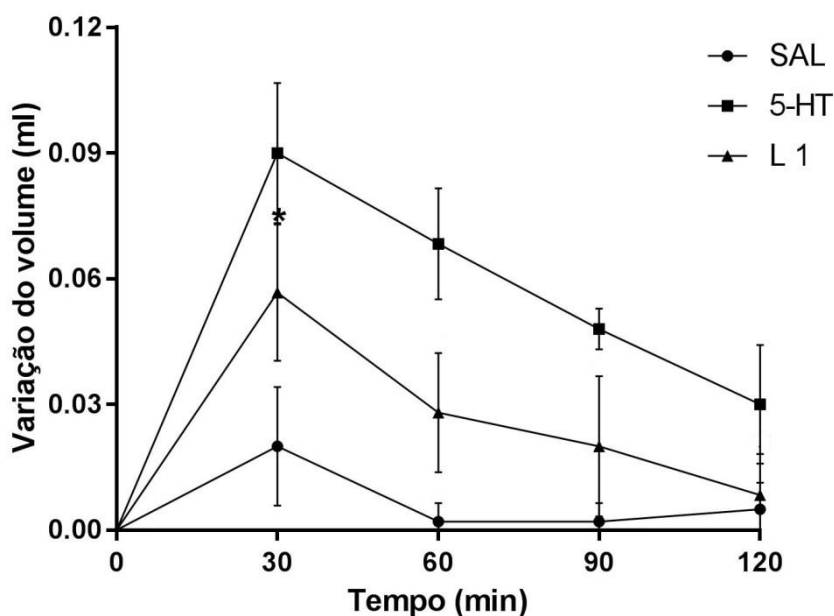


**Figura 16-** Edema de pata induzido por Histamina.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5 J após a administração de Histamina na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min para mensurar o edema. O tratamento com laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> foi mais eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo histamina no pico de 30 minutos. Como o esperado, o grupo salina não apresentou qualquer efeito inflamatório. Os valores são representados como média +/- SEM. \*P<0,05 comparado com o grupo Histamina.

### 5.3.3 Edema de pata induzido por Serotonina

O tratamento com laser na dose 1 J/cm<sup>2</sup> reduziu o edema em comparação ao grupo Serotonina. No pico do edema (30 minutos) o grupo controle Serotonina apresentou variação de volume do edema em 0,09±0,006 ml; no grupo L1 foi de 0,06±0,007 ml, equivalente a uma redução de 33,3 % em comparação ao grupo Serotonina.

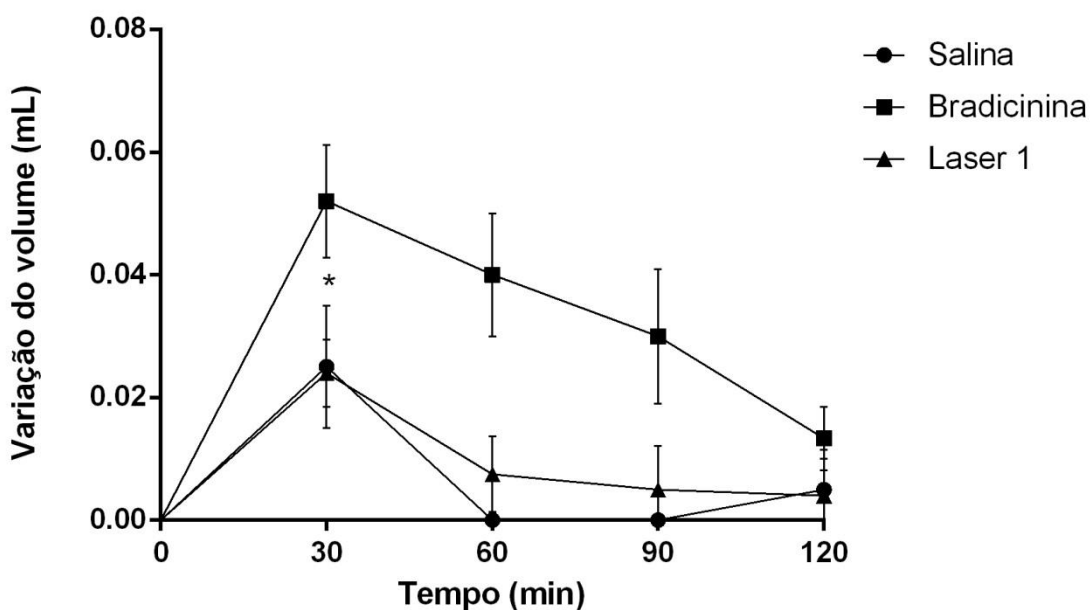


**Figura 17-** Edema de pata induzido por Serotonina

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> após a administração de Serotonina na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min. O tratamento com laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> reduziu significativamente o edema quando comparado ao grupo serotonina no pico de 30 minutos. Como o esperado, o grupo salina não apresentou qualquer efeito inflamatório. Os valores são representados como média +/- SEM. \*P<0,05 comparado com o grupo Serotonina.

### 5.3.4 Edema de pata induzido por Bradicinina

O tratamento com laser na dose 1 J/cm<sup>2</sup> reduziu o edema em comparação ao grupo Bradicinina. No pico do edema (30 minutos) o grupo controle Bradicinina apresentou variação de volume do edema em 0,052±0,003 ml; no grupo L1 foi de 0,024±0,002 ml, equivalente a uma redução de 53,8% em comparação ao grupo Bradicinina.

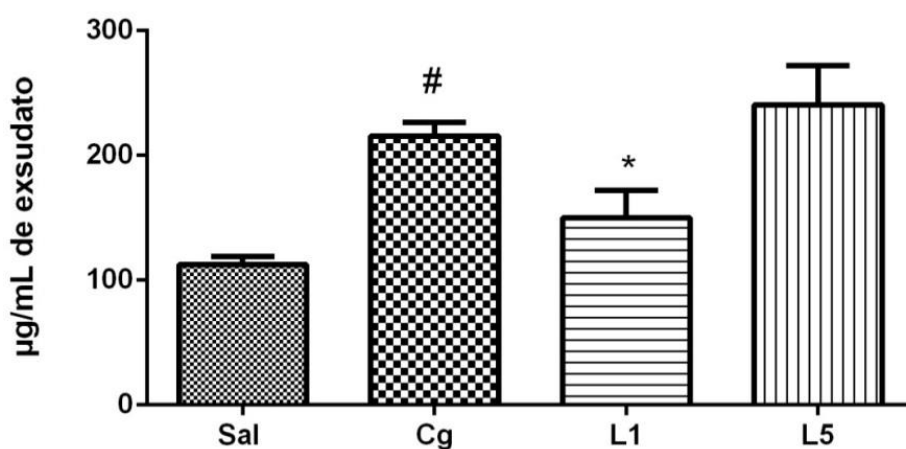


**Figura 18-** Edema de pata induzido por Bradicinina.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> após a administração de Bradicinina na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min para mensurar o edema. O tratamento com laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> reduziu significativamente o edema quando comparado ao grupo Bradicinina no pico de 30 minutos. Os valores são representados como média +/- SEM. \*P<0,05 comparado com o grupo Bradicinina.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

A figura 18 mostra que a administração de carragenina ( $215,6 \pm 11 \mu\text{g/ml}$  de exsudato) produziu um significativo aumento na permeabilidade vascular, em comparação com o grupo salina ( $112,4 \pm 6,3 \mu\text{g/ml}$  de exsudato). O tratamento com laser na dose de  $1\text{J/cm}^2$  reduziu significativamente a permeabilidade vascular ( $150,2 \pm 22 \mu\text{g/ml}$  de exsudato) em comparação ao grupo carragenina. No entanto, o tratamento na dose de  $5\text{J/cm}^2$  não reduziu de forma significativa a permeabilidade ( $240,7 \pm 31,3 \mu\text{g/ml}$  de exsudato).



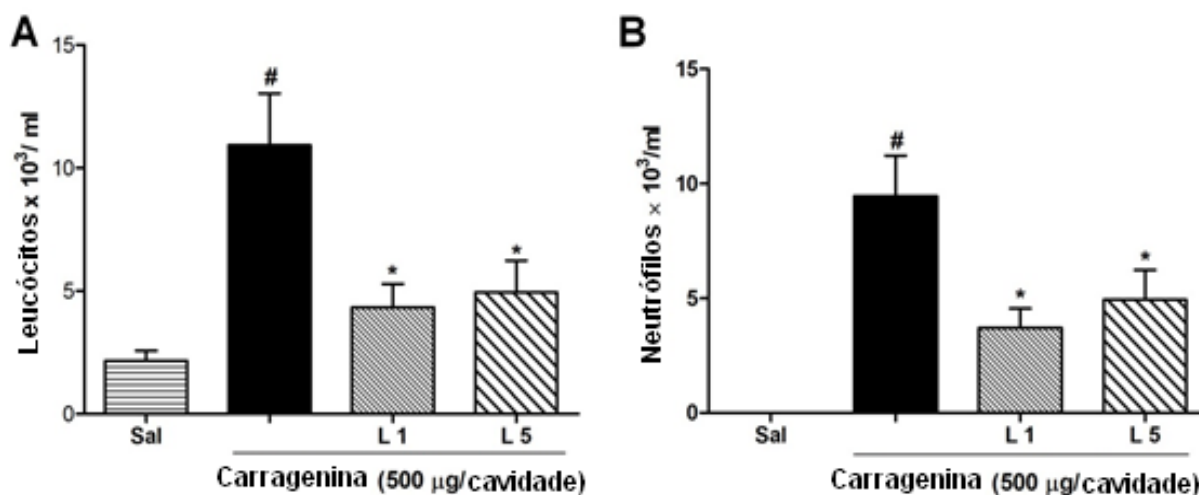
**Figura 19-** Efeito do laser na dose de 1 e  $5\text{J/cm}^2$  na permeabilidade vascular.

Legenda: Os camundongos receberam azul de Evans ( $50\text{mg/kg}$ ) via plexo ocular. Foi administrado a carragenina e 30 minutos após os animais foram tratados com laser nas duas doses de laser ( $1$  e  $5\text{J/cm}^2$ ). 4 horas após indução com carragenina os parâmetros bioquímicos foram analisados. O grupo tratado com laser na dose de  $1\text{J/cm}^2$  inibiu a permeabilidade vascular, enquanto a dose de  $5\text{J/cm}^2$  aumentou essa permeabilidade. \*Indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo Cg. # $P < 0,05$  comparado com o grupo da solução salina.

## 5.5 MODELO EXPERIMENTAL DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

### 5.5.1 Migração neutrofílica para cavidade peritoneal

A administração de carragenina promoveu um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) na contagem total de leucócitos ( $10,93 \pm 5,15 \times 10^6$  células/ml; Fig 19 a) e neutrófilos ( $9,46 \pm 4,31 \times 10^6$  células /ml; Fig 19 b) para a cavidade peritoneal. No entanto, o tratamento com laser nas doses de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  reduziram consideravelmente a contagem total de leucócitos ( $4,33 \pm 2,34 \times 10^6$  células /ml e  $4,95 \pm 2,86 \times 10^6$  células /ml, respectivamente) e diferencial de neutrófilo ( $3,7 \pm 0,85 \times 10^6$  células /ml e  $4,93 \pm 1,2 \times 10^6$  células /ml) para o peritoneo.

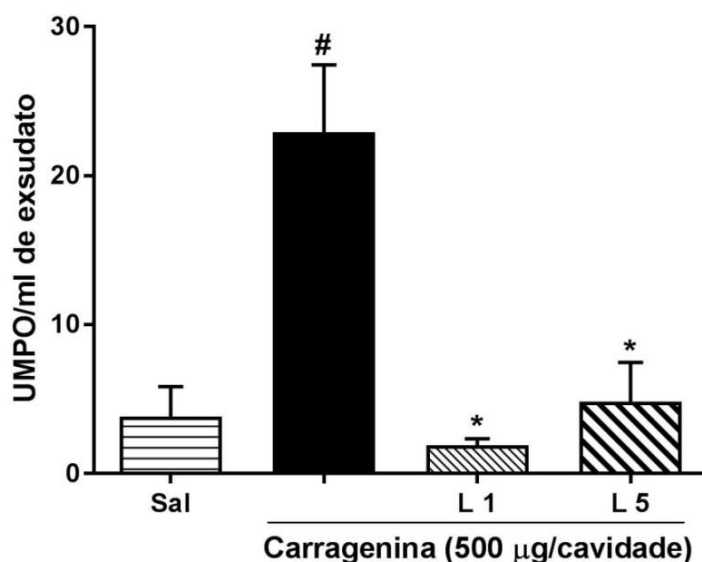


**Figura 20-** Contagem total de leucócitos (A) e contagem diferencial de neutrófilos(B) no líquido peritoneal.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  após a administração de Carragenina no peritoneo do animal. A migração celular foi avaliada 4 h mais tarde. (A) Contagem total de leucócitos e (B) Contagem diferencial de neutrófilos. Observou-se aumento no grupo que recebeu apenas carragenina e uma redução nos grupos tratados com Laser ( $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$ ). Os valores são representados como média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  comparado com o grupo de carragenina; # $P < 0,05$  comparado com o grupo da solução salina.

### 5.5.2 Ação da Mieloperoxidase (MPO)

O tratamento com laser induziu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na ação da mieloperoxidase, utilizada como um marcador bioquímico para a migração neutrofílica, corroborando com os dados da contagem diferencial de neutrófilos (Figura 21). Os valores do grupo salina foram  $3,835 \pm 2,015$  UMPO/ml, enquanto que o grupo carragenina foi de  $22,92 \pm 4,524$  UMPO/ml. O tratamento com o laser reduziu os valores para  $1,896 \pm 0,437$  UMPO/ml no grupo Laser 1 e para  $4,846 \pm 2,622$  UMPO/ml no grupo Laser 5, equivalentes, respectivamente a uma redução de 91,7% e 78,8% em comparação ao grupo carragenina.

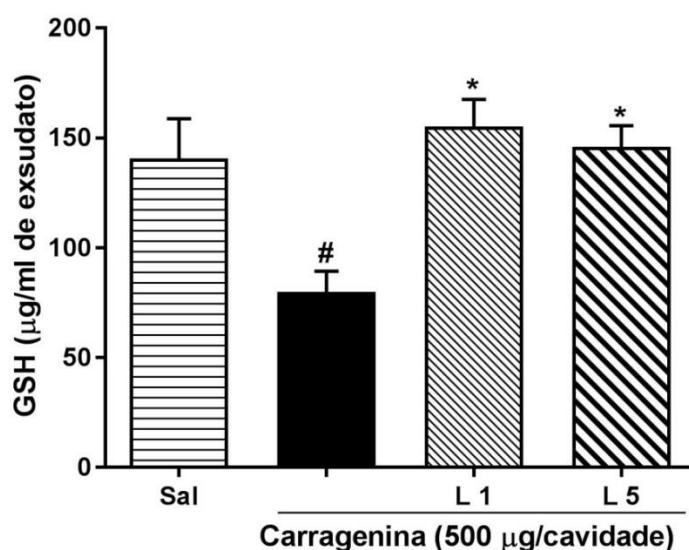


**Figura 21-** Avaliação do Laser na atividade da Mieloperoxidase induzida por carragenina na peritonite.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5J/cm<sup>2</sup> após a administração de Carragenina no peritoneo do animal. A infiltração neutrofílica foi avaliada 4 h mais tarde. A figura mostra que ambas as doses do Laser inibiram a infiltração neutrofílica, o qual foi evidenciado pela mensuração da atividade de MPO no líquido peritoneal. Observou-se aumento no grupo que recebeu apenas carragenina. Os valores são representados como média +/- SEM. \* P < 0,05 comparado com o grupo de carragenina; #P < 0,05 comparado com o grupo da solução salina.

### 5.5.3 Dosagem de Glutathiona (GSH)

No grupo com indução pela carragenina os níveis de GSH foram de  $(79,75 \pm 9,567 \mu\text{g/ml})$ , enquanto que no grupo salina foi de  $140,6 \pm 18,19 \mu\text{g/ml}$ . Nos grupos tratados com laser observou-se uma manutenção nos níveis de GSH,  $155,2 \pm 12,43 \mu\text{g/ml}$  no laser 1 e  $145,9 \pm 9,585 \mu\text{g/ml}$  no laser 5 em comparação ao grupo salina.

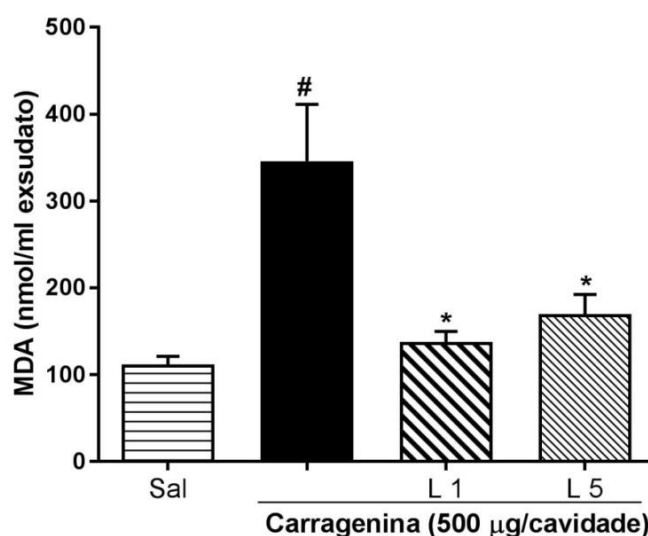


**Figura 22-** Avaliação do Laser na concentração de Glutathiona (GSH) na peritonite induzida por carragenina em camundongos.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5J/cm<sup>2</sup> após a administração de Carragenina no peritoneo do animal. A concentração de GSH foi avaliada 4 h mais tarde. A figura mostra que ambas as doses do Laser preservaram a atividade antioxidante, a qual foi evidenciada pela mensuração da atividade de GSH no líquido peritoneal. Os valores são representados como média +/- SEM. \* P <0,05 comparado com o grupo de carragenina; #P <0,05 comparado com o grupo da solução salina.

#### 5.5.4 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

A administração da carragenina elevou os níveis de MDA para  $345,7 \pm 65,67$  nmol/ml quando comparado com o grupo salina ( $111,5 \pm 9,571$  nmol/ml). O laser reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de MDA no exsudato peritoneal para  $137,5 \pm 12,33$  nmol/ml no grupo laser 1 e  $169,6 \pm 22,77$  nmol/ml no grupo laser 5, equivalentes, respectivamente a uma redução de 39,7% e de 49 % em comparação ao grupo carragenina (Figura 23).



**Figura 23-** Avaliação do Laser na concentração de Malondialdeído (MDA) na peritonite induzida por carragenina em camundongos.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5J/cm<sup>2</sup> após a administração de Carragenina no peritoneo do animal. A concentração de MDA foi avaliada 4 h mais tarde. A figura mostra que ambas as doses do Laser reduziram concentração de MDA. Os valores são representados como média +/- SEM. \* P < 0,05 comparado com o grupo de carragenina; #P < 0,05 comparado com o grupo da solução salina.



## 6 DISCUSSÃO

A fotobiomodulação é amplamente usada na clínica fisioterapêutica para o tratamento de diversas patologias inflamatórias, porém não há padronização quanto aos seus parâmetros dosimétricos, nem há concordância nem aceitação generalizada em grande parte devido à incerteza sobre seus mecanismos de ação moleculares, celulares e tissulares. (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Não havendo um consenso na literatura sobre dose e efeito, apresentando inclusive resultados contraditórios. Nesse contexto, o estudo sobre parâmetros dosimétricos é de grande importância, uma vez que o uso inadequado de parâmetros do laser podem gerar tratamentos ineficazes. (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; HUANG et al., 2009; HUANG et al., 2011).

Neste estudo, foi observado os efeitos de duas doses de Laser AsGa 904nm em modelos experimentais de inflamação. Em conjunto, os resultados sugerem que dependendo da dose, os efeitos produzidos nos parâmetros inflamatórios avaliados são distintos. Assim, a dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  reverteu eventos inflamatórios de caráter celular, reduzindo a migração neutrofílica e vascular, revertendo edema e aumento de permeabilidade, enquanto que a dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , observou-se reversão apenas dos parâmetros celulares.

As doses analisadas foram baseadas em estudo feito por De Almeida e colaboradores (2014), no qual foram analisados os efeitos do diclofenaco de sódio, crioterapia e LBI (AsGa 904nm) em níveis de citocinas pró-inflamatórias após um modelo de lesão muscular. As doses utilizadas foram: 1, 3, 6 e 9 J, porém a dose de 1J foi a que demonstrou melhores efeitos, diminuindo significativamente os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Portanto, a dose de 1J se mostrou mais eficaz em fase inflamatória aguda após trauma muscular. Utilizamos a melhor dose demonstrada por De Almeida et al.(2014) e comparamos com outra dose de maior densidade de energia ( $5\text{J}/\text{cm}^2$ ), podendo assim sugerir que o efeito é dose-dependente e que menores doses podem ter melhores efeitos na inflamação aguda.

Inicialmente, os efeitos das duas doses de laser foram avaliadas no modelo de edema de pata induzido por Carragenina, um modelo bem conhecido de inflamação aguda, usado para testar novos tratamentos anti-inflamatórios (GILLIGAN et al., 1994). A injeção de carragenina na superfície subplantar da pata de camundongo induz um edema bifásico. A fase precoce observada em cerca de 1 hora está relacionada com a liberação de mediadores, como histamina, serotonina e bradicinina, seguida de intensa infiltração de células polimorfonucleares (PMN), com o pico ocorrendo entre a 3ª e 4ª hora após sua administração (CHAVES et al., 2013; SILVA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2016). Nossos resultados mostraram que a dose de 1J/cm<sup>2</sup> foi a mais eficiente, inibindo a formação de edema, principalmente no pico da indução, enquanto a dose de 5J/cm<sup>2</sup> não apresentou efeito na reversão do edema.

Em um estudo feito por Albertini et. al., foram analisados os efeitos de dois diferentes comprimentos de onda (660 e 684 nm) no edema de pata induzido por Carragenina. Os dois tipos de laser foram utilizados com uma mesma dose de 7,5 J/cm<sup>2</sup>. Foi visto que os dois comprimentos de onda reduziram o edema em comparação ao grupo que não foi tratado (ALBERTINI et al., 2007). Indicando que o fator dose pode ser mais importante quando comparado com o fator comprimento de onda (DOS ANJOS et al., 2017). Em outra pesquisa foi usada uma menor dose de 2,5 J/cm<sup>2</sup> e um laser tipo He-Ne (632,8 nm) houve uma redução de edema de pata induzido por carragenina, com diminuição de 54% do volume da pata no grupo tratado com laser (FERREIRA et al., 2005).

Em sequência, foi analisado o efeito da fotobiomodulação na concentração de neutrófilos na pata de animais após a indução de inflamação por carragenina. Esse experimento indica que ambas as doses do laser foram eficazes na redução da concentração neutrofílica medida pela ação da MPO. Assim, observou-se uma aparente inconsistência, uma vez que a dose de 5J/cm<sup>2</sup> não reverteu o edema, mas inibiu a migração neutrofílica, indicando que a depender da dose, o laser poderá produzir efeitos distintos na inflamação aguda.

Para observar as alterações morfológicas realizamos o estudo histológico das patas dos animais, e os resultados corroboram com os achados anteriores, onde em ambas as doses foi observado que o recrutamento de células

no tecido da pata 4 horas após a administração de carragenina foi marcadamente reduzido nos grupos tratados.

Nossos dados corroboram em parte com Alves et al.(2013), o qual utilizou um laser GaAlAs (808nm), porém em potências distintas de 50 e 100 mW e dose constante de 4J/cm<sup>2</sup> em inflamações agudas induzidas em articulações. O mesmo observou na análise histológica uma redução da migração de neutrófilos na fase inflamatória inicial nos grupos tratados com laser.

Já em relação à Brassolatti et al.(2016), mostraram-se similaridades em partes. O estudo teve como objetivo investigar os efeitos do LBI (660nm) em duas doses diferentes (12,5 e 25J/cm<sup>2</sup>) em queimaduras de terceiro grau em ratos, mostrando na análise histológica uma diminuição de infiltrado inflamatório no grupo tratado com 25J. Sugerindo-se que o uso do laser nessa dose foi mais efetivo na estimulação de processos celulares envolvidos na reparação tecidual e também reduzindo a fase inflamatória, conseqüentemente restaurando a microcirculação local que é essencial na migração celular (BRASSOLATTI et al., 2016).

Assim, para melhor elucidarmos os efeitos da Fotobiomodulação realizamos o estudo da variação do edema de pata induzido por mediadores inflamatórios: dextrana, histamina, bradicinina e serotonina. O sulfato de dextrana é conhecido por promover um edema osmótico caracterizado por aumento de permeabilidade vascular, pela ativação de cininas (bradicinina) e indução a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina) derivadas da degranulação de mastócitos, causando um edema essencialmente vascular (CUNHA et al., 2016; DE OLIVEIRA, et al., 2016).

Nossos resultados indicam que o laser com dose de 1J/cm<sup>2</sup> inibiu o edema de pata induzido por dextrana, sugerindo que o mesmo pode estar relacionado com a estabilização da membrana dos mastócitos e também na prevenção da degranulação ou inibindo a ação das aminas vasoativas, em seus respectivos locais de ação. Diferentemente do resultado com a dose de 5J/cm<sup>2</sup> que não foi capaz de reverter o edema induzido por dextrana.

Também comparamos as duas doses do laser no edema provocado por histamina. A histamina é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação através de sua ação sobre os receptores-H1 de células endoteliais (DE TONI et al., 2015). O resultado desse ensaio corrobora com o anterior, onde apenas a dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  reverteu o edema.

Analisamos ainda a ação da dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  nos edemas induzidos por serotonina, um agente pró-inflamatório com ação periférica, seus efeitos são mediados por diferentes receptores, que quando ativados promovem vasodilatação e aumento de permeabilidade (DE TONI et al., 2015; SHAJIB;KHAN, 2015) e Bradicinina, uma quinina de ação local derivada do sangue, é um mediador inflamatório bastante importante nos principais sinais da inflamação, atuando na produção e liberação de mediadores pró inflamatórios derivados da via do ácido araquidônico, como PGE2, citocinas, produtos derivados dos mastócitos e óxido nítrico (NO) (GOLIAS et al., 2007; YIMAM et al., 2016). Em ambos os experimentos houve a redução do edema quando tratados com laser na dose  $1\text{J}/\text{cm}^2$ .

Estes resultados sugerem a dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  tem ação de caráter celular e vascular, já que foi capaz de reverter todos os edemas, enquanto que a dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , apesar de ser eficaz na diminuição da migração de leucócito, é uma quantidade de energia que ultrapassa o limite para diminuição da permeabilidade vascular, produzindo um efeito reverso.

Em um estudo utilizando o laser com comprimento de onda de 830nm e dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  em pontos de acupuntura, especialmente o ST36, o qual é tradicionalmente utilizado para tratar processos inflamatórios e dor, o resultado encontrado foi de uma redução dos níveis de edema induzidos por carragenina e mediadores inflamatórios (bradicinina, histamina e PGE2). Corroborando com alguns de nossos resultados que mostraram a diminuição de edemas induzido por mediadores na dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  em um laser com comprimento de onda de 904nm (ERTHAL et al., 2016).

A ação de aminas vasoativas (histamina e serotonina), bradicinina, leucotrienos, substância P, fator de ativação de plaquetas (PAF) e ativação do

sistema complemento podem induzir a alteração na permeabilidade vascular. Esse evento tem como função permitir o fornecimento de fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Então para investigarmos esta alteração, analisamos o extravasamento vascular utilizando o corante azul de Evans, que forma um complexo estável com proteínas plasmáticas (albumina). Nossos resultados demonstram que o tratamento com Laser na dose de 1J/cm<sup>2</sup> reduziu a permeabilidade vascular quando comparado ao grupo carragenina. Enquanto que o grupo tratado com laser na dose 5J/cm<sup>2</sup> não reduziu esse aumento de permeabilidade.

Divergindo com nossos resultados, um estudo desenvolvido por Pallotta et al. (2012), investigou os efeitos do LBI (810nm) na inflamação induzida por carragenina em joelhos de ratos, o mesmo verificou a inibição do extravasamento vascular através do corante azul de Evans, nos animais que receberam tratamento com laser na maior dose avaliada (10 Joules). Essa divergência pode ser causada pela diferença nos comprimentos de onda utilizados nos estudos.

Para melhor esclarecer os eventos celulares envolvidos na inflamação aguda e tratamento com laser, realizamos um ensaio de peritonite induzida por carragenina. Os resultados demonstraram que o tratamento com laser gerou uma redução no número de leucócitos, especialmente de neutrófilos no líquido peritoneal dos grupos tratados com laser quantificados através da contagem total e diferencial de células.

Outros dados relatados por Pallotta e colaboradores, utilizando um laser de comprimento de onda de 810nm apontam uma redução na contagem de neutrófilos nos tratamentos com doses de 3J, 6J e 10J, 3h após a indução da inflamação no joelho de ratos, não havendo o mesmo efeito para o grupo tratado com 1J, diferentemente dos nossos resultados (PALLOTTA et. al., 2012). Por outro lado, estudos demonstram que em doses menores há maior redução de citocinas e de migração de células inflamatórias (DE ALMEIDA et.al., 2014; DOS SANTOS et. al., 2014; ALVES, 2012).

Corroborando com nossos resultados, Correa et al., 2007 mostrou uma redução da migração de células inflamatórias em ratos com peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de forma dose dependente quando tratados com LBI (904nm) na dose de 3J/cm<sup>2</sup>. Após 24 horas de experimento, apresentou melhores resultados com reduções de 77% de neutrófilos e 49% na contagem de leucócitos (CORREA et.al., 2007).

A infiltração de neutrófilos nos tecidos inflamados é uma das principais características da resposta inflamatória aguda inata e essencial para a defesa do hospedeiro (GOMIDES et al., 2014; CANO et al., 2016). Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da lesão, desempenhando assim, um papel fundamental como primeira linha de defesa contra agentes patogênicos do corpo em diferentes tipos de inflamação, sendo sua ação condicionada por citocinas inflamatórias e alterações teciduais características (MÓCSAI et.al.,2015; KRUGER et al., 2015).

Além da contagem total e diferencial de células no líquido peritoneal, realizamos também a dosagem bioquímica, através da avaliação da ação da enzima mieloperoxidase. Nossos dados mostram um aumento no grupo que recebeu apenas carragenina e uma redução na quantificação de MPO nos grupos tratados com laser. O mecanismo exato da ação do laser na migração neutrofílica não está totalmente esclarecido, porém sugere-se que ocorra inibição da adesão do neutrófilo ao endotélio e consequente da migração para o sítio da inflamação (WANG et.al., 2014). A ação de defesa dos neutrófilos pode levar a fase de resolução da lesão com retorno às condições fisiológicas, quando isso não ocorre tem-se a inflamação crônica caracterizada pela liberação de oxidantes e protease levando a lesão tecidual e estresse oxidativo (KRUGER et al., 2015).

Inflamação e estresse oxidativo são fenômenos intrinsecamente ligados, sendo ambos ao mesmo tempo causa e consequência de patologia celular, de modo que a cascata anti-inflamatória está relacionada com a diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (TERLECKY, 2012). Durante o processo inflamatório esses compostos são liberados como produtos do metabolismo oxidativo mitocondrial de células

inflamatórias, endoteliais e musculares (RIBEIRO et. al., 2016). O acúmulo de espécies reativas de oxigênio podem amplificar a severidade da lesão, alterar estrutural e funcionalmente membranas celulares interferindo nas vias de sinalização aumentando assim a resposta inflamatória (ASSIS et.al., 2013).

Para estudar o efeito do laser no estresse oxidativo, optou-se pela dosagem de Malondialdeído (MDA), metabólito da peroxidação lipídica, provocada pela liberação local de ERO e normalmente elevado durante a inflamação (RIBEIRO et. al., 2016). Dessa forma, nossos dados apontam uma redução nos níveis de MDA nos animais que receberam a irradiação laser, corroborando com o estudo de Assis et al.(2013), no qual o tratamento com laser reduziu a produção de ERO em modelo de lesão muscular, diminuindo a peroxidação lipídica (ASSIS et.al., 2013). Outro estudo observou também uma redução nos níveis de MDA em lesões em ratos diabéticos e não-diabéticos tratados com laser (DENADAI et. al., 2015). Ribeiro e colaboradores apontam também a redução da peroxidação lipídica nos grupos tratados com laser em modelos de lesão muscular (RIBEIRO et. al., 2016) e em modelo de indução experimental de artrite (DOS SANTOS et al., 2017).

Para aprofundar a análise do efeito antioxidante da terapia com laser, realizamos a dosagem de GSH, o principal agente antioxidante endógeno não enzimático, presente em todas as células, cujos níveis são significativamente influenciados por processos inflamatórios agudos e crônicos (ALLEN; BRADLEY, 2011). Evidências apontam o GSH como importante na sinalização de diversas funções celulares, como crescimento e apoptose, bem como na resistência ao estresse. Trata-se de uma molécula presente em células animais e vegetais e seu papel como antioxidante natural está no fato de reduzir os níveis de EROs limitando assim a sinalização oxidante (DIAZ-VIVANCOS et. al, 2015). Nossos resultados mostram que houve um incremento nos níveis de GSH nos grupos tratados com Laser, o que é bastante satisfatório para um recurso usado no tratamento de afecções inflamatórias.

Corroborando com nosso estudo, Takhtfooladi e colaboradores (2014) observaram que ratos com inflamação hepática induzida por isquemia tiveram

menor redução dos níveis de GSH quando tratados com Laser GaAlAs (400mW e 804nm) na dose de  $3\text{J}/\text{cm}^2$  em comparação ao grupo com inflamação induzida que não recebeu irradiação. Em outro estudo, observou-se uma menor redução dos níveis de GSH na inflamação pulmonar induzida por isquemia em ratos tratados com laser (50mW e 630nm) na dose de  $1.8\text{J}/\text{cm}^2$  quando comparado ao grupo que não recebeu o tratamento (TAKHTFOOLADI; TAKHTFOOLADI, 2015). Macedo e colaboradores (2015) em estudo envolvendo cultura celular, constataram que a terapia com laser AlGaAs (830nm) na dose de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  promoveu uma menor redução do GSH e de outras moléculas antioxidantes em um grupo celular que mimetizou a Distrofia Muscular de Duchenne, quando comparado ao grupo que não recebeu esse tratamento.

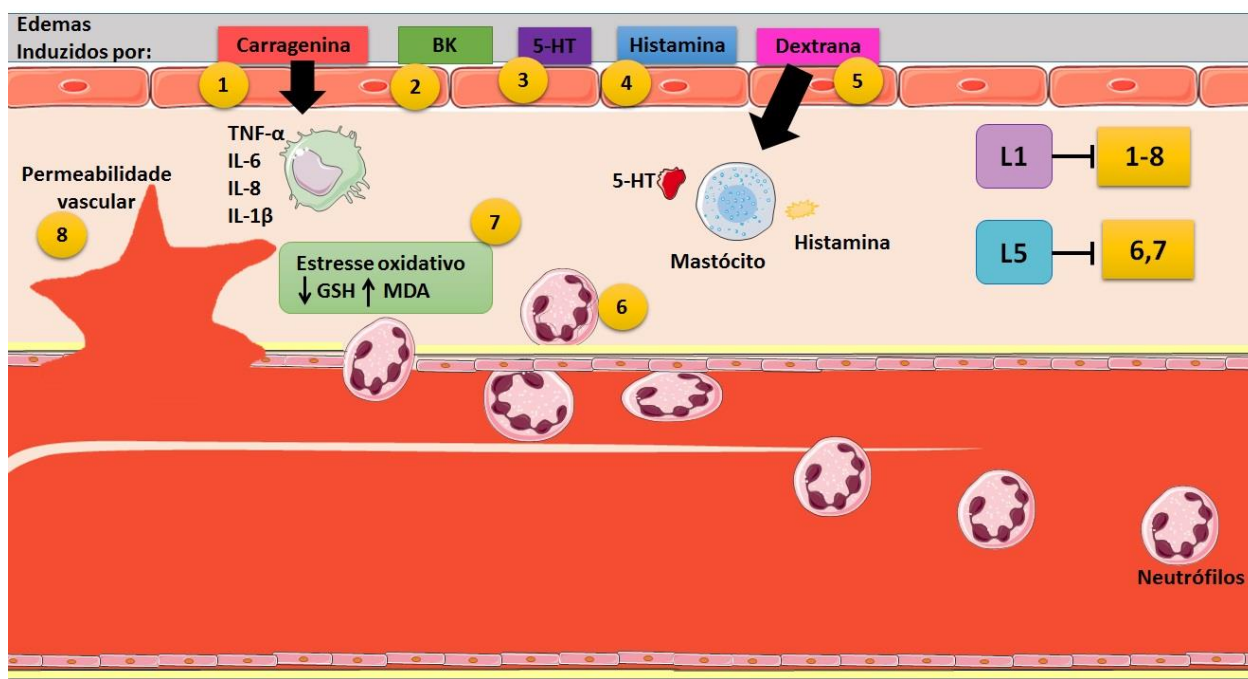
Dos Santos et al.(2017) observou também uma diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade antioxidante em modelo experimental de artrite, quando o tratamento associava exercícios e aplicações de laser (808nm) nas doses de 2 e 4  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Assim, estes dados confirmam que a resposta inflamatória produz metabólitos reativos que agravam e intensificam ainda mais este processo e dessa forma essas diferentes doses de irradiação com ação antioxidantes podem apresentar efeito anti-inflamatório potencial. Com base nestes dados sugerimos que o LBI (904 nm) pode promover proteção contra ação de EROS por aumentar as concentrações de antioxidantes endógenos, e assim atenuar o processo inflamatório.



## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados expostos podemos sugerir que a terapia Laser de Baixa Intensidade na dose de 1J/cm<sup>2</sup> tem ação de caráter celular e vascular, já que foi capaz de reverter todos os modelos experimentais executados. Enquanto a dose de 5J/cm<sup>2</sup>, apesar de ser eficaz na diminuição da migração de leucócito, é uma quantidade de energia que ultrapassa o limite para diminuição da permeabilidade vascular, produzindo um efeito reverso. Podemos assim, sugerir que o efeito da Fotobiomodulação é dose-dependente e que menores doses, dentro de uma janela terapêutica de energia, podem ter melhores efeitos na inflamação aguda. Além de tudo, o Laser atua como recurso anti-inflamatório eficiente, uma vez que é de fácil aplicação, não invasivo e relativamente barato.



**Figura 24-** Diagrama esquemático representativo do efeito do LBI (1 e 5J/cm<sup>2</sup>) na Resposta inflamatória.

## 8 REFERÊNCIAS

AKRAM, M.; KIM, K.A.; KIM, E.S.; SYED, A.S.; KIM, C.Y.; LEE, J.S.; BAE, O.N. Potent Anti-inflammatory and Analgesic Actions of the Chloroform Extract of *Dendropanax morbifera* Mediated by the Nrf2/HO-1 Pathway. **Biol. Pharm. Bull.**, V.39, p. 728–736, 2016.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.C.; BJORDAL J.M.; ALVES L.P.; et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **J Photochem Photobiol B Biol.**, v.89(1), p. 50–5, 2007.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.C.; CORREA F.I.; RIBEIRO W.; COGO J.C.; ANTUNES E.; ET AL. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J Photochem Photobiol B Biol.**, v.74(2-3):p.101–7, 2004.

ALLEN, J.; BRADLEY, R.D. Effects of Oral Glutathione Supplementation on Systemic Oxidative Stress Biomarkers in Human Volunteers. **J Altern Complement Med.**, v.17(9), p.827–33, 2011.

ALVES A.C.A. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther.**, v.15, 2013.

ALVES, A.C.; DE CARVALHO, P.T.; PARENTE, M. et al. Low level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. **Lasers Med Sci.**, v. 28(2), p.529-36, 2013.

ARANY P.R. Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy. **J Dent Res.** V. 95, p.977-984, 2016.

ASSIS L.; MORETTI, A.I.S.; ABRAHÃO, T.B.; CURY, V.; SOUZA, H.P.; HAMBLIN, M.R.; ET al. Low-Level Laser Therapy (808 nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion. **Lasers Surg Med.**, v.44(9),p. 726–35, 2013.

AVCI, P.;GUPTA, A.;SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.;PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M.R. Low-level laser (light) therapy (LLL) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 32(1), p.41-52, 2013.

BARATTO L.; CALZÀ L.; CAPRA R.; GALLAMINI M.; GIARDINO L.; GIULIANI A.; LORENZINI L.; TRAVERSO S. Ultra-low-level laser therapy, **Lasers Med. Sci.** V.26 p.103–112. ,2011.

BARBOSA A.L.R.; PINHEIRO, C.A.; OLIVEIRA, G.J.; MORAES M.O.; RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; SOUZA, M.H.L.P. Tumor bearing decreases systemic acute inflammation in rats-role of mast cell degranulation. **Inflamm Res.**v. 58,p. 235–40, 2009.

BISWAS S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox ? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**; v.2016, p.17–9, 2016.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60 (3), p. 618-622, 1982.

BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; OLIVEIRA, M.C. et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microsc Res Tech.**, v.79(4), p. 313-20, 2016.

CANO, P. M.; VARGAS, A.; LAVOIE, J. P. A real-time assay for neutrophil chemotaxis. **Biotechniques**, v. 60, p. 245-251, 2016.

CARVALHO, A.F.; SOUSA, P.F.; FEITOSA, M.C.; COELHO, N.P., BARROS, E.M.; FEITOSA, V.C.; ARISAWA, E.A. The low-level laser on acute myositis in rats. **Acta Cir Bras.** v.30(12), p. 806-11, 2015.

CHAVES, L.S. *et al.* Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**; v. 35 (1), p. 93-100, 2013.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S.K. et al. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann Biomed Eng** v.40: p. 516, 2012.

CORREA, F.; LOPES MARTINS R.A.B.; CORREA, J.C.; IVERSEN V.V.; JOENSON, J., BJORDAL, J.M. Low-level laser therapy (GaAs  $\lambda = 904$  nm) reduces inflammatory cell migration in mice with lipopolysaccharide-induced peritonitis. **Photomed Laser Surg.**, v.25(4), p. 245–9, 2007.

CUNHA, V.R. et al. Delivery system for mefenamic acid based on the nanocarrier layered double hydroxide: Physicochemical characterization and evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive potential. **Mater. Sci. Eng.C. Mater. Biol.**, v. 58, p.629–638, 2016.

DE ALMEIDA P.; TOMAZONI S.S.; FRIGO L.; DE CARVALHO P.D.T.C.; VANIN A.A.; SANTOS L.A. et al. What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: Low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy? **Lasers Med Sci.** v.29(2), p.653–8, 2014.

DE FREITAS, L.F.; HAMBLIN, M.R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v.22(3):7000417, 2016.

DE LIMA, F.M.; VILLAVERDE, A.B.; ALBERTINI, R.; CORRÊA, J.C.; CARVALHO, R.L.P.; MUNIN, E. et al. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. **Lasers Surg Med.**, V.43(5), p.410–20, 2011.

DE LIMA F.M. et al. Low intensity laser therapy (LILT) in vivo acts on the neutrophils recruitment and chemokines/cytokines levels in a model of acute pulmonary inflammation induced by aerosol of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* in rat, J. **Photochem. Photobiol. B Biol.** V.101, p.271–278, 2010.

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E.E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nat Rev Immunol**, v. 16, p. 378-391, 2016.

DE TONI, L. G. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Int Immunopharmacol**, v. 28(1), p. 199-207, 2015.

DENADAI, A.S.; AYDOS, R.D.; SILVA, I.S., OLMEDO, L., MENDONÇA, B.; CARDOSO, D.S. ET AL. Acute effects of low-level laser therapy ( 660 nm ) on oxidative stress levels in diabetic rats with skin wounds. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, V.11, p.85–9, 2015.

DIAZ-VIVANCOS, P.; DE SIMONE, A.; KIDDLE, G.; FOYER, C.H. Glutathione - Linking cell proliferation to oxidative stress. **Free Radic Biol Med**.,v. 89, p. 1154–64, 2015.

DOS ANJOS, L.M.J.; DA FONSECA, A.S.; GAMEIRO,J.; DE PAOLI,F. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers Med Sci**.,\_v.32(5), p.975-983, 2017.

DOS SANTOS S.A.; ALVES A.C.A.; LEAL E.C.P.; ALBERTINI R.; VIEIRA R.D.P.; LIGEIRO A.P., ET AL. 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**, v.29(3), p.1051–8, 2014.

DOS SANTOS, S.A.; DOS SANTOS VIEIRA, M.A.; SIMÕES, M.C.B; SERRA, A.J.; LEAL-JUNIOR, E.C.; DE CARVALHO, P.T.C. Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. **Lasers Med Sci**., v. 32(5), p.1071-1079, 2017.

ENWEMEKA C.S. Intricacies of dose in laser phototherapy for tissue repair and pain relief. **Photomed Laser Surg**. V.27(3),p.387–93, 2009.

ERTHAL, V.; MARIA-FERREIRA, D.;WERNER, M.F.;BAGGIO, C.H.; NOHAMA, P. Antiinflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse paw edema. **Lasers Med Sci**., v. 31(2), p. 315-22, 2016.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci**., v. 5(2),p.58–62, 2014.

FERREIRA,D.M. et al. Analgesic Effect of He-Ne (632.8 Nm) Low-Level Laser

Therapy on Acute Inflammatory Pain. **Photomed Laser Surg**, v.23 (2), p. 177-181, 2005.

FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat Rev Drug Discov**. v.15(8) p.1-7. 2016.

GILLIGAN, J.P.; LOVATO, S.J.; ERION, M.D.; JENG, A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. **Inflammation**. V.18(3), p. 285-92. 1994.

GOLIAS, C. et al. The kinin system-bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system-bradykinin. **Hippokratia**, v.11, p. 124-128, 2007.

GOMIDES, L.F. et al. Blockade of proteinase-activated receptor 4 inhibits neutrophil recruitment in experimental inflammation in mice. **Inflamm Res**, v.63, p. 935-41, 2014.

GUPTA, A.; DAI, T; HAMBLIN, M.R. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. **Lasers Med Sci**, v. 29, p.257, 2014.

HAJARE, S. W.; CHANDRA, S.; CHARMA, J.; TANDAN, S. K.; LAL, J., TELANG, A. G. Anti-inflammatory activity of Dalbergia sisso oleaves. **Fitoterapia**. v.72, p.131–139, 2001.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg**., v.23(3), p. 251–9, 2005.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L.V. The resolution of inflammation: Principles and challenges, **Semin Immunol**, v.27(3),p.149-60,2015.

HOUK, A. R.; JILKINE, A.; MEJEAN, C.O.; BOLTYANSKIY, R.; DUFRESNE, E.R.; ANGENENT, S.B.; ALTSCHULER, S.J.; WU L.F.; WEINER, O.D.. Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. **Cell**, v. 148, p. 175–188, 2012.

HUANG, Y.Y.; CHEN, A.C.H.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. **Dose Response**, V. 7(4), p. 358–383, 2009.

HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy—an update. **Dose.Response** v. 9, p.602–618, 2011.

KARU, T.I.; KOLYAKOV, S.F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomed Laser Surg.** v.23 (4), p.355-361, 2005.

KARU, T. I. Photobiological Fundamentals of LowPower Therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, New York, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.

KARU, T.I. Low power laser therapy. In: **Biomedical Photonics Handbook**, Tuan Vo-Dinh, ed., CRC Press, Boca Raton: 2003, Ch. 48.

KRUGER, P.; SAFFARZADEH, M.; WEBER, A.N.R.; RIEBER, N.; RADSAK, M.; VON BERNUTH, H.; et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. **PLOS Pathog.**, v.11(3), p.1–22, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran: Bases Patológicas das Doenças. 8ª edição. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008

LALRINZUALI, K.; VABEIRYUREILAI, M.; JAGETIA, G.C. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of stem Bark of Sonapatha *Oroxylum indicum* in vivo. **International Journal of Inflammation** . p.1-8, 2016.

LARAIA E.M.S.; SILVA I.S.; PEREIRA D.M.; DOS REIS F.A.; ALBERTINI R.; DE ALMEIDA P.; ET AL. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of achilles tendon in rats. **Photochem Photobiol.** v. 88(6),p.1546–50,2012.

LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators Inflamm.**, v. 2008, p.1-4, 2008.

MARTIUS F. Das arndt-schulz grundgesetz .**Munch Med Wschr.**, v.70,p.1005–1006,1923

- MCEVER, R.P. Selectins: Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. **Thrombosis and haemostasis**. v.65,p.223-228,1991.
- MCDONOUGH A.K.; CURTIS J.R.; SAAG K.G. The epidemiology of glucocorticoid associated adverse events. **Curr Opin Rheumatol.**, v.20(2), p.131-7, 2008.
- MAIMAN, T.H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature** v.187, p. 493 – 494, 1960.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation, **Nature**, v.454,p.428–435,2008.
- MELIS M.; DI GIOSIA, M.; ZAWAWI, K. H. Low level laser therapy for the treatment of temporomandibular disorders: a systematic review of the literature. **The Journal of Craniomandibular Practice**, v. 30(4), p. 304–312, 2012.
- MIZOKAMI, S.S. et al. Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan-Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. **PLoS One**. v.2, n. 11, 2016.
- MÓCSAI, A.; WALZOG, B. Lowell C.A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovasc Res**.v.107(3),p.373–85, 2015
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature** v.420, p.846–852,2002.
- OSTUNI R.;NATOLI G.; CASSATELLA M.A.;TAMASSIA N. Epigenetic regulation of neutrophil development and function. **Seminars in Immunology**, v.28, p.83–93, 2016.
- PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Ver.** v.87, p.315-424, 2007.
- PALLOTTA R.C.; BJORDAL J.M.; FRIGO L.; LEAL JUNIOR E.C.P.; TEIXEIRA S.; MARCOS R.L.; et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**. v.27(1),p.71–8, 2012.
- PARKIN J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**. V.357, p.1777–1789, 2001.
- POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Rev. Immunol**. V.7, p.803–815, 2007.



POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw o edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression, **Br. J. Pharmacol**,v. 142, p.331-338, 2004.

RIBEIRO, B.G.; ALVES, A.N.; DOS SANTOS, L.A.D.; CANTERO, T.M.; FERNANDES, K.P.S.; DIAS ET AL. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. **PLoS One** , v.11(4), p.1-13, 2016.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

SERHAN, C.N. A search for endogenous mechanisms of anti-inflammation uncovers novel chemical mediators: missing links to resolution. **Histochem Cell Biol.** V.122(4), p.305-21,2004

SHAJIB, M.S., KHAN, W.I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta. Physiol. (Oxf)**., v.213, p.561-574, 2015.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Pract. Res.Clin.Anaesthesiol.**, v.18, n.3, p. 385-405, 2004.

SILVA V.G.; SILVA R.O.; DAMASCENO S.R.B.; CARVALHO N.S.; PRUDENCIO R.S. et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **J Nat Prod.**, v. 76, p.1071–1077, 2013.

SILVA, R.O.; SILVA, S.R.; SILVA, I,S.; SILVA, V,G.; BRITO, C,F.; TEIXEIRA, A,E. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem Biol Interact.** v.229, p.55–63, 2015.

SONIS, S.T.; HASHEMI, S.; EPSTEIN, J.B.; NAIR, R.G.; RABER-DURLACHER, J.E. Could the biological robustness of low level laser therapy (

Photobiomodulation ) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. **Oral Oncol.** v.54,p.7–14, 2016.

SOSTRES, C. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 24, n. 2, p. 7-22, 2010.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p.97–103, 1985.

TAKHTFOOLADI, M.A.; TAKHTFOOLADI, H.A.; KHANSARI, M. The effects of low-intensity laser therapy on hepatic ischemia-reperfusion injury in a rat model. **Lasers MedSci.** ,V.29, p.1887–93, 2014.

TAKHTFOOLADI, M.A.; TAKHTFOOLADI, H.A; SEDAGHATFAR, H.; SHABANI, S. Effect of low-level laser therapy on lung injury induced by hindlimb ischemia/reperfusion in rats. **Lasers Med Sci.** v. 30(6), p.1757-62, 2015.

TAYLOR, C.T.; MONCADA, S. Nitric oxide, cytochrome c oxidase, and the cellular response to hypoxia, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.30, p.643–647, 2010.

TERLECKY, S.R. Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. **World J Biol Chem.**, v.3(5), p. 93, 2012.

THOMAS, C.J.; SCHRODER, K.; Pattern recognition receptor function in neutrophils. **Trends Immunol.** V. 34,p.317–328, 2013.

THURSTON, G. et al. Angiotensin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**, v. 6, p. 460-463, 2000.

TOMAZONI, S.S.; LEAL-JUNIOR, E.C.; PALLOTTA, R.C.; TEXEIRA, S.; DE ALMEIDA, P.; LOPES-MARTINS, R.A. Effects of photobiomodulation therapy, pharmacological therapy, and physical exercise as single and/or combined treatment on the inflammatory response induced by experimental osteoarthritis. **Lasers Med Sci.**, v.32(1), p.101-108, 2017.

VAN ESCH, R.W.; KOOL, M.M.; VAN AS, S. NSAIDs can have adverse effects on bone healing. **Med Hypotheses**. V. 81 (2), p.343–346, 2013.

VASCONCELOS, D. I. B.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L. T.; PIUVEZAM, M. R.; LIMA, M. R. V.; MORAIS, L. C. R., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v.11, p.1–12, 2011.

VONKEMAN, H.E.; VAN DE LAAR, M.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Semin Arthritis Rheum**, v. 39, n. 4, p. 294-312, 2010.

WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDEVIG, D. M. S. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14(5), p.9126–9167, 2013.

WALT/NAALT (September 9–12 2014) Photobiomodulation: mainstream medicine and beyond. WALT Biennial Congress and NAALT Annual Conference, Arlington Virginia USA

WANG, Y.; HE, X.; HAO, D.; YU, D.; LIANG, J.; QU, Y. et al. Low-Level Laser Therapy Attenuates LPS-Induced Rats Mastitis by Inhibiting Polymorphonuclear Neutrophil Adhesion. **J Vet Med Sci.**, v.76(11), p.1443–50,2014.

YIMAM, M. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of UP1304, a botanical composite containing standardized extracts of *Curcuma longa* and *Morus alba*. **J Integr Med.**, v. 14, n. 1, p. 60-8, 2016.

ZECHA, J.A.E.M. et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations **Support Care Cancer**, v.24(6), p.2793-805, 2016.

## ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64061-900  
Telefone: (88) 3215-1734, e-mail: ceua@ufpi.edu.br



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da eletrotermofototerapia na inflamação e reparo tecidual", protocolo nº 038/15, sob a responsabilidade de **MARCELO DE CARVALHO FILGUEIRAS**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.898, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/11/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/2015 a Julho/ 2020
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico/ swiss
Nº de Animais	218
Peso/ idade	20-35g/ 1 mês
Sexo	Machos
Origem	Biotério de Manutenção de Animais Destinados a Experimentação do Departamento de Morfologia Veterinária-CCA/UFPI.

Teresina, 27 de Novembro de 2015.

*Fátima de Mendonça*  
Prof.<sup>a</sup> Fátima L. de Mendonça  
Coordenadora de Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora