

Redução da nocicepção articular induzida pela formalina em ratos tratados com laser de baixa potência 670 ou 830 nm

Reduction of joint nociception induced by formalin in rats treated with low level laser therapy 670 or 830 nm

Jhenifer Karvat¹, Camila M. M. Kakhata², Jéssica A. Malanotte², Daniele Pelissari³, Assis R. Escher⁴, Gladson R. F. Bertolini⁵

RESUMO

Modelo do estudo: estudo experimental, de caráter transversal. **Objetivo:** avaliar os efeitos do laser de baixa potência (LBP), com comprimento de onda de 670nm e 820nm, na nocicepção de ratos Wistar submetidos à hipernocicepção articular no joelho direito. **Metodologia:** foram utilizados 18 ratos Wistar, separados em 3 grupos: G1 – não tratados; G2 – tratados com LBP 670 nm; G3 – tratados com LBP 830 nm. Para a indução da hipernocicepção foi injetado no espaço articular tíbio-femoral 100 µL de formalina 5%. Para avaliar a nocicepção foi utilizado o filamento de von Frey digital, tanto com pressão sobre o joelho, quanto na região plantar; esta avaliação aconteceu: pré-lesão (AV1), após 15 (AV2), 30 (AV3) e 60 (AV4) minutos da indução da hipernocicepção. Para o tratamento com LBP foi usada fluência de 8 J/cm, logo após AV2. **Resultados:** o limiar de retirada, quando a pressão foi realizada no joelho, mostrou que 670 nm produziu elevação do limiar em AV3 e AV4, retornando para valores semelhantes aos de AV1. Para a região plantar, apenas 830 nm mostrou restauração dos valores em AV4, e foi maior em AV3 ao comparar com o grupo controle. **Conclusão:** ambos os comprimentos de onda produziram elevação do limiar de retirada da pata, em ratos com hipernocicepção em joelho.

Palavras-chave: Terapia a Laser de Baixa Intensidade . Medição da Dor. Sinovite. Modalidades de Fisioterapia.

ABSTRACT

Study design: experimental study of cross-cutting nature. **Objective:** To evaluate the low level laser therapy (LLLT) effects, with a wavelength of 670 and 820nm, in nociception of Wistar rats submitted to hypernociception in his right knee. **Methods:** 18 Wistar rats, separated into 3 groups: G1 – untreated; G2 – treated with LBP 670 nm; G3 – treated with LBP 830 nm. For the hypernociception induction was injected into the tibiofemoral articular space 100 µL of 5% formalin. To evaluate nociception was used

1. Mestre pelo Programa de Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste);
2. Mestranda do Programa de Biociências e Saúde da Unioeste;
3. Discente do curso de Fisioterapia da Unioeste;
4. Técnico do Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos da Unioeste.
5. Docente no Programa de Biociências e Saúde e na graduação em Fisioterapia da Unioeste.

Correspondencia
Gladson Ricardo Flor Bertolini
Rua Universitária, 2069. Jardim Universitário,
Cascavel – PR. CEP: 85819-110.

Recebido em 03/12/2014
Aprovado em 19/03/2015

digital von Frey filament, both with pressure on the knee, as in the plantar region. The evaluations occurred: pre-injury (EV1), 15 (EV2), 30 (EV3) and 60 (EV4) minutes after hypernociception induction. For the treatment with LBP was used to 8 J/cm², after EV2. **Results:** the withdrawal threshold, when the pressure was held at the knee, showed that 670 nm produced threshold elevation in EV3 and EV4, returning to values similar to those of EV1. For the plantar region, only 830 nm showed restoration of values in EV4, and was higher in EV3 when comparing with G1. **Conclusion:** Both wavelengths produced raising the paw withdrawal threshold in rats with knee hypernociception.

Keywords: Laser Therapy, Low-Level . Pain Measurement . Synovitis. Physical Therapy Modalities.

Introdução

Laser é um acrônimo para amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, tem como características a colimação, a convergência e a monocromaticidade. O laser de baixa potência (LBP) produz alterações insignificantes na temperatura (medidos ao redor de 1° C), sendo utilizado devido seus efeitos estimulantes para tratar várias alterações musculoesqueléticas como, diminuir dor e inflamação, estimular o metabolismo do colágeno e reparo.^{1,2} Equipamentos com maiores comprimentos de onda apresentam maior penetração nos tecidos, existem evidências que os efeitos biológicos e comportamentos físicos de lasers variam com o comprimento de onda usado.¹

O LBP é muito utilizado para fins analgésicos, acredita-se que os principais mecanismos são: liberações de opióides endógenos, alterações na velocidade de condução nervosa, há relatos de alteração no potencial de ação e velocidade de condução nervosa produzindo aumento do limiar de dor, regulação de mediadores inflamatórios indutores de dor.^{1,3-6} Visto que a dor é uma condição complexa que se manifesta em uma variedade de formas diferentes, provavelmente não exista um padrão de tratamento que seja suficiente para todos os casos.⁶ Muitas vezes o anti-inflamatório não hormonal é utilizado com vistas à analgesia, contudo, produzem diversos efeitos colaterais, como sangramento, insuficiência renal, asma, ulcera gástrica ou duodenal, entre outros, por isso é necessário introduzir novos métodos para aliviar a dor sem efeitos colaterais.²

Diferentes comprimentos de onda do LBP podem influenciar, além da profundidade de penetração, alterações bioquímicas em células e tecidos, sendo que os parâmetros apropriados que influenciam os efeitos terapêuticos para dor articular continuam controversos.³ Assim, modelos de dor articular têm sido

utilizados para testar o LBP, como a indução de artrite séptica⁷, secção do ligamento cruzado anterior⁸, injeção de carragenina⁹ e formalina.^{10,11} A injeção intra-articular de formalina promove alterações caracterizadas por 2 fases de intenso comportamento de defesa do membro, separadas por um pequeno período de quiescência, aproximadamente entre o quinto e décimo minuto.¹² O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos LBP, com comprimento de onda de 670 e 830nm, na nocicepção de ratos Wistar submetidos à hipernocicepção articular no joelho direito.

Materials e métodos

Grupos experimentais

O grupo amostral foi composto por 18 ratos da linhagem *Wistar*, machos, com idade média de 10 semanas, os quais foram obtidos junto ao Biotério Central da Unioeste, e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, em caixas padrão de polipropileno, em ambiente com temperatura de 23±1°C, com fotoperíodo de 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste).

Os animais foram separados, aleatoriamente, em três grupos:

- Grupo 1 (G1, n = 6) – submetidos à indução de hipernocicepção no joelho direito e não tratados.
- Grupo 2 (G2, n = 6) – indução de hipernocicepção e tratados com laser de baixa potência, 670 nm com dose de 8 J/cm²;
- Grupo 3 (G3, n = 6) – indução de hipernocicepção e tratados com laser de baixa potência, 830 nm com dose de 8 J/cm².

Indução da hipernociceção

Para a indução da hipernociceção foi realizada a tricotomia na face medial dos joelhos direitos e em seguida os animais foram contidos manualmente, e injetado no espaço articular tíbio-femoral 100 μ L de solução de formalina a 5%.¹²

Avaliação da nociceção

Foi utilizado o filamento de von Frey digital (Insight®), o qual testa a sensibilidade nociceptiva ao estímulo mecânico em animais.¹³ Para isso, o animal foi contido manualmente, e o filamento aplicado na face medial da articulação tíbio-femoral (joelho), do membro pélvico direito. A ponta de polipropileno do filamento foi aplicada perpendicularmente à área, com gradual aumento de pressão, e logo que o animal retirou o membro o teste foi interrompido para o registro do limiar de retirada.

Em seguida, o animal foi colocado em caixas de madeira com tampa em acrílico, sendo que a base da mesma é confeccionada em grade metálica vazada, pela qual foi possível inserir o filamento na região plantar das patas dos animais. Novamente foi realizada pressão, com aumento gradual, até o animal retirar o membro.

Esta avaliação aconteceu nos seguintes momentos: AV1 – pré-lesão (antes da indução da hipernociceção); as reavaliações foram e ocorreram respectivamente: AV2 – 15 minutos; AV3 – 30 minutos e AV4 – 60 minutos após a indução da hipernociceção.

Protocolo de tratamento com laser de baixa potência

Para o tratamento de G2 e G3, foi utilizado o LBP (Ibramed®) previamente aferido quanto à sua potência. Para isso, os animais foram contidos manualmente, e o laser aplicado de maneira pontual e contínua sobre a articulação tíbio-femoral (joelho) do membro pélvico direito. A diferença entre os grupos foi o comprimento de onda utilizado; G2 foi irradiado, por cerca de 17s, com laser com comprimento de onda de 670 nm, potência de 30 mW, fluência de 8J/cm², energia de 0,5 J, área de saída de 0,06 cm²; G3 foi irradiado, por cerca de 31s, com laser com comprimento de onda de 830 nm, potência de 30 mW, fluência de 8J/cm², energia de 0,9 J, área de saída de 0,11 cm².

Este tratamento aconteceu após a AV2, ou seja, 15 minutos após a indução da hipernociceção. G1 não foi submetido à intervenção terapêutica, apenas simulação da mesma.

Análise dos Dados

Os resultados são expressos por meio da estatística descritiva e analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, posteriormente foi utilizada a Análise de Variância, para análise intra e inter-grupos, em ambos os testes o nível de significância aceito foi $\alpha = 0,05$.

Resultados

Os resultados obtidos pela avaliação do limiar de nociceção, apontaram que para o local da lesão (joelho) o comprimento de onda de 670 nm produziu elevação do limiar em AV3 e AV4, retornando para valores semelhantes aos de AV1, o que para 830 nm ocorreu apenas em AV4. Já para a avaliação na região plantar, apenas 830 nm mostrou restauração dos valores em AV4, ao comparar com AV1, e ainda apresentou-se significativamente maior em AV3 ao comparar com o grupo controle (Tabela 1).

Discussão

O LBP tem se mostrado controverso com relação a efeitos em casos de osteoartrite, com autores que o apontam como um útil instrumento na melhora na dor e incapacidade funcional,¹⁴⁻¹⁸ enquanto outros não observaram resultados positivos,^{19,20} tal fato pode ocorrer pela diversidade nas técnicas de aplicação e outras características do laser, como potência, comprimentos de onda, fluências e irradiâncias.

Em modelos experimentais de osteoartrite de joelho, Wang et al.⁸ utilizando um equipamento de 830 nm, com densidade de energia de 4,8 J/cm² e energia 0,13 J, observaram que a partir de 6 semanas de lesão do ligamento cruzado anterior, havia alívio da hipernociceção e da sinovite, com menor lesão da cartilagem do côndilo femoral articular. A redução do quadro algico pode estar associada com a diminuição do processo inflamatório, visto que o LBP pode reduzir a expressão de agentes pró-inflamatórios como a ciclooxygenase-2,⁹ prostaglandina E2 (21), TNF- α ,²² dentre outras citocinas.^{23,24} Salienta-se, dentre as li-

Tabela 1. Resultados em média e desvio-padrão, para os três grupos, de acordo com o momento de avaliação (avaliação 1 – AV1; avaliação 2 – AV2; avaliação 3 – AV3; avaliação 4 – AV4), tanto para a região da injeção de formalina (joelho) quanto distal (plantar), para os diferentes grupos (grupo 1 – G1; grupo 2 – G2; grupo 3 – G3).

Local	Grupos	AV1	AV2	AV3	AV4
Joelho	G1	123,48±10,66a	69,00±36,20b	56,80±21,42b	69,94±22,67b
	G2	106,40±18,06a	52,88±4,52b	79,94±34,01ab	74,20±36,81ab
	G3	98,20±19,44a	71,94±6,33b	70,60±11,02b	77,52±14,92ab
Plantar	G1	96,06±37,27a	46,11±14,65b	47,39±13,56b*	55,44±18,68b
	G2	117,50±29,32a	49,22±9,01b	56,06±16,86b	63,72±16,86b
	G3	106,50±27,34a	55,67±20,61b	72,56±11,95b*	75,889±8,14ab

AV1 = avaliação 1; AV2 = avaliação 2; AV3 = avaliação 3; AV4 = avaliação 4.

G1 = grupo 1; G2 = grupo 2; G3 = grupo 3.

A comparação dentro dos grupos é apresentada com letras diferentes mostrando diferenças estatísticas significativas dentro dos grupos, quando são apresentadas letras iguais significam ausência de diferença estatística significativa.

* mostra diferença significativa, no mesmo momento de avaliação, entre os grupos G1 e G3.

mitações do presente estudo, a não realização de uma análise molecular ou imunohistoquímica, focando alterações no processo inflamatório, mas, foi avaliado uma importante característica encontrada durante o mesmo, que é a hipernocicepção, investigada por meio de um teste válido que é o limiar de retirada do membro acometido.¹³

As doses de LBP seguem a regra de Arndt-Schultz, significando que a fotobiomodulação apenas ocorre quando as doses atingem determinado limiar, e pode ser suprimida ao exceder.³ Desta forma, no presente estudo optou-se por utilizar a dose de 8 J/cm², pois em estudo prévio, com o equipamento de 830 nm, houve redução do limiar nociceptivo, quando avaliado à pressão em região plantar;¹¹ e o equipamento de 670 nm tinha se mostrado útil, com dose semelhante, na redução do comportamento álgico durante o teste de incapacidade funcional, por redução do tempo de elevação da pata durante a marcha.²⁵

Foi observado que ambos os comprimentos de onda foram efetivos na redução da hipernocicepção, 670 nm na avaliação local e 830 nm na avaliação distal, sendo que tais diferenças podem ter ocorrido devido aos distintos comprimentos de onda, pelos tempos de irradiação e energias entregues desiguais. Segundo Smith,²⁴ a absorção de comprimentos de onda compreendidos no infravermelho ocorre por moléculas

constituintes da membrana, diferente da irradiação compreendida na faixa vermelha, a qual é absorvida pelo citocromo c oxidase na mitocôndria. Desta forma, alguns autores têm comparado as ações de diferentes comprimentos de onda, como Gupta et al.,²⁶ que avaliaram o uso de diferentes comprimentos de onda (635, 730, 810 e 980 nm) no reparo epitelial de camundongos submetidos a abrasão dérmica parcial, relatam que apenas 635 e 810 nm foram efetivos na aceleração do reparo, sendo mais pronunciado em 810 nm. Tal fato pode ter ocorrido pelas diferentes bandas de absorção, apontadas por Karu,²⁷ que seriam estimulantes, principalmente o espectro compreendido no vermelho (620 e 680 nm) e também no infravermelho próximo (820 nm).

Já Masoumpoor et al.,²⁸ observaram em animais submetidos a modelo de compressão de nervo isquiático, que 4 J/cm², tanto no comprimento de onda de 660 quanto no de 980 nm foram efetivos em reduzir os limiares álgicos em ratos, contudo, o comprimento de onda compreendido na faixa do vermelho apresentou melhores resultados. E Panhoca et al.,²⁹ relatam que em pacientes com disfunção temporomandibular, LEDs na faixa do vermelho (630±10 nm) e infravermelho (850±10 nm) foram igualmente eficazes em reduzir o quadro álgico e aumentar a abertura oral. No presente estudo apesar de ambos os compri-

mentos terem aumento o limiar de retirada do membro, apenas 830 nm, na avaliação na região plantar, foi significativamente diferente do grupo controle em uma avaliação, isto pode indicar que apenas este comprimento de onda pode ser efetivo em reduzir a alodínea, visto que a avaliação foi por meio de pressão gradual, distal ao local de lesão.³⁰ Estudos que comprovem diferenças entre os comprimentos de onda mostram-se importantes, inclusive visando a associação destes para o tratamento, como Nesioonpour et al.,³¹ irradiando com 650 e 808 nm em pacientes no pós-operatório de fixação de fraturas de tíbia, indicando efeitos analgésicos da técnica.

Conclusão

Conclui-se que ambos os comprimentos de onda produziram alteração na hipernocicepção em joelhos de ratos, quando avaliados com pressão local, sendo que 670 nm mostrou redução precocemente. Quando a pressão foi realizada distal (região plantar), apenas 830 nm diminuiu a hipernocicepção.

Referências

- Gross AR, Dziengo S, Boers O, Goldsmith CH, Graham N, Lilge L, et al. Low Level Laser Therapy (LLLT) for neck pain: a systematic review and meta-regression. *Open Orthp J*. 2013;7(Suppl. 4): 396-419.
- Li FJ, Zhang JY, Zeng XT, Guo Y. Low-level laser therapy for orthodontic pain: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2015;30:1789-803.
- Chang W-D, Lee C-L, Lin H-Y, Hsu Y-C, Wang C-J, Lai P-T. A meta-analysis of clinical effects of low-level laser therapy on temporomandibular joint pain. *J Phys Ther Sci*. 2014;26:1297-300.
- Falaki F, Nejat AH, Dalirsani Z. The effect of low-level laser therapy on trigeminal neuralgia: a review of literature. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect*. 2014;8:115.
- He WL, Yu FY, Li CJ, Pan J, Zhuang R, Duan PJ. A systematic review and meta-analysis on the efficacy of low-level laser therapy in the management of complication after mandibular third molar surgery. *Lasers Med Sci*. 2014; head of print. DOI: 10.1007/s10103-014-1634-0.
- Kingsley JD, Demchak T, Mathis R. Low-level laser therapy as a treatment for chronic pain. *Front Physiol*. 2014; 5:306. doi: 10.3389/fphys.2014.00306.
- Araujo BF, Silva LI, Meireles A, Rosa CT, Gioppo NMR, Jorge AS, et al. Effects of low-level laser therapy, 660 nm, in experimental septic arthritis. *ISRN Rheumatol*. 2013;2013(341832).
- Wang P, Liu C, Yang X, Zhou Y, Wei X, Ji Q, et al. Effects of low-level laser therapy on joint pain, synovitis, anabolic, and catabolic factors in a progressive osteoarthritis rabbit model. *Lasers Med Sci*. 2014;29:1875-85.
- Prianti Jr ACG, Silva Jr JA, Santos RF dos. Low-level laser therapy (LLLT) reduces the COX-2 mRNA expression in both subplantar and total brain tissues in the model of peripheral inflammation induced by administration of carrageenan. *Lasers Med Sci*. 2014;29:1397-403.
- Barretto SR, Melo GC de, Santos JC, Oliveira MGB de, Pereira-filho RN, Alves AVF, et al. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. *J Photochem Photobiol B*. 2013;129:135-42.
- Coradini JG, Mattjie TF, Bernardino GR, Peretti AL, Kakihata CMM, Errero TK, et al. Comparação entre o laser de baixa potência, ultrassom terapêutico e associação, na dor articular em ratos Wistar. *Rev Bras Reumatol*. 2014;4:7-12.
- Martins MA, Bastos LC, Tonussi CR. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *J Pain*. 2006;7:100-7.
- Vivancos GG, Verri Jr WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:391-9.
- Alghadir A, Omar MTA, Al-Askar AB, Al-Muteri NK. Effect of low-level laser therapy in patients with chronic knee osteoarthritis: a single-blinded randomized clinical study. *Lasers Med Sci*. 2014;29:749-55.
- Kheshie AR, Alayat MSM, Ali MME. High-intensity versus low-level laser therapy in the treatment of patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Lasers Med Sci*. 2014;29:1371-6.
- Al Rashoud AS, Abboud RJ, Wang W, Wigderowitz C. Efficacy of low-level laser therapy applied at acupuncture points in knee osteoarthritis: a randomised double-blind comparative trial. *Physiotherapy*. 2014;100:242-8.
- Soleimanpour H, Gahramani K, Taheri R, Golzari SEJ, Safari S, Esfanjani RM, et al. The effect of low-level laser therapy on knee osteoarthritis: prospective, descriptive study. *Lasers Med Sci*. 2014;29:1695-700.
- Alfredo PP, Bjordal JM, Dreyer SH, Meneses SRF, Zaguetti G, Ovanessian V, et al. Efficacy of low level laser therapy associated with exercises in knee osteoarthritis: a randomized double-blind study. *Clin Rehabil*. 2012;26:523-33.
- Tascioglu F, Armagan O, Tabak Y, Corapci I, Oner C. Low power laser treatment in patients with knee osteoarthritis. *Swiss Med Wkly*. 2004;134:254-9.
- Madani AS, Ahrari F, Nasiri F, Abtahi M, Tuner J. Low-level laser therapy for management of TMJ osteoarthritis. *Cranio*. 2014;32:38-44.
- Carvalho RL de P, Leal-Jr ECP, Petrellis MC, Marcos RL, Carvalho MHC de, De Nucci G, et al. Effects of low-level laser therapy (LLLT) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats. *Photochem Photobiol*. 2013;89:508-12.
- Almeida P de, Lopes-Martins RÁB, Tomazoni SS, Albuquerque-Pontes GM, Santos LA, Vanin AA, et al. Low-level laser therapy and sodium diclofenac in acute inflammatory response induced by skeletal muscle trauma: effects in muscle morphology and mRNA gene expression of inflammatory markers. *Photochem Photobiol*. 2013;89:501-7.

23. Mantineo M, Pinheiro JP, Morgado AM. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. *J Biomed Opt.* 2014;19:98002.
24. Smith KC. Molecular targets for low level light therapy. *Laser Ther.* 2010;19:135-42.
25. Bertolini GRF, Matos CMP, Artifon EL, Ferrari D, Vituri RF. Avaliação funcional da nocicepção do joelho de ratos tratada com laser de baixa potência e natação. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17:45-8.
26. Gupta A, Dai T, Hamblin MR. 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.* 2014;29:257-65.
27. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B.* 1999;49:1-17.
28. Masoumpoor M, Jameie SB, Janzadeh A, Nasirinezhad F, Soleimani M, Kerdary M. Effects of 660- and 980-nm low-level laser therapy on neuropathic pain relief following chronic constriction injury in rat sciatic nerve. *Lasers Med Sci.* 2014;29:1593-8.
29. Panhoca VH, Lizarelli R de FZ, Nunez SC, Pizzo RC de A, Grecco C, Paolillo FR, et al. Comparative clinical study of light analgesic effect on temporomandibular disorder (TMD) using red and infrared led therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; Ahead of print. DOI: 10.1007/s10103-013-1444-9.
30. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol.* 2014;13:924-35.
31. Nesioonpour S, Mokmeli S, Vojdani S, Mohtadi A, Akhondzadeh R, Behaeen K, et al. The effect of low-level laser on postoperative pain after tibial fracture surgery: a double-blind controlled randomized clinical trial. *Anesth Pain Med.* 2014;4:e17350.