

**UNINOVE - UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

ANA CAROLINA ARARUNA ALVES

**ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA
NOCICEPÇÃO, EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS,
NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS NA FASE AGUDA DE ARTRITE
REUMATÓIDE EXPERIMENTAL EM RATOS.**

**São Paulo, SP.
2016**

ANA CAROLINA ARARUNA ALVES

**ANÁLISE DO EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA
NOCICEPÇÃO, EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS,
NEUTRÓFILOS E MACRÓFAGOS NA FASE AGUDA DE ARTRITE
REUMATÓIDE EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Tese apresentada junto à Universidade Nove de Julho
para obtenção do título de
Doutor em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Paulo De Tarso Camillo de Carvalho

São Paulo/SP

Alves, Ana Carolina Araruna.

Análise do efeito da laserterapia de baixa intensidade na nocicepção, expressão de mediadores inflamatórios, neutrófilos e macrófagos na fase aguda de artrite reumatóide experimental em ratos. / Ana Carolina Araruna Alves. 2016.

72 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho.

1. Artrite reumatoide. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Hiperalgesia. 4. Citocinas.

I. Carvalho. Paulo de Tarso Camillo de.

II. Título.

CDU 615.8

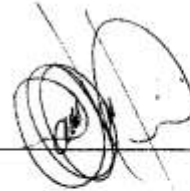
São Paulo, 29 de março de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

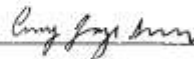
Aluno(a): Ana Carolina Araruna Alves

Título da Tese: "Análise do efeito da laserterapia de baixa intensidade na nocicepção, expressão de mediadores inflamatórios, neutrófilos e macrófagos na fase aguda de artrite reumatóide experimental em ratos".

Presidente: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILLO DE CARVALHO



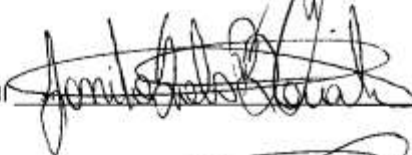
Membro: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR



Membro: PROF. DR. DANILO SALES BOCALINI



Membro: PROF. DR. RODRIGO LEAL DE PAIVA CARVALHO



DEDICATÓRIA

Dedico todo meu esforço e dedicação aos meus pais: Francisco e Betinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, fonte da minha força e persistência.

À minha família: Pais, irmãos, sobrinhos, tios e primos. Por terem sido tantas vezes meu suporte e torcida.

Aos amigos de longa data, desde Rondônia, São José dos Campos e São Paulo. Muitos passaram, e outros ficaram. A todos, obrigada pelas lições e momentos.

Aos mestres desde à primeira infância, passando pelos da faculdade, até os da pós-graduação. Meus espelhos e verdadeiros ídolos.

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, obrigada pela paciência, pela confiança e pela ajuda com amizade paternal.

A todos os funcionários da Uninove, pela disposição e prontidão em auxiliar. Especialmente aos técnicos Ângela e Giovani, às secretárias Camila, Ligia, Andreia e Juliana.

Às minhas amigas durante o programa: Caroline Rambo, Heliadora Leão e Solange Almeida, que foram meus anjos da guarda. Com vocês, tudo foi mais leve.

Aos demais colegas de mestrado e doutorado na Uninove (Agnelo, Patrícia, Nadhia, Luciana, Evela, Anna).

À CAPES pela bolsa PROSUP (Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares) e PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior) pela oportunidade da vivência internacional, de grande aprendizado técnico e pessoal.

RESUMO

O tratamento para Artrite Reumatoide (AR) com inibidores de citocinas tem sido considerado padrão-ouro nas últimas décadas embora ainda não garantam a remissão completa da doença ou da hiperalgesia, sabe-se que a Laserterapia de Baixa Intensidade (LBI) também é capaz de atuar na expressão das citocinas pró-inflamatórias, podendo ser assim, uma alternativa de tratamento para a AR. Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da LBI na fase aguda de AR experimental sobre a nocicepção, sobre o número de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, e linfócitos), e sobre a expressão proteica de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-10) no lavado e cartilagem articular de ratos. Foram utilizados 49 ratos Wistar, machos, com idade aproximada de 90 dias e peso corporal variando de 250 a 300 g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, com 21 animais em cada grupo experimental (grupo Artrite Reumatoide - RA e o grupo tratado com laser AR-LBI), e 7 animais no grupo controle. Cada grupo foi composto por 3 tempos experimentais distintos de acordo com o tempo da eutanásia (6 horas, 24 horas e 48 horas). Para a reprodução da lesão os animais foram submetidos a duas induções: a primeira consistiu em uma infiltração subcutânea no dorso de cada animal (nos grupos AR e AR-LBI) utilizando-se 500 μ g de mBSA diluído em uma solução de 100 μ L de Adjuvante completo de Freund (CFA), e 100 μ L de PBS, esse procedimento foi repetido semanalmente por 21 dias. No 28º dia, foi realizada uma indução intra-articular com 10 μ g de mBSA diluído em 10 μ L PBS, no espaço articular da pata direita traseira de cada animal. Após a indução articular, deu-se início ao tratamento no grupo AR-LBI, por meio do laser da marca DMC® modelo Photon Laser III, com comprimento de onda de λ 808 nm, meio ativo de Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), com potência de 50 mW (densidade de potência de 1,78 W/cm²), área do feixe de 0,028cm² e aplicação sob a forma de dois pontos pelo método transcutâneo nos compartimentos medial e lateral da articulação, dose final foi de 2J, densidade de energia de 71,2 J/cm², e tempo 40s, por ponto. Ao final de cada período experimental (6 horas, 24 horas e 48 horas) os animais foram submetidos à avaliação da nocicepção, seguido de extração do lavado articular e da cartilagem articular, que foram encaminhados às análises de contagem total e diferencial de células, e da expressão proteica dos mediadores inflamatórios descritos. Os resultados demonstram biomodulação da LBI principalmente na expressão de neutrófilos e macrófagos entre os grupos controle e AR, bem como nas citocinas IL-6 e IL-10, contribuindo diretamente para a atenuação da hiperalgesia.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide. Laser de Baixa Intensidade. Hiperalgesia. Citocinas.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) treatment in the last decades has evolved medications with cytokine inhibitors, which though they are today considered the gold standard in RA treatment, still do not guarantee complete remission from the disease or from hyperalgesia, and it is known that Photobiostimulation (PBM) is also capable of acting on the expression of pro-inflammatory cytokines, being in this way an alternative treatment for RA. This research had as its objective the analysis and comparison of the effects of PBM in the acute phase of experimental RA in terms of nociception, of the number of inflammatory cells (neutrophils, macrophages, lymphocytes), and of the protein expression of inflammatory mediators (TNF- α , IL-6, IL-10), in the lavage and joint cartilage of rats. 49 male Wistar rats were used, with an approximate age of 90 days and a body weight varying from 250 to 300g. The animals were randomly distributed in 3 groups, with 21 animals in each experimental group (Rheumatoid arthritis group – RA) and the group treated with PBM (RA-LLLT), and with 7 animals in the control group. Each group was arranged in three distinct experimental periods according to the time of euthanasia (6 hours, 24 hours, and 48 hours). For the reproduction of the lesion the animals were submitted to two inductions: the first consisted in a subcutaneous infiltration in the dorsal of each animal (in the RA and RA-LLLT groups) using 500 μ g of mBSA diluted in a solution of 100 μ L of complete Adjuvant de Freund (CFA), and 100 μ L of PBS, with this procedure being repeated weekly for 21 days. On the 28th day, an intrajoint induction was carried out with 10 μ g of mBSA diluted in 10 μ L of PBS, in the joint space of the right hind paw of each animal. After the joint induction, the treatment on the RA-LLLT group began, using a DMC[®] brand Photon Laser III, with a wave length of λ 808 nm, active medium of Gallium Arsenide, and Aluminium (AsGaAl), with a potency of 50 mW (potency density of 1,78 W/cm²) and area of the beam 0,028cm². The final dose was of 2J, the density of energy of 71,2 J/cm², and time of 40s by point. At the end of each test period (6 hours, 24 hours, and 48 hours) the animals were submitted to an evaluation of their nociception, followed by the extraction of joint lavage and joint cartilage, which were sent for analysis of the total count and differential cells, and for protein expression of the inflammatory mediators described. The results demonstrate biomodulation in the expression of neutrophils and macrophages amongst the control group and RA, as well as in the cytokines IL-6 and IL-10, contributing daily to the attenuation of hyperalgesia by the PBM.

Key-words: Rheumatoid arthritis; Low Intensity Laser; Hyperalgesia; Cytokines.

SUMÁRIO

1 Contextualização.....	11
1.1 Artrite Reumatóide	11
1.2 Células e Mediadores inflamatórios na Artrite Reumatóide	14
1.3 Artrite Rematóide e Hiperalgisia	15
1.4 Tratamento.....	16
1.5 Laserterapia de Baixa Intensidade	17
2 Objetivo	20
2.1 Objetivos Específicos	20
3 Método	21
3.1 Animais de Experimentação	21
3.2 Grupos Experimentais	21
3.3 Protocolo.....	22
3.3.1 Indução da Artrite Reumatóide Experimental.....	22
3.3.2 Aplicação da Laserterapia	23
3.3.3 Eutanásia.....	24
3.4 Avaliações.	24
3.4.1Avaliação da Hiperalgisia com analgesímetro digital von Frey.....	24
3.4.2 Coleta de Material Biológico.....	25
3.4.3 Contagem Total e Diferencial de Células	26
3.3.8 Análise da expressão proteica (ELISA)	26
3.5 Análise Estatística	27
4 Resultados	28
4.1 Contagem Total e Diferencial de Células.....	28
4.1.1 Contagem Total de Células.....	28
4.1.2 Contagem Diferencial de Células (6 horas)	28
4.1.3 Contagem Diferencial de Células (24 horas)	28
4.1.4 Contagem Diferencial de Células (48 horas)	28
4.2 Análise da expressão proteica (ELISA)	29

4.2.1 Expressão Proteica de IL-6.....	31
4.2.2 Expressão Proteica de TNF- α	32
4.2.3 Expressão Proteica de IL-10.....	33
4.3 Avaliação da Hiperalgesia Mecânica.....	34
5 Considerações Finais	36
6 Referências Bibliográficas	41
7 Apêndice	49
8 ANEXO A	50

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Artrite Reumatóide

A Artrite Reumatoide (RA) é uma doença inflamatória autoimune sistêmica, crônica e progressiva, que acomete articulações sinoviais, preferencialmente a membrana sinovial de pequenas articulações das mãos e dos pés, levando à destruição das articulações (óssea e cartilaginosa) e incapacidade (Figuras 1 e 2). Seus principais sintomas são dor crônica, edema, rigidez e aumento da temperatura local em múltiplas articulações e pode gerar grande impacto na qualidade de vida e produtividade, levando a distúrbios do sono e fadiga (1, 2, 3,4).



Figura 1. Apresentação clínica da doença.

(Fonte: <http://fisioterapiapersonalizada.files.wordpress.com/2012/05/ar17130.jpg>. Acesso em 13/04/14 às 19:50h).

Trata-se de uma condição frequente (1 a 2% da população mundial, e na América Latina varia de 0,4 a 1,6%), sendo sua ocorrência observada em todos os grupos étnicos. Há nítido predomínio no sexo feminino (2,5 a três vezes em relação ao sexo masculino), acometendo, sobretudo, pacientes entre a quarta e sexta década de vida, embora haja registro em todas as faixas etárias (5, 6, 7,8).

A etiologia clara da AR nunca foi identificada. Existem, na literatura, achados que relatam fatores genéticos, ambientais e de autoimunidade como determinantes no desenvolvimento da AR (8). Os fatores genéticos predisponentes mais fortes são encontrados nos anticorpos anti-proteínas citrulinadas (AAPCs) e ao Fator Reumatoide (FR) (9, 5, 10). Os

AAPCs e o FR são anticorpos importantes na patogênese da doença e marcadores de diagnóstico e prognóstico. O FR ocorre comumente em doenças infecciosas e inflamatórias, provavelmente refletindo ativação autoimune não específica e se apresenta em cerca de 80 % dos pacientes com AR. Embora marcador sensível para diagnóstico, o FR não é específico para AR. Em contrapartida, os AAPCs são altamente específicos para a AR. Estes anticorpos são dirigidos para proteínas contendo a citrulina e podem ser detectados em aproximadamente 80% dos soros de pacientes com AR com especificidade de 95% a 99%. Além disso, aparecem precocemente durante a evolução da enfermidade, portanto sua detecção apresenta-se bastante útil para auxiliar no diagnóstico da doença, especialmente em suas fases iniciais (11,12, 5, 13).



Figura 2. Apresentação Clínica da Doença. (Fonte: <http://www.mdsaude.com/2010/02/artrite-reumatoide.html> Acesso em 13/04/14 as 19:52h).

A membrana sinovial é o alvo da resposta imune na AR. O revestimento sinovial normal que envolve a cápsula articular de articulações diartrodiais é caracterizado por fina camada de células de linhagem fibroblástica, denominadas sinoviócitos e macrófagos. Com AR, a o revestimento sinovial expande-se dramaticamente em associação com o crescimento alterado de sinoviócitos para formar uma estrutura chamada "pannus". Neste cenário, o fibroblasto sinovial na AR se torna destrutivo e produz mediadores que degradam a

cartilagem e articulações. Os diferentes fenótipos celulares (Figura 3) envolvidos nas articulações (osteoblastos, osteoclastos, condrócitos, macrófagos, células B, Células T e macrófagos) atuam de formas complexas distintas e inter-relacionadas na patogênese e progressão das lesões articulares na AR. Erosão óssea subcondral, esclerose e degradação da cartilagem articular são características centrais das lesões articulares na AR e levam a redução do espaço articular. Sinovite e osteíte associadas a ativação dos osteoclastos e a degradação óssea por metaloproteinases de matriz (MMPs) parecem preceder erosões visualizadas por ressonância magnética ou radiografia (14,15).

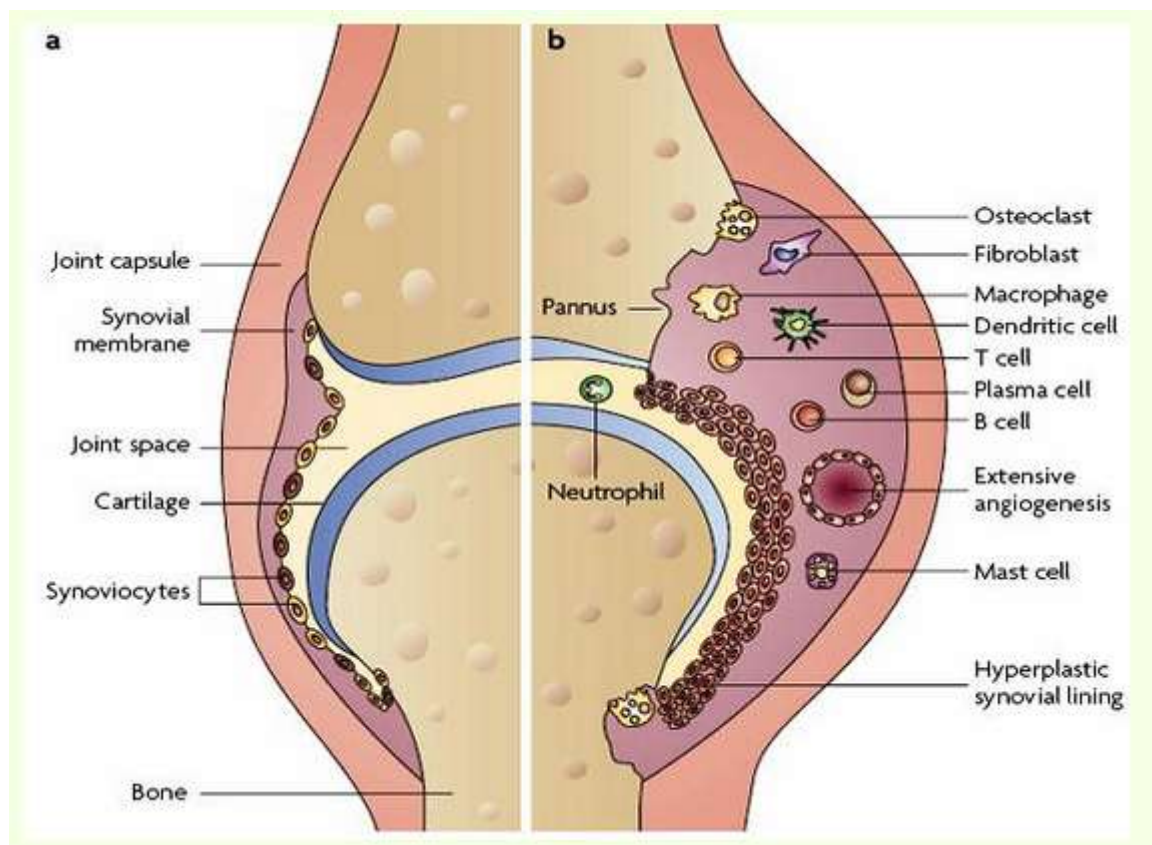


Figura 3. Demonstração dos mediadores envolvidos na inflamação da Artrite Reumatoide: Em a) articulação sem alterações; em b) articulação com artrite reumatoide. Fonte:

http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g9_metotrexato/artrite_reumatoide.html Acesso em 13/04/14 as 19:55h.

Além disso, o infiltrado inflamatório, secreta grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 beta (IL-1 β), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) e estimulam a ativação dos condrócitos e expressão das MMPs resultando em intenso processo inflamatório e degradação de toda a articulação, incluindo o fluido sinovial. Dessa forma, embora a AR seja classificada como artrite inflamatória, a

patologia sinovial sugere complexo processo que transforma a articulação em local de inflamação persistente e destruição tecidual (Figura 4). Assim, vasta gama de processos contribui para a fisiopatologia da AR, e eventualmente, levam à falha articular (15,10,5).

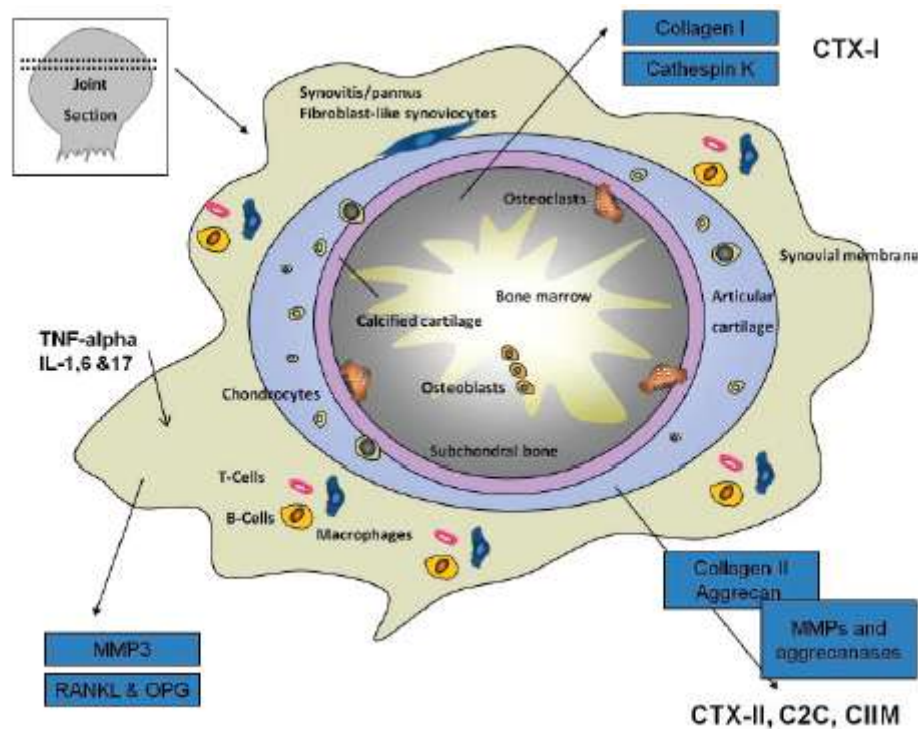


Figura 4. Células envolvidas na lesão articular da artrite reumatóide incluem osteoblastos, osteoclastos, condrocytes, monócitos/macrófagos, Células B, subconjuntos de células T (incluindo as células T reguladoras), e fibroblastos, cada um com papéis complexos e distintos e inter-relacionados na patogênese e progressão da AR (Karsdal, 2011).

1.2 Células e Mediadores Inflamatórios na Artrite Reumatóide

As células e mediadores envolvidos na AR são variados e atuam desde o desencadeamento e perpetuação da inflamação articular e dos seus sintomas até a destruição da cartilagem.

Diversos estudos indicam que os macrófagos, por exemplo, estão envolvidos na fisiopatologia da inflamação articular na osteoartrite (OA), produzindo fatores de crescimento tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e citocinas inflamatórias como a IL-1 β e o TNF α , e que as citocinas produzidas por macrófagos podem amplificar inflamação em articulações (16, 17, 18).

Em lesões articulares como a AR, tanto em fases de agudização como nas fases de remissão, os neutrófilos também parecem estar envolvidos no processo de manutenção da inflamação, modulando o tônus vascular através da vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular e, consequentemente, o edema. Atuam ainda na resposta

inflamatória, em adição à sua capacidade para apresentar antígenos, secretam citocinas e prostaglandinas, e ainda mediadores responsáveis pela fase tardia da inflamação, como espécies reativas de oxigênio (ROS), o que também culmina na destruição da cartilagem articular (18,19).

Durante a inflamação articular, portanto, as células sinoviais produzem grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6. De fato, a literatura demonstra que citocinas como IL-1 β são capazes de comprometer a integridade da cartilagem de articulações em processos inflamatórios crônicos como a AR e a OA. (20, 21, 22).

O TNF- α , por exemplo, é um dos principais mediadores inflamatórios, e é produzido por diversos tipos celulares. Além disso, os efeitos biológicos observados após a estimulação *in vitro* ou *in vivo* com o TNF- α , decorrem de sua ligação a receptores específicos localizados na membrana celular. Devido a sua interação com o sistema imune, esta citocina é capaz de exacerbar os sinais e sintomas de doenças que são desencadeadas por alterações da resposta imunológica, como o lúpus eritematoso e AR. Considerando os resultados que descrevem o envolvimento do TNF- α na resposta inflamatória crônica, esta citocina tem sido alvo de ação de terapias anti-inflamatórias (23, 24, 25, 26).

A citocina interleucina 6 (IL-6) é envolvida em uma variedade de atividades biológicas, entre as quais a de defesa do hospedeiro contra infecções e lesões dos tecidos por estimulação da resposta imune de fase aguda. Quando a homeostase dos tecidos é restaurada, a síntese de IL-6 cessa. No entanto, a produção contínua e desregulada de IL-6 por populações distintas de células desempenha um papel patológico várias doenças. Na AR, esta citocina parece estar envolvida na produção de auto-anticorpos, inflamação local, degradação óssea e sinais e sintomas inflamatórios crônicos (27, 28).

Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) podem auxiliar no controle da inflamação e do dano articular provocados pela atuação primária de citocinas pró-inflamatórias em AR (29).

1.3 Artrite Reumatóide e Hiperalgisia

A dor em pacientes com artrite inflamatória tem sido atribuída a inflamação periférica, sendo ela o principal motivo que leva os pacientes com artrite inflamatória a procurar cuidados com o especialista. Entre aqueles com AR, 68-88% relatam a dor como uma de suas prioridades, e 90% deles, como uma de suas três prioridades. O Colégio Americano de Reumatologia publicou recentemente que "a dor é provavelmente o mais importante sintoma relatado pelo paciente em reumatologia. ”

O tratamento com drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) em ensaios clínicos com pacientes de AR em estágio inicial tem sido eficaz na redução dos sintomas inflamatórios de dor, com diminuição de 2-4 pontos na EVA, Escala Visual Analógica. Entretanto, apesar da terapia com DMARD ser eficaz, estudos observacionais de artrite inflamatória indicam que muitos pacientes continuam a sofrer de dor moderada (30).

Dessa forma, apesar da dor representar uma variável importante de como a doença pode estar influenciando a vida do paciente, o seu manejo não está ligado à cura da doença.

1.4 Tratamento

O tratamento atual da AR baseia-se desde a realização de cirurgia de substituição total da articulação, até a introdução de novas classes de DMARDs, como as medicações modificadoras da resposta biológica (terapia anti TNF- α , anti-IL-1 β e anti- IL-6), que suprimem a inflamação.

Nas últimas duas décadas, a terapia para AR passou por intensas mudanças. Tratamentos com medicamentos modernos, incluindo terapias inibidoras de citocinas, não promovem a cura, mas visam melhorar os resultados a curto e longo prazo, através da supressão da inflamação. A completa supressão da inflamação (remissão clínica) é cada vez mais viável, e pode melhorar os resultados a longo prazo. Esses avanços, apesar de terem melhorado a qualidade de vida de grande número de pessoas, ainda não são disponíveis a toda à população, visto que são associados a despesas substanciais no âmbito da saúde, e ainda assim, no entanto, 15% dos pacientes submetidos à artroplastia total do joelho podem continuar a ter dor persistente e incapacitante, e até 25% dos pacientes que receberam terapia anti-TNF não relatam nenhum benefício significativo.

Vale ressaltar que o fator limitante à boa resposta terapêutica continua sendo o retardo no diagnóstico e na instituição do tratamento adequado, bem como a dificuldade de manejo da medicação durante o acompanhamento do paciente. As terapias biológicas e cirurgia são reservadas para as pessoas com a doença mais avançada ou grave, e para a maioria dos doentes o controle da doença depende de cocorticosteróides e DMARDs tradicionais (31, 4). Nesse contexto, além das intervenções farmacológica e cirúrgica, terapias convencionais tais como fisioterapia, terapia ocupacional e programas abrangentes de reabilitação e autogestão são intervenções comumente usadas.

As lesões cartilaginosas (traumáticas ou degenerativas) são doenças ambulatoriais comuns na prática da Fisioterapia, e muitas vezes levam a perda da função articular, aumento

da morbidade e diminuição da qualidade de vida dos pacientes acometidos. Na literatura, são citados diversos métodos e recursos para o atendimento de pacientes com lesões cartilaginosas para promover a reparação do tecido, dentre esses, a terapia a laser de baixa intensidade (LBI).

1.5 Laserterapia de Baixa Intensidade

A LBI é uma forma de fototerapia que envolve a aplicação da luz laser de baixa potência nos comprimentos de onda vermelho ou infravermelho para tratar diversas doenças. A intensidade dos seus efeitos depende do metabolismo celular ou da condição clínica tecidual antes da irradiação. As características que diferem a luz laser de uma luz halógena são: monocromaticidade, colimação e coerência (32-39).

O termo Laser é um acrônimo para “Light Amplification by emission of radiation” (amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação). A LBI é uma modalidade de tratamento clínico que não produz efeito térmico sobre os tecidos, portanto, os efeitos biológicos não podem ser atribuídos ao aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas, sim, nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e nos tecidos irradiados.

A interação da luz laser com os tecidos biológicos é determinada pelo seu comprimento de onda e pelas características ópticas de cada tecido. Cada tipo de laser resulta em luz de comprimento de onda específico e cada comprimento de onda reage de uma maneira diferente com determinado tecido (40). Em baixas intensidades de luz, predomina a conversão da energia absorvida por fotoreceptores endógenos e também por moléculas fotoaceitadoras não especializadas. A este fenômeno denominamos de biomodulação (41). Os mecanismos da LBI são complexos, mas que essencialmente, ocorrem por meio da absorção da luz no espectro visível ou infravermelho por fotoreceptores dentro de componentes subcelulares, resultando na ativação de enzimas da cadeia respiratória, principalmente o citocromo c no interior da mitocôndria ou da bomba de sódio-potássio (42).

Em 2003, Martin relatou que em nível celular os citocromos podem ser definidos como proteínas ou transferentes de elétrons que transportam a energia produzida para as funções biológicas dos tecidos humanos. As enzimas citocromo c oxidase e óxido nítrico (NOS) têm sido particularmente responsabilizadas pela reação à estimulação pela luz laser. A particular afinidade destas e de outras enzimas fotoreativas, aceleram suas funções na presença da LBI e provocam aumento de ATP e óxido nítrico (NO) no interior da molécula, mudanças estas que acentuam o metabolismo celular e circulatório (43).

Afirmou-se então, que a LBI tem potencial para estimular a atividade enzimática, enquanto este aumento de energia, induz a aceleração da reprodução do DNA mitocondrial e a proliferação celular (40, 37).

As reações fotobiológicas do laser terapêutico dependem da absorção de um comprimento de onda específico para ativação das moléculas fotoreceptoras, e que este efeito fotobiológico natural significa que alguma molécula fotoreceptora deve absorver primeiramente a luz utilizada para a irradiação do tecido. Esta absorção de luz promove uma excitação eletrônica em nível celular e provoca mudanças na propriedade redox destas moléculas, consequentemente, a aceleração na transferência dos elétrons (reações primárias). Após o início destas reações, iniciam-se as reações secundárias em cascata em nível celular, como por exemplo, o acréscimo na síntese de DNA (44).

A radiação com LBI emitida no intervalo do espectro visível ao infravermelho próximo ativa os efeitos celulares por três vias principais, embora seus efeitos ainda não estejam completamente estabelecidos e compreendidos (45):

1. O mecanismo fotobiológico de ação via ativação da cadeia respiratória, onde os fotoreceptores realizam o controle sobre o nível de ATP intracelular. Este evento pode significar uma alteração no metabolismo das células.

2. Ativação e mudanças na propriedade redox dos componentes da cadeia respiratória nas células: a fotoexcitação de certos cromóforos na molécula citocromo c oxidase influencia a condição redox destes centros e, consequentemente, a taxa de escoamento dos elétrons no interior da molécula.

3. Ativação indireta das células via liberação de mensageiros secundários das células ativadas diretamente: moléculas de oxigênio que reagem produzidas pelos fagócitos, linfocinas e citocinas produzidas através de várias subpopulações de linfócitos, ou ainda, a não produção de macrófagos ou como um resultado da não fotólise da hemoglobulina das células sanguíneas.

Diversos estudos experimentais *in vivo*, *in vitro* e clínicos têm demonstrado os efeitos positivos da fotobioestimulação por meio da LBI em: proliferação celular, incremento da microcirculação, neoformação vascular, estimulação da produção de colágeno pelos fibroblastos e reparação óssea. Entretanto, quando se trata de lesões cartilaginosas os resultados ainda são incipientes e controversos. Os resultados demonstram que tanto a bioestimulação como a bioinibição parecem estar relacionadas com o comprimento de onda e com a energia gerada. Portanto, os parâmetros utilizados afetam diretamente os resultados (36, 46-55).

Alguns estudos confirmam o alívio da dor observada entre os pacientes com AR tratados com LBI (56-60). Outros, ainda, relatam um mecanismo de ação anti-inflamatório da LBI e efeitos analgésicos, normalização da permeabilidade da membrana sinovial, aumento da microcirculação tecidual, redução de edema, aumento da fibrose da membrana sinovial, e aumento da síntese de proteínas das células sinoviais, uma síntese que indica um processo de regeneração sinovial (36, 61, 62, 63). Entretanto, mais estudos são necessários a fim de definir um padrão de tratamento com a LBI para determinar efeitos em longo prazo nos doentes com AR (64, 65).

Nesse sentido, considerando o atual panorama de tratamento da AR, justifica-se, portanto, a proposta de um estudo da ação da LBI sobre modelo experimental de AR, devido: ao tratamento medicamentoso conservador não atuar na remissão clínica da doença e produzir efeitos adversos indesejáveis, os tratamentos inibidores de citocinas não apresentarem resultados totalmente satisfatórios e por ser um tratamento de alto custo e ainda, devido aos efeitos positivos da fotobioestimulação obtidos por meio da LBI relatados pela literatura sobre citocinas inflamatórias em diversos tipos de tecido e modelos experimentais (66, 67), bem como a não uniformização de uma dosimetria adequada para a utilização deste recurso, por ser um tratamento de baixo custo, sem efeitos colaterais e de fácil acesso. Propõe-se assim, alternativa de tratamento não-invasiva e sem efeitos deletérios.

2 OBJETIVO

Analisar os efeitos da LBI sob a nocicepção e processo inflamatório em modelo experimental agudo de Artrite Reumatóide.

2.1 Objetivos Específicos

Analisar os efeitos da LBI sobre:

- A hiperalgesia mecânica na articulação;
- O número de células totais e diferenciais no lavado articular do joelho;
- Os níveis de expressão proteica por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) das citocinas:
 - Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interleucina 10 (IL-10) no lavado articular.

3 MÉTODO

3.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados 49 ratos (*norvergicos albinus*), de linhagem Wistar, machos com idade aproximada de 90 dias com peso corporal variando de 250 a 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho - UNINOVE, mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação do Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho (AN0020/2014) e estavam de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aos padrões de experimentação animal do International Council for Laboratory Animal Science.

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 3 grupos distintos, sendo:

Grupo Controle (C): Os animais não submetidos a lesão, ou a LBI;

Grupo Artrite Reumatóide (AR): Os animais foram submetidos a lesão, mas não foram tratados com LBI;

Grupo LBI 2J (AR-LBI): Os animais foram submetidos a lesão e tratados com laser de baixa potência, com dose de 2J.

Os animais referentes aos grupos experimentais (AR e AR-LBI) foram distribuídos em 3 tempos experimentais distintos: 6 horas, 24 horas e 48 horas. Nesses 2 grupos, portanto, 7 animais compuseram cada tempo experimental (Figura 5).

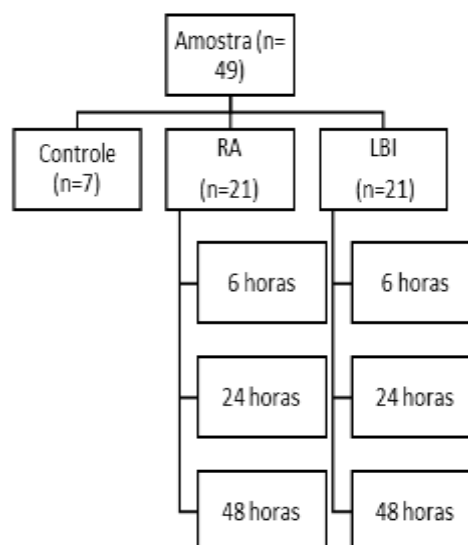


Figura 5. Composição dos grupos experimentais e tempos experimentais.

3.3 Protocolo

3.3.1 Indução da Artrite Reumatóide Experimental

Os animais dos grupos AR e AR-LBI foram anestesiados antes de cada infiltração da substância indutora da lesão com mistura de Ketamina (10%) e Xilasina (2%) por via i.p., numa dose de 87 e 13 mg/kg.

Após o procedimento anestésico foi realizada uma infiltração subcutânea no dorso de cada animal utilizando-se 500 µg mBSA diluído em solução de 100 µL de CFA, e 100µL de PBS (Figura 6A). Esse procedimento foi usado para produzir reação autoimune, e repetido semanalmente por 21 dias (3 semanas). No dia 28 (quarta semana) foi realizada indução no complexo articular do joelho, com 10 µg de mBSA diluído em 10µL PBS (Figura 6B), após procedimento anestésico, na pata direita traseira de cada animal. (68). Após a indução articular, deu-se início ao tratamento no grupo LBI, bem como eutanásia de cada grupo, nos devidos tempos experimentais. A sequência dos procedimentos experimentais pode ser vista na Figura 7.

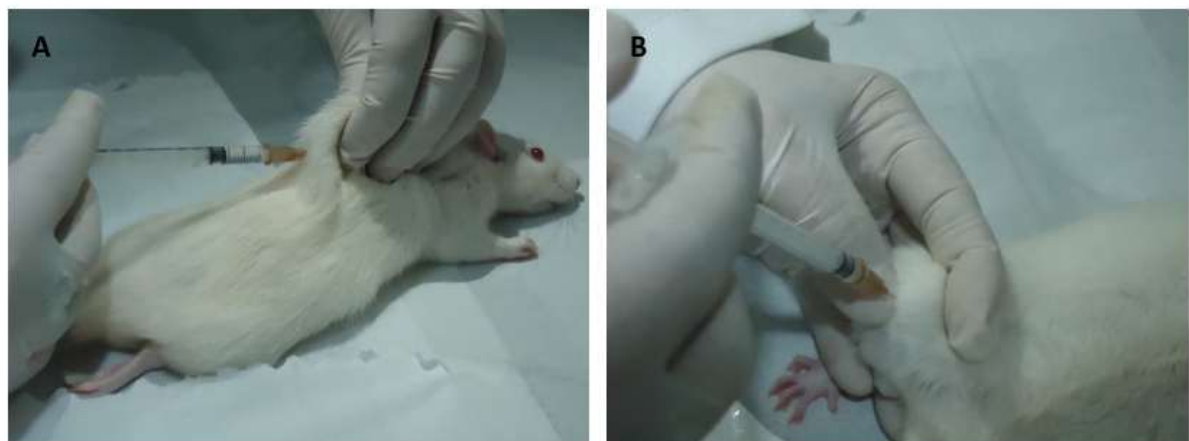


Figura 6: A Indução Sistêmica; B: Indução Local.

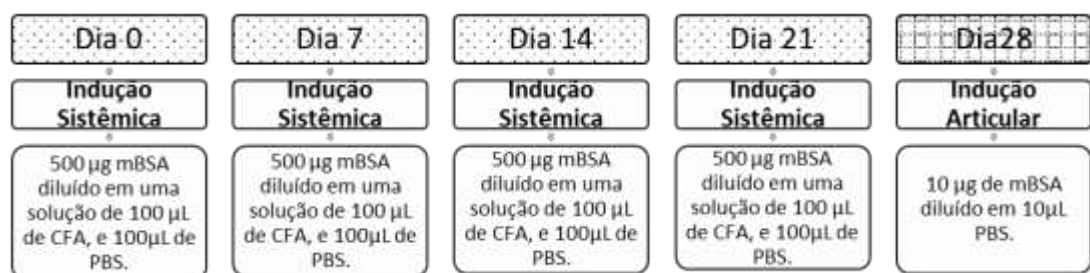


Figura 7. Linha do tempo da indução da AR.

Após as infiltrações os animais foram colocados em gaiolas limpas, sendo cinco em cada uma, com água e ração apropriada à vontade. Perdas amostrais durante o procedimento foram substituídas para dar continuidade à pesquisa.

3.3.2 Aplicação da Laserterapia

No grupo tratado com LBI, foi utilizado o Laser da marca DMC[®] modelo Photon Lase III, com comprimento de onda de λ 808 nm, meio ativo de Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) e a aplicação se deu sob forma de dois pontos pelo método transcutâneo nos compartimentos medial e lateral da articulação, com dose final de 2J (Figura 8A e B).

A escolha dos parâmetros (Tabela 1) foi pautada em estudos prévios do grupo de pesquisa, principalmente a potência de saída, que demonstrou bons resultados em manejo do processo inflamatório e reparo tecidual, bem como processo de regeneração da cartilagem articular, em modelo experimental de OA (17, 18, 65).

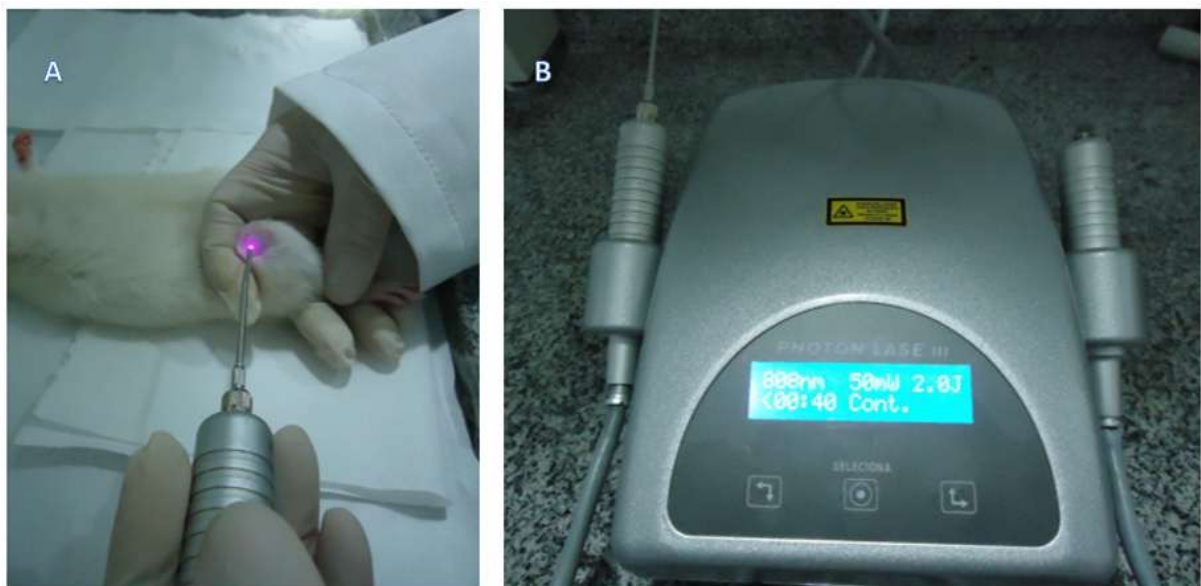


Figura 8. A: Aplicação do Laser; B: Parâmetros do aparelho.

O tratamento foi iniciado logo após a indução local (ou indução intra-articular), no grupo experimental 2J, nos tempos experimentais relatados, totalizando 1, 2 ou 3 sessões de tratamento até a eutanásia de cada grupo.

3.3.3 Eutanásia

Ao final de cada período experimental (6, 24 e 48 horas) os animais foram identificados, pesados e posteriormente sacrificados administrando-se, Tiopental (THIOPENTAX - Cristália), dose de 100mg/kg por via intraperitoneal associado a lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália) (69).

Parâmetros de Tratamento com LBI	
Frequência - Modo	Contínuo
Potência de Saída	50 mW
Densidade de Potência	1,78 W/cm ²
Área do Feixe	0,028 cm ²
Número de Pontos	2
Local	Compartimentos Medial e Lateral (Pata Traseira Direita)
Método	Transcutâneo
Energia/Ponto	2J
Tempo de Tratamento/Ponto	40s
Densidade de Energia	71,2 J/cm ²
Energia Total / Terapia	4J

Tabela 1. Descrição dos Parâmetros de tratamento da LBI.

3.4 Avaliações

3.4.1 Avaliação da Hiperalgisia com analgesímetro digital von Frey

Foi avaliada a hiperalgisia mecânica segundo método descrito por Cunha et al. (2008). Para esta avaliação, os animais foram colocados, individualmente, em gaiolas de acrílico transparente, apoiados sobre uma plataforma com fundo vazado, para permitir acesso a superfície plantar (Figura 9A). Os animais foram inicialmente, habituados às gaiolas, por uma hora, durante os 3 dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados na gaiola, 20 minutos antes do início de cada medida (70).

Para realização da avaliação da hiperalgisia foi utilizado um analgesímetro digital Insight Ltda (Ribeirão Preto/Sp, Brasil) com capacidade de transdutor: 0,1 – 1000 gramas, tempo de reação 1ms (Figura 9B). Assim, a avaliação consiste em transdutor de pressão conectado a um contador digital de força, expressa em gramas. O contato do transdutor de pressão com a área da superfície plantar foi realizado por intermédio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro, acoplada a sua ponta do transdutor de pressão.

Um examinador experiente e treinado aplicou a ponteira perpendicularmente com uma

pressão linearmente crescente na superfície plantar dos ratos, por dentro a plataforma com fundo vazado, até que o animal produzisse uma resposta de retirada da pata.

Para esta avaliação foram realizadas três medidas por animal, somente na pata traseira direita (correspondente a pata onde foi realizada a indução local da AR), sendo realizada a média aritmética dessas três medidas para posterior análise estatística.

A sala para realização destes procedimentos foi caracterizada sem nenhum tipo de interrupção sonora que agitasse os animais, só estava presente um examinador responsável pela avaliação, não sabendo as respectivas alocações dos animais em seus grupos.

A avaliação da hiperalgesia foi realizada nos três grupos (controle, AR e AR-LBI) e em todos os períodos experimentais: 6 horas, 24 horas e 48 horas.

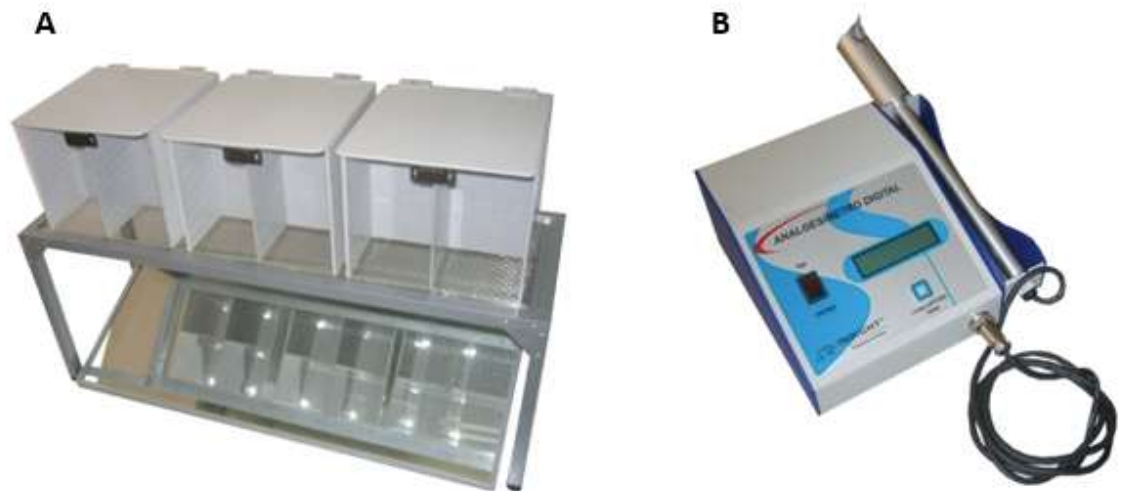


Figura 9. A: Gaiola de contenção com suporte para avaliação da hiperalgesia; B: Analgesímetro digital utilizado para a avaliação da hiperalgesia.

3.4.2 Coleta de Material Biológico

Após a eutanásia, foi realizada a tricotomia do joelho direito e o animal posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução. Desarticulou-se a articulação coxo-femoral da pata direita traseira de cada animal, para posterior análise do tecido cartilaginoso da articulação do joelho (esses foram imediatamente fixados por meio de solução de formol tamponado a 10% e encaminhados para procedimentos histológicos), e foi realizado ainda, procedimento para obtenção do lavado articular sendo que a cavidade articular foi lavada 2 vezes com 5µl de PBS contendo 1 mM EDTA e diluído posteriormente em 90µl de PBS + EDTA. O material foi imediatamente centrifugado (300Xg/10min) e o sobrenadante armazenado a -80°C para análise dos mediadores inflamatórios.

3.4.3 Contagem Total e Diferencial de Células

Para quantificação de células inflamatórias, o lavado recuperado foi centrifugado a 1500rpm, durante 5 minutos, e o botão celular ressuspensionado em 200 µl de PBS. As células totais foram então contadas em um hematocítmetro (câmara de Neubauer espelhada; 10 µl foram utilizados, diluindo-se em solução de Turk 1:5). O restante do material do lavado articular foi completamente utilizado para a contagem diferencial das células (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). Para isso, o lavado articular foi processado em uma citocentrífuga (Citocentrífuga BIO research, 450rpm por 6 minutos) e as lâminas contendo o botão celular foram coradas com Diff Quick. Foram contadas 300 células por lâmina como previamente descrito (71, 72).

3.4.4 Análise da expressão protéica (ELISA)

A dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β das amostras do lavado articular foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D System, EUA). Para tanto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µl de anticorpo monoclonal para TNF- α e IL-1 β foram diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). A seguir, 100µl das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa, e deixadas por 18 h em temperatura de 4 °C. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300 µl/poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) à 37°C por 3 horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. Após lavagem, 100µl dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100µl de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por 1 h em temperatura ambiente (22 °C) seguida de novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100 µl/poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450nm com correção a 570nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para TNF- α é de 1,95 pg/ml.

3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2007 e inicialmente avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, concluindo como resultado a distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância Two-Way ANOVA e “*post hoc test*” Bonferroni para comparações entre os grupos experimentais. Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Foi utilizado o Software GraphPad Prism 5. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas, tomando-se como hipótese de nulidade $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados da presente Tese serão apresentados no formato de artigo. O estudo foi intitulado “Analysis of Photobiostimulation effects on Inflammation and Hyperalgesia in acute phase of experimental Rheumatoid Arthritis in rats” e foi submetido à publicação na revista Osteoarthritis and Cartilage (Anexo A).

4.1 Contagem Total e Diferencial de Células

4.1.1 Contagem Total de Células

Os dados apresentados mostram a contagem total de células viáveis no lavado das articulações, que foram contadas na câmara de Neubauer. O grupo controle tinha menos células ($6,8 \pm 0,5$) do que o grupo AR ($72,8 \pm 5,3$) e o grupo RA-LBI ($32,3 \pm 0,8$).

4.1.2 Contagem Diferencial de Células (6 horas) OK.

Os dados obtidos pela contagem diferencial de células foram submetidos a teste estatístico ANOVA two way e seguido de *post hoc* test Bonferroni, para a comparação de 6 horas após o estabelecimento da lesão (AR). O cruzamento estatístico da contagem diferencial de macrófagos quando comparado o grupo controle ($16,0 \pm 1,5$) com grupo AR ($3,0 \pm 0,5$) e grupo AR- LBI ($25,0 \pm 3,0$), pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$), já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se também para *post hoc* test Bonferroni ($p < 0.001$). Nos resultados para neutrófilos também submetidos a mesma análise estatística observou-se quando comparado o grupo controle ($39,0 \pm 4,0$) com grupo AR ($79,0 \pm 6,8$) pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0,001$), e com grupo AR- LBI ($47,0 \pm 3,7$), ($p < 0.01$), já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se ($p < 0.001$). Ainda foi realizada a contagem de linfócitos que quando comparamos o grupo controle ($45,0 \pm 3,9$) com grupo AR ($19,0 \pm 2,0$) e grupo AR-LBI ($28,0 \pm 2,1$), pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$), já na comparação entre os grupos com AR e AR-LBI obteve-se também para *post hoc* test Bonferroni ($p < 0.001$) (Figura 10).

4.1.3 Contagem Diferencial de Células (24 horas)

Os dados obtidos pela contagem diferencial de células foram submetidos a teste estatístico ANOVA two way e seguido de *post hoc* test Bonferroni, para a comparação de 24 horas após o estabelecimento da lesão (AR). O cruzamento estatístico da contagem diferencial

de macrófagos quando comparado o grupo controle ($16,0 \pm 1,5$) com grupo AR ($22,0 \pm 2,0$) obteve-se ($p < 0.05$) e na comparação entre controle e o grupo AR-LBI ($76,0 \pm 6,2$), pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$), já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se também para *post hoc* test Bonferroni ($p < 0.001$). Nos resultados para neutrófilos também submetidos a mesma análise estatística observou-se quando comparado o grupo controle ($39,0 \pm 4,0$) com grupo AR ($60,0 \pm 4,5$) pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$), e com grupo AR-LBI ($13,0 \pm 2,0$), ($p < 0.001$), já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se ($p < 0.001$). Ainda foi realizada a contagem de linfócitos que quando comparamos o grupo controle ($45,0 \pm 3,9$) com grupo AR ($18,0 \pm 2,0$) e o grupo AR-LBI ($11,0 \pm 1,5$), pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$), já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se também para *post hoc* test Bonferroni ($p < 0.001$) (Figura 11).

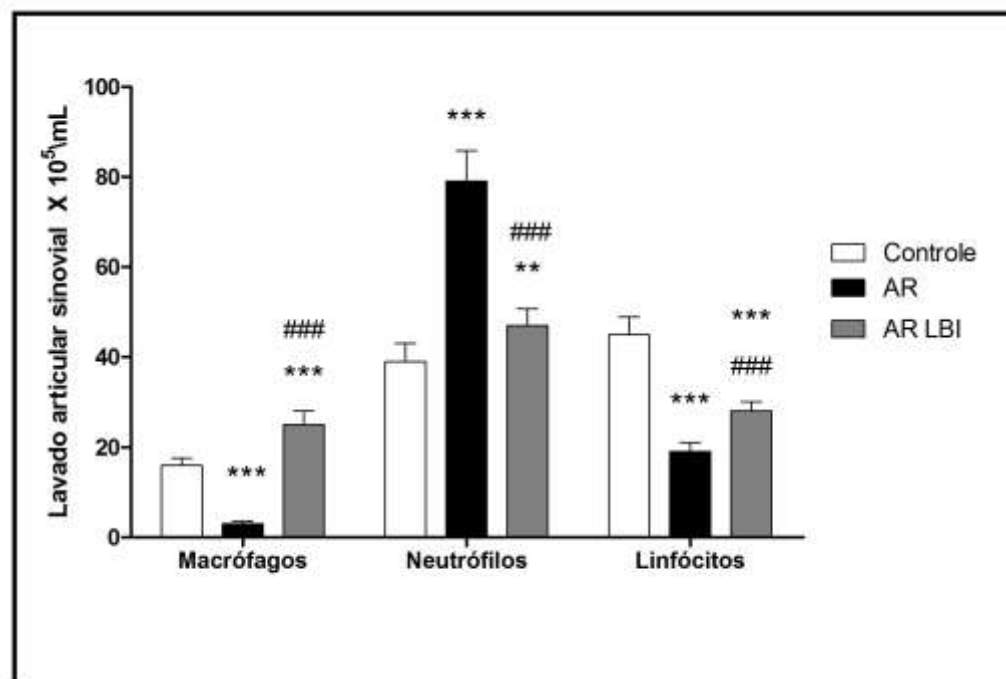


Figura 10: Análise do lavado articular 6 h após a AR induzida com contagem diferencial que foi determinada em preparações de cytopspin coradas com Diff-Quik, para macrófagos, linfócitos e neutrófilos. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ para o Bonferroni *post hoc* test quando comparada com o grupo controle. ## $P < 0,01$ para o Bonferroni *post hoc* test quando comparada com o grupo AR. Os resultados são expressos como média e $\pm$ desvio padrão.

4.1.4 Contagem Diferencial de Células (48 horas)

Os dados obtidos pela contagem diferencial de células foram submetidos a teste estatístico ANOVA two way e seguido de *post hoc* test Bonferroni, para a comparação de 48 horas após o estabelecimento da lesão (AR). O cruzamento estatístico da contagem diferencial

de macrófagos quando comparado o grupo controle ($16,0 \pm 1,5$) com grupo AR ($71,0 \pm 6,7$) e grupo AR-LBI ($54,0 \pm 4,5$), pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$). Nos resultados para neutrófilos também submetidos a mesma análise estatística observou-se quando comparado o grupo controle ($39,0 \pm 4,0$) com os grupos AR ($3,0 \pm 0,4$) e com grupo AR-LBI ($2,0 \pm 0,1$), pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$), já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se ($p > 0.05$) ou seja não se observou diferença entre os grupos. Ainda foi realizada a contagem de linfócitos que quando comparamos o grupo controle ($45,0 \pm 3,9$) com grupo AR ($26,0 \pm 2,1$) pelo *post hoc* test Bonferroni, obteve-se ($p < 0.001$) e comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI ($44,0 \pm 3,9$) obteve-se ($p > 0.05$) ou seja não se observou diferença entre os grupos. Já na comparação entre os grupos AR e AR-LBI obteve-se também para *post hoc* test Bonferroni ($p < 0.001$) (Figura 12).

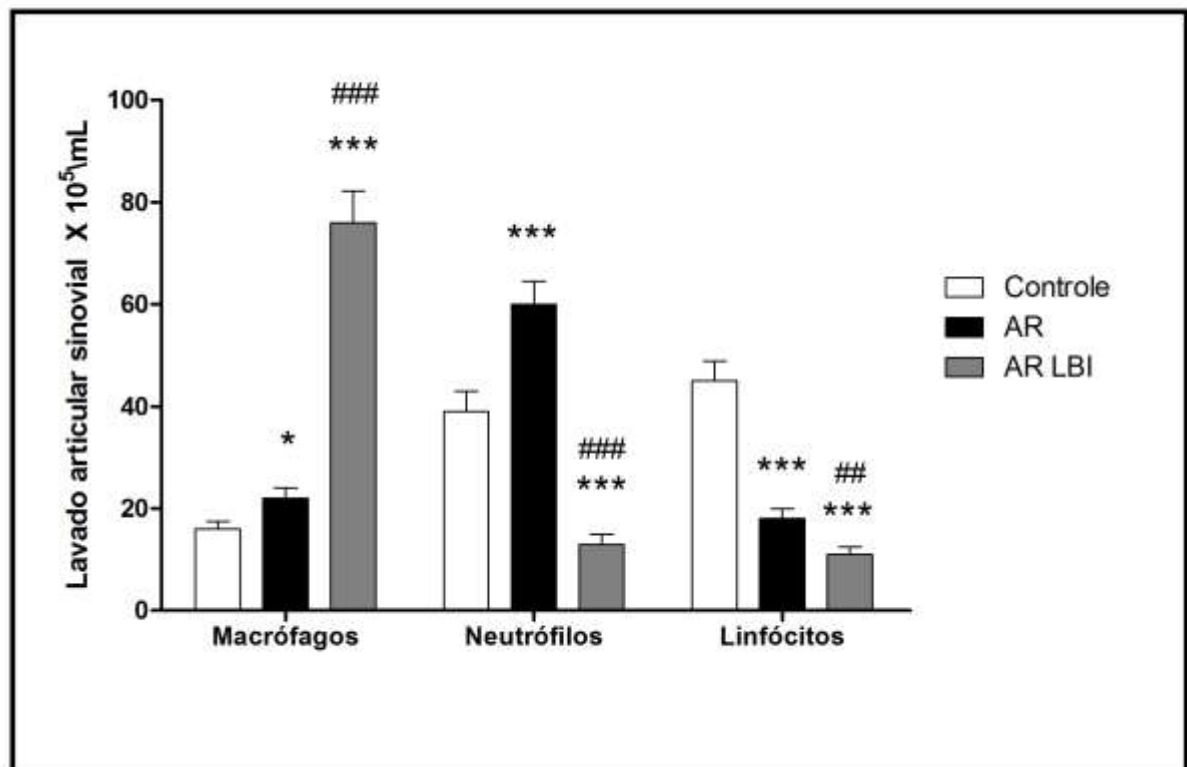


Figura 11: Análise do lavado articular 24 h após a artrite reumatoide induzida com contagem diferencial que foi determinada em preparações de cytopspin coradas com Diff-Quik, para macrófagos, linfócitos e neutrófilos. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ para o Bonferroni *post hoc* test quando comparada com o grupo controle. ## $P < 0,01$; ### $p < 0,001$ para o Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo AR. Os resultados são expressos como média e $\pm$ desvio padrão.

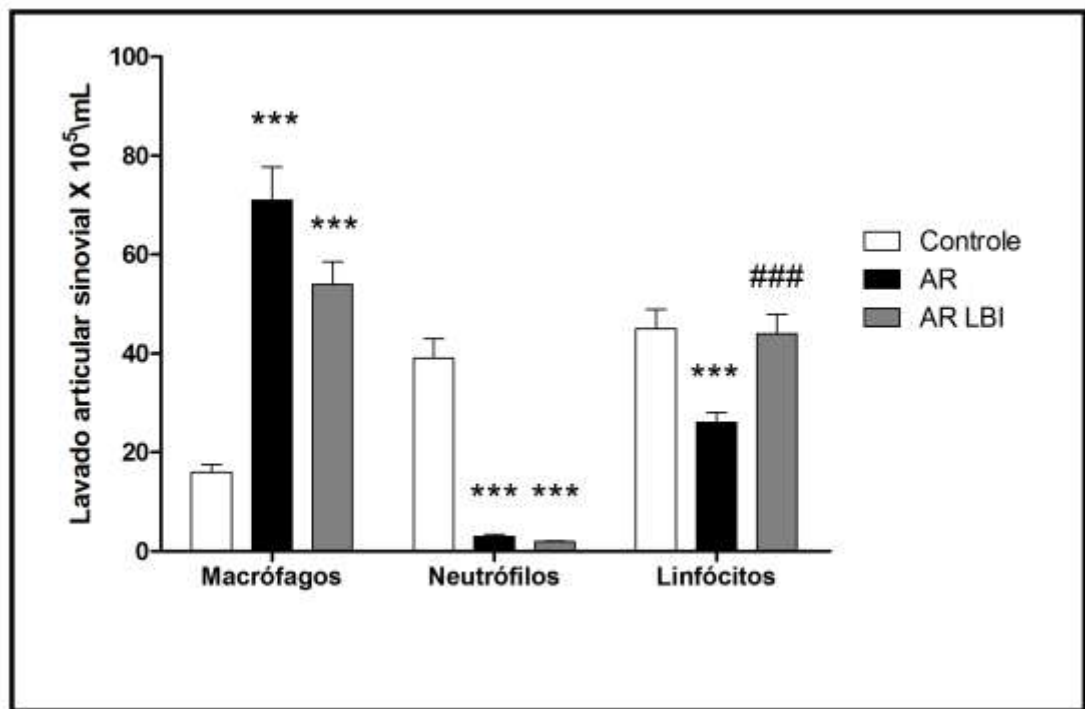


Figura 12: Análise do lavado articular 48 h após a artrite reumatoide induzida com contagem diferencial que foi determinada em preparações de cytopspin coradas com Diff-Quik, para macrófagos, linfócitos e neutrófilos. *** $p < 0,001$ para o Bonferroni *post hoc* test quando comparada com o grupo controle. ### $p < 0,001$ para o Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo AR. Os resultados são expressos como média e $\pm$ desvio padrão.

4.2 Análise da Expressão proteica (ELISA)

4.2.1 Expressão proteica de IL-6

Na comparação para expressão proteica da interleucina -6 (IL-6) utilizando *post hoc* test Bonferroni observamos: Na análise do período experimental 6 horas entre o grupo controle (121.30 ± 24.76 pg/ml) e os grupos AR (181.00 ± 26.5 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (128.50 ± 25.64 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Já na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.01$). Na análise 24 horas após a lesão entre o grupo controle (121.30 ± 24.76 pg/ml) e os grupos AR (224.80 ± 31.2 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (142.63 ± 21.70 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$). Na comparação de 48 horas entre o grupo controle (121.30 ± 24.76 pg/ml) e os grupos AR

(255.89 ± 33.3 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (147.91 ± 22.80 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$) (Figura 13).

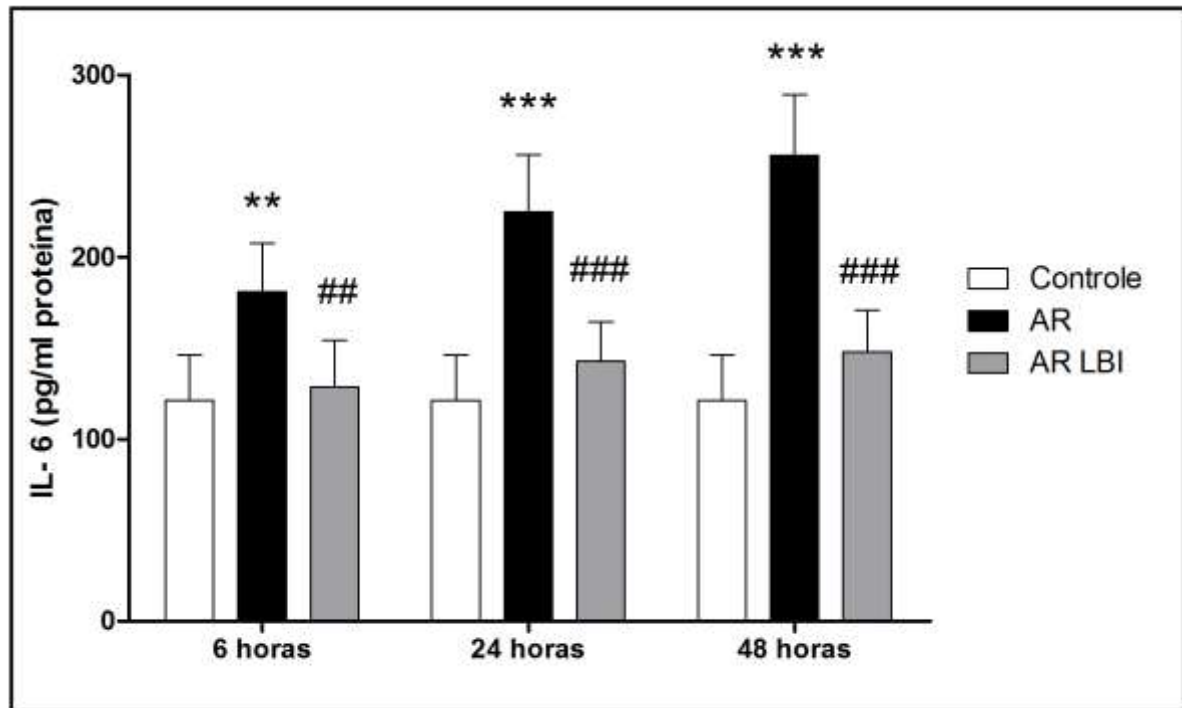


Figura 13: Comparação da média e desvio padrão dos níveis de interleucina-6 em 6, 24 e 48 h obtido a partir de lavado articular utilizando o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) nos grupos controle, AR e AR-LBI. ** Indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$ pelo Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo controle; e ## indica $p < 0,01$, ### indica $p < 0,001$, pelo Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo AR.

4.2.2 Expressão proteica de TNF- α

Na análise estatística da expressão proteica de TNF- α utilizando *post hoc* test Bonferroni, observamos: No período experimental 6 horas entre o grupo controle (12.26 ± 4.4 pg/ml) e os grupos AR (27.40 ± 6.0 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (15.48 ± 4.4 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Já na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$). Na análise 24 horas após a lesão entre o grupo controle (12.260 ± 4.456 pg/ml) e os grupos AR (28.12 ± 3.2 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (17.52 ± 3.0 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$). Na comparação de 48 horas entre o

grupo controle (12.260 ± 4.456 pg/ml) e os grupos AR (31.40 ± 5.8 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (18.3 ± 3.4 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$) (Figura 14).

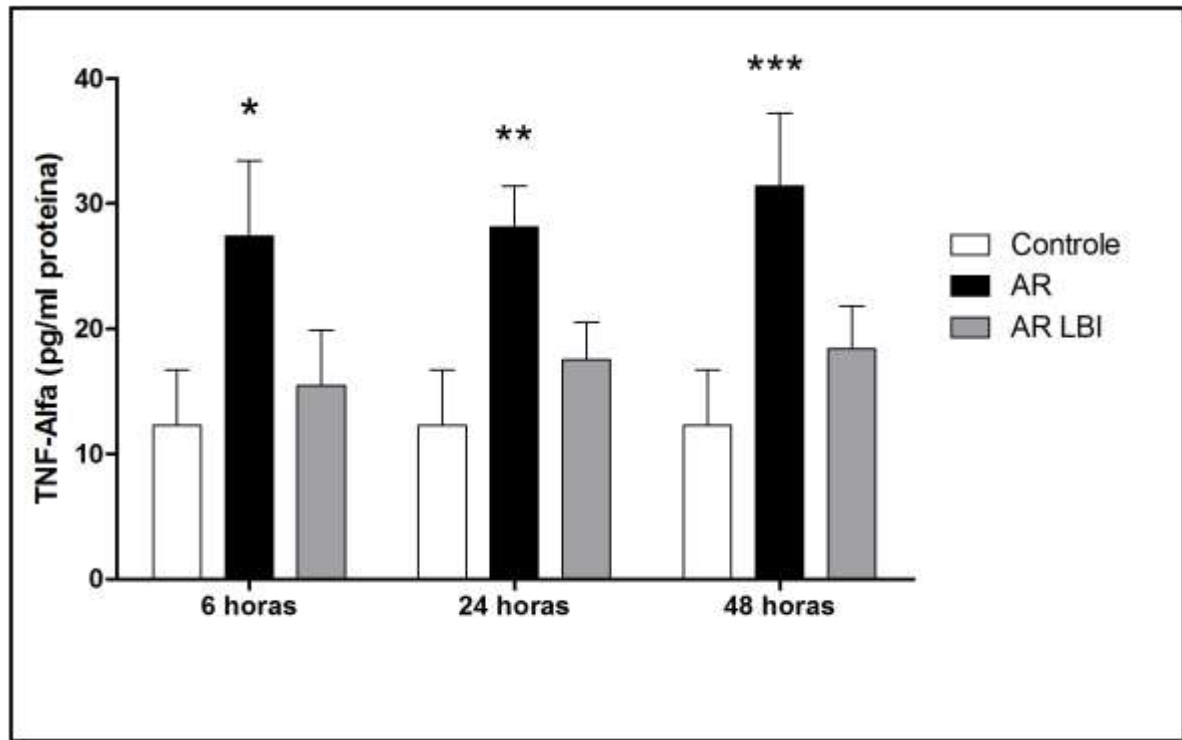


Figura 14: Comparação da média e desvio padrão dos níveis de TNF- α em 6, 24 e 48 h obtido a partir de lavado articular utilizando o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) nos grupos controle, AR e AR-LBI. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ pelo Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo controle; e ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, pelo Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo AR.

4.2.3 Expressão proteica de IL-10

Na comparação para expressão proteica da interleucina - 10 (IL- 10) utilizando *post hoc* test Bonferroni observamos: Na análise do período experimental 6 horas entre o grupo controle (137.7 ± 19.7 pg/ml) e os grupos AR (59.70 ± 16.46 pg/ml) e grupo AR-LBI (93.1 ± 12.3 pg/ml) foi observada diferença estatística ($p < 0.001$). Já na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.01$). Na análise 24 horas após a lesão entre o grupo controle (137.7 ± 19.7 pg/ml) e os grupos AR (67.34 ± 13.0 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (110.0 ± 12.9 pg/ml) foi observada diferença estatística ($p < 0.05$). Na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$). Na comparação

de 48 horas entre o grupo controle (137.7 ± 19.7 pg/ml) e o grupo RA (79.40 ± 14.6 pg/ml) observou-se diferença estatística ($p < 0.001$), comparando o grupo controle com o grupo AR-LBI (137.0 ± 14.0 pg/ml) não foi observada diferença estatística ($p > 0.05$). Na comparação entre os grupos AR e grupo AR-LBI foi observada diferença estatística ($p < 0.001$) (Figura 15).

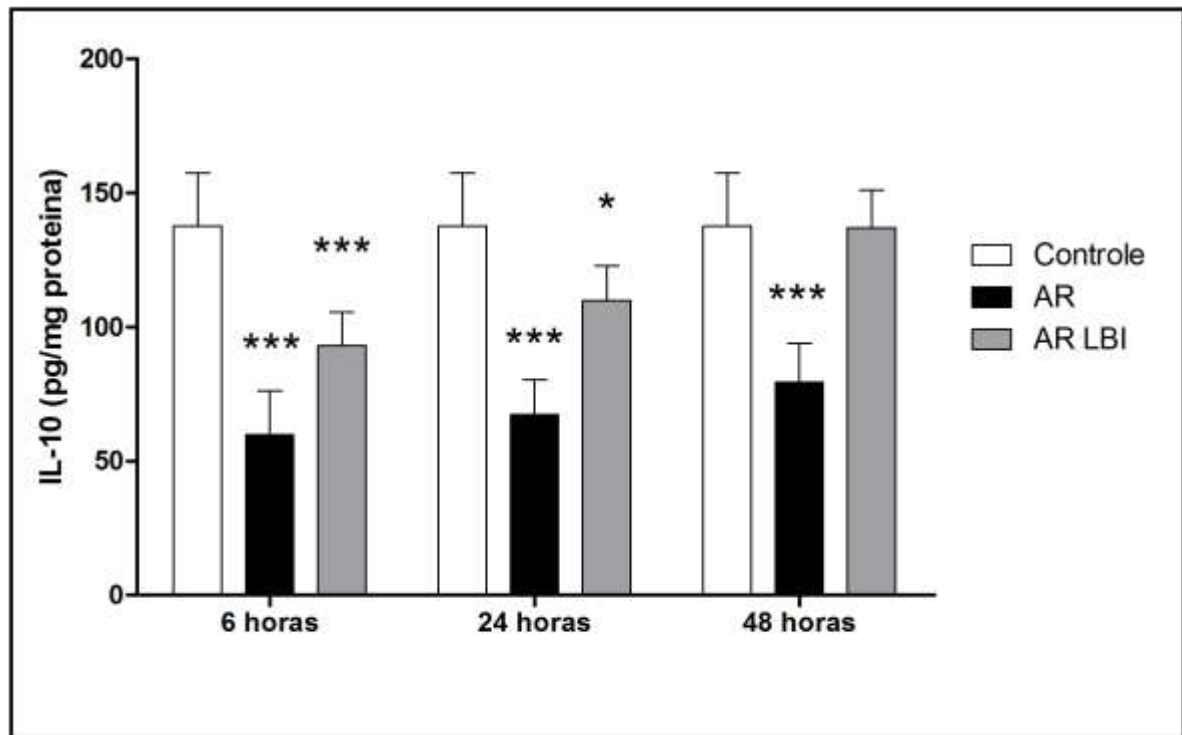


Figura 15: Comparação da média e desvio padrão dos níveis de IL-10 em 6, 24 e 48 h obtido a partir de lavado articular utilizando o ensaio imunabsorvente ligado a enzima (ELISA) nos grupos controle, AR e AR-LBI. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ pelo Bonferroni *post hoc* test para comparações com o grupo controle.

4.3 Avaliação da Hiperálgia Mecânica

Na avaliação da hiperálgia no período experimental de 6 horas entre o grupo controle ($28,42 \pm 1,0$ g) e o grupo AR ($21,32 \pm 2,7$ g) observou-se diferença estatística ($p < 0,001$), entre o grupo controle ($28,42 \pm 1,0$ g) e o grupo AR-LBI ($24,24 \pm 2,8$ g), também com diferença estatística ($p < 0,01$) e por fim, na comparação entre os grupos AR com o grupo AR-LBI, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$). No período experimental de 24 horas, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre o grupo controle ($28,42 \pm 1,0$ g) e o grupo AR ($18,33 \pm 0,4473$ g), entre controle ($28,42 \pm 1,0$ g) e AR-LBI ($22,15 \pm 0,5399$ g), com diferença estatística ($p < 0,05$), e entre o grupo AR ($18,33 \pm 0,4473$ g) versus o grupo AR-

LBI ($22,15 \pm 0,5399$ g), com diferença estatística entre os grupos ($p < 0,01$). No período experimental de 48 horas, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre o Controle ($28,42 \pm 1,0$) e o grupo AR ($18,19 \pm 2,2$ g), e entre o grupo AR versus AR-LBI ($26,28 \pm 0,9$ g). Entre os grupos controle e RA-LBI não houve diferença estatística (Figura 16).

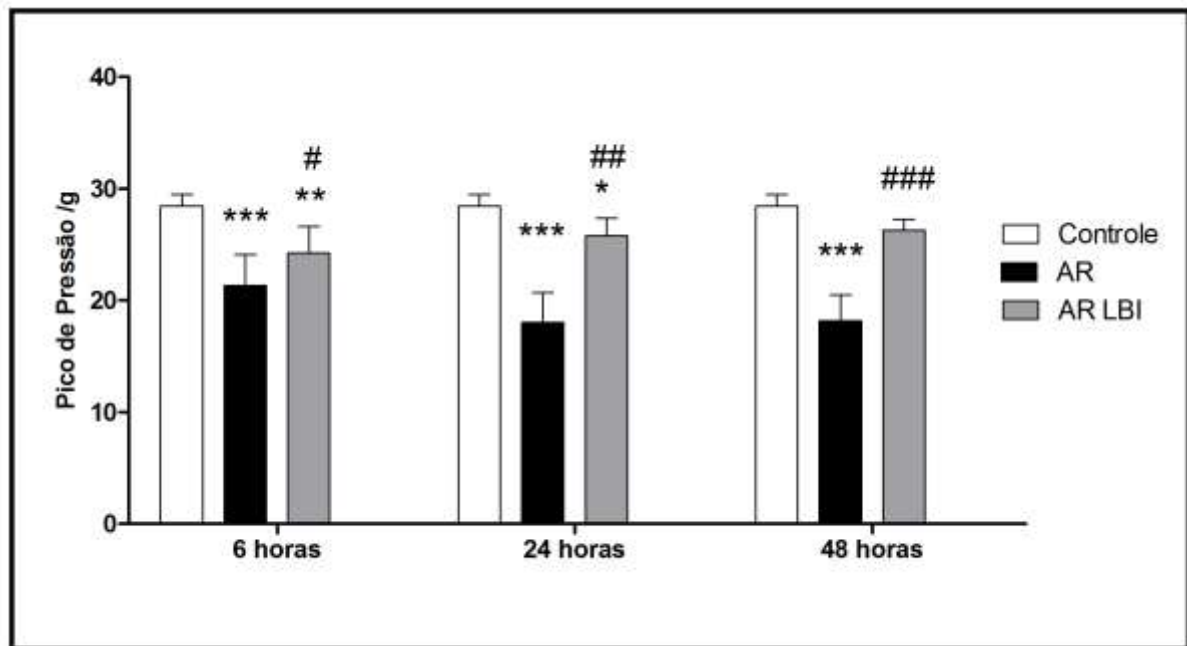


Figura 16: A comparação da média e desvio padrão da hiperalgesia no joelho antes e após a indução da artrite reumatoide para os grupos Controle, AR e AR-LBI em 6, 24 e 48 horas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, pelo teste de Bonferroni *post hoc* com as comparações contra limiar de pressão controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$, pelo teste de Bonferroni *post hoc* para comparações contra o grupo AR.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da LBI sob o processo inflamatório e a nocicepção em modelo experimental agudo de AR, e obteve respostas satisfatórias da fotobiomodulação em atenuação do número de células inflamatórias, modulação da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, e promoveu melhora no limiar nociceptivo, confirmando a hipótese de que a LBI pode ser uma alternativa eficaz em estágios agudos de AR.

Os objetivos específicos preconizaram avaliar a ação da LBI sobre o número de células totais e diferenciais no lavado articular do joelho, sobre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e sob a nocicepção. A escolha dos desfechos deve-se ao fato de que, os macrófagos e os neutrófilos ativados, são células-chave na produção de citocinas inflamatórias (73,74); que por sua vez, são responsáveis por eventos ligados à inflamação persistente e degradação articular (75), culminando nos sintomas crônicos da AR, sendo a hiperalgesia a maior e mais frequente queixa.

Para responder os objetivos propostos, foi realizado um estudo experimental, no qual foram determinados 3 grupos: um controle (sadio), um AR (com artrite reumatoide), e um AR- LBI (com AR e tratado com LBI), avaliados em 3 tempos experimentais (6h, 24h, 48h). A escolha dos tempos experimentais, é pautada na relação existente entre níveis aumentados de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 em soro de pacientes com AR inicial e a apresentação de anticorpos para AR, seguida de manifestações mais severas da doença. Além disso, o diagnóstico e intervenção precoces inibindo tais citocinas, retardam a progressão da AR, diminuem os procedimentos cirúrgicos e melhoram a qualidade de vida do paciente (76, 77).

O do modelo experimental de indução por meio de adjuvante foi o primeiro modelo animal da AR a ser descrito e é sem dúvida, um meio eficaz no desenvolvimento da doença, e caracteriza-se por uma fase inflamatória, seguida de destruição articular e anquilose, ou seja, representam com fidelidade as manifestações da AR (78). Já o protocolo de tratamento com LBI foi baseado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, em modelo experimental de osteoartrite, nos quais observou-se que a dose de 2 J com maior tempo de irradiação obteve melhores resultados, diminuindo o influxo de células inflamatórias, produção de citocinas inflamatórias e a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) (17,18,67).

Em busca de avaliar os efeitos da LBI sob a nocicepção, os animais foram submetidos ao teste de hiperalgesia mecânica com uso de analgesímetro digital. Já seus efeitos sob a inflamação, foram avaliados por meio de contagem total e diferencial de células no lavado

articular dos animais, e a avaliação das citocinas pró e antiinflamatórias, foram dosadas através de análise da expressão proteica (ELISA).

Os resultados para contagem total de células, demonstram que o grupo que apresentou menor número de células foi o grupo Controle, enquanto o maior número de células foi encontrado no grupo AR, evidenciando intensa proliferação celular neste grupo. Já o grupo AR-LBI, apresentou número intermediário de células, sugerindo que a LBI foi capaz de atenuar a migração de células inflamatórias (18).

No tempo experimental de 6 horas observa-se grande influxo de neutrófilos, principalmente no grupo AR-LBI, devido a lesão, e ainda, a ação moduladora da LBI, que com apenas uma irradiação, diminuiu a proporção não apenas de neutrófilos, como também de linfócitos e macrófagos. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, em modelo experimental de osteoartrite, evidenciam que a LBI quando aplicada nos estágios iniciais, previne a proliferação de células inflamatórias, e nesse sentido, parâmetros que se utilizem de maiores tempos de irradiação, promovem melhores resultados (17,18).

Após 24 horas de lesão, notou-se que os níveis de neutrófilos continuavam aumentados, de modo que o grupo AR-LBI, permaneceu modulando a expressão de neutrófilos. Sabe-se que os neutrófilos são as células imunes mais abundantes em lavado de pacientes com AR (79) e que vários eventos na AR estão associados à sua expressão, como: a exposição a imuno-complexos, ao fator reumatoide e a citocinas, que contribuirão para o ciclo de inflamação e degradação crônica da cartilagem (80). Dessa forma, a modulação dos níveis de neutrófilos pelo uso da LBI pode atenuar esses eventos.

Em 48 horas após a lesão, obtivemos os melhores resultados em relação a modulação da LBI na expressão de células inflamatórias, de modo que neste tempo, após 3 irradiações, o grupo AR-LBI reduziu a proporção de macrófagos e neutrófilos a níveis mais baixos que no grupo controle e ainda reduziu a expressão de linfócitos em relação ao grupo AR. Esses dados vão de encontro aos relatados por Dos Santos, et.al (2014), que compararam duas doses (2 e 4 J) em modelo experimental de osteoartrite, e também obtiveram diminuição do número de neutrófilos, sendo o grupo tratado com 2J (mesmo parâmetro utilizado em nosso estudo) sua melhor dose. Ainda segundo os autores, para contagem diferencial de macrófagos, a LBI foi diferente apenas do grupo lesão, já em nosso caso, a LBI produziu melhores resultados no tempo experimental de 6 e 48 horas, e não apenas em comparação ao grupo AR, como também em relação ao controle (17).

Nos 3 tempos experimentais, o grupo AR apresenta níveis elevados de linfócitos em relação ao grupo controle, padrão esse que corrobora com os dados da literatura, encontrando-se linfócitos (T e B) já nos estágios precoces da doença (81).

As citocinas pró-inflamatórias, por exemplo IL-1 β , IL-6 e TNF- α , tem particular atuação na patogênese da AR, sendo esta última produzida pelos macrófagos ativados na membrada sinovial inflamada e são alvos terapêuticos no tratamento da doença nos últimos anos, por serem mediadoras de diversas alterações em AR, como: indução da produção de outras citocinas, bem como quimiocinas que atraem leucócitos, ativação de osteoclastos e condrócitos e produção de PGE2 (82, 75). Entretanto, o fato de não ser ainda uma intervenção aplicada a pacientes de longa data, seu alto custo e seu grande risco de infecções, são algumas das motivações que tem justificado a manutenção das DMCD convencionais (83, 84). Nesse contexto, a LBI se encaixa como um tratamento convencional, não-invasivo, sem efeitos adversos e com bons resultados em inflamação e hiperalgesia (85).

Nossos achados demonstram níveis aumentados de TNF- α e IL-6 no grupo AR em relação ao grupo controle, o que reforça que o modelo utilizado é condizente com a literatura no que se diz respeito à expressão de tais citocinas pró-inflamatórias na severidade e atividade da AR (86). Em relação aos efeitos da LBI, o grupo AR-LBI obteve diminuição nos níveis de IL-6 em todos os tempos experimentais ($p < 0.01$ e $p < 0.001$) em relação ao grupo AR, e também dos níveis de TNF- α , entretanto esse resultado não teve diferença estatística.

Sabe-se que a LBI é uma ferramenta muito utilizada nos últimos anos para atenuação da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α , por exemplo) em diversos tecidos e doenças, como nas doenças neuro-musculares (87, 88, 89), pulmonares (90, 91, 92), tendinosas (93) e cartilaginosas (94, 18, 65, 67, 95), em estudos experimentais (*in vivo* e *in vitro*) e ensaios clínicos (96, 97), achados estes que corroboram com nosso estudo.

Citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, por sua vez, podem ser produzidas por macrófagos e tem importante papel imuno-regulador na defesa e homeostase. Em pacientes portadores de AR, existem achados apontando tanto níveis aumentados, quanto diminuídos de IL-10 em pacientes portadores da doença em comparação a indivíduos controle, sugerindo que há níveis de produção desequilibrados de IL-10 na doença, mas estes são insuficientes para conter os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Portanto, a produção de IL-10 pode ser viável no controle da inflamação e dano tecidual causado pela hiperatividade das citocinas pró-inflamatórias (98, 99, 29).

Os resultados do presente estudo para IL-10, mostram níveis aumentados desta citocina, do grupo AR-LBI em comparação ao grupo AR, e por sua vez, não apresenta diferença

estatística em relação ao grupo controle no tempo experimental de 48h, sugerindo que após 3 irradiações, o grupo AR-LBI produziu citocinas anti-inflamatórias em níveis de normalidade. Outros estudos utilizando LBI reproduziram resultados semelhantes (101, 102) em diferentes modelos experimentais.

Esse arsenal de mediadores envolvidos na AR, como as citocinas pró e anti-inflamatórias, constituem uma ligação entre as lesões celulares e o desenvolvimento de sinais e sintomas de inflamação local e sistêmica. Dentre tais sintomas, o maior e mais frequente em AR é a hipernocicepção, que afeta diretamente a função e contribui indiretamente no impacto psicológico e social da doença (4, 16, 103).

Essa cascata de liberação de citocinas constitui uma ligação entre as lesões e a liberação de mediadores de hipernocicepção primária. Esse conceito permite entender porque a inibição de IL-1 β ou TNF- α provoca analgesia experimental (por supressão) e clinicamente (terapia anti-TNF- α) (70, 103, 75). Poucos estudos foram encontrados sobre o efeito da LBI na hiperalgesia em AR em condições que busquem explicar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na nocicepção e na alteração do comportamento frente a ela. Destes, os artigos clínicos apresentam metodologia divergente entre si, ou ainda apenas dados subjetivos (63). Apesar disso, mesmo com poucos estudos comprovando a eficácia da LBI, a hipótese de ação analgésica da LBI permanece, devido aos seus efeitos biológicos conhecidos, como a estimulação da produção de ATP mitocondrial, ativando fatores de transcrição e proliferação celular (104).

Nos resultados referentes à nocicepção deste estudo, o grupo AR-LBI apresentou-se diferente estatisticamente dos grupos controle e AR, nos tempos 6h e 24h, e no tempo experimental de 48h, foi estatisticamente diferente apenas do grupo AR. Esses dados sugerem que a LBI foi capaz de modular a hipernocicepção em AR, após 3 irradiações, a níveis semelhantes ao do grupo controle.

Por fim, este estudo pré-clínico, teve como objetivo investigar a ação da LBI nas fases iniciais de modelo experimental de AR, na atenuação da expressão de mediadores inflamatórios e consequentemente, na hiperalgesia. Os resultados demonstram biomodulação da LBI principalmente na expressão de neutrófilos e macrófagos entre os grupos controle e AR, bem como nas citocinas IL-6 e IL-10, contribuindo diretamente para a atenuação da hiperalgesia.

Entretanto, são necessários mais estudos experimentais e ensaios clínicos com rigor científico, para elucidar os mecanismos pelos quais a LBI atua na modulação dos mecanismos celulares, moleculares e na hipernocicepção inerentes à AR.

Diante do exposto, o estudo confirmou a hipótese de que a LBI é capaz de atenuar a resposta inflamatória e nociceptiva em modelo experimental de AR, agindo em células inflamatórias, citocinas pró e anti-inflamatórias, e na nocicepção. Dessa forma, os objetivos foram alcançados, e foi possível realizar novas indagações a respeito da ação da LBI, redirecionando o foco de pesquisas futuras.

Tal investigação foi norteadada pela ação da LBI nos mecanismos inflamatórios e nociceptivos da doença, permitindo inferências sobre o laser em diferentes mediadores. Por meio dela, podemos reconhecer os efeitos da LBI através de um modelo experimental de AR, uma doença auto-imune, inflamatória e incapacitante. A LBI tem sido alvo de estudo nos últimos anos, mas seus mecanismos e efeitos permanecem não respondidos, o que promove cada vez mais alternativas de pesquisa.

Sabe-se que clinicamente, é uma ferramenta valiosa em diversas doenças e condições patológicas, e que em AR, é eficaz no auxílio da dor, maior e mais frequente sintoma. Faz-se necessário, entretanto, encontrar um padrão de tratamento que ofereça a atenuação da expressão de células e mediadores primários, de forma a prevenir o desencadeamento da lesão, e os eventos primários envolvidos na perpetuação do processo inflamatório.

Sugere-se, assim, manutenção de pesquisas que envolvam modelos experimentais, para que dessa forma, se estabeleça um critério de tratamento que promova tais benefícios com a fotobiomodulação, e feito isso, implementar protocolos de ensaios clínicos criteriosos, de forma a beneficiar a população, o processo de reabilitação e a pesquisa científica.

Apesar dos resultados positivos da LBI nos mecanismos anti-inflamatórios e na hipernocicepção demonstrados, existem limitações neste estudo que se atendidas, podem responder questões importantes, como: a ação da LBI em AR nos receptores das citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), em NF- κ β , fatores de quimiotaxia para neutrófilos (CINC-1), Mieloperoxidase (MPO), Cox 1 e 2.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- YAMAURA M. et al. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. **Lasers Surg Med.** 41 (4), 282-90, Apr/2009.
- 2- MOTA, Licia M. H. da et al. Artrite reumatoide inicial: Conceitos. **Revista da Associação Médica Brasileira.** 56 (2), 227-9. Retrieved February 14/2014.
- 3- CONIGLIARO, P. et al. Characterization of the anticollagen antibody response in a new model of chronic polyarthritis. **Arthritis Rheum.** 63 (8), 2299-308. Aug/2011.
- 4- WALSH D. A.; MCWILLIAMS, D. F. Pain in rheumatoid arthritis. **Curr Pain Headache Rep.** 16 (6), 509-17. Dec/2012.
- 5- PISETSKY, D. S.; WARD, M. M. Advances in the treatment of inflammatory arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology.** Vol. 26, Issue 2, 251-261, April/2012.
- 6- BURGOS-VARGAS, R. et al. Current therapies in rheumatoid arthritis: A Latin American perspective. **Reumatol Clin.** 9 (2), 106-12. Mar-Apr/2013.
- 7- GARY, E.; SOLOMON, M. D. T. Cell Agents in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Bull NYU Hosp Jt Dis.** 68 (3), 162-5. 2010.
- 8- KURKÓ, J. et al. Genetics of rheumatoid arthritis – A comprehensive review. **Clin Rev Allergy Immunol.** 45 (2), 170-9. Oct/2013.
- 9- PAULA, F. S.; DELGADO, Alves J. Non-tumor necrosis factor-based biologic therapies for rheumatoid arthritis: Present, future, and insights into pathogenesis. **Biologics.** 8, 1-12. 2014.
- 10- WILLEMZE, A. et al. New biomarkers in rheumatoid arthritis. **Neth J Med.** 70 (9), 392-9. Nov/2012.
- 11- FARHEEN, K.; AGARWAL, S. K. Assessment of disease activity and treatment outcomes in rheumatoid arthritis. **J Manag Care Pharm.** 7. Nov-Dec/2011 é 2011 ou 2001?
- 12- PISETSKY, David S; WARD, Michael M. Advances in the treatment of inflammatory arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology.** Vol. 26, Issue 2, 251-261. April/2012.
- 13- LARCON, Renata T.; ANDRADE, Luís E. C. (2007). Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia.** 47 (3), 180-187. Retrieved February 14, 2014.
- 14- PISETSKY, D. S.; WARD, M. M. Advances in the treatment of inflammatory arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 26 (2), 251-61. Apr/2012.
- 15- AGARWAL, S. K. Biologic agents in rheumatoid arthritis: An update for managed care professionals. **J Manag Care Pharm.** 17 (9 Suppl B), S14-8. Nov-Dec/2011.

- 16-CHOY, E. et al. Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology** (Oxford). 51 Suppl 5v., 3-11. Jul/2012.
- 17-SANTOS S, A. dos 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**. Faltam dados da revista aqui Oct/2014.
- 18-ALVES, A. C. et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther**. 15 (5), 116. 2013.
- 19-PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B. et al. Fcγ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. **Evid Based Complement Alternat Med**. 429878. 2015. Faltam dados da revista
- 20-BRADDOCK, M.; QUINN, A. Target IL-1 in inflammatory disease: New opportunities for therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov**. 3 (4), 330-339. 2004.
- 21-AIGNER T.; SOEDER S.; HAAG, J. IL-1β and BMPs – interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cell Mater**. 26 (12), 49-56. 2006.
- 22-VERBRUGGEN, L. A. et al. Soluble HLA-G in rheumatoid arthritis. **Hum Immunol**. 67 (8), 561-567. 2006.
- 23-FONG, Y.; LOWRY, S. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol**. v. 55, 157-170. 1990.
- 24-SBARSÍ, I. et al. Inflammation and atherosclerosis: The role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease. **Int J Immunopathol Pharmacol**. 20 (1), 145-154, 2007.
- 25-LOPEZ-ARMADA, M. J. et al. Cytokines, tumor necrosis factor-α and interleukin-1 β, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**. 14 (7), 660-669. 2006.
- 26-KAPLANSKI, G. et al. IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol**. 24, 25-29. 2003.
- 27-TANAKA, T.1; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer Immunol Res**. 2 (4), 288-94. Apr/2014 doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0022.
- 28-YOSHIDA, Y.; TANAKA T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis **Biomed Res Int**. 2014, 698313. doi: 10.1155/2014/698313. Epub 2014 Jan 12.
- 29-VENKATESHA, S. H. et al. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy **Int J Mol Sci**. 2014/Dec 31, 16 (1), 887-906. doi: 10.3390/ijms16010887.

- 30-PONTE, L. M. M. **Caracterização do Plimorfismo no gene de susceptibilidade para a enxaqueca STX1A**: Estudo numa população controlada na Ilha de São Miguel (Açores). 2012. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Departamento de Biologia, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 2012.
- 31-ROCHA, A. P. C. et al. Dolor: Aspectos Actuales de la Sensibilización Periférica y Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Vol. 57, n. 1, 94-105, Jan-Fev/2007.
- 32-CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Vol. 48, Nº 2, 137-158, Mar-Abr/1998.
- 33-LEE, A. S. et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. **Gene**. 25, 527 (2), 440-7, Sep/2013.
- 34-MOTA, Licia M. H. da; LAURINDO, Ieda M. M.; SANTOS NETO, Leopoldo L. dos. Artrite reumatoide inicial: Conceitos. **Rev. Assoc. Med. Bras**. 56 (2), 227-229, 2010.
- 35-CAFALLI, F. A. S. et al. Estudo Experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilágnea em joelhos de coelhos. Aspectos Histológicos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 28, n. 9, 673-678, 1993.
- 36-TORRICELLI, P. et al. Laser Biostimulation of cartilage: In vitro evaluation. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 55, 117-20, 2001.
- 37-SCHURMAN, D. J.; SMITH, L. R. Osteoarthritis: Current Treatment and Future prospects for Surgical, Medical, and Biological Intervention. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 427, 183-189, 2004.
- 38-LIN, Y. S. et al. Effects of helium-neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. **Am J. Rehabil Phys Med**. 83 (10), 758-65, Oct/2004.
- 39-KUO, A. C. et al. Microfracture and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) synergistically stimulate articular cartilage repair. **Osteoarthritis Cartilage**. 14 (11), 1126-35, Nov/2006.
- 40-FROST-CHRISTENSEN, L. N. et al. Degeneration, inflammation, regeneration, and pain/disability in dogs following destabilization or articular cartilage grooving of the stifle joint. **Osteoarthritis Cartilage**. 16 (11), 1327-35, Nov/2008.
- 41-CASTANO, A. P. et al. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers Surg Med**. 39 (6), 543-50, Jul/2007.
- 42-KARU, T. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. **J Photochem Photobiol B**. 3 (4), 638-40, Aug/1989.
- 43-KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near – IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B**. 49 (1), 1-17, Mar/1999.
- 44-MARTIN, R. Inflammation/Pain Reduction and Healing. **Practical Pain Management**. 20-25, Nov-Dec/2003.

- 45-OGAWA, T. et al. Dynamic sweating response of man to infrared irradiation in various spectral regions. **Int J Biometeorol.** 35 (1), 18-23, Jun/1991.
- 46-KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. **Photochem Photobiol Sci.** 3 (2), 211-6, Feb/2004.
- 47-GAIDA, K. et al. Low Level Laser Therapy – A conservative approach to the burn scar? **Burns.** 30 (4), 362-7, Jun/ 2004.
- 48-BAXTER, D. G. Therapeutic Lasers. Londres: Churchill Livingstone, 1994.
- 49-KLEBANOV, G. I. et al. Mechanism of Therapeutic Effect of Low-Intensity Infrared Laser Radiation. **Biophysics and Biochemistry.** n. 3, 239-241, 2001.
- 50-CARVALHO, P. T. C. et al. Effect of 650 nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir Bras.** 21, Suppl 4, 63-8, 2001.
- 51-LAAKSO, E. L. Plasma ACTH and B-endorphin levels in response to low level laser therapy (LLLT) for myofascial trigger points. **Laser Therapy.** v. 6, 133-42, 1994.
- 52-HAGIWARA, S. et al. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Lasers Surg Med.** 39 (10), 797-802, Dec/2007.
- 53-CHOU, R.; HUFFMAN, L. H. Nonpharmacologic therapies for acute and chronic low back pain: A review of the evidence for an American Pain Society/American College of Physicians clinical practice guideline. **Ann Intern Med.** 2,147 (7), 492-504, Oct/2007.
- 54-ANDREU, M. I. G.; ZALDIVAR, C. V. Efectos biológicos de la radiación laser de baja potencia en la reparación hística. **Rev Cubana Estomatol,** v. 33, n. 2, 4-5, 1996.
- 55-VLADIMIROV Y. U., A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry** (Moscow), v. 69, n.1, 103-113, 2003.
- 56-CAMPANA, V. R. et al. Laser Therapy on Arthritis Induced by Urate Crystals. **Photomedicine and Laser Surgery.** v. 22, n. 6, 499-503, 2004.
- 57-FANDER, D. et al. The influence of laser irradiation of low-power density on an experimental cartilage damage in rabbit knee-joints: An in vivo investigation considering macroscopic, histological and immunohistochemical changes. **Biomed Tech.** (Berlim), 51 (3), 131-8, 2006.
- 58-BAYAT, M. et al. Effect of low-level helium-neon laser therapy on histological and ultrastructural features of immobilized rabbit articular cartilage. **J Photochem Photobiol B.** 25, 87 (2), 81-7, May/2007.
- 59-KAMALI, F. et al. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **J Photochem Photobiol B.** 27, 88 (1), 11-5, Jul/2007.

- 60-MEIRELES, S. M. et al. Assessment of the effectiveness of low-level laser therapy on the hands of patients with rheumatoid arthritis: A randomized double blind controlled trial. **Clin Rheumatol.** 29 (5), 501-9, May/2010.
- 61-PETERSEN, F.; YU, X. A novel preclinical model for rheumatoid arthritis research. **Arthritis Res Ther.** 12 (6), 148, 2010.
- 62-BROSSEAU, L. et al. (2000) Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. **J Rheumatol.** 27, 1961-9, 2000.
- 63-MACIAS, D. M. et al. Low-Level Laser Therapy at 635 nm for Treatment of Chronic Plantar Fasciitis: A Placebo-Controlled, Randomized Study. **J Foot Ankle Surg.** 54 (5), 768-72, Sep-Oct/2015.
- 64-EKIM, A. et al. Effect of low level laser therapy in rheumatoid arthritis patients with carpal tunnel syndrome. **Swiss Med Wkly.** 16, 137 (23-24), 347-52, Jun/2007.
- 65-PALLOTTA, R. C. et al. Infrared (810- nm) lowlevel laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci.** 27 (1), 71-8, Jan/2012.
- 66-ALVES, A. C. et al. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: An histological study. **Lasers Med Sci.** 28 (2), 529-36, Feb/2013.
- 67-CARVALHO, P. de T. et al. Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. **Acta Cir Bras.** 25 (1), 71-9, Feb/2010.
- 68-ALVES, A. C. et al. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. **Lasers Med Sci.** Aug/2013.
- 69-QUINTEIRO, M. S. et al. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. **Eur J Pain.** 16 (8), 1106-15, Sep/2012.
- 70-POPPI, R. R. et al. Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808nm and 660nm) on bone defects induced in femurs of female rats submitted to ovariectomy. **Lasers in Medical Science.** v. 5, 110-16, Jul/2011.
- 71-CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol.** 2008/Apr, 83 (4), 824-32. doi: 10.1189/jlb.0907654. Epub 2008, Jan/18.
- 72-VIEIRA, R. P. et al. Creatine Supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 37 (6), 660-7, Dec/2007.
- 73-VIEIRA, R. P. et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **Am J Respir Crit Care Med.** 1, 176 (9), 871-7, Nov/2007.
- 74-MUSCHTER, D. et al. Reactivity of rat bone marrow-derived macrophages to neurotransmitter stimulation in the context of collagen II-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy.** 17 (1), 169. doi:10.1186/s13075-015-0684-4, 2015.

- 75-NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunol Lett.** 2012/Mar 30, 143 (1), 9-19. doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.013. Epub 2012/Feb 11.
- 76-BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest.** 2008/Nov, 118 (11), 3537-45. doi: 10.1172/JCI36389.
- 77-KUNZ, M.; Ibrahim S. M. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. **Mediators Inflamm.** 2009, 979258. doi: 10.1155/2009/979258. Epub 2009/Oct 26.
- 78-DAVIS, J. M.; MATTESON, E. L. American College of Rheumatology, European League Against Rheumatism. My treatment approach to rheumatoid arthritis. **Mayo Clin Proc.** 2012/Jul, 87 (7), 659-73. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.03.011.
- 79-VINCENT, T. L. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models Arthritis Research UK animal models working group. **Rheumatology** (Oxford). 2012/Nov, 51 (11), 1931-41. doi: 10.1093/rheumatology/kes035. Epub 2012/Mar 16.
- 80-WRIGHT, H. L. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases **Rheumatology** (Oxford). 2010/Sep, 49 (9), 1618-31. doi: 10.1093/ rheumatology/keq045. Epub 2010/Mar 24.
- 81-KAPLAN, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. **Arthritis Res Ther.** 2013/Oct 2, 15 (5), 219. doi: 10.1186/ar4325.
- 82-FOGEL, L. A.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells in human autoimmune disorders. **Arthritis Res Ther.** 2013/Jul 11, 15 (4), 216. doi: 10.1186/ar4232.
- 83-SCHAIBLE, H. G et al. Joint pain. **Exp Brain Res.** 2009/Jun; 196 (1), 153-62. doi: 10.1007/s00221-009-1782-9. Epub 2009/Apr 11.
- 84-PARIDA, J. R. et al. Is non-biological treatment of rheumatoid arthritis as good as biologics? **World J Orthop.** 2015/Mar 18, 6 (2), 278-83. doi: 10.5312/wjo.v6.i2.278. eCollection 2015.
- 85-DETERT, J.; KLAUS, P. Biologic monotherapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Biologics.** 2015/May 14, 9, 35-43. doi: 10.2147/BTT.S53361. eCollection 2015.
- 86-JANG, H.; LEE, H. Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas **Photomed Laser Surg.** 2012/Aug, 30 (8), 405-17. doi: 10.1089/pho.2012.3240. Epub 2012/Jun 29.
- 87-WEI, S. T. et al. Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. **Med Sci Monit.** 2015/Dec 24, 21, 4030-8.
- 88-ALMEIDA, P. de. 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.** 2014/Mar, 29 (2), 653-8. doi: 10.1007/s10103-013-1377-3. Epub 2013/Jun 30.

- 89-LEAL-JUNIOR, E. C. et al. Superpulsed low-level laser therapy protects skeletal muscle of mdx mice against damage, inflammation and morphological changes delaying dystrophy progression. **PLoS One**. 2014/Mar 5, 9 (3), e89453. doi: 10.1371/journal.pone.0089453, eCollection 2014.
- 90-MACEDO, A. B. et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. **PLoS One**. 2015/Jun 17, 10 (6): e0128567. doi: 10.1371/journal.pone.0128567. eCollection 2015.
- 91-SILVA, V. R. et al. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma **Respir Physiol Neurobiol**. 2014/Apr 1, 194, 37-48. doi: 10.1016/j.resp.2014.01.008. Epub 2014/Jan 28.
- 92-PERON, J. P. et al. Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice **PLoS One**. 2015/Aug 31, 10 (8), e0136942. doi: 10.1371/journal.pone.0136942. eCollection 2015.
- 93-SILVA, C. M. da et al. Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. **PLoS One**. 2015/Nov 16, 10 (11), e0142816. doi: 10.1371/journal.pone.0142816. eCollection 2015.
- 94-MARCOS, R. L. et al. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: Analyses of biochemical and biomechanical aspects. **J Orthop Res**. 2012/ Dec, 30 (12), 1945-51. doi: 10.1002/jor.22156. Epub 2012/Jun 5.
- 95-HSIEH, Y. L. et al. The fluence effects of low-level laser therapy on inflammation, fibroblast-like synoviocytes, and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. **Photomed Laser Surg**. 2014/Dec, 32 (12), 669-77. doi: 10.1089/pho.2014.3821
- 96-OTON-LEITE, A. F. et al. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. **Lasers Surg Med**. 2015/Apr, 47 (4), 296-305. doi: 10.1002/lsm.22349. Epub 2015/Mar 30.
- 97-DERKACZ, A. et al. Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. **Lasers Med Sci**. 2013/May, 28 (3), 763-8. doi: 10.1007/s10103-012-1142-z. Epub 2012/Jun 26.
- 98-MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Res**. 2015/Dec 17, 4. pii: F1000 Faculty Rev-1465. doi: 10.12688/f1000research.7010.1. eCollection 2015.
- 99-TRIFUNOVIĆ, J. et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. **Biochem Med (Zagreb)**. 2015, 25 (1), 36-48. doi: 10.11613/BM.2015.004.
- 100- VENKATESHA, S. H. et al. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy **Int J Mol Sci**. 2014/Dec 31, 16 (1), 887-906. doi: 10.3390/ijms16010887.

- 101- CASALECHI, H. L. et al. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: Effects in acute and chronic inflammatory phases. **Lasers Med Sci.** 2013/May, 28 (3), 989-95. doi: 10.1007/s10103-012-1189-x. Epub 2012/Aug 28.
- 102- MELO, Rambo C. S. de et al. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. **Lasers Med Sci.** 2014/Sep, 29 (5), 1723-33. doi: 10.1007/s10103-014-1582-8. Epub 2014 May 7.
- 103- STARODUBTSEVA, I. A.; VASILIEVA, L. V. The analysis of dynamics of oxidative modification of proteins in the blood sera of the patients presenting with secondary osteoarthritis associated with rheumatoid arthritis and treated by laser therapy. **Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.** 2015/Jan-Feb, 92 (1), 19-22.
- 104- FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci.** 2014/Spring, 5 (2), 58-62.

7 APÊNDICE

Publicações da Autora no período (2013-2016)

1. ALVES, A. C. A.; VIEIRA, R. P.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ALBERTINI, R.; LIGEIRO, A. P.; SILVA-JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P.T.C.
Effect of low level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Research & Therapy* (Print)., v.15, p.116, 2013.
2. DOS SANTOS, S. A.; ALVES, A. C.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ALBERTINI, R.; VIEIRA, R. P.; LIGEIRO, A. P.; SILVA-JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P.T.C.
Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers in Medical Science.*, v.29, p.1051 - 1058, 2014.
3. ALVES, A. C. A.; ALBERTINI, R.; DOS SANTOS, S. A.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; SANTANA, E.; SERRA, A. J.; SILVA- JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P.T.C.
Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. *Lasers in Medical Science.*, v.29, p.911 - 919, 2014.
4. ALVES, A. C. A.; SILVA, A. A. O.; RAMBO, C. S. M.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ALBERTINI, R.; SANTOS, I. R.; OLIVEIRA, L. V. F.; DE CARVALHO, P.T.C.
Effects of low power laser irradiation on cartilage injury in animal model: Systematic Review. *Clinical and Experimental Medical Letters.*, v.54, p.35 - 42, 2013.
5. ALVES, A. C. A.; DE CARVALHO, P.T.C.; PARENTE, M.; XAVIER, M.; FRIGO, L.; AIMBIRE, F.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ALBERTINI, R.
Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. *Lasers in Medical Science.*, v.28, p.529 - 536, 2013.

8 ANEXO A

O estudo intitulado “Anlalysis of Photobiostimulation effects on Inflammation and Hyperalgesia in acute phase of experimental Rheumatoid Arthritis in rats” foi submetido à publicação na revista Osteoarthritis and Cartilage.

ANALYSIS OF PHOTOBIOSTIMULATION EFFECTS ON INFLAMMATION AND HYPERALGESIA IN ACUTE PHASE OF EXPERIMENTAL RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS.

ABSTRACT

This experimental research had as its objective analyse the effects of Photobiostimulation (PBM) in the acute phase of experimental RA in terms of nociception, number of inflammatory cells, and expression of inflammatory mediators (TNF- α , IL-6, IL-10), therapeutic targets of therapy with cytokine inhibitors. Forty-nine male Wistar rats were randomly distributed in 3 groups: 7 animals in the control group, 21 in Rheumatoid Arthritis group (RA) and 21 in treated group (RA-LLLT). Each group was evaluated in 3 distinct experimental periods (6, 24 and 48 hours). For the reproduction of the injury the animals were submitted to an Antigen-induced arthritis (AIA) with methylated bovine serum albumin (mBSA) by two inductions: the first one consisted in a subcutaneous infiltration and the second one was an intrajoint induction. After the joint induction, the treatment on the RA-LLLT group began with: wave length of λ 808 nm, output of 50 mW, area of the beam 0,028cm², final dose of 2J and time of 40s by point. At the end of each experimental period, the animals were submitted to an evaluation of their nociception, followed by the extraction of joint lavage and cartilage, which were sent for analysis of the total count and differential cells, and for protein expression of the inflammatory mediators described. The results demonstrate biomodulation in the expression of neutrophils and macrophages amongst the RA and RA-LLLT ($p < 0,001$) at 6 and 48h, as well as the cytokine IL-6 in all experimental times, contributing to the attenuation of hyperalgesia into control levels.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that results in chronic, progressive inflammatory disorders of the joints and surrounding tissues, finally leading to irreversible joint damage. Diseases of the joints, such as RA and osteoarthritis, are characterized by elevated levels of proinflammatory cytokines in the joints. (1, 2,3)

Cytokines regulate a broad range of inflammatory processes that are involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In rheumatoid joints, it is well known that an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine activities induces autoimmune functions, chronic inflammation, and thereby leads to joint damage. (4)

It is widely believed that changes in the concentration of inflammatory cytokines, amongst which is interleukin-6 (IL-6) which has received much attention, are related to RA processes. Growing evidence has indicated that IL-6 is present at very high levels in the serum and synovial fluid of patients with RA, and increased IL-6 levels accelerate the recruitment of inflammatory cells into the tissues and aggravates joint deterioration (1)

The infiltration and activation of monocyte/macrophages in the synovial joints is important in the pathogenesis of inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis (RA). The

activated macrophages play a key role in the progression and regression of the inflammatory processes by secreting various cytokines, growth factors, and proteases. (5) Of the cytokines fundamental for the pathogenesis of joint inflammation and damage the most important is TNF α (tumor necrosis factor- α), a primary cytokine of the cascade, which regulates production of other pro-inflammatory cytokines in the rheumatoid synovial tissue. TNF α is mostly produced by activated macrophages but it is also expressed by neutrophils, NK-cells, endothelial cells, and activated lymphocytes. (6)

The proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 not only promote and maintain inflammation, but also contribute to the generation and maintenance of inflammatory pain by acting at nociceptive nerve cells. A large proportion of dorsal root ganglion neurons express TNF receptors and receptor units for stimulation with IL-6. In addition, TNF and IL-6 sensitize joint nociceptors for mechanical stimulation, and thus directly contribute to mechanical hyperalgesia, i.e., pain upon movement and pressure. The neutralization of TNF causes a rapid decrease in mechanical hyperalgesia in inflammation models and in patients with RA. (7, 8).

Persistent pain is a major symptom of arthritis such as human rheumatoid arthritis. Inflammatory pain is caused by the activation and sensitization of primary afferent nociceptive neurons ('pain fibres') supplying the tissue (peripheral sensitization), and through the activation and sensitization of nociceptive neurons in the central nervous system (central sensitization). After sensitization, nociceptive neurons respond more strongly to mechanical and thermal stimulation of the tissue, and their activation threshold is lowered (9).

In synovial fluid (SF) of the rheumatoid joint, the most abundant cells by far are neutrophils, which comprise as much as 80% of all infiltrating cells, and are present in high numbers at sites of bone deterioration. (10) The expression profiles of PMN-derived cytokines are similar to those of monocytes/macrophages, major specialized phagocytes. Like monocytes, PMNs are able to secrete proinflammatory cytokines. (11)

In the last decade, anti-TNF- α agents have been launched and licensed as the first biological therapies for rheumatoid arthritis in clinical trials. Accordingly, TNF- α has become a promising target for drug screening and treatment strategies. (12) In effect, the TNF- α blocker, alone or in combination with other drugs, shows a marked inhibition of arthritis and delays joint deterioration. However, even so, the application of anti-TNF- α monoclonal antibodies is hindered by the risk of injection site reactions, infusional reactions, or infections. (13)

Accordingly, the search for therapies that reduce the expression of pro-inflammatory cytokines without producing major side effects has meant that photobioestimulation (PBM) by means of lasers has assumed a prominent place in this scenario. It has been essential for the reduction of cytokine expression in various clinical conditions and experiments into pain and inflammation.

The term LASER means Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. The laser was developed in the 1960s, and is light with special proprieties including monochromaticity and low divergence. (14) The red or near-infrared photons are absorbed in cytochrome and oxidase (unit IV of the mitochondrial respiratory chain), thereby increasing mitochondrial respiration and ATP production, and initiating signaling pathways mediated by reactive oxygen species, nitric oxide, and cyclic AMP, ultimately leading to activation of several transcription factors. (15) There is strong evidence for the efficacy of low level laser therapy (LLLT) in anti-inflammatory effects (16,17,18), in inflammatory cell infiltration reductions (19,20,21), in pain reduction (22,23), and in the reduction of levels of inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF- α . (24, 25, 26).

Assuming that increased expression of pro-inflammatory cytokines is largely responsible for outbreaks of various harmful events in RA, amongst these, bone and joint cartilage degeneration, and with its being intimately connected with the main symptom of this disease, pain, phototherapy by low intensity laser has proven effective in reducing cytokine levels and accordingly, pain. This study aimed to verify the low-intensity laser action on cytokines TNF - α , IL-6 and IL-10, mechanical hyperalgesia as well as macrophages, neutrophils, and lymphocytes in the synovial fluid and joint tissue of an experimental model of RA in rats.

MATERIALS AND METHOD

Experimental Animals

The experimental protocol was approved by our local ethics committee (AN 0020/2014) that follows the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation. A total of 49 male Wistar rats were used for the study. Rats weighting 250–280 g were housed in cages with free access to a standard laboratory diet and drinking water. Animals were kept in a 12:12-h light–dark cycle in a temperature-controlled room. All experiments were designed to minimize animal suffering and to use the minimum number necessary for valid statistical evaluation.

Experimental groups

The animals were randomly distributed into 2 experimental groups of 21 animals each: The injury group (RA), received induction but did not receive any treatment; and the low level laser therapy group (RA-LLLT) was treated with LLLT at 2J. The control group (control) of 7 animals did not receive any kind of intervention. All the groups were evaluated 6, 24, and 48 hours post injury (five animals per group, at each experimental time point).

The animals from the RA and RA-LLLT groups were anesthetized before each infiltration of the inductive substance for the lesion, with a mixture of Ketamine (10%) and Xilasina (2%), in a dose of 87 and 13 mg/kg, via the peritoneum.

After the anesthetic procedure was realized, a subcutaneous infiltration on the dorsal of each animal using 500 µg mBSA diluted in a solution of 100 µL of CFA, and 100µL of PBS was given. This procedure is used to produce an autoimmune reaction, and was repeated weekly for 21 days (3 weeks). On the 28th day (fourth week) an intra-joint induction with 10 µg of mBSA diluted in 10µL PBS was given after the anesthetic procedure, in the joint space of the right hind paw of each animal. (27). After the joint induction, the treatment on the LBI group began, as well as the euthanasia of each group at the correct experimental times.

Low-level laser therapy

The LLLT device used was an Aluminium Gallium Arsenide (GaAlAs), a DMC® brand (São Carlos / SP, Brazil) Model Photon Laser III. The animal was lightly immobilized during the treatment period/irradiation. The application was performed by a transcutaneous point method, manually irradiating the animal at an angle of 90° in relation to the area of the knee joint. The parameters are presented in Table 1.

Phototherapy Parameters	
Laser Output Frequency	Continuous
Power Output	50 mW
Power Density	1,78 W/cm ²
Spot Area	0,028 cm ²
Number of points	2
Method	Transcutâneo
Energy per point	2J
Treatment Time per Point	40s
Energy Density per Point	71,2 J/cm ²
Total Energy Delivered	4J

Irradiation

Laser irradiation was applied transcutaneously at two points: medial and lateral compartments of knee joint. Laser irradiation was performed 6h, 24h, and 48h after the induction, on the right knee. Animals were immobilized by means of grip and were irradiated at an angle of 90° to the surface of the tissue.

Von Frey Test

Based on the method described by Cunha et al. (2008) (28), it was performed before the randomization of the three experimental groups, and during periods: 6, 24, and 48 hours.

For this evaluation, the animals were placed individually in transparent acrylic cages, supported on a platform with a knockout background, to allow access to the plantar surface. Cages were initially used for an hour, during the 3 days prior to experimentation. On the test day, animals were placed in the cage 20 minutes before the start of each measurement.

To carry out the assessment of hyperalgesia a digital analgesymeter device (Insight Ltd; Ribeirão Preto / Sp, Brazil) with transducer capacity of 0.1 - 1000 grams, and a reaction time of 1ms was used. The evaluation consists of a pressure transducer connected to a digital counter, calibrated to measure force in grams. The contact pressure transducer on the area of the plantar surface was carried out using a disposable polypropylene tip, 0.5 mm in diameter, attached to the pressure transducer tip.

An experienced and trained examiner applied the tip perpendicularly, with linearly increasing pressure on the mouse's plantar surface, from the platform to the leaked bottom, until the animal responded by withdrawing its paw.

For this evaluation three measurements were taken per animal only on the left hind leg. The arithmetic average of the three measurements was derived for statistical analysis. The room in which these procedures were carried out, had no sound disturbance to affect the animals, and only the examiner responsible for the evaluation was present.

Euthanasia

At the end of each trial period after 6, 24, and 48 hours, the animals were identified, weighed, and subsequently euthanized by administering, a 100mg / kg (DL) dose of Thiopental (THIOPENTAX - Cristália) of intraperitoneally, associated with lidocaine 10 mg / ml (Xylestesin - Cristália). The articular cavity was washed with 1 ml physiologic serum in the knee space, with the material being immediately centrifuged at 1,500 rpm/5 minutes, as

previously described, and the supernatant was stored at -80°C for analysis of inflammatory mediators. The knee tissue was then removed and stored in a freezer at -80°C for the ELISA and Western Blotting studies to be subsequently carried out.

Total and differentiated cell counts

The articular synovium was washed by injecting 200 µl phosphate-buffered saline (PBS) in the joint cavity, allowing the recovery of a large quantity of washed material (usually around 20 to 30 µl). The recovered lavage was centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes, and the cell pellet was suspended in 200 µl PBS. Total cells were then counted in a hemocytometer (Neubauer chamber, 10 µl; diluting solution, Turk's solution 1:5). The remaining articular material was washed thoroughly and used for the differential cell count (neutrophils, macrophages, and lymphocytes). For this counting, the washed joint was processed in a cytocentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 450 rpm for 6 minutes, and the slides containing the cell pellet were stained with Diff-Quick. As shown in previous studies, 300 cells were counted on each slide (29).

Analysis of protein expression ELISA of IL-6, IL-10, and TNF- α

An IL-6, IL-10, and TNF- α kit was used as per the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Briefly, 96-well plates were coated with 100 µL of the monoclonal antibodies specific for the cytokines, anti-IL-6, IL-10, and TNF- α , that were diluted in a sodium carbonate buffer (0.1 M, pH 9.6), and the plates were incubated at 4 °C for 18 h. To block the plates, they were washed four times with phosphate-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 (PBST), then filled with blocking solution containing 3% gelatin in PBST (Sigma, St. Louis, MO, USA) (300 µL/well) and incubated at 37 °C for 3 h before being subjected to a new washing cycle. Next, 100 µL of the appropriately diluted samples or recombinant cytokine, was added.

The reaction was visualized by adding 3,3',5,5' tetramethylbenzidine solution (100 µL/well), followed by the addition of 2 N sulfuric acid (50 µL/well) to halt the reaction. The plates were read using a Spectrum Max Plus 384 spectrophotometer (Sunnyvale, CA, USA) at a wavelength of 450 nm with correction at 570 nm. The concentrations of the cytokines in the samples were calculated according to the standard curves obtained from the recombinant cytokines.

Statistical Analysis

For the molecular analysis, the data was tabulated using Microsoft Excel 2007 software and initially assessed for normality using the Shapiro–Wilk test. Since a normal distribution was observed, a Two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test was used for comparisons between experimental groups. All of the data is expressed as mean and standard deviation values. The GraphPad Prism 5 Software program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used. Significant differences from the null hypothesis were considered to exist when $p < 0.05$.

RESULTS

Differential Cell Counting (6 hours)

Data obtained from the differential cell count was submitted to statistical, two-way ANOVA testing followed by *Bonferroni post hoc test*, for comparison 6 hours after the establishment of the lesion (RA). With the statistical crossing of the differential macrophage count when comparing the control group (16.0 ± 1.5) with the RA (3.0 ± 0.5) and the RA-LLLT group (25.0 ± 3.0), using the *Bonferroni post hoc test*, ($p < 0.001$) was obtained, while in comparisons between the RA group and the RA-LLLT group using the *Bonferroni post hoc test*, ($p < 0.001$). The results for neutrophil counting was also obtained, crossing the control group (39.0 ± 4.0) with the RA group (79.0 ± 6.8) using the *Bonferroni post hoc test* ($p < 0.001$), and with RA-LLLT group (47.0 ± 3.7), ($p < 0.01$), in comparison between the groups with RA and RA-LLLT, ($p < 0.001$) was obtained. A further lymphocyte count was carried out, which, in comparing the control group (45.0 ± 3.9) with the RA group (19.0 ± 2.0) and the RA-LLLT group (28.0 ± 2.1), using the *Bonferroni post hoc test* obtained ($p < 0.001$), while in comparing between the RA group and the RA-LLLT group, ($p < 0.001$) was also obtained using the *Bonferroni post hoc test*. (Fig. 1A).

Differential Cell Counting (24 hours)

The data obtained for the differential cell count was submitted to a two-way, ANOVA statistical test, followed by a *Bonferroni post hoc test*, for comparison at 24 hours after the establishment of the lesion (RA). With the statistical crossing of the differential macrophage count, when comparing the control group (16.0 ± 1.5) with RA group (22.0 ± 2.5), ($p < 0.05$) was obtained, and in the comparison between the control group and RA-LLLT (76.0 ± 6.2), using the *Bonferroni post hoc test*, ($p < 0.001$) is obtained, while in the comparison between the RA groups and RA-LLLT group, using the *Bonferroni post hoc test*, ($p < 0.001$) was also

obtained. In the results for neutrophils, also submitted to the same statistical analysis, when comparing the control group (39.0 ± 4.0) with the RA group (60.0 ± 4.5) using the *post hoc* *Boferroni* test, ($p < 0.001$) was obtained, and with the RA-LLLT group (13.0 ± 2.0), ($p < 0.001$). In a comparison between the RA group and the RA-LLLT group ($p < 0.001$) was obtained. For the lymphocyte count, when comparing the control group (45.0 ± 3.9) with the RA group (18.0 ± 2.0) and the RA-LLLT (11.0 ± 1.5), the *Boferroni post hoc* test was also realized, obtaining ($p < 0.001$), while in the comparison between the RA group and RA-LLLT group, ($p < 0.001$) was also obtained using the *Boferroni post hoc* test (Fig.1B).

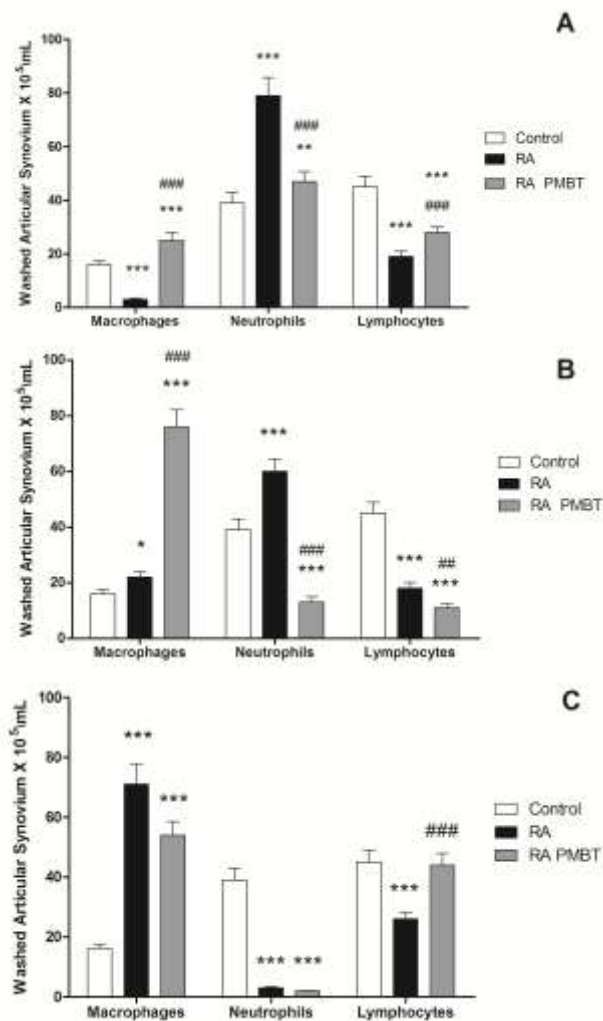


Fig. 1: Analysis of joint wash with differential cell counting realized in cytocentrifuge preparations stained with Diff-Quik, for macrophages, lymphocytes and neutrophils. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ for the *Boferroni post hoc* test when compared to control group. ### $p < 0.001$ for the *Boferroni post hoc* test when compared to RA group. Data shown are the mean $\pm$ standard deviation. A: 6 hours after RA induction; B: 24 hours after RA induction; C: 48 hours after RA induction.

Differential Cell Counting (48 hours)

Data obtained from the differential cell count was submitted to two-way statistical ANOVA testing, followed by the *Boferroni post hoc* test for comparison 48 hours after the

establishment of the lesion (RA). With the statistical crossing of the differential macrophage count, when comparing the control group (16.0 ± 1.5) with the RA group (71.0 ± 6.7) and the RA-LLLT group (54.0 ± 4.5) using the *Boferroni post hoc* test, ($p < 0.001$) was obtained. In the results for the neutrophils, also submitted to the same statistical analysis, when comparing the the control group (39.0 ± 4.0) with the RA group (3.0 ± 0.4) and with the RA-LLLT group (2.0 ± 0.1), using the *Boferroni post hoc* test, ($p < 0.001$) was obtained, while in the comparison between the groups RA and RA-LLLT, ($p > 0.05$) was obtained, that is to say, no difference was observed between the groups. A further lymphocyte count was carried out which, when comparing the control group (45.0 ± 3.9) with the RA group (26.0 ± 2.1) using the *Boferroni post hoc* test, ($p < 0.001$) was obtained, and in comparing the control group with the RA-LLLT group (44.0 ± 3.9) ($p > 0.05$) was obtained, that is to say, no difference was observed between the groups. In comparing between the groups with RA and the group RA-LLLT, ($p < 0.001$) was also obtained using the *Boferroni post hoc* test (Fig.1C).

Analysis of Protein Expression (ELISA)

Protein expression of IL-6

In the comparison of protein expression of interleukin-6 (IL-6), using the *Bonferroni post hoc* test, we observe: in the analysis of the 6 hours experimental period between the control group (121.30 ± 24.76 pg/ml) and the RA group (181.00 ± 26.5 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$), while comparing the control group with the RA-LLLT group (128.50 ± 25.64 pg/ml) a statistical difference was not found. In the comparison between the RA and RA-LLLT groups, a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed. In the 24 hours analysis after the lesion, between the control group (121.30 ± 24.76 pg/ml) and the RA groups (224.80 ± 31.2 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed, while when comparing the control group with the RA-LLLT (142.63 ± 21.70 pg/ml) group, no statistical difference was observed ($p > 0.05$). In comparison between the RA groups and RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed. In the 48 hours comparison between the control group (121.30 ± 24.76 pg/ml) and the RA groups (255.89 ± 33.3 pg/ml) a ($p < 0.001$) statistical difference was observed, while in comparing the control group with the RA-LLLT group (147.91 ± 22.80 pg/ml), no statistical difference was found ($p > 0.05$). In comparing between the RA and RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed (Fig. 2).

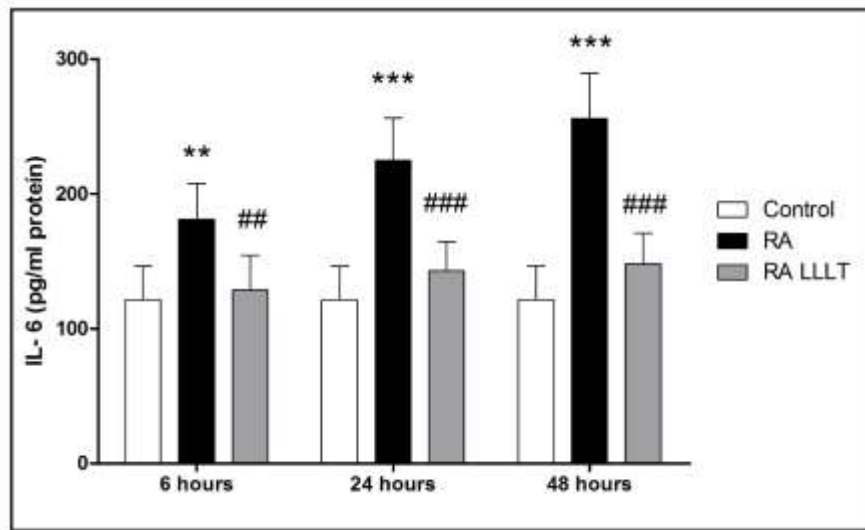


Fig. 2: Comparison of mean and standard deviation for interleukin-6 levels at 6h, 24h and 48h obtained from joint wash using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the control group, RA and RA-LLLT. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for the *Bonferroni post hoc* test for comparisons with the control group; and ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, for the *Bonferroni post hoc* test for comparisons with the RA group.

Protein Expression of TNF- α

In the statistical analysis of the protein expression of TNF- α using the *Bonferroni post hoc* test, we discovered: In the analysis of the 6 hours experimental period, between the control group (12.26 ± 4.4 pg/ml) and the RA groups (27.40 ± 6.0 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed, while in comparing the control group with the RA-LLLT (15.48 ± 4.4 pg/ml), no statistical difference was observed ($p > 0.05$). In the comparison between the RA and the RA-LLLT group a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed. In the analysis 24 hours after the lesion, between the control group (12.260 ± 4.456 pg/ml) and the RA group (28.12 ± 3.2 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was found, while in comparing the control group with the RA-LLLT group (17.52 ± 3.0 pg/ml) no statistical difference ($p > 0.05$) was observed. In the comparison between the RA and the RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed. In the comparison at 48 hours, between the control group (12.260 ± 4.456 pg/ml) and the RA group (31.40 ± 5.8 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was discovered, while in comparing the control group with the RA-LLLT group (18.3 ± 3.4 pg/ml) no statistical difference ($p > 0.05$) was observed. In the comparison between the RA and RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed (Fig. 3).

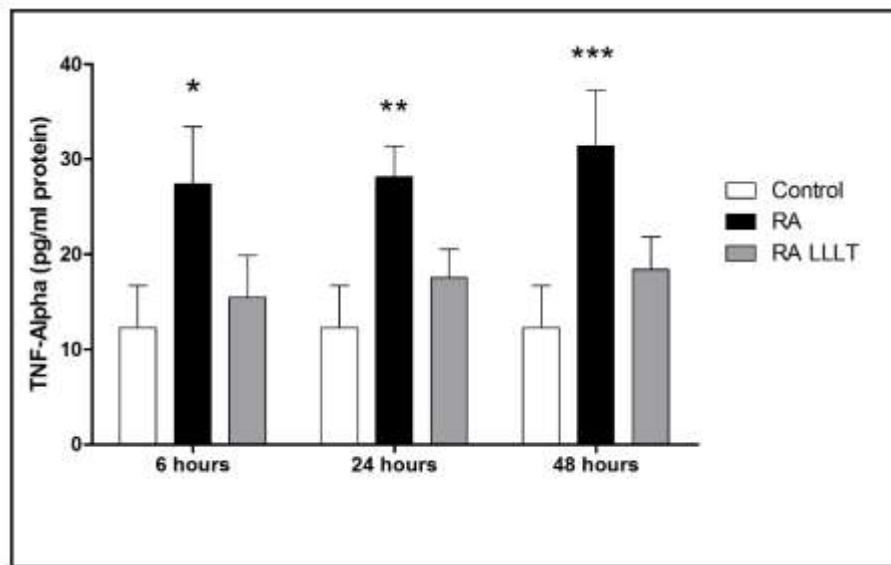


Fig. 3: Comparisons of mean and standard deviation of the TNF- α levels at 6h, 24h and 48 h obtained from joint wash using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the control group, RA and RA-LLLT. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ for the *Bonferroni post hoc* test for comparisons with the control group.

Protein expression of IL-10

In the comparison for protein expression of the interleukin – 10 (IL-10) using the *Bonferroni post hoc* test, we found that: In the analysis of the 6 hours experimental period, between the control group (137.7 ± 19.7 pg/ml) and the RA groups (59.70 ± 16.46 pg/ml) and the RA-LLLT group (93.1 ± 12.3 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed. In the comparison between the RA and the RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was discovered. In the 24 hours analysis after the lesion, between the control group (137.7 ± 19.7 pg/ml) and the RA group (67.34 ± 13.0 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed, while in comparing the control group with the RA-LLLT group (110.0 ± 12.9 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.05$) was derived. In the comparison between the RA and the RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed. In the comparison at 48 hours, between the control group (137.7 ± 19.7 pg/ml) and the RA group (79.40 ± 14.6 pg/ml) a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed, while in comparing the control group with the RA-LLLT group (137.0 ± 14.0 pg/ml) no statistical difference ($p > 0.05$) was found. In the comparison between the RA and the RA-LLLT groups a statistical difference of ($p < 0.001$) was observed (Fig. 4).

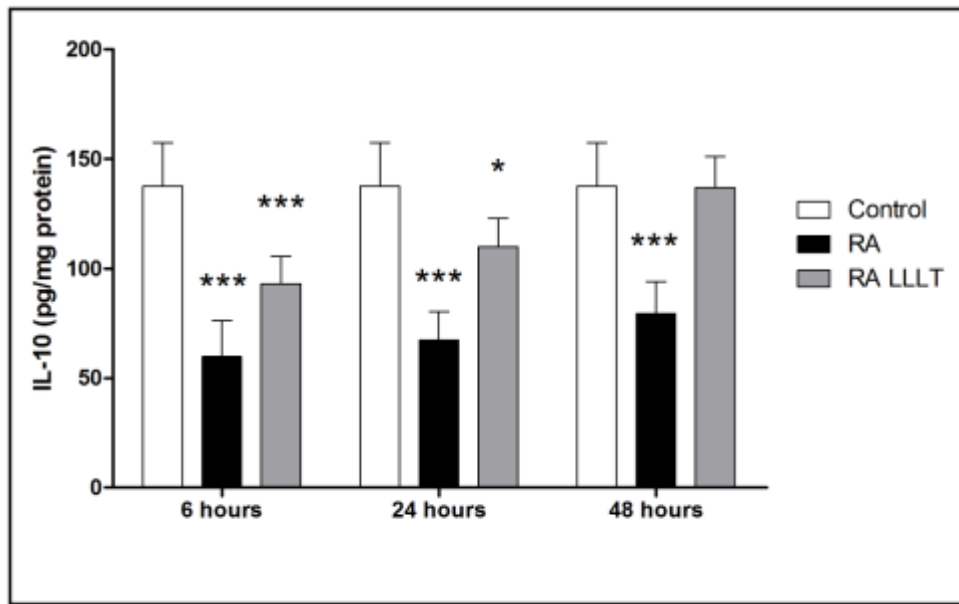


Fig. 4: Comparisons of mean and standard deviation of IL-10 levels at 6h, 24h and 48 h obtained from joint wash using the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the control group, RA and RA-LLLT. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ for the *Bonferroni post hoc* test for comparison with the control group.

Hyperalgesia evaluation

Hyperalgesia at the 6-hour experimental period mark was significantly different ($p < 0.001$) from that observed at Control (34.63 ± 0.8 g) in the RA group (17.58 ± 0.3 g), RA-LLLT (19.39 ± 0.8 g). The RA group showed a significant difference ($p < 0.001$) compared to the RA-LLLT group. Over the experimental period of 24 hours, significant differences were found ($p < 0.001$) from the Control (34.63 ± 0.8 g) in the RA group (18.33 ± 0.4473 g), RA-LLLT (22.15 ± 0.5399 g), and significant differences ($p < 0.001$) were also observed among the RA group (18.33 ± 0.4473 g) and-RA LLLT (22.15 ± 0.5399 g). In the experimental period of 48 hours, significant differences ($p < 0.001$) from the Control (34.63 ± 0.8) were found in the RA (19.52 ± 0.8732 g), and RA-LLLT (29.32 ± 0.8565 g) groups. Significant differences ($p < 0.001$) were also observed among the RA, and RA-LLLT (Fig. 5).

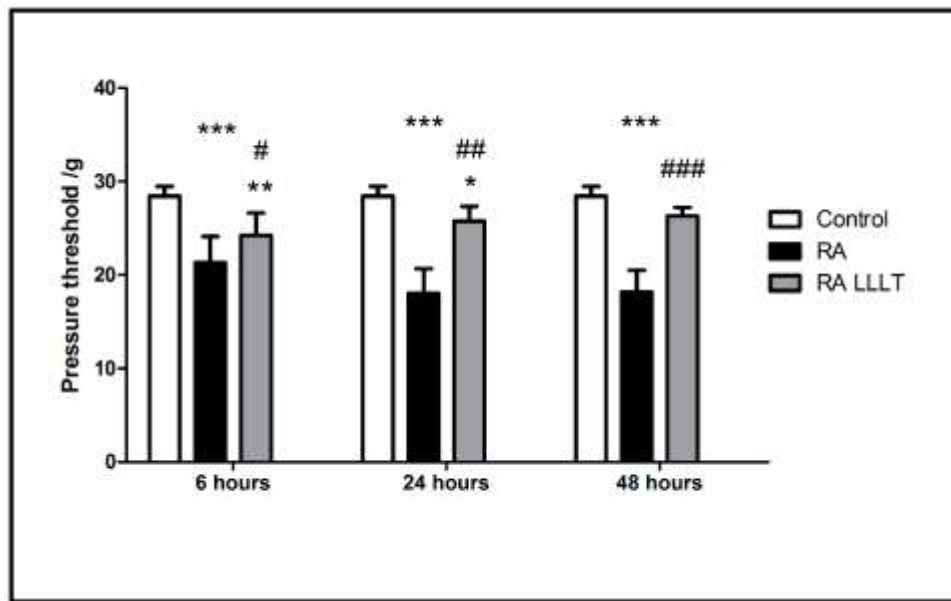


Fig. 5: Comparison of mean and standard deviation of knee hyperalgesia before and after the induction of rheumatoid arthritis for the control group, RA and RA-LLLT 6h, 24h and 48 hours. * $p < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, by the *Bonferroni post hoc* test with comparisons against pressure control threshold. # $p < 0.05$; ## $P < 0.01$ and ### $p < 0.001$ by the *Bonferroni post hoc* test for comparison against the RA group.

DISCUSSION

This study has as its objective the analysis of the effects of LBI on inflammatory processes and nociception in an acute RA experimental model, given that in the precocious stages of the disease there is an activation of inflammatory cells, contributing to persistent inflammation and degeneration of the joints, as well as producing antibodies and cytokines, and generating pain and deformity. The literature presents conflicting results, with few studies directed towards the effects of LBI on nociception. In this sense, our results suggest positive effects for LBI, in terms of a reduction of the expression of inflammatory cell numbers (mainly neutrophils), a reduction of the production of pro-inflammatory cytokines, and an attenuation of hyperalgesia,

The results for the total cell count, show that the group which presents a smaller number of cells was the Control group, while the greatest number of cells was found in the RA group, evidencing an intense cellular proliferation in this group. The RA-LLLT group in their turn, presented a medium number of cells, suggesting that the LLLT was able to attenuate the migration of inflammatory cells (20).

During the test period of 6 hours a great influx of neutrophils was observed, mainly in the RA-LLLT group, due to the lesion, and further, the modulating action of the LLLT, which with only one irradiation diminished the proportion not only of the neutrophils but also of the

lymphocytes and macrophages. Previous studies from our research group, in an experimental model for osteoarthritis, showed that LLLT, when applied in the initial stages prevents the proliferation of inflammatory cells, and in this sense, parameters making use of longer irradiation timeframes show better results (20).

After 24 hours of lesion, it is noted that the levels of neutrophils continued to be higher, in such a way that the RA-LLLT group, remained modulating the expression of neutrophils. It is known that the neutrophils are the most abundant immune cells in lavage from patients with RA (30) and that various events in RA are associated with its expression, such as: exposure to immune complexes, to the rheumatoid factor and cytokines, which contribute to the cycle of chronic inflammation and degeneration of the cartilage (31). In this manner, the modulation of neutrophil levels through the use of LLLT can attenuate these events.

In the 48 hours after the lesion, we obtained the best results in relation to modulation by the LLLT of the expression of inflammatory cells, in such a way that in this period, after three irradiations, the RA-LLLT group reduced the proportion of macrophages and neutrophils to lower levels than in the control group and still reduced the expression of lymphocytes in relation to the RA group. This data confirms that reported by Dos Santos, et.al (2014), which compared two doses (2J and 4J) in an osteoarthritis test model, and also observed a reduction in the number of neutrophils within the group treated with 2J (the same parameter used in our study), its best dose. Further, according to these authors, in terms of the differential count of macrophages, the LLLT was only different from the lesion group, while in our case, the LLLT produced better results in the experimental periods of 6 and 48 hours, and not only in comparison with the RA group, but also in relation to the control group (19).

During the three experimental periods, the RA group presented elevated levels of lymphocytes in relation to the control group, a pattern which corroborated with the data from the literature, encountering lymphocytes (T and B) already in the precocious stages of the disease (32).

The pro-inflammatory cytokines, for example IL-1 β , IL-6 e TNF- α , have a particular role in RA pathogenesis, with the latter produced by activated macrophages in the inflamed synovial membrane, being therapeutic targets in the treatment of the disease in recent years, for their acting as mediators of diverse RA alterations, such as: induction of the production of other cytokines, as well as chemokines that attract leukocytes, activation of osteoblasts and chondrocytes, and the production of PGE2 (7, 33). However, the fact of still not having an applied intervention for long term patients, its high cost, and its high risk of infection, are some of the motives that have justified the maintenance of the DMCD conventions (34, 35).

In this context, the LLLT fits as a conventional, non-invasive treatment, without adverse effects and with good results in inflammation and hyperalgesia (36).

Our findings show elevated levels of TNF- α and IL-6 in the RA group in relation to the control group, which reinforces that the model used is coherent with the literature regarding the expression of such pro-inflammatory cytokines in the severity and activity of RA (37). In relation to the effects of LBI, the RA-LLLT group obtained a reduction in the levels of IL-6 across all experimental periods ($p < 0.01$ and $p < 0.01$) in relation to the RA group, and also in relation to TNF- α levels, however this result did not have a statistical difference.

It is known that LLLT is a widely used tool in recent years for the attenuation of the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α , for example) in diverse tissues and diseases such as in neuromuscular diseases (14, 38, 39), pulmonary (40, 41, 42), tendon (43), and cartilage (44, 45, 25), in experimental studies (*in vivo* and *in vitro*) and clinical trials (46, 47), findings which match those of our study.

Anti-inflammatory cytokines such as IL-10, in their turn, can be produced by macrophages and have an important regulating role in defense and homeostasis. In patients who carry RA, there exists findings pointing as much toward increased levels, as to reductions in IL-10 in patients carrying the disease in comparison with control individuals, suggesting that there are unequal levels of production of IL-10 in the disease, but these are insufficient to contain the effects of the pro-inflammatory cytokines. Therefore, the production of deIL-10 can be viable in the control of inflammation and tissue damage caused by the hyperactivity of pro-inflammatory cytokines (48, 49, 50).

The results of this study into IL-10, show increased levels of this cytokine for the RA-LLLT group in comparison with the RA group, and in its turn, does not present a statistical difference in relation to the control group during the experimental period of 48 hours, suggesting that after three irradiations, the RA-LLLT group produces anti-inflammatory cytokines at normal levels. Other studies making use of LLLT reproduce similar results (51, 52) in different experimental models.

This arsenal of mediators such as pro and anti-inflammatory cytokines involved in RA, constitute a connection between the cellular lesions and the development of signs and symptoms of local and systemic inflammation. Amongst such symptoms, the significant and most frequent in RA is the hypernociception, which directly affects general functioning and contributes to the social and psychological impact of the disease (53, 54, 55).

The cascade of liberated cytokines constitutes a connection between the lesions and the liberation of the mediators for primary hypernociception. This concept permits us to

understand why the inhibition of IL-1 β or TNF- α provokes experimental analgesia (by suppression) and clinically (anti-TNF- α therapy) (28, 33). Few studies were encountered regarding the effect of LLLT in hyperalgesia in RA, in contexts seeking to explain the cellular and molecular mechanisms involved in the nociception and in the alteration of resultant behavior. Of these, the clinical articles present themselves as being methodologically divergent amongst themselves, or as still only presenting subjective data (55, 56). Despite this, even with few studies showing the efficacy of LLLT, the hypothesis of analgesic action of LLLT remains, due to its known biological effects, such as the stimulation of the production of mitochondrial ATP, activating cellular proliferation and transcription factors (57).

In the results of this study referent to nociception, the RA-LLLT group presented itself as statistically different only from the RA group. This data suggests that LLLT was able to modulate hypernociception in RA, after three irradiations to levels similar to the control group.

Finally, this preclinical study had as its objective the investigation of the action of LLLT in the initial phases of the experimental model for RA, in the attenuation of the expression of inflammatory mediators and consequently, hyperalgesia. The results show biomodulation of LLLT principally in the expression of neutrophils and macrophages between the control and RA groups, as well as in the cytokines IL-6 and IL-10, contributing directly to the attenuation of the hyperalgesia.

However, more experimental studies and clinical trials with scientific rigor are necessary, to elucidate the mechanisms by which the LLLT acts in the modulation of the cellular, molecular, and hypernociception mechanisms inherent in RA.

Perspectives and Limitations

Despite the positive results demonstrated for LLLT in the anti-inflammatory mechanisms and in hypernociception, there exist limitations in this study, which if dealt with, could respond to important questions, such as what the action of LLLT is in RA on the cytokine receptors (IL-1 β , IL-6, TNF- α), in NF κ β , and in terms of factors of chemotaxis for neutrophils (CINC-1), Mieloperoxidase (MPO), and Cox 1 and 2.

Acknowledgements

Professor Paulo de Tarso Camillo de Carvalho thanks the Brazilian Research Council-CNPq for the Research Productivity Scholarship (Process nº 307665/2012-7).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist. Professor Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior receives research support from Multi Radiance Medical (Solon, OH - USA), a laser device manufacturer. Multi Radiance Medical had no role in the planning of this study, and the laser device used was not theirs. They had no influence on study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The remaining authors declare that they have no conflict of interests.

REFERENCES

1. Zhou R, Wu X, Wang Z, Ge J, Chen F Interleukin-6 enhances acid-induced apoptosis via upregulating acid-sensing ion channel 1a expression and function in rat articular chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2015 Dec;29(2):748-60. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.044.
2. Favalli EG, Becciolini A, Biggioggero M. Structural integrity versus radiographic progression in rheumatoid arthritis. *RMD Open.* 2015 Aug 15;1(Suppl 1):e000064. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000064.
3. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205–19.
4. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):429-42.
5. Ogata H, Takeya M, Yoshimura T, Takagi K, Takahashi K. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *J Pathol.* 1997 May;182(1):106-14.
6. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis--Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of

- personalized therapy. *Cytokine*. 2015 Dec;76(2):527-36. doi: 10.1016/j.cyto.2015.08.260.
7. Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, Bräuer R, Gajda M, Richter F, Hensellek S, Brenn D, Natura G. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Apr;1193:60-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05301.x
 8. Ebbinghaus M, Uhlig B, Richter F, von Banchet GS, Gajda M, Bräuer R, Schaible HG. The role of interleukin-1 β in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012 Dec;64(12):3897-907. doi: 10.1002/art.34675.
 9. von Banchet GS, Petrow PK, Bräuer R, Schaible HG. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res*. 2000;2(5):424-7.
 10. Kasama T, Miwa Y, Isozaki T, Odai T, Adachi M, Kunkel SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Jun;4(3):273-9.
 11. Cross A, Edwards SW, Bucknall RC, Moots RJ. Secretion of oncostatin M by neutrophils in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 May;50(5):1430-6.
 12. So Jin Lee, Aeju Lee, Seung Rim Hwang, Jong-Sung Park, Jiyeon Jang, Myung Sook Huh, Dong-Gyu Jo, Soo-Young Yoon, Youngro Byun, Sun Hwa Kim, Ick Chan Kwon, Inchan Youn, Kwangmeyung Kim. Anti-oxidative and TNF- α suppressive activities of puerarin derivative (4AC) in RAW264.7 cells and collagen-induced arthritic rats. *Mol Ther*. 2014 February; 22(2): 397–408. doi: 10.1038/mt.2013.245
 13. Xiao C, Li J, Dong X, He X, Niu X, Liu C, Zhong G, Bauer R, Yang D, Lu A. Anti-oxidative and TNF- α suppressive activities of puerarin derivative (4AC) in RAW264.7 cells and collagen-induced arthritic rats. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;666(1-3):242-50. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.061.
 14. Leal-Junior EC, de Almeida P, Tomazoni SS, de Carvalho Pde T, Lopes-Martins RÁ, Frigo L, Joensen J, Johnson MI, Bjordal JM. Superpulsed low-level laser therapy protects skeletal muscle of mdx mice against damage, inflammation and

- morphological changes delaying dystrophy progression. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3):e89453. doi: 10.1371/journal.pone.0089453
15. Hamblin MR. Can osteoarthritis be treated with light? *Arthritis Res Ther*. 2013 Oct 29;15(5):120. doi: 10.1186/ar4354.
 16. Manchini MT, Serra AJ, Feliciano Rdos S, Santana ET, Antônio EL, de Tarso Camillo de Carvalho P, Montemor J, Crajoinas RO, Girardi AC, Tucci PJ, Silva JA Jr. Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PLoS One*. 2014 Jul 3;9(7):e101270. doi: 10.1371/journal.pone.0101270.
 17. Barretto SR, de Melo GC, dos Santos JC, de Oliveira MG, Pereira-Filho RN, Alves AV, Ribeiro MA, Lima-Verde IB, Quintans Júnior LJ, de Albuquerque-Júnior RL, Bonjardim LR. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Dec 5;129:135-42. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.002.
 18. Marinho RR, Matos RM, Santos JS, Ribeiro MA, Smaniotto S, Barreto EO, Ribeiro RA, Lima RC Jr, Albuquerque RL Jr, Thomazzi SM. Potentiated anti-inflammatory effect of combined 780 nm and 660 nm low level laser therapy on the experimental laryngitis. *J Photochem Photobiol B*. 2013 Apr 5;121:86-93. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.02.012.
 19. dos Santos SA, Alves AC, Leal-Junior EC, Albertini R, Vieira Rde P, Ligeiro AP, Junior JA, de Carvalho Pde T. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers Med Sci*. 2014 May;29(3):1051-8. doi: 10.1007/s10103-013-1467-2. Epub 2013 Oct 31.
 20. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, de Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R116.
 21. Carlos FP, de Paula Alves da Silva M, de Lemos Vasconcelos Silva Melo E, Costa MS, Zamuner SR. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar;29(2):757-63. doi: 10.1007/s10103-013-1413-3.

22. Smoot B, Chiavola-Larson L, Lee J, Manibusan H, Allen DD. Effect of low-level laser therapy on pain and swelling in women with breast cancer-related lymphedema: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Surviv.* 2014 Nov 29
23. Jang H, Lee H. Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas. *Photomed Laser Surg.* 2012 Aug;30(8):405-17. doi: 10.1089/pho.2012.3240.
24. Amadio EM, Serra AJ, Guaraldo SA, Silva JA Jr, Antônio EL, Silva F, Portes LA, Tucci PJ, Leal-Junior EC, de Carvalho Pde T. The action of pre-exercise low-level laser therapy (LLLT) on the expression of IL-6 and TNF- α proteins and on the functional fitness of elderly rats subjected to aerobic training. *Lasers Med Sci.* 2015 Apr;30(3):1127-34. doi: 10.1007/s10103-015-1713-x.
25. Hsieh YL, Cheng YJ, Huang FC, Yang CC. The fluence effects of low-level laser therapy on inflammation, fibroblast-like synoviocytes, and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. *Photomed Laser Surg.* 2014 Dec;32(12):669-77. doi: 10.1089/pho.2014.3821.
26. Pallotta RC, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior EC, Teixeira S, Marcos RL, Ramos L, Messias Fde M, Lopes-Martins RA. Infrared (810-nm)_low-level_laser_therapy_on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2012 Jan;27(1):71-8. doi: 10.1007/s10103-011-0906-1.
27. QUINTEIRO, M. S. et al. The indirect antinociceptive mechanism of 15d-PGJ2 on rheumatoid arthritis-induced TMJ inflammatory pain in rats. *Eur J Pain.* 16 (8), 1106-15, Sep/2012.
28. CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol.* 2008/Apr, 83 (4), 824-32. doi: 10.1189/jlb.0907654. Epub 2008, Jan/18.
29. VIEIRA, R. P. et al. Creatine Supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37 (6), 660-7, Dec/2007.
30. WRIGHT, H. L. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases *Rheumatology (Oxford).* 2010/Sep, 49 (9), 1618-31. doi: 10.1093/ rheumatology/ keq045. Epub 2010/Mar 24.
31. KAPLAN, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2013/Oct 2, 15 (5), 219. doi: 10.1186/ar4325.
32. FOGEL, L. A.; YOKOYAMA, W. M. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther.* 2013/Jul 11, 15 (4), 216. doi: 10.1186/ar4232.
33. BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008/Nov, 118 (11), 3537-45. doi: 10.1172/JCI36389.

34. PARIDA, J. R. et al. Is non-biological treatment of rheumatoid arthritis as good as biologics? *World J Orthop.* 2015/Mar 18, 6 (2), 278-83. doi: 10.5312/wjo.v6.i2.278. eCollection 2015.
35. DETERT, J.; KLAUS, P. Biologic monotherapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics.* 2015/May 14, 9, 35-43. doi: 10.2147/BTT.S53361. eCollection 2015.
36. JANG, H.; LEE, H. Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas *Photomed Laser Surg.* 2012/Aug, 30 (8), 405-17. doi: 10.1089/pho.2012.3240. Epub 2012/Jun 29.
37. WEI, S. T. et al. Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. *Med Sci Monit.* 2015/Dec 24, 21, 4030-8.
38. ALMEIDA, P. de. 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.* 2014/Mar, 29 (2), 653-8. doi: 10.1007/s10103-013-1377-3. Epub 2013/Jun 30.
39. MACEDO, A. B. et al. Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. *PLoS One.* 2015/Jun 17, 10 (6): e0128567. doi: 10.1371/journal.pone.0128567. eCollection 2015.
40. SILVA, V. R. et al. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma *Respir Physiol Neurobiol.* 2014/Apr 1, 194, 37-48. doi: 10.1016/j.resp.2014.01.008. Epub 2014/Jan 28.
41. PERON, J. P. et al. Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice *PLoS One.* 2015/Aug 31, 10 (8), e0136942. doi: 10.1371/journal.pone.0136942. eCollection 2015.
42. SILVA, C. M. da et al. Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS One.* 2015/Nov 16, 10 (11), e0142816. doi: 10.1371/journal.pone.0142816. eCollection 2015.
43. MARCOS, R. L. et al. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: Analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res.* 2012/ Dec, 30 (12), 1945-51. doi: 10.1002/jor.22156. Epub 2012/Jun 5.
44. YAMAURA, M. et al. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers Surg Med.* 2009/Apr, 41 (4), 282-90. doi: 10.1002/lsm.20766..
45. ALVES, A. C. A.; DE CARVALHO, P.T.C.; PARENTE, M.; XAVIER, M.; FRIGO, L.; AIMBIRE, F.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. *Lasers in Medical Science.*, v.28, p.529 - 536, 2013.
46. OTON-LEITE, A. F. et al. Effect of low-level laser therapy on chemoradiotherapy-

- induced oral mucositis and salivary inflammatory mediators in head and neck cancer patients. *Lasers Surg Med.* 2015/Apr, 47 (4), 296-305. doi: 10.1002/lsm.22349. Epub 2015/Mar 30.
47. DERKACZ, A. et al. Effect of the intravascular low energy laser illumination during percutaneous coronary intervention on the inflammatory process in vascular wall. *Lasers Med Sci.* 2013/May, 28 (3), 763-8. doi: 10.1007/s10103-012-1142-z. Epub 2012/Jun 26.
 48. MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res.* 2015/Dec 17, 4. pii: F1000 Faculty Rev-1465. doi: 10.12688/f1000research.7010.1. eCollection 2015.
 49. TRIFUNOVIĆ, J. et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. *Biochem Med (Zagreb).* 2015, 25 (1), 36-48. doi: 10.11613/BM.2015.004.
 50. VENKATESHA, S. H. et al. Cytokine-modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy *Int J Mol Sci.* 2014/Dec 31, 16 (1), 887-906. doi: 10.3390/ijms16010887.
 51. CASALECHI, H. L. et al. Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: Effects in acute and chronic inflammatory phases. *Lasers Med Sci.* 2013/May, 28 (3), 989-95. doi: 10.1007/s10103-012-1189-x. Epub 2012/Aug 28.
 52. MELO, Rambo C. S. de et al. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. *Lasers Med Sci.* 2014/Sep, 29 (5), 1723-33. doi: 10.1007/s10103-014-1582-8. Epub 2014 May 7.
 53. WALSH D. A.; MCWILLIAMS, D. F. Pain in rheumatoid arthritis. *Curr Pain Headache Rep.* 16 (6), 509-17. Dec/2012.
 54. CHOY, E. et al. Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 51 Suppl 5v., 3-11. Jul/2012.
 55. STARODUBTSEVA, I. A.; VASILIEVA, L. V. The analysis of dynamics of oxidative modification of proteins in the blood sera of the patients presenting with secondary osteoarthritis associated with rheumatoid arthritis and treated by laser therapy. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2015/Jan-Feb, 92 (1), 19-22.
 56. EKIM, A. et al. Effect of low level laser therapy in rheumatoid arthritis patients with carpal tunnel syndrome. *Swiss Med Wkly.* 137 (23-24), 347-52, Jun/2007.
 57. FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci.* 2014/Spring, 5 (2), 58-62.

[lick here to download Cover Letter: Cover Letter.docx](#)

Universidade Nove de Julho
Rua Vergueiro, 235/249
Postgraduate Studies Department
Liberdade – São Paulo/SP - Brazil

Ana Carolina Araruna Alves
PhD Student
carolararuna@uninove.br

Dear Editor,

We are submitting the manuscript "*Analysis of Photobiostimulation effects on Inflammation and Hyperalgesia in acute phase of experimental Rheumatoid Arthritis in rats*" for possible publication in the journal Osteoarthritis and Cartilage.

We declare that this work is unpublished. It strictly followed all ethical procedures and it has not been submitted to any other journal for publication. Moreover, we are aware that, if the manuscript is accepted for publication, copyright now belong to the journal Osteoarthritis and Cartilage.

Our manuscript had the objective to see if photobiostimulation applied previously at early stages in an autoimmune disease, like Rheumatoid Arthritis using an animal model, can act on inflammatory cells and the levels of cytokine expression modulating hyperalgesia, most frequent and incapacitating disease symptom. In this way, photobiostimulation could be an accessible cheaper alternative of treatment.

The authors declare to have not conflict of Interests.

Finally, we authorize, if necessary, the reformulation of wording and style and thank you for the attention.

Yours Sincerely,

Ana C Araruna-Alves

PhD Student in Rehabilitation Sciences

Geana M Albuquerque-Pontes,

PhD Student in Biophotonics applied to Health Sciences

Prof. Ernesto CP Leal-Junior, PhD

Rehabilitation Sciences And Biophotonics Department

Prof. Andrey J Serra, PhD

Biophotonics Department

Prof. Paulo de TC de Carvalho, PhD

Rehabilitation Sciences And Biophotonics Department