

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

**SOLANGE ALMEIDA DOS SANTOS**

**Efeito da terapia por fotobiomodulação no controle da  
lesão articular em modelo experimental de artrite reumatoide –  
Aspectos morfológicos e funcionais**

**São Paulo, SP**

**2020**

**SOLANGE ALMEIDA DOS SANTOS**

**Efeito da terapia por fotobiomodulação no controle da lesão articular em modelo experimental de artrite reumatoide – Aspectos morfológicos e funcionais**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho.

**Orientadores:** Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho (*in memoriam*).  
Prof. Dr. Cid André Fidelis de Paula Gomes.

**São Paulo, SP**

**2020**

Santos, Solange Almeida dos.

Efeito da terapia por fotobiomodulação no controle da lesão articular em modelo experimental de artrite reumatóide – Aspectos morfológicos e funcionais. / Solange Almeida dos Santos. 2020.

51 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

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

Orientador (a): Prof. Dr. Cid André Fidelis de Paula Gomes.

1. Fotobiomodulação. 2. Artrite reumatóide. 3. Cartilagem. 4. Infiltrado inflamatório. 5. Propriedades mecânicas.

I. Gomes, Cid André Fidelis de Paula. II. Título.

CDU 615.8

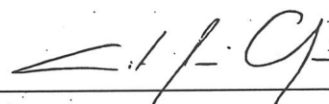
São Paulo, 30 de junho de 2020.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Solange Almeida dos Santos

Título da Tese: "Efeito da Terapia por Fotobiomodulação no Controle da Lesão Articular em Modelo Experimental de Artrite Reumatoide – Aspectos Morfológicos e Funcionais".

Presidente: PROF. DR. CID ANDRÉ FIDELIS DE PAULA GOMES



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF. DR. LÚCIO FRIGO



## DEDICATÓRIA

À minha mãe Valdelice (*in memoriam*), que sempre me incentivou a estudar e ao meu pai Antonio que valoriza e apoia meu percurso acadêmico, sempre ensinou o valor do trabalho honesto, obrigada por ensinar que mesmo com prejuízos preciso manter a minha palavra e honrar meus compromissos, por ensinar a ser uma pessoa comprometida. Sinto que sou extremamente abençoada por ser filha de pais maravilhosos.

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados, obrigada pelo apoio, por entenderem e perdoarem a minha ausência em muitos momentos em família, pelo suporte emocional e por todos cuidarem de mim. Obrigada pelo amor que vocês demonstram a cada dia.

Ao meu mestre com carinho Paulo de Tarso Camillo de Carvalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre iluminar meu caminho, colocar pessoas incríveis em minha vida, e por me fazer levantar a cada queda.

À Universidade Nove de Julho (UNINOVE), pela oportunidade, infraestrutura fornecida e concessão da bolsa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa PROSUP.

Ao meu amado e eterno orientador, Prof.<sup>o</sup> Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, por toda paciência e ensinamento.

Aos professores Dr. Cid André Fidelis de Paula Gomes e Dr. Rodrigo Labat, que assumiram o papel de orientadores, foram fundamentais para a conclusão do trabalho, pela eterna disposição em ajudar no que fosse preciso.

Aos técnicos do Laboratório de Pesquisa e do Biotério da UNINOVE, Gabriel Padilha, Giovanni Julioti, Eduardo, Nubia e Haryanne, Vanessa, Nurya, pelo suporte.

Aos meus amigos de laboratório e parceiros na vida, sou grata pela parceria, paciência em ensinar, ouvir e aconselhar. Em especial à Andreia Martinelli, Renata Salani, Patrícia Almeida, Lucas Andreo, Kaline, Aline Silva, Guilherme Henrique, e José Marcelo.

Aos alunos de Iniciação Científica, Jheniphe R. Caires, Fernando Souza, pela vontade em aprender, e por toda ajuda e dedicação.

Aos meus amigos, por me manterem em pé (ou me reerguer) sempre que situações difíceis surgiram.

À minha amada família, sem eles, eu nada seria.

*“O que passou, passou,  
mas o que passou luzindo,  
resplandecerá para sempre”.*

*Johann Goethe*

## RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença crônica inflamatória, autoimune, sistêmica e progressiva, que leva à destruição irreversível da cartilagem e osso. Estudos experimentais *in vivo* utilizando a terapia de fotobiomodulação têm demonstrado efeitos positivos sobre a modulação do processo inflamatório. **Objetivo:** Analisar os efeitos da terapia por fotobiomodulação na organização celular e das propriedades mecânicas da cartilagem de joelho em um modelo experimental de Artrite Reumatoide induzida por colágeno tipo II. **Metodologia:** Um estudo piloto com 12 animais foi realizado para determinar os parâmetros de Colágeno II e Adjuvante de Freund para a indução da AR. Na segunda fase do estudo vinte e cinco ratos machos wistar, foram distribuídos em 5 grupos, CTL (controle), AR (artrite reumatoide) com 7 dias (AR7) e 14 dias (AR14), além dos grupos tratados com PBM em 7 dias (AR7+PBM) e 14 dias (AR14+PBM). Para a indução da AR, os animais receberam 2 injeções intradérmicas da solução indutora da lesão nos dias 0 e 7 e após 21 dias foi aplicada 3ª dose na articulação dos joelhos. Para os grupos tratados, a PBM (808nm; 2J; 50mW) iniciou no dia 21, imediatamente após a última indução. **Resultados:** Foi observada redução da Força de Ruptura (Fruptura) e da Deformação máxima (Dmax) nos grupos com AR, além de alterações histológicas como desorganização tecidual e presença de infiltrado inflamatório. A PBM reduziu as alterações biomecânicas provocadas pela AR e promoveu melhor organização histológica, evitando a progressão da doença. **Conclusão:** O modelo de indução da AR pelo uso de Colágeno II e Adjuvante de Freund com 1ª e 2ª indução intradérmica e 3ª indução no joelho foi eficaz na indução da AR apresentando sinais clínicos característicos da doença. A PBM promoveu melhora nas características morfológicas e funcionais, reduzindo o impacto na resistência da cartilagem e na organização tecidual. A PBM aparece como uma importante terapia no tratamento da AR com ausência de efeitos colaterais conhecidos.

Palavras Chaves: Fotobiomodulação, Artrite reumatoide, Cartilagem, infiltrado inflamatório, propriedades mecânicas.



## **Abstract**

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic, autoimmune, inflammatory, progressive disease that leads to irreversible destruction of cartilage and bone. Experimental *in vivo* studies using photobiomodulation therapy have demonstrated positive effects on the modulation of the inflammatory process. Objective: To analyze the effects of photobiomodulation therapy on cell organization and the mechanical properties of knee cartilage in an experimental model of Rheumatoid Arthritis induced by type II Collagen. Methodology: A pilot study with 12 animals was carried out to determine the parameters of Collagen II and Freund's Adjuvant for RA induction. In the second phase of the study, twenty-five male wistar rats were divided into 5 groups, CTL (control), RA (rheumatoid arthritis) with 7 days (AR7) and 14 days (AR14), in addition to the groups treated with PBM in 7 days (AR7 + PBM) and 14 days (AR14 + PBM). For RA induction, the animals received 2 intradermal injections of the lesion-inducing solution on days 0 and 7 and after 21 days a 3rd dose was applied to the knee joint. For the treated groups, PBM (808nm; 2J; 50mW) started on the 21st, immediately after the last induction. Results: A reduction in Rupture Force (Fracture) and maximum Deformation (Dmax) was observed in RA groups, in addition to histological changes such as tissue disorganization and the presence of inflammatory infiltrate. PBM reduced the biomechanical changes caused by RA and promoted better histological organization, preventing the progression of the disease. Conclusion: The model of RA induction using Collagen II and Freund's Adjuvant with 1st and 2nd intradermal induction and 3rd knee induction was effective in inducing RA with clinical signs characteristic of the disease. PBM improved the morphological and functional characteristics, reducing the impact on cartilage resistance and tissue organization. PBM appears as an important therapy in the treatment of RA with no known side effects.

Keywords: Photobiomodulation, Rheumatoid arthritis, Cartilage, Inflammatory Process, mechanical properties.

## Lista de Abreviaturas

<b>AINES</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>AR</b>	Artrite Reumatoide
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cm<sup>2</sup></b>	Centímetro ao quadrado
<b>CTL</b>	Controle
<b>GPx</b>	Glutathiona Peroxidase
<b>IL</b>	Interleucina
<b>J</b>	Joules
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases
<b>Nm</b>	Nanômetros
<b>PBM</b>	Terapia de Fotobiomodulação
<b>PGE2</b>	Prostaglandina
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>W</b>	Watts

## **SUMÁRIO**

<b>1.Contextualização</b>	<b>13</b>
<b>2.Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>3.Material e métodos</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Animais de experimentação</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Teste da dose ideal para artrite reumatoide</b>	<b>23</b>
<b>3.4.Modelo de artrite induzida por colágeno</b>	<b>26</b>
<b>3.5. Evolução da artrite reumatoide</b>	<b>26</b>
<b>3.6. Terapia de fotobiomodulação</b>	<b>27</b>
<b>3.7. Eutanásia</b>	<b>28</b>
<b>3.8. Análise biomecânica</b>	<b>28</b>
<b>3.9. Análise histológica (HE)</b>	<b>28</b>
<b>3.10. Análise estatística</b>	<b>29</b>
<b>4. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>37</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>43</b>
<b>7. Referências</b>	<b>44</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>52</b>

## Lista de Figuras

Figura 1: Linha do tempo dos grupos estudados.....	23
Figura 2: Fluxograma do estudo.....	24
Figura 3: Aparelho utilizado para fotobiomodulação.....	26
Figura 4A: Modelo estudo piloto.....	29
Figura 4B: Cortes histológicos estudo piloto.....	29
Figura 5: Prancha histológica dos grupos estudados.....	31
Figura 6: Gráfico Força máxima.....	32
Figura 7: Gráfico Força máxima.....	33
Figura 8: Gráfico Deformação máxima.....	34
Figura 9: Gráfico Deformação máxima.....	35

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Score clínico de sinais artríticos.....22

Tabela 2: Parâmetros do laser de baixa potência utilizados para irradiação dos grupos experimentais.....26

## 1- Contextualização

### 1.1- Artrite Reumatoide

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença crônica inflamatória autoimune sistêmica, e progressiva, que acomete articulações sinoviais, preferencialmente a membrana sinovial de pequenas articulações, levando à destruição irreversível (óssea e cartilaginosa). Seus principais sintomas são dor crônica, edema, rigidez e aumento da temperatura local em múltiplas articulações essas intercorrências causam grande impacto na qualidade de vida e produtividade levando a distúrbios do sono e fadiga <sup>(1-4)</sup>.

A prevalência da AR é de 0,5 a 1% da população mundial, e as mulheres são as mais afetadas. A AR pode ocorrer em qualquer idade, embora o aparecimento seja mais frequente entre os 40 e 50 anos de idade. A etiologia e patogênese da doença permanecem desconhecidas <sup>(5,6)</sup>.

De maneira geral a artrite reumatoide acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como rigidez matinal, edema das articulações, fadiga e perda de peso. Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos <sup>(6)</sup>. A progressão da AR, leva a incapacidade para realização das atividades de vida diária bem como a profissional, causando impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade <sup>(6,7)</sup>

A susceptibilidade genética, com vários fatores ambientais também desempenha um papel crítico na patogênese desta doença, ativando o sistema imune, gerando processos altamente complexos e coordenados, perpetuando assim uma resposta autoimune <sup>(7)</sup>.

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 uma fina camada de células de linhagem fibroblástica, denominadas sinoviócitos e macrófagos. Com a AR, 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 envolvidos nas articulações (osteoblastos, osteoclastos, condrócitos, macrófagos, células B,

Células T) 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 <sup>(8,9)</sup>.

Entende-se que durante o processo patológico primário da AR, que ocorre após a ativação do sistema imunológico, as citocinas e as quimiocinas que são abundantes induzem a infiltração de imunócitos na sinóvia levando a displasia de sinoviócitos, e à diferenciação de osteoclastos <sup>(10)</sup>.

Ainda ocorre o aumento de mediadores catabólicos, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), da interleucina (IL) -1 $\beta$ , e metaloproteinases de matriz (MMPs). Acredita-se que as citocinas ajudam a perpetuar a inflamação crônica na AR, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 são fundamentais na inflamação e nos danos que ocorrem nas articulações, essas citocinas medeiam a destruição de ossos e cartilagens, são responsáveis pela síntese e liberação excessiva das MMPs inflamatórias, prostaglandinas e óxido nítrico e inibe a produção de componentes de matriz. Outra citocina participante desse processo inflamatório na AR é a IL-6, seus níveis encontram-se elevados no líquido sinovial, esse aumento é responsável pelo aumento do recrutamento de células inflamatórias <sup>(11-13)</sup>.

Os autores Goedner et.al. <sup>(14)</sup> e Burrage <sup>(15)</sup> consideram que AR é resultado da ação auto reativa dos linfócitos T e B, levando a sinovite, infiltração celular, e a desorganização de destruição e remodelação óssea. O sistema imunológico do corpo desencadeia uma cascata inflamatória imunológica autodirigida que culmina na destruição das articulações. A patogênese da AR origina-se nos tecidos sinoviais adjacentes às articulações e depois se espalha para a cartilagem.

Portanto o agente causador pode ser disseminado por todo o corpo, incluindo as articulações. Como parte de uma resposta de defesa, os neutrófilos inflamatórios migram para o local e acabam degradando os componentes da matriz ao atacarem os organismos invasores. Os fragmentos dos componentes da matriz são liberados na circulação, onde estimulam uma resposta autoimune em indivíduos suscetíveis. Células do sistema imunológico auto reativas abrigam as articulações e atacam seus antígenos cognatos. Os macrófagos são então recrutados para as articulações onde eles liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  (que exacerba muito

mais o processo inflamatório), juntamente com IL-6 e IL-8, e vários fatores de crescimento <sup>(15,16)</sup>.

### **1.2- Processo de degradação da cartilagem**

A ação das citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 induzem a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs), sendo estas as responsáveis pela destruição irreversível da cartilagem, osso e tendões nas articulações. A atividade das MMP's é regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP's). Em condições patológicas os níveis elevados de MMPs excedem os das TIMP's tornando suas ações ineficientes. Fatores de crescimento na sinóvia inflamada dirigem a proliferação de fibroblastos sinoviais residentes, e essas células, juntamente com os macrófagos recrutados e células imunes, formam uma grande massa celular chamada pannus. O pannus invade e destrói a cartilagem, tendão e osso. Outros eventos durante a AR, como a degradação do colágeno, é mediado principalmente pelas metaloproteinases, que são predominantemente responsáveis pela destruição do tecido conjuntivo. Mais especificamente, por duas famílias dentro da classe de metaloproteinases, uma desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina (ADAMTS) e as metaloproteinases da matriz (MMPs), são as principais mediadoras da destruição da cartilagem na AR <sup>(15-17)</sup>.

A cartilagem articular tem estrutura anatômica única, caracterizada por tecido avascular e aneural altamente estruturado, sua estrutura é lisa para facilitar o movimento articular e transmissão de cargas, possui baixa densidade celular e matriz extracelular muito densa, sua capacidade de regeneração é limitada, podendo levar a perda completa da função articular <sup>(18,19)</sup>.

Com o passar do tempo pode ocorrer a erosão da cartilagem em determinadas áreas, isso diminuirá a capacidade biomecânica de distribuição de carga <sup>(19)</sup>.

Sabe-se que a cartilagem é composta principalmente por colágeno tipo II, junto com o proteoglicano agregano são os dois principais alvos da degradação, devido a essa destruição de colágeno II ocorre a sua substituição por fibrocartilagem de colágeno tipo I <sup>(15)</sup>.



Sendo os condrócitos o único tipo de células presentes na cartilagem articular representa 1% do volume da matriz, e são responsáveis pela produção da matriz extracelular complexa (MEC), incluindo colágeno tipo II e agrecano <sup>(13,19)</sup>.

Portanto o equilíbrio adequado dos conteúdos de agrecano e colágeno estabelecem a homeostase da cartilagem e desenvolve uma estrutura físico-química característica para a distribuição de cargas e mobilidade. Entretanto, citocinas como IL-1 e TNF- $\alpha$ , que são produzidas por sinoviócitos ativados, células mononucleares ou pela própria cartilagem articular, expressam significativamente a expressão do gene da metaloproteinase da matriz (MMP). As citocinas também neutralizam as vias de síntese compensatória de condrócitos que são necessárias para restaurar a integridade da matriz extracelular degradada. Então a resposta dos condrócitos as citocinas são reduzidas pela síntese irregular de agrecanos, atrapalhando a integridade estrutural da cartilagem. Embora a AR tenha uma variedade de causas complexas, a apoptose de condrócitos articulares, especialmente no estágio avançado, tem sido sugerida como uma das principais causas de AR <sup>(13,20,21)</sup>.

### **1.3- Tratamento da Artrite Reumatoide**

A AR causa grande impacto econômico para a sociedade <sup>(22)</sup>. Entre as doenças autoimunes a AR é uma das mais relatadas, pois tem alta prevalência que pode aumentar com a idade entre homens e mulheres, porém não existe um consenso quando se trata da escolha de um tratamento ideal, o motivo está diretamente ligado a falta de evidências de qualidade. Estima-se um aumento da incapacidade, morbidade e mortalidade associadas a AR, visto que existe um crescimento da população acima de 60 anos de idade <sup>(23)</sup>.

Existe uma preferência clínica na escolha do tratamento da AR, muitos iniciam o tratamento com o uso do Metotrexato na tentativa de reduzir a inflamação, escolhendo o medicamento como primeira opção.

Devida a complexidade e a lentidão na sua regeneração, os recursos utilizados como tratamento para reversão do quadro de degradação não apresentam resultados eficientes, por isso novas estratégias são necessárias <sup>(17)</sup>.

De acordo com Alves et.al. <sup>(17)</sup> é possível encontrar outros tratamentos capazes de diminuir a degradação da cartilagem. Efeitos positivos da terapia com

fotobiomodulação têm sido relatados em diversas situações clínicas e experimentais, com bons resultados na modulação danos articulares.

#### **1.4- Terapia por Fotobiomodulação na Artrite Reumatoide**

A teoria da emissão estimulada em 1917 por Albert Einstein deu início a investigação das propriedades terapêuticas do laser. Essa teoria se tornou realidade em 1960, quando Theodore Maiman construiu o primeiro emissor de laser de Rubi <sup>(24)</sup>. Basicamente, esse tipo de emissão ocorre quando um conjunto de átomos é excitado por um pulso elétrico ou de luz, dando início a uma emissão espontânea de fótons. Essa emissão quando no eixo de um cilindro em que há reflexão provoca a emissão de outros fótons idênticos aos incidentes e a partir desse momento, com a mesma direção, energia e comprimento de onda <sup>(25, 26, 27)</sup>.

Laser é um acrônimo Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation que quer dizer amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Os mecanismos de ação sobre os tecidos são atribuídos à capacidade de energia da luz ser absorvida pelas células <sup>(24)</sup>.

Vários estudos <sup>(17,29)</sup> demonstraram que a terapia de fotobiomodulação tem efeitos bioestimulantes ao nível celular. O mecanismo de ação ocorre através da absorção de fótons pelos cromóforos moleculares específicos atuantes na cadeia respiratória mitocondrial, é um efeito da estimulação por comprimento de onda específico.

Presume-se que a luz tem a capacidade de alterar o metabolismo celular, devido a absorção pela mitocôndria e citocromo C oxidase. Inicialmente os efeitos da interação entre o laser e o tecido biológico podem provocar a liberação de substâncias, como a histamina, serotonina, bradicinina. As reações enzimáticas normais podem ser modificadas, sendo aceleradas ou ainda retardando tais reações <sup>(24)</sup>.

Esses efeitos melhoram a diferença de potencial elétrico entre o interior e o exterior da célula. A biomodulação de vários processos intracelulares por irradiação com o laser de baixa intensidade tem sido bem estabelecida como o aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP <sup>(29-32)</sup>.

Entende-se que a terapia por fotobiomodulação possui a capacidade de alterar vários processos biológicos em modelos animais e em humanos,

estimulando a cicatrização de feridas e a síntese de colágeno, promovendo o processo de regeneração do músculo, após lesão, diminui a resposta inflamatória, aumenta a neoformação de vasos sanguíneos na ferida <sup>(28,33)</sup>.

Essa irradiação com energia a laser produz efeitos biológicos, bioquímicos, e fisiológicos e eventos proliferativos em várias enzimas, células, tecidos, órgãos e organismos. A radiação a laser tem uma capacidade dependente do comprimento de onda para alterar o comportamento celular <sup>(34)</sup>. Possui propriedades reparadoras, é considerada uma terapia segura para várias doenças e lesões <sup>(35)</sup>.

A terapia de fotobiomodulação traz várias vantagens no tratamento de muitas doenças, esse recurso tem sido utilizado no tratamento de tendinopatias, lesões musculares, entre outras doenças, proporcionando um reparo mais rápido do tecido muscular podendo aliviar sinais clínicos e sintomas. Apresenta efeitos favoráveis na modulação do processo inflamatório com resultados relevantes na AR <sup>(29,36)</sup>.

Outro efeito importante do laser de baixa intensidade é a capacidade de influenciar a biologia ao nível molecular, celular e tecidual, causando vasodilatação, fator relevante para a inflamação articular, pois aumenta o suporte local de oxigênio e contribui para a migração de células imunes <sup>(37)</sup>.

O uso dessa terapia foi introduzido aproximadamente a duas décadas atrás como um tratamento não invasivo alternativo para a AR <sup>(38)</sup>.

De acordo com os parâmetros utilizados é possível haver redução da dor, inflamação, bem como a melhora funcional em articulações reumatóides <sup>(39)</sup>.

Estudos demonstram <sup>(15,29)</sup> resultados positivos com uso da terapia por fotobiomodulação em vários eventos que ocorrem na AR como a capacidade de diminuir o estresse oxidativo, modulação de citocinas inflamatórias e das metaloproteínas.

No estudo de Alves et.al <sup>(40)</sup> obtiveram como resultado a diminuição da dor e do processo inflamatório em modelo de AR, concluiu-se que o laser de baixa intensidade com comprimento de onda de 780 nm é capaz de modular a resposta inflamatória em modelo experimental de artrite reumatóide induzida por colágeno considerando a terapia eficaz tanto no estágio inicial quanto no tardio da doença.

Em uma pesquisa realizada por Lin Zhang et.al <sup>(41)</sup>, a AR foi induzida em ratos utilizando o modelo CIA, com objetivo de analisar os efeitos do laser diodo Ga-Al-As com comprimento de onda de 830 nm, na expressão gênica do receptor de

quimiocinas CXCR4 e seu ligante CXCL12, bem como sua expressão proteica na membrana sinovial das articulações. Os pesquisadores encontraram como resultados, a diminuição da produção de CXCR4 afetando o processo de transcrição em tecidos da membrana sinovial, sugeriu-se que este pode ser um dos mecanismos moleculares usados para reduzir a inflamação e a dor por terapia de fotobiomodulação na AR.

Em recente estudo Issa JPM et.al. <sup>(36)</sup>, com o objetivo de investigar os efeitos pós laser, mediados por três comprimentos de onda, (660, 808 e 905 nm) em modelos pré-clínicos de artrite aguda e crônica, avaliando biomarcadores clínicos, histológicos e anatômicos previamente associado à inflamação e o desenvolvimento de artrite reumatoide, o grupo induziu em camundongos artrite crônica com BSA e colágeno bovino tipo II, enquanto para artrite aguda foi utilizado Zymosan dissolvido em solução salina. Os animais foram tratados 3 vezes por semana, durante 4 semanas. Baseado nas análises estatísticas, histológicas, clínicas e imunohistoquímicas, os autores concluíram que laser de baixa intensidade pode promover efeitos anti-inflamatório e analgésicos na AR aguda e crônica, pode eliminar sinais clínicos e controlar a reabsorção articular, porém é dependente do número de aplicações, comprimento de onda, formas de irradiação usadas, do tecido e condições de tratamento, o melhor resultado foi nos grupos em que o laser foi aplicado em dias alternados.

F.P. Carlos et.al. <sup>(43)</sup> adotou como protocolo o uso de zymosan dissolvido em solução salina para induzir AR em ratos, a solução foi aplicada na articulação do joelho, os animais desenvolveram uma inflamação articular aguda, em seguida foram tratados com terapia de fotobiomodulação na 1ª e 2ª hora imediatamente após a indução, o comprimento de onda utilizado foi 660 nm, o grupo comparou o tratamento com laser versus dexametasona. Foi avaliado o influxo de leucócitos, a quantificação de concentração das interleucinas IL-1 e IL-6, total de fibras de colágeno, e atividade das MMPs 2 e 9. O grupo laser foi avaliado em dois momentos, após 6 e 12 horas. Os autores observaram que a radiação laser diminuiu o influxo de leucócitos e a atividade das MMPs 2 e 9, sugerindo menor degradação do colágeno e concluíram que o laser fornece efeitos protetores para cartilagem articular.

No estudo de Dos Santos et.al. <sup>(29)</sup>, recentemente foi verificado que a terapia de fotobiomodulação nas doses de 2 e 4 joules e comprimento de onda de 808 nm, aplicado em dois pontos na articulação do joelho de ratos em dias alternados, tem efeitos benéficos e pode reduzir a peroxidação lipídica, e aumentar a expressão das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Catalase (CAT) na AR induzida por colágeno tipo II associada ao adjuvante completo de Freund.

A terapia de fotobiomodulação tem sido utilizada para auxiliar diversos tratamentos devido aos seus efeitos e capacidade anti-inflamatório, possui propriedades reparativas e analgésicas, reduz a liberação de marcadores inflamatórios em diferentes distúrbios musculoesquelético. Essa redução deve-se a uma diminuição inicial do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), seguida da inibição das citocinas que estão envolvidas na inflamação aguda <sup>(44,45)</sup>.

É possível observar que o laser inibe a proliferação de células inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF-  $\alpha$ , demonstra ser uma alternativa anti-inflamatória com efeitos semelhantes aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) diminuindo e/ou inibindo prostaglandina (PGE2), ciclooxigenase 2 (COX-2) e histamina <sup>(17,24)</sup>.

Ainda regula negativamente as MMPs e melhora a produção de colágeno em diferentes tecidos, como cartilagem, músculo, tendões, ossos e pele. É sugerida que laser tenha uma atuação no metabolismo neurológico, agindo na prevenção de processos degenerativos da cartilagem articular, essa terapia pode ser considerada eficaz na interrupção da progressão de doenças, e na melhora do processo inflamatório <sup>(46)</sup>.

Atualmente, há um crescente consenso de que várias citocinas pró-inflamatórias que são produzidas por macrófagos sinoviais estimulados, são parcialmente responsáveis por desencadear as alterações morfológicas que são encontradas na cartilagem articular causada por MMPs. A literatura também mostrou que a supressão ou diminuição dessas citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) pode aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 <sup>(21)</sup>.

Recentemente Stancker et.al <sup>(46)</sup>, avaliaram os efeitos do laser de baixa intensidade sozinho e em associação com injeção intra-articular de células tronco mesenquimais, sobre o processo inflamatório em amostras *in vivo* e *in vitro* de osteoartrite, foram analisadas as citocinas inflamatórias, metaloproteinases 1, 2 e

13, Timp 1 e 2, Colágeno II, o grupo avaliou expressão gênica, expressão proteica, os autores concluíram que uma combinação de PBM e injeção intra-articular de células tronco mesenquimais previne modificações degenerativas de colágeno II e modula processos inflamatórios pela diminuição de citocinas e MMPs em ratos OA.

Independente da doença e do tecido tratado, os laser de baixa intensidade têm demonstrado resultados positivos e muito promissores, principalmente quando se trata de modulação do processo inflamatório, na capacidade de reparação tecidual bem como na diminuição de danos articulares. Estudos como de Alves et.al<sup>(47)</sup>, Hamblin (48), Silva Tomazoni et. al<sup>(45)</sup>, investigaram a ação do laser sobre o processo inflamatório em doenças e tecidos diferentes, porém alcançaram resultados positivos na modulação da inflamação.

Achados na literatura<sup>(21,45)</sup> nas mais diversas situações clínicas, comprovam a eficácia do laser de baixa intensidade em modular o processo inflamatório, além de ser um tratamento de baixo custo que não causa reações adversas. Nesse sentido, considerando o atual panorama de tratamento da AR, justifica-se, portanto, a proposta de um estudo da ação da terapia com fotobiomodulação sobre modelo experimental de AR, devido: ao tratamento conservador não atuar na remissão clínica da doença e produzir efeitos adversos indesejáveis, não apresentar resultados totalmente satisfatórios e por ser um tratamento de alto custo e ainda, devido aos efeitos positivos da fotobioestimulação obtidos por meio do laser de baixa intensidade relatados pela literatura sobre citocinas inflamatórias em diversos tipos de tecido e modelos experimentais<sup>(47,49)</sup>, 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, uma alternativa de tratamento não-invasiva e sem efeitos deletérios.

## **2- OBJETIVO GERAL**

Analisar os efeitos da terapia por fotobiomodulação na organização celular e das propriedades mecânicas da cartilagem de joelho em modelo experimental de Artrite Reumatóide induzida por Colágeno Tipo II.

### **2.1- Objetivos específicos**

Avaliar o modelo experimental de indução da AR pela indução transdérmica seguida de injeção local, no joelho de ratos utilizando colágeno tipo II e Adjuvante de Freund na evolução da doença;

Avaliar a força máxima no momento da ruptura (Fruptura) e a deformação máxima (Dmax) suportada pela cartilagem após 7 e 14 dias da indução da artrite reumatoide;

Verificar o efeito da terapia com fotobiomodulação sobre os valores da força máxima (Fruptura) e a deformação máxima (Dmax) suportada pela cartilagem após 7 e 14 dias da indução da artrite reumatoide;

Avaliar as alterações histológicas, como a organização celular na cartilagem do joelho na indução da artrite reumatoide e após o tratamento utilizando terapia com fotobiomodulação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (AN 2063120618– ANEXO 8) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.1- Animais de experimentação

Para o estudo foram utilizados 32 ratos (*norvergicos albinus*) 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*.

#### 3.2- Teste de dose eficaz para um modelo experimental de artrite reumatoide

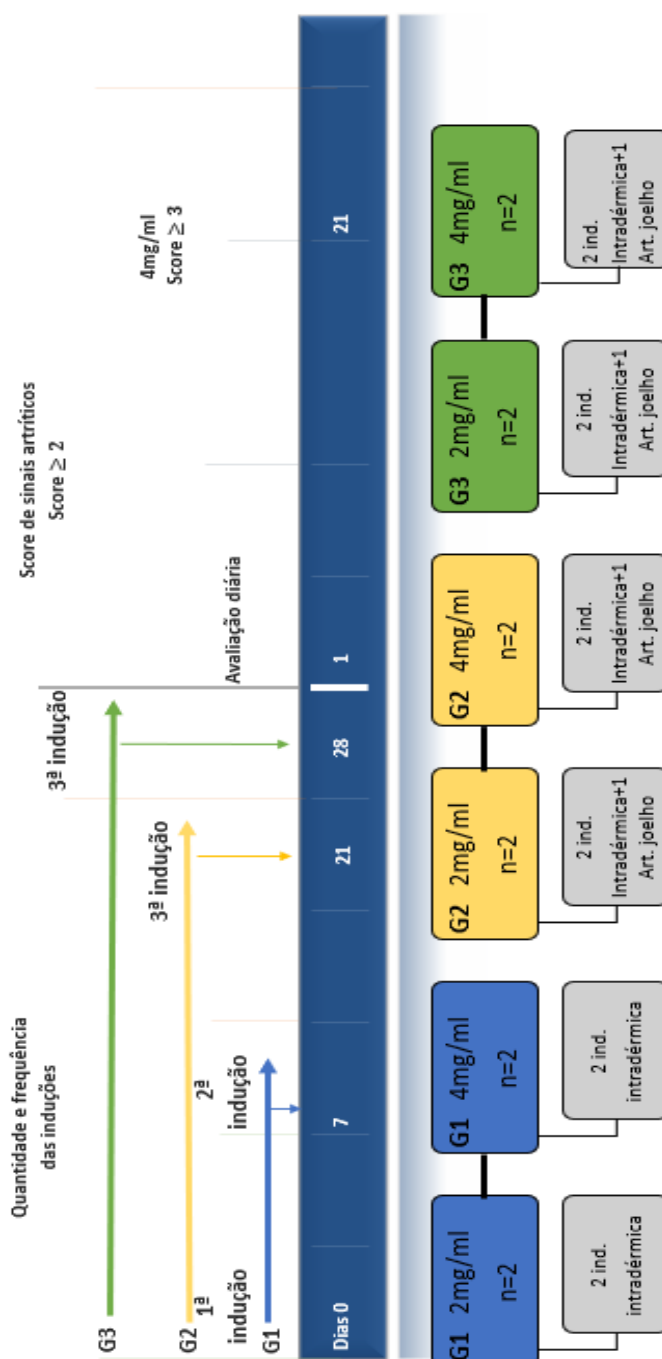
Para testar o modelo mais eficaz de AR, foram utilizados 12 animais para um estudo piloto, distribuídos em 3 grupos com 4 animais cada; os grupos foram subdivididos para testagem de duas concentrações diferentes de colágeno II. Foram avaliados os seguintes fatores para a indução da artrite: concentração de colágeno (2 e 4 mg/ml), e local de administração, quantidade e intervalo das induções.

**Tabela 1.** Score clínico de sinais artríticos

<b>0 = sem evidência de eritema e edema.</b>
<b>1 = eritema e edema leve confinado ao meio das patas, ou articulação do tornozelo.</b>
<b>2 = eritema e edema leve que se estende do tornozelo à pata.</b>
<b>3 = eritema e edema moderado que se estende desde o tornozelo até a articulação metatársica.</b>
<b>4 = eritema e edema severo envolvendo o tornozelo, patas e dedos.</b>



De acordo com a análise do Índice de Artrite (IA), o edema da articulação foi classificado usando uma escala de 0 a 4 para cada membro, pontuação entre 0 e máximo de 16 por animal.



**Figura 1.** Linha do tempo dos grupos estudados.

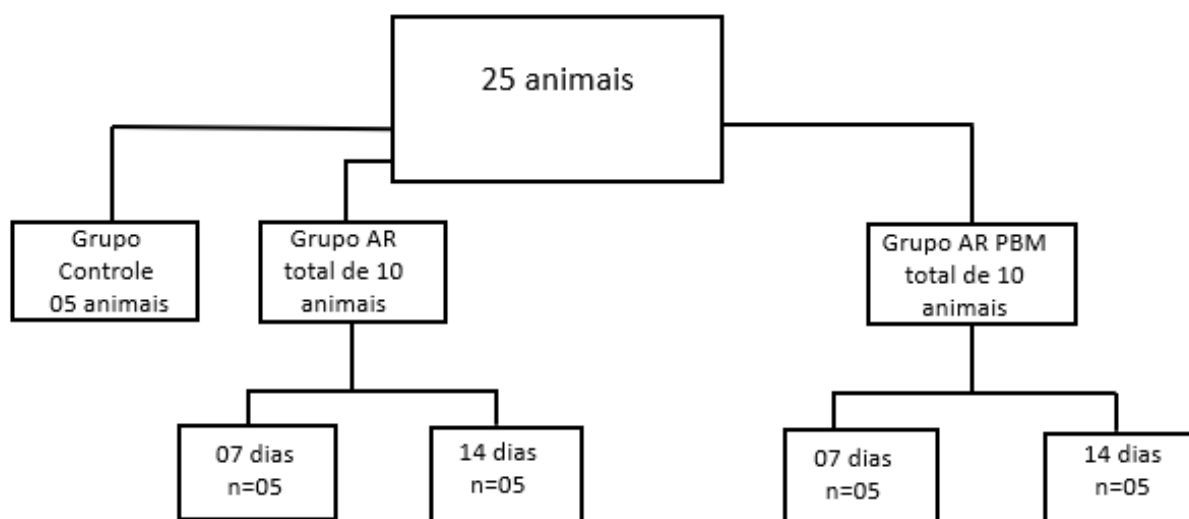
Os sinais artríticos das patas foram avaliados diariamente durante 21 dias após a última indução. Foi considerado positivo para AR score clínico  $\geq 2$ .

### 3.3- GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo controle (CTL):** Composto por 05 animais. Não foi realizado nenhum procedimento.
- **Grupo artrite reumatoide (AR):** Realização da indução da artrite reumatoide em 10 animais, os animais foram divididos em 2 grupos, nos seguintes tempos experimentais: 07 dias (AR7) e 14 dias (AR14). Não receberam nenhum tratamento.
- **Grupo AR + terapia com fotobiomodulação (AR+PBM):** Realização da indução da AR em 10 animais, os animais foram divididos em 2 grupos nos tempos experimentais de 07 dias (AR7+PBM) e 14 dias (AR14+PBM), o tratamento dos animais foi realizado com terapia de fotobiomodulação, as irradiações foram aplicadas em dias alternados.

#### Composição dos grupos experimentais e tempos experimentais



**Figura 2.** Fluxograma do estudo.

### **3.4- Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA)**

O modelo CIA foi gerado de acordo com o estudo piloto, baseado em estudos anteriores <sup>(29,50)</sup>. O colágeno tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em ácido acético a 0,05 M a 4 mg / ml, a substância permaneceu a uma temperatura de 4 ° C durante a noite, no dia seguinte a substância foi emulsionada em adjuvante completo de Freund CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Vinte animais foram anestesiados antes de cada infiltração da substância indutora da lesão, com uma mistura de Quetamina (7%) e Xilazina (0,3%), em uma mistura de 2:1 utilizando-se 0,1 ml/100gr por via intraperitoneal. Depois de anestesiados os vinte animais foram posicionados em decúbito ventral, cada animal foi imunizado por injeção intradérmica de 100 µl de colágeno tipo II na base da cauda + 100 µl no dorso, a primeira indução foi realizada no dia 0. Ao sétimo dia o procedimento foi repetido, os animais receberam uma segunda dose intradérmica da substância indutora da lesão. Após vinte e um dias a segunda indução, foi realizada a última indução, a aplicação foi administrada na articulação, com 20 µl da solução, em ambos joelhos de cada animal.

### **3.5- Evolução da artrite reumatoide**

Os sinais artríticos das patas foram caracterizados por edema e eritema, a avaliação foi diária durante 21 dias após a última injeção da solução indutora da doença. Para avaliar a incidência e a gravidade da artrite, as lesões nas quatro patas de cada rato foram classificadas por meio de um sistema de pontuação artrítico. A lesão foi classificada usando uma escala de 0 a 4 para cada membro, a pontuação foi entre 0 e máximo de 16 por animal. Os escores de gravidade foram definidos da seguinte forma: 0, sem evidência de eritema e edema; 1, eritema e edema leve confinado ao meio das patas, ou articulação do tornozelo; 2, eritema e edema leve que se estende do tornozelo a pata; 3, eritema e edema moderado que se estende desde o tornozelo até as articulações metatársicas; e 4, eritema e edema severo envolvendo o tornozelo, patas e dedos. Score clínico  $\geq 2$  foi considerado positivo para AR.

### 3.6- Tratamento com terapia de fotobiomodulação

O tratamento dos animais dos grupos AR+ PBM foi iniciado imediatamente após a última indução. Os animais foram imobilizados por contenção e irradiados a um ângulo de  $90^{\circ}$  <sup>(29)</sup>, em relação a superfície do tecido com laser por via transcutânea em dois pontos: medial e lateral, ambos joelhos receberão tratamento. Os animais do grupo RA PBM foram irradiados em dias alternados durante 20 segundos em cada ponto (total de 40 segundos em cada joelho). Foi utilizado o Laser da marca DMC® modelo Photon Laser III, meio ativo de AsGaAl, potência de 50 mW, comprimento de onda de 808 nm.

A dosimetria e parâmetros estão resumidos na Tabela 2.



**Figura 3.** Aparelho utilizado para fotobiomodulação e local da aplicação da PBM.

**Tabela 2. Parâmetros do laser de baixa potência utilizados para irradiação dos grupos experimentais.**

Comprimento de onda (nm)	808
Meio ativo	AsGaAl
Potência Média (mW)	50
Feixe de área (cm <sup>2</sup> )	0.028
Densidade de Potência (W/cm <sup>2</sup> )	1.78
Energia em joules	2
Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	71.4
Tempo por ponto (segundos)	40

### **3.7- Eutanásia**

Os animais de cada grupo foram pesados, para administração de tiopental (THIOPENTAX - Cristália) dose de 100mg/kg (DL) e lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália), a dose foi administrada por via intraperitoneal, o procedimento de eutanásia foi imediatamente após o último dia de tratamento com PBM. O material coletado foi imediatamente recolhido e armazenado em freezer -80°.

### **3.8- Análise biomecânica**

Os tecidos cartilagosos foram testados imediatamente após a remoção para evitar qualquer influência de armazenamento. A cartilagem foi fixada a uma máquina de ensaio de tração universal. O deslocamento da garra foi ajustado para tensionar levemente a cartilagem. A distância L0 entre as garras foram medidas antes de cada teste, seu valor médio foi calculado. Para evitar a secagem durante o teste, a cartilagem foi imersa em uma solução isotônica de NaCl a 0,9% (p / v).

O deslocamento foi controlado após os ciclos de carga e descarga a uma velocidade constante de 1 mm / min. Em cada ciclo, o deslocamento máximo aplicado a cartilagem foi aumentado de 10% de L0 e a força de tração F foi liberada até 0,1 N. A sequência foi repetida até a ruptura. O pré-condicionamento mecânico foi realizado durante os primeiros ciclos do ensaio de compressão <sup>(51)</sup>.

A partir do ensaio foi avaliada a força máxima para a ruptura do tecido, bem como a deformação máxima para o mesmo ponto de ruptura. Na relação entre Força Máxima e Capacidade de deformação, foi calculada a resistência do tecido cartilaginoso.

### **3.9- Análise Histológica:**

Preparação das secções de cartilagem: Para o processamento histológico, as cartilagens foram fixadas durante 24 horas em formol tamponado a 10% (pH 7,4). Em seguida, as cartilagens foram desidratadas em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90%) num período de 90 minutos cada,

passados três vezes em álcool absoluto e três vezes em Xilol (Reagen). A impregnação e inclusão em parafina foram efetuadas em duas incubações durante 1 hora a 60°C. As cartilagens foram incluídas transversalmente com as porções centrais do fragmento posicionadas mais externamente no bloco. Foram feitos 3 cortes por bloco de 5 µm de espessura no micrótomo (Leica RM2125, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas de microscopia e mantidos em estufa a 37°C durante 12 horas. Então, foi realizada a coloração com hematoxilina-eosina (HE) para exame histológico de rotina realizada sob microscopia de luz convencional (Zeiss Axioplan 2, Alemanha). A análise qualitativa dos cortes histológicos corados com HE inclui uma descrição da presença de infiltrado inflamatório, degradação da matriz cartilaginosa, células de condrócitos e grupos isogênicos.

### **3.10. Análise Estatística**

Os dados encontrados foram distribuídos normalmente (teste de Shapiro Wilk), e uma ANOVA de uma via com o teste post hoc de Tukey foi utilizado para comparações entre cada grupo. Todos os dados foram expressos como a média ± desvio padrão (SD). Foi utilizado programa de software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), e considerado significativo valores para  $P < 0,05$ .

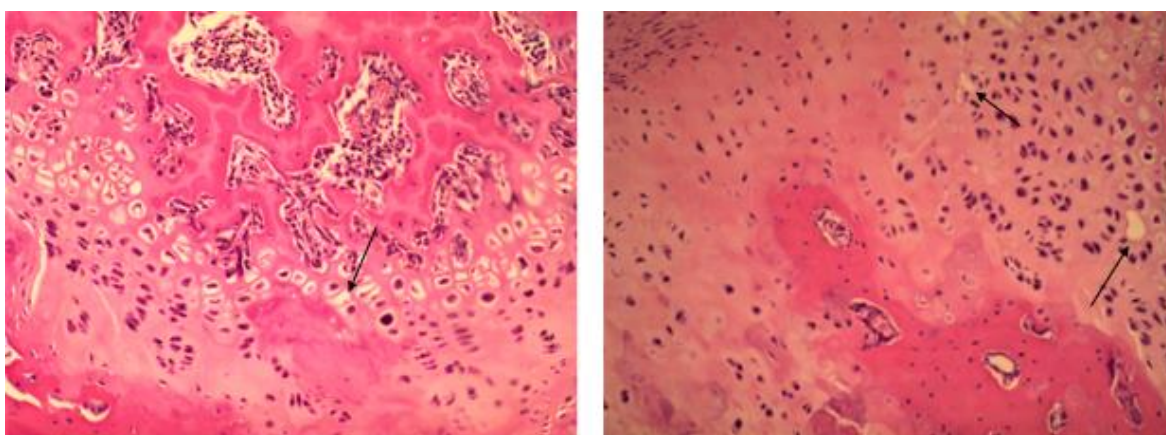
## 4- RESULTADOS

### 4.1- Modelo de Indução da Artrite Reumatóide:

O modelo mais indicado para AR experimental no estudo foi com a concentração de 4mg de colágeno II e 3 aplicações da solução indutora da lesão. O score clínico apresentado foi  $\geq 3$ . 1ª injeção de 100  $\mu$ l no Dorso + 100  $\mu$ l na base da cauda, da solução indutora de A, 2ª Após 7 dias receberam novamente injeção de 100  $\mu$ l dorso + 100  $\mu$ l na base da cauda, da solução indutora de AR., 3ª Após 21 dias, a injeção 20  $\mu$ l na articulação do joelho, da solução indutora de AR



**Figura 4 A.** Teste melhor dose de um modelo experimental de artrite reumatóide.



**Figura 4B:** Análise qualitativa da morfologia do osso subcondral e da cartilagem: Coloração com hematoxilina e eosina (HE). Aumento de 400X.

Limites irregulares entre tecido cartilaginoso e ósseo. Cartilagem com a presença de lacunas vazias sem condrócitos (setas).

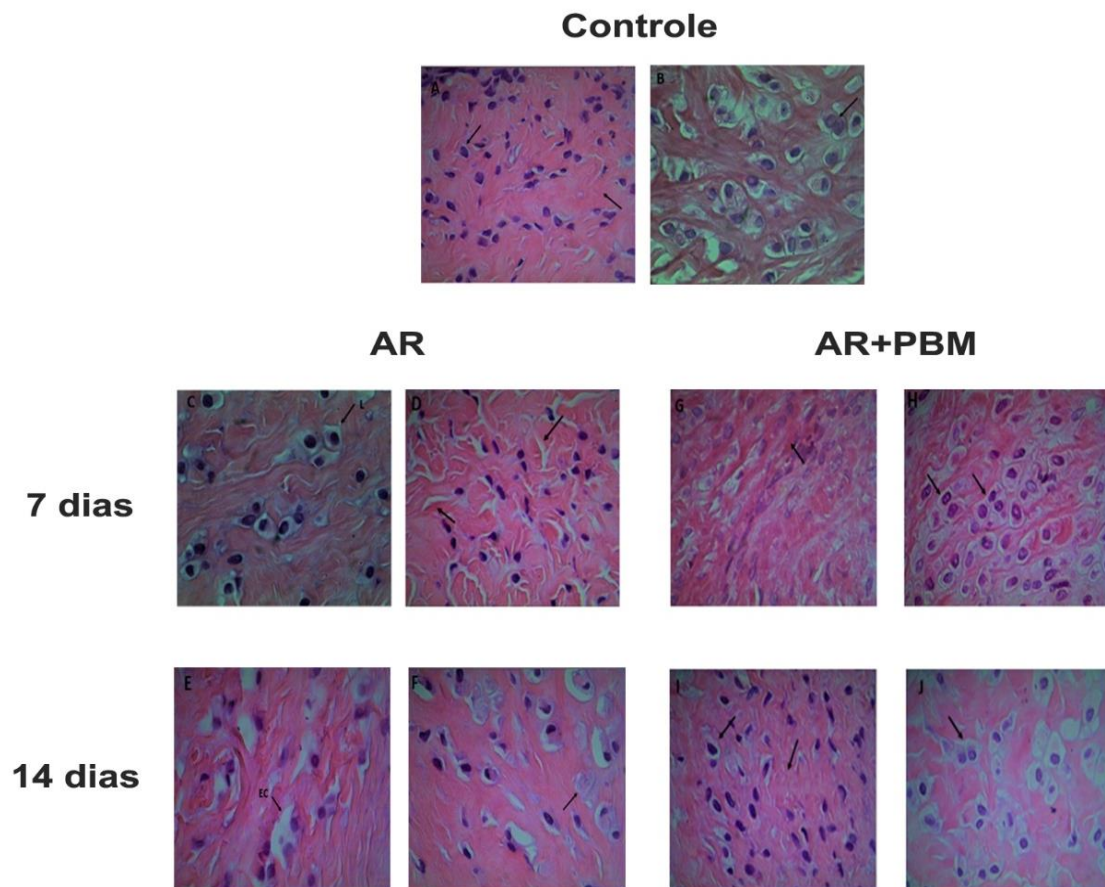
#### **4.2- Análise qualitativa da morfologia da cartilagem articular: Coloração com hematoxilina e eosina (HE)**

O grupo controle exibiu características morfológicas normais, como esperado, foi observado condrócitos distribuídos uniformemente (setas), com formato arredondado, presença de matriz celular íntegra (figuras 5A e 5B).

Nos grupos lesionados após 7 dias, foi observado degradação das lacunas e migração dos condrócitos para o interstício e retração celular (setas), indicando início do processo apoptótico (figuras 5C e 5D). Após 14 dias foi observado efeitos semelhantes, porém com diminuição dos condrócitos lacunares (setas) que apresentaram cariólise e ausência dos grupos isogênicos indicando desorganização tecidual (figuras 5E e 5F).

Nos grupos tratados com laser infravermelho, foi possível observar a permanência dos condrócitos nas lacunas (setas), menor grau de desorganização da matriz extracelular e manutenção dos grupos isogênicos em 7 dias (figuras 5G e 5H). Após 14 dias o efeito fotobiomodulatório foi semelhante ao observado em 7 dias, porém com a presença de condrócitos nas lacunas (setas) e no espaço intersticial (figuras 5I e 5J).





**Figura 5:** Prancha histológica demonstrando a cartilagem articular do grupo controle em (A) e (B), artrite reumatoide após 7 dias em (C) e (D), após 14 dias em (E) e (F), tratados com laser infravermelho após 7 dias (G) e (H) e após 14 dias em (I) e (J). Aumento de 400X.

#### 4.3- Propriedades Mecânicas – Teste de Compressão

Após os ensaios cíclicos de compressão mecânica das cartilagens na Máquina Universal de Ensaio, foram avaliados Força Máxima no momento da ruptura da cartilagem ( $F_{max}$ ) em Newtons e a capacidade de deformação até o momento da ruptura ( $D_{max}$ ) em milímetros.

A figura (6) representa a Força Máxima no momento da ruptura da cartilagem nos grupos Controle (CTL e Artrite Reumatóide em 7 dias (AR7) e 14 dias (AR14) após a indução da doença.

Neste gráfico, é possível observar a redução significativa de Fmax no grupo AR14 (130, 31±13), comparado aos grupos CTL (212,09±11) e AR7 (224,45±17).

Não foi observada alteração no grupo AR7 em comparação ao grupo CTL

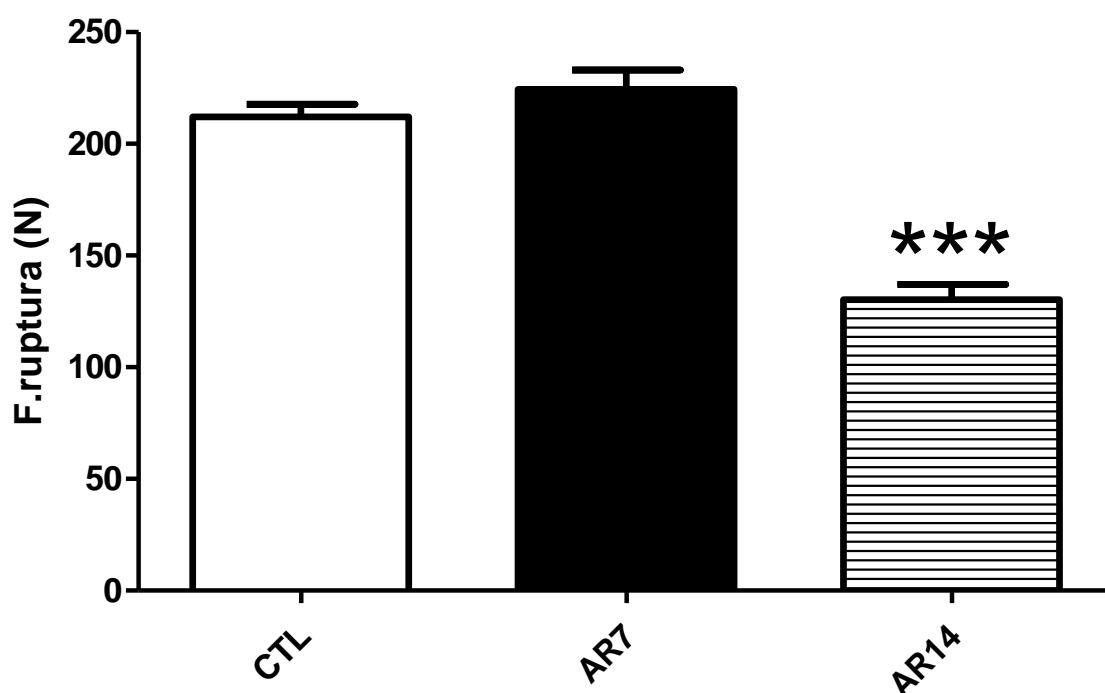


Figura (6): Gráfico da Força Máxima suportada pela cartilagem do joelho até o momento de ruptura (Fmax) em ensaio cíclico de compressão. Grupos Controle Saudável (CTL) e doente com 7 dias (AR7) e 14 dias (AR14) após a indução da artrite reumatoide. Média e Desvio Padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  VS CTL.

O gráfico da figura (7) mostra as alterações na Força Máxima no momento da ruptura da cartilagem e compara o grupo saudável (CTL) com os grupos com artrite reumatoide induzida sem tratamento (AR7 e AR14) ou tratados com terapia por fotobiomodulação (AR7+PBM e AR14+PBM).

Não houve alteração de Fmax nos grupos AR7(224,45±17) e AR7+PBM (203,06±4) quando comparado ao grupo CTL (212,09±11).

Ambos os grupos AR14 ( $130,3 \pm 13$ ) e AR14+PBM ( $167,8 \pm 10$ ) apresentaram redução de Fmax quando comparados ao grupo CTL ( $212,09 \pm 11$ ). Porém, o grupo artrite reumatoide tratado com PBM apresentou aumento de Fmax quando comparado ao grupo doente e sem tratamento (AR14).

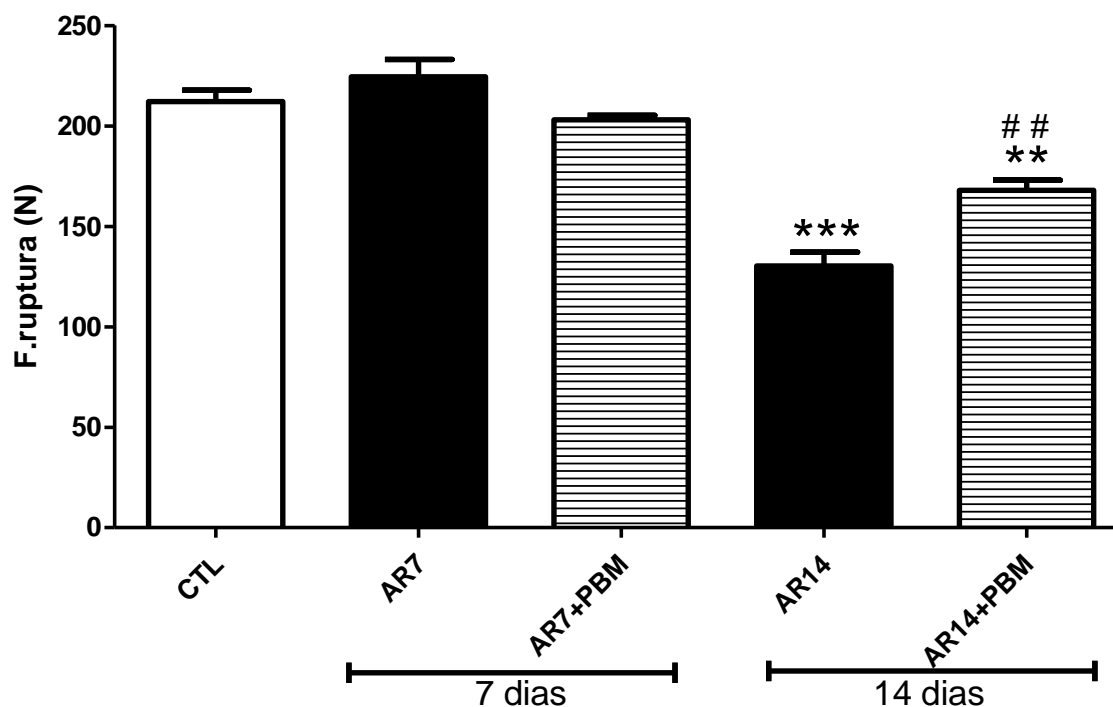


Figura (7): Gráfico da Força Máxima suportada pela cartilagem do joelho até o momento de ruptura (Fmax) em ensaio cíclico de compressão. Grupos Controle Saudável (CTL) e doente não tratados com 7 dias (AR7) e 14 dias (AR14) e tratados (AR7, AR14) após a indução da artrite reumatoide. Média e Desvio Padrão. \*\*\*  $p < 0,001$  VS CTL; ##  $p < 0,01$  VS AR14.

Na figura (8) podemos observar as alterações da capacidade de deformação da cartilagem após 7 e 14 dias da indução da artrite reumatoide.

No gráfico, o grupo AR7 ( $1,43 \pm 0,08$ ) e o grupo AR14 ( $1,2 \pm 0,09$ ) apresentaram redução de Dmax comparado ao grupo CTL ( $1,8 \pm 0,06$ ).

A redução da Dmax foi maior no grupo Artrite reumatoide com 14 dias.

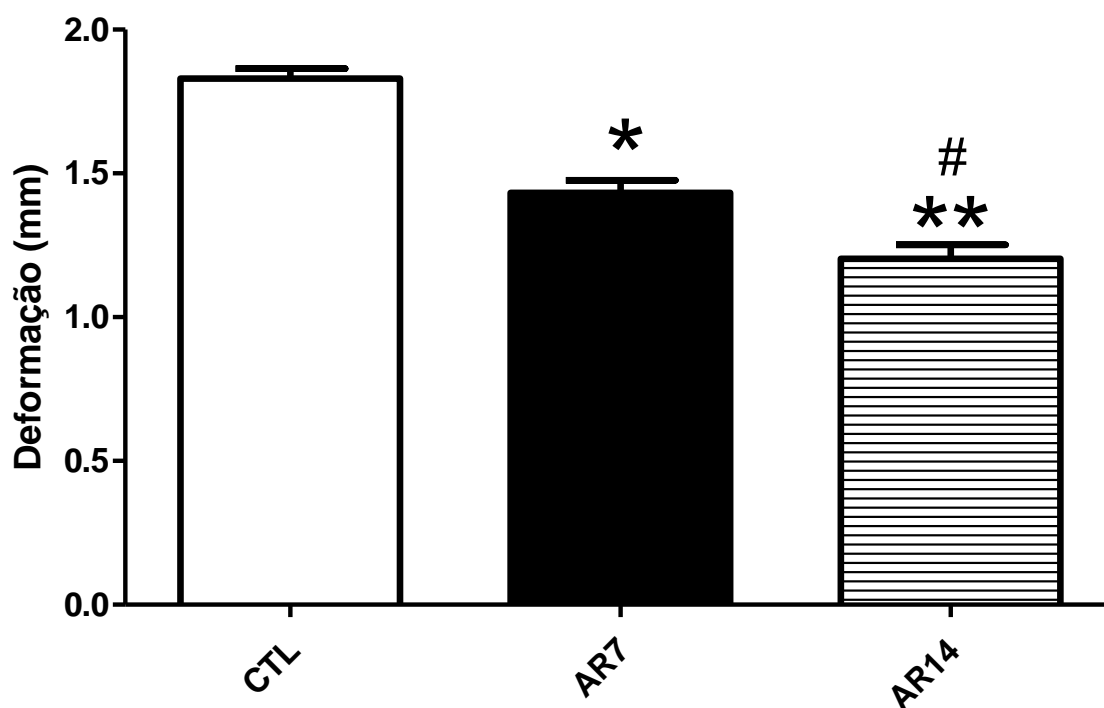


Figura (8): Gráfico da Deformação Máxima suportada pela cartilagem do joelho até o momento de ruptura (Dmax) em ensaio cíclico de compressão. Grupos Controle Saudável (CTL) e doente com 7 dias (AR7) e 14 dias (AR14) após a indução da artrite reumatoide. Média e Desvio Padrão. \*\*  $p < 0,01$  VS CTL e #  $p < 0,05$  VS AR7.

No gráfico da figura (9), foi avaliado a capacidade de deformação máxima até o momento da ruptura da cartilagem (Dmax).

Todos os grupos com artrite reumatoide, com 7 ou 14 dias, tratados ou não com PBM, apresentaram redução da capacidade de deformação, quando comparados só grupo CTL ( $1,8 \pm 0,06$ ). O grupo AR14 ( $1,2 \pm 0,09$ ) apresentou significativa redução de Dmax quando comparado ao grupo AR7 ( $1,43 \pm 0,08$ ).

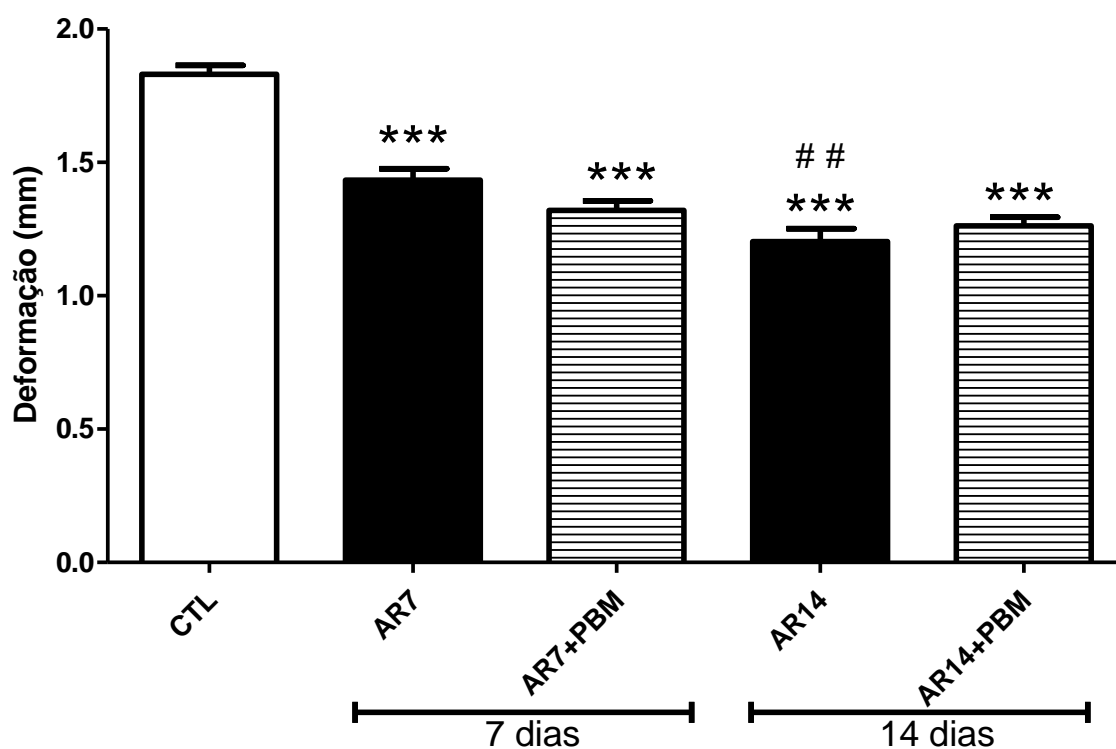


Figura (9): Gráfico da Deformação Máxima suportada pela cartilagem do joelho até o momento de ruptura (Dmax) em ensaio cíclico de compressão. Grupos Controle Saudável (CTL) e doente não tratados com 7 dias (AR7) e 14 dias (AR14) e tratados (AR7, AR14) após a indução da artrite reumatoide. Média e Desvio Padrão. \*\*8  $p < 0,001$  VS CTL e # #  $p < 0,01$  VS AR7.

## 5- DISCUSSÃO

O modelo de artrite reumatoide (AR) induzida por colágeno II em ratos tem sido de extrema importância para a compreensão dos mecanismos inflamatórios nesta doença <sup>(3)</sup>. Existe na literatura uma variedade de protocolos para aplicação em modelos experimentais *in vivo* de AR, alguns utilizando apenas adjuvante incompleto de Freund, principalmente para analisar a inflamação na fase aguda, enquanto outros trabalhos utilizam a associação do adjuvante completo de Freund com colágeno II, podendo assim mimetizar a AR, desenvolvendo um modelo mais próximo aos eventos ocorridos no humano, contudo a concentração ideal de colágeno II e local da aplicação ainda não está bem estabelecida na literatura, onde são encontrados variações na dosagem destes compostos <sup>(3,29,50,52)</sup>.

Este trabalho foi realizado em 2 etapas de estudo. A primeira etapa está relacionada ao desenvolvimento de um protocolo de indução de artrite reumatoide a partir de modelos experimentais anteriores conhecidos, utilizando tanto colágeno tipo II como adjuvante de Freund a fim de garantir a manifestação de eventos clínicos mais próximos da doença em humanos.

Para esta primeira etapa, foi realizado um estudo piloto para garantir um modelo mais fidedigno, que fosse adequado para análises de alguns eventos na fase mais tardia da AR. Desta forma, foi utilizado a injeção de colágeno tipo II com a concentração de 4 mg/ml, com duas aplicações intradérmicas no início do experimento e outra injeção após 21 dias, na articulação do joelho. No final desta primeira série de eventos, conseguimos desenvolver neste estudo um modelo em que os sinais como edema nas articulações e eritema permaneceram durante todo o tempo de avaliação. Também foi utilizado o Índice de Artrite (IA), para avaliação dos sinais de evolução da doença. Neste caso, o edema da articulação foi classificado usando uma escala de 0 a 4 para cada membro, além de uma pontuação com escala de 0 até 16 por animal e foi escolhido animais que apresentassem score clínico  $\geq 3$ .

Estudos de artrite induzida por colágeno (CIA) têm sido vitais para entender os mecanismos pró-inflamatórios que contribuem para a doença <sup>(50,53)</sup>.

Para Rosloniec *et al.* <sup>(54)</sup> a artrite induzida por colágeno tipo II em modelo de roedores (CIA) é um modelo autoimune amplamente estudado de artrite reumatoide. Neste modelo, a artrite autoimune é induzida por imunização com colágeno do tipo II (CII) emulsionado em adjuvante completo de Freund. Neste modelo, os primeiros sinais de artrite aparecem aproximadamente 21 a 28 dias após a imunização.

O modelo CIA estabelece claramente uma reação autoimune que pode levar a uma poliartrite crônica e destruição da cartilagem. É vista como uma ferramenta valiosa para estudar lesões inflamatórias nas articulações. Esse modelo contribui para o entendimento da gênese da AR humana <sup>(50)</sup>. O modelo apresentado neste trabalho define que a indução da artrite reumatoide pode ser realizada a partir dos seguintes parâmetros: 4mg/ml de colágeno II, dissolvido em ácido acético a 0,05 M armazenado a uma temperatura de 4 ° C, overnight, emulsionada no dia seguinte em adjuvante completo de Freund (CFA)

O modelo experimental proposto neste trabalho garante alterações tanto morfológicas quanto funcionais, indicadas pelas alterações apresentadas nos grupos AR7 e AR14 em que foi observada alteração na organização tecidual e redução na resistência da cartilagem com progressão destes sinais quando comparamos os resultados de 7 e 14 dias do início do protocolo experimental. Estas alterações histológicas corroboram com os achados de Huh *et al*, que avaliou a evolução da AR em modelo animal, observando presença de erosões teciduais e destruição tanto óssea como da cartilaginosa, além do progresso do processo inflamatório articular. Neste estudo o autor sugere que quimiocinas também seriam produzidas pelos condrócitos, difundindo-se na matriz cartilaginosa afetando assim as células sinoviais na AR <sup>(52)</sup>.

Outros sinais clínicos importantes na avaliação da doença é a presença de edema e eritema na região das articulações. Contudo, seria importante avaliar outros eventos como a hiperalgesia além de informações moleculares, como marcadores de degradação de colágeno, Metaloproteinases de Matriz e TNF- $\alpha$ , a fim de compreender as relações entre degradação do tecido cartilaginoso com seus aspectos morfológicos e funcionais.

A segunda etapa, será apresentado a evolução da artrite reumatoide em 2 tempos experimentais (7 e 14 dias) e o efeito da terapia por fotobiomodulação, usando laser com baixa intensidade e avaliando aspectos biomecânicos a partir de ensaios cíclicos de compressão na cartilagem do joelho do animal, além de análises morfológicas a partir de imagens histológicas da cartilagem corada com Hematoxilina e Eosina.

Para esta segunda etapa foi observada que os animais com AR apresentaram redução tanto na resistência da cartilagem ao teste cíclico de compressão como na capacidade de deformação da cartilagem, além de alteração histológicas como desorganização celular e modificação da matriz extracelular. A terapia por fotobiomodulação, usando laser com baixa intensidade no comprimento de onda de 808nm; 71,4J/cm<sup>2</sup> e potência de 50mW melhorou as propriedades mecânicas das cartilagens, além de favorecer a organização tecidual neste modelo experimental de AR.

O ensaio mecânico cíclico de compressão permite avaliar a força máxima suportada pela cartilagem até sua ruptura. Este modelo foi adaptado de ensaios biomecânicos descritos por Marcos *et al*, 2012 e Almeida-Mattos *et al*, 2017 em que foi utilizado ensaios cíclicos de tração no tendão e de flexão em tibia de ratos <sup>(55,56)</sup>. Nestes modelos o teste cíclico permite simular a atividade destes tecidos ao esforço repetitivo. Neste estudo, após os ensaios cíclicos de compressão, o grupo controle (CTL) suportou cerca de 200N de força até o momento da ruptura e próximo de 1,8mm de capacidade de deformação.

Ao avaliar as imagens histológicas do grupo CTL, é possível visualizar condrócitos distribuídos de maneira uniforme com espaço entre as células, além de ausência de infiltrado inflamatório. A organização da matriz também pode ser observada. Esta distribuição celular e organização do tecido cartilaginoso são fundamentais para suportar os impactos frequentes impostos pelos movimentos do corpo neste tecido <sup>(13)</sup>.

Ao analisar os grupos com artrite reumatoide induzida, é possível observar uma progressão da doença quando comparamos as informações biomecânicas e histológicas nos grupos artrite reumatoide em 7 dias (AR7) comparado ao grupo artrite reumatoide em 14 dias (AR14). Não houve diferença na força máxima no momento da ruptura para os grupos (AR7) quando comparado ao grupo CTL,



contudo a capacidade de deformação decai conforme a doença evolui. Neste caso, a deformação é menor no grupo AR7 e reduz mais ainda no grupo AR14. Neste último grupo é observado também redução da força de ruptura.

Da mesma forma, as informações histológicas mostram um tecido com matriz extracelular desorganizada, espaços celulares reduzidos e presença de infiltrado inflamatório. A artrite reumatoide é conhecida por ser uma doença crônica que reduz significativamente a qualidade da cartilagem. Alguns estudos mostraram que a progressão da AR está relacionada com a desorganização tecidual e presença de infiltrado inflamatório <sup>(13,39)</sup>. Da mesma forma, com a permanência do processo inflamatório, ocorre a degradação do tecido devido ao aumento da atividade de células de defesa <sup>(10)</sup>. Foi evidenciado ainda a presença de mediadores pró-inflamatórios no tecido cartilaginoso na AR <sup>(10)</sup>.

Atualmente, as terapias para a artrite reumatoide apresentam resultados pouco eficientes. O principal tratamento para artrite reumatoide ainda é o farmacológico, com o uso de corticoides e medicamentos biológicos que diminuem a atividade do TNF- $\alpha$ , porém, os efeitos adversos pelo uso prolongados são preocupantes <sup>(57)</sup>.

Neste estudo utilizamos a terapia por fotobiomodulação (PBM) para o tratamento da artrite reumatoide em modelo experimental induzido em ratos. A escolha dos parâmetros de irradiação (808nm, 2J, 50mW) estão de acordo com trabalhos anteriores descritos por Santos *et al*, 2017 em que foi utilizado parâmetros similares para o tratamento de artrite induzida. A preocupação pela escolha da dosimetria no uso de terapias por fotobiomodulação é fundamental, uma vez que a falta de parâmetros dosimétricos para o uso do laser com baixa intensidade e LEDs no tratamento da AR pode dificultar seu uso e aceitação pelos profissionais de saúde.

Nossos resultados demonstraram que a PBM foi efetiva na melhora da força suportada pela cartilagem após 14 dias da indução da AR. Da mesma forma, a PBM reduziu a progressão da doença quando avaliamos seu efeito sobre a capacidade de deformação em 14 dias comparada ao grupo AR14 em que houve a progressão da doença. Da mesma forma as informações histológicas mostraram melhor organização celular e manutenção do espaço entre os condrócitos, semelhantes ao grupo controle (CTL). Estes resultados corroboram com o estudo de Hsieh *et al*, em

que foi observado que a terapia por fotobiomodulação foi capaz de atenuar a inflamação da AR<sup>(39)</sup>.

O laser de baixa potência tem demonstrado ser eficiente em diferentes comprimentos de onda, promovendo a recuperação tecidual, diminuindo o dor e reduzindo o processo inflamatório <sup>(58)</sup>. Os resultados positivos estão presentes em condições musculoesqueléticas e neuropáticas, podendo incluir lesões tendíneas <sup>(59)</sup>.

Para Naterstad *et al.* <sup>(59)</sup>, o mecanismo pelo qual a terapia por fotobiomodulação estimula a produção de colágeno durante o processo regenerativo não é claro, mas pode incluir alterações na regulação dos genes e / ou modulação da ação das enzimas envolvidas no metabolismo do colágeno.

Stancker *et. al.* atribuíram as MMPs o papel na degradação da matriz extracelular e descreveram as MMPs como responsáveis pelo início e progressão aos danos a cartilagem. Porém quando foi avaliado os efeitos da terapia por fotobiomodulação nas citocinas pró-inflamatórias e metaloproteínases de matriz, foi observado a regulação das MMPs 2 e 13, e aumento na expressão de colágeno II <sup>(46)</sup>, o que seria um fator importante para a proteção da cartilagem.

Vale ressaltar que o presente estudo tem limitações, uma vez que, embora os resultados funcionais e morfológicos apontem para uma melhora estrutural da cartilagem articular após o tratamento por laser com baixa intensidade, este estudo não avaliou a relação entre marcadores moleculares, importantes para o conhecimento dos mecanismos de ação da terapia por fotobiomodulação. Também, não foi avaliado e quantificado o colágeno tipo II, bem como a atividade das enzimas relacionadas à sua degradação. Da mesma forma não foram descritos os tipos celulares encontrados no infiltrado inflamatório. Neste caso, o conhecimento das células presentes na inflamação seria fundamental para compreender o estágio da doença e a evolução da AR neste modelo experimental. Seria importante ainda avaliar a AR em outros tempos, para saber se a PBM tem influência na fase inflamatória, na fase proliferativa e na de reparo.

A artrite reumatoide é uma doença incapacitante que gera impacto na qualidade de vida do indivíduo. O tratamento com terapia por fotobiomodulação não tem reações adversas conhecidas para este tipo de doença e ainda apresenta eficácia na modulação da progressão da AR. A procura por uma terapia que seja

eficiente na diminuição dos danos provocados pela AR na região articular e que reduza os efeitos colaterais provocados pelo uso de fármacos anti-inflamatórios, ainda é um desafio. Entender e comprovar cientificamente os efeitos da terapia por fotobiomodulação em todas as etapas da AR é fundamental para sua indicação e uso pelos profissionais da área de saúde.

## **6- CONCLUSÃO:**

Podemos concluir que o modelo de indução da AR pelo uso de Colágeno II e Adjuvante de Freund com 1ª e 2ª indução intradérmica e 3ª indução no joelho foi eficaz na indução da AR apresentando sinais clínicos característicos da doença. A terapia por fotobiomodulação, (808nm; 2J; 50mW) promoveu melhora nas características morfológicas e funcionais, reduzindo o impacto na resistência da cartilagem e na organização tecidual. A PBM aparece como uma importante terapia no tratamento da AR com ausência de efeitos colaterais conhecidos.

## 7. Referências Bibliográfica

1. Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, Cohen R, Smotrich M, Kochevar IE. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):282–90.
2. Maria L, Da Mota H, Magalhães Laurindo M, Luiz Dos Santos Neto L. Artrite reumatoide inicial -conceitos. *Rev Assoc. Med. Bras.* 2010; 56(2):227–9.
3. Conigliaro P, Benson RA, Patakas A, Kelly SM, Valesini G, Holmdahl R, *et al.* Characterization of the anticollagen antibody response in a new model of chronic polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2299–308.
4. Walsh DA, McWilliams DF. Pain in rheumatoid arthritis. *Curr Pain Headache Rep.* 2012;16(6):509–17.
5. Farzaei MH, Farzaei F, Abdollahi M, Abbasabadi Z, Abdolghaffari AH, Mehraban B. A mechanistic review on medicinal plants used for rheumatoid arthritis in traditional Persian medicine. *J Pharm Farmacol.* [Internet]. 2016 Oct. [cited 2018 May 11];68(10):1233–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12606>
6. María Quiñonez-Flores C, González-Chávez SA, Río Nájera D Del, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. [cited 2018 May 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906181/pdf/BMRI2016-6097417.pdf>
7. Carol A Hitchon and Hani S El-Gabalawy. Oxidation in rheumatoid arthritis. [cited 2018 May 11]; Available from: <http://arthritis-research.com/content/6/6/265>
8. Zeynep Tuna, Tulin Duger, Nevin Atalay-Guzel, Arzu Aral, Bilkay Basturk, Seminur Haznedaroglu, *et al.* Aerobic exercise improves oxidant-antioxidant balance in patients with rheumatoid arthritis. [cited 2018 May 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4434018/pdf/jpts-27-1239.pdf>
9. Pisetsky DS, Ward MM. Advances in the treatment of inflammatory arthritis. [cited 2018 May 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461328/pdf/nihms405169>.

10. Wang Q, Wang L, Wu L, Zhang M, Hu S, Wang R, *et al.* Paroxetine alleviates T lymphocyte activation and infiltration to joints of collagen-induced arthritis. *Sci. Rep.* 2017; 7:1–12.
11. Lu Q-Y, Han Q-H, Li X, Li Z-C, Pan Y-T, Liu L, *et al.* Analysis of differentially expressed genes between rheumatoid arthritis and osteoarthritis based on the gene co-expression network. *Mol Med. Rep [Internet]*. 2014;10(1):119–24. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2014.2166>
12. Carteron NL. Cytokines in rheumatoid arthritis: Trials and tribulations. *Mol Med. Today.* 2000;6(8):315–23.
13. R. Zhou, 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 [Internet]*. 2015 Dec. [cited 2018 May 11];29(2):748–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576915301016>
14. Goeldner I, Skare TL, Reason ITDM. Artrite reumatoide: uma visão atual. *J Bras Patol. Med. Lab.* 2011;47(5):495–503.
15. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci [Internet]*. 2006 Jan 1 [cited 2018 May 11]; 11:529–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146751>
16. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol. [Internet]*. 2018 [cited 2018 May 11]; 36:175–84. Available from: <http://www.clinexprheumatol.org/article.asp?a=12889>
17. Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, *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 [Internet]*. 2013;15(5): R116. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4296>
18. Pretzel D, Linss S, Ahrem H, Endres M, Kaps C, Klemm D, *et al.* A novel in vitro bovine cartilage punch model for assessing the regeneration of focal cartilage defects with biocompatible bacterial nanocellulose. *Arthritis Res Ther [Internet]*. 2013;15(3): R59. Available from: <http://arthritis->

- research.com/content/15/3/R59
19. I.M. Khan, S.J. Gilbert, S.K. Singhrao, V.C. Duance CWA. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Cartil Integr Eur Cells Mater* [Internet]. 2008 [cited 2018 May 23]; 16:26–39. Available from: <http://www.ecmjournal.org/papers/vol016/pdf/v016a04.pdf>
  20. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Syed-Abdul S, Wang JR, Wang PD, *et al.* Combating Osteoarthritis through Stem Cell Therapies by Rejuvenating Cartilage: A Review. *Stem Cells Int* [Internet]. 2018 [cited 2018 May 24]; 2018:5421019. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29765416>
  21. Dos Santos SA, Alves ACA, Leal ECP, Albertini R, Vieira RDP, Ligeiro AP, *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.* 2014;29(3):1051–8.
  22. Zhao Wang, MDa, Hong-Wei Bao, Bda, Yong Ji, MDb. A systematic review and meta-analysis of rituximab combined with methotrexate versus methotrexate alone in the treatment of rheumatoid arthritis. *Medicine* (2020) 99:8.
  23. Afnan Sedky Adly, Aya Sedky Adly, Mahmoud Sedky Adly, Zahra M. H. Serry. Laser acupuncture versus reflexology therapy in elderly with rheumatoid arthritis. *Lasers Med. Sci.* DOI 10.1007/s10103-017-2213-y.
  24. Guimarães B, R, Neves A, A, Dias LA, Santos D, *et al.* Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. [cited 2018 May 11]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4833286/pdf/pone.0153618.pdf>.
  25. Castro SJO, Zucoloto S, Menegazzo LA, Granato RG, Arcassa LG, Bagnato VS. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg. Med.* 2001; 29(1): 73-77.
  26. Silva DFT, Lopes F, Guedes GH. In: Fernandes KPS, Ferrari RAM, França CM, organizadores. *Biofotônica: conceitos e Aplicações*. 1.ed. São Paulo:

- Universidade Nove de Julho – UNINOVE; 2017; p.42-49.
27. Davidovich L. The quantum of light and quantum optics. *Rev. Bras. Ensino Física*. 2015; 37(4): 2205 – 12.
  28. Aparecida De Almeida J, Piva C, Márcia E, Abreu C, Dos V, Silva S, *et al.* Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2011 [cited 2018 May 11];86(5):947–54. Available from: [http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n5/en\\_v86n5a13.pdf](http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n5/en_v86n5a13.pdf)
  29. dos Santos SA, dos Santos Vieira MA, Simões MCB, Serra AJ, Leal-Junior EC, de Carvalho P de TC. Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. *Lasers Med. Sci*. 2017;32(5):1071–9.
  30. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med*. [Internet]. 2007 April [cited 2018 May 11];39(4):373–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lsm.20492>
  31. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts *in Vitro*. *Photomed. Laser Surg* [Internet]. 2005 Apr 23 [cited 2018 May 11];23(2):161–6. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2005.23.161>
  32. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2006 Dec. [cited 2018 May 11];24(6):705–14. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/pho.2006.24.705>
  33. Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Cury V, Souza HP, Hamblin MR, *et al.* Low-Level Laser Therapy (808 nm) Reduces Inflammatory Response and Oxidative Stress in Rat Tibialis Anterior Muscle After Cryolesion. *Lasers Surg Med*. [Internet]. 2012 [cited 2018 May 11];44(9):726–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516365/pdf/nihms424305>.
  34. Barbosa A, M, Henrique L, Moraes R, Mizobuti DS, Reis Fogaça A, *et al.* Low-Level Laser Therapy (LLLT) in Dystrophin-Deficient Muscle Cells: Effects on



- Regeneration Capacity, Inflammation Response and Oxidative Stress. 2015 [cited 2018 May 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470633/pdf/pone.0128567.pdf>
35. De Lima FM, Albertini R, Dantas Y, Maia-Filho AL, De Loura Santana C, Castro-Faria-Neto HC, *et al.* Low-level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. *Photochem. Photobiol.* [Internet]. 2013 Jan [cited 2018 May 12];89(1):179–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.2012.01214.x>
  36. Moges H, Vasconcelos OM, Campbell WW, Borke RC, McCoy JA, Kaczmarczyk L, *et al.* Light therapy and supplementary riboflavin in the SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Lasers Surg Med.* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2018 May 12];41(1):52–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/lsm.20732>
  37. Issa JPM, Trawitzki BF, Ervolino E, Macedo AP, Lilge L. Low-intensity laser therapy efficacy evaluation in FVB mice subjected to acute and chronic arthritis. *Lasers Med. Sci* [Internet]. 2017 Aug 30 [cited 2018 May 14];32(6):1269–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560473>
  38. Trawitzki BF, Lilge L, de Figueiredo FAT, Macedo AP, Issa JPM. Low-intensity laser therapy efficacy evaluation in mice subjected to acute arthritis condition. *J Photochem Photobiol B Biol.* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2018 May 16];174:126–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416308545?via%3Dihub>.
  39. Hsieh Y-L, Cheng Y-J, Huang F-C, Yang C-C. 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* [Internet]. 2014;32(12):669–77. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2014.3821>
  40. Silva DP, Paula De Oliveira A, Novaretti C, Baldan C. Efeito analgésico do laser de baixa intensidade (LILT) na artrite reumatoide aguda Effect analgesic of low intensity laser (LILT) in rheumatoid arthritis acute. *Rev Inst. Ciênc.*

- Saúde [Internet]. 2009 [cited 2018 May 14];27(1):35–8. Available from: <http://files.bvs.br/upload/S/0104-1894/2009/v27n1/a006.pdf>
41. Carolina Araruna Alves A, de Tarso Camillo de Carvalho P, Parente M, Xavier M, Frigo L, Aimbire F, *et al.* Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. [cited 2018 May 14]; Available from: <https://link-springer-com.ez345.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs10103-012-1102-7>.
  42. Lin Zhang, Hiroki Kajiwara, Noboru Kuboyama YA. Reduction of cxcr4 expression in rheumatoid arthritis rat joints by low level diode laser irradiation. [cited 2018 May 15]; Available from: [www.jstage.jst.go.jp/browse/islm](http://www.jstage.jst.go.jp/browse/islm).
  43. 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* [Internet]. 2014 Mar 10 [cited 2018 May 16];29(2):757–63.
  44. Oliveira FA de, Matos AA, Matsuda SS, Buzalaf Mar, Bagnato VS, Machado MA de AM, *et al.* Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. *J Photochem Photobiol Biol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2018 May 18]; 169:35–40.
  45. Silva Tomazoni S, Frigo L, Cristina dos Reis Ferreira T, Leão Casalechi H, Teixeira S, de Almeida P, *et al.* Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats—part 2: biochemical aspects. [cited 2018 May 17]; Available from: <https://link-springer-com.ez345.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs10103-017-2299-2>.
  46. Stancker TG, Vieira SS, Serra AJ, Do Nascimento Lima R, Dos Santos Feliciano R, Silva JA, *et al.* Can photobiomodulation associated with implantation of mesenchymal adipose-derived stem cells attenuate the expression of MMPs and decrease degradation of type II collagen in an experimental model of osteoarthritis? *Lasers Med. Sci.* 2018;1–12.
  47. Alves ACA, Albertini R, dos Santos SA, Leal-Junior ECP, Santana E, Serra

- AJ, *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* [Internet]. 2013 Aug 29 [cited 2018 May 19];29(3):911–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-013-1427-x>.
48. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation HHS Public Access. *AIMS Biophys* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 16];4(3):337–61.
  49. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, landara Schettert da Silva, Filipe Abdalla dos Reis, Daniel Martins Perreira, Ricardo Dutra Aydos. Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats Influência do laser ingaalp (660nm) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. *Acta Cirúrgica Bras* [Internet]. 2010 [cited 2018 May 19];25(251).
  50. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* [Internet]. 1997 Oct 3 [cited 2018 May 19];61(19):1861–78. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320597004803?via%3Dihub>.
  51. Marcos RL, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Magdalou J, Lopes-Martins RÁB. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for achilles tendinitis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014; 29:272–85.
  52. Yun Hyun Huh, Gyuseok Lee, Keun-Bae Lee, Jeong-Tae Koh, Jang-Soo Chun, Je-Hwang Ryu. HIF-2 $\alpha$ -induced chemokines stimulate motility of fibroblast-like synoviocytes and chondrocytes into the cartilage-pannus interface in experimental rheumatoid arthritis mouse models. *Arthritis Research & Therapy* (2015) 17:302. DOI 10.1186/s13075-015-0816-x.
  53. Miguel Otero and Mary B Goldring. Review Cells of the synovium in rheumatoid arthritis Chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9:220 (doi:10.1186/ar2292).
  54. Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD. (2010) Collagen-induced arthritis. *Curr Protoc Immunol*. 15:Unit 15.5.1-25. doi: 10.1002/0471142735.im1505s89.
  55. Rodrigo Labat Marcos, Ernesto Cesar Pinto Leal-Junior, Gilles Arnold, Vincent

- Magenet, Rachid Rahouadj, Xiong Wang et.al. Low-Level Laser Therapy in Collagenase-Induced Achilles Tendinitis in Rats: Analyses of Biochemical and Biomechanical Aspects. *Journal of orthopaedic research* december 2012. DOI 10.1002/jor.22156.
56. Tomazoni SS, Frigo L, Dos Reis Ferreira TC, Casalechi HL, Teixeira S, de Almeida P et.al. Effects of Photobiomodulation Therapy and Topical Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug on Skeletal Muscle Injury Induced by Contusion in Rats-Part 1: Morphological and Functional Aspects. *Lasers Med. Sci.* 2017 Dec;32(9):2111-2120. doi: 10.1007/s10103-017-2346-z. Epub 2017 Oct 5.
57. Katsuaki Kanbe, Junji Chiba, Atsushi Nakamura. Decrease of CD68 and MMP-3 expression in synovium by treatment of adalimumab for rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2011; 14: 261–266.
58. Paulo Cesar Lock Silveira, Debora da Luz Scheffer, Viviane Glaser, Aline Pertile Remor, Ricardo Aurino Pinho, Aderbal Silva Aguiar Junior. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free radical research*, 2016 <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2016.1147649>.
59. Ingvill Fjell Naterstad, Rafael Paolo Rossi, Rodrigo Labat Marcos, Nivaldo Antonio Parizzoto, Lucio Frigo, Jón Joensen. Comparison of Photobiomodulation and Anti-Inflammatory Drugs on Tissue Repair on Collagenase-Induced Achilles Tendon Inflammation in Rats. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2017 pp. 1–9 DOI: 10.1089/pho.2017.4364.
59. M. Leigheb, M. Bosetti, A. De Consoli, *et al.* Chondral tissue engineering of the reumatoid knee with collagen matrix autologous chondrocytes implant. *Acta Biomed* 2017; Vol. 88, Supplement 4: 107-113 DOI: 10.23750/abm.v88i4-S.6801.

## 8- Anexos

### 8.1- Certificado da aprovação do comitê de experimentação animal – CEUA (UNINOVE)



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise dos efeitos da terapia com fotobiomodulação sobre a atividade de condrócitos e cartilagem articular em modelo de artrite reumatoide in vitro e in vivo", protocolada sob o CEUA nº 2063120618 (ID 000019), sob a responsabilidade de **Paulo de Tarso Camillo de Carvalho e equipe; Solange Almeida dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 12/06/2018.

We certify that the proposal "Analysis of the effects of photobiomodulation therapy on chondrocyte and articular cartilage activity in rheumatoid arthritis model in vitro and in vivo", utilizing 51 Heterogenics rats (51 males), protocol number CEUA 2063120618 (ID 000019), under the responsibility of **Paulo de Tarso Camillo de Carvalho and team; Solange Almeida dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 06/12/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2018](#) a [12/2019](#)

Área: [Ciências da Reabilitação](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 10 semanas](#) N: [51](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [180 a 300 g](#)

Local do experimento: Sala de procedimentos do biotério da Unidade Vergueiro

São Paulo, 05 de maio de 2020

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho