



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

GUILHERME HENRIQUE CARDOSO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A
ATIVIDADE DOS CONDRÓCITOS E CARTILAGEM ARTICULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE**

São Paulo, SP

2021



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

GUILHERME HENRIQUE CARDOSO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A
ATIVIDADE DOS CONDRÓCITOS E CARTILAGEM ARTICULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE**

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

Orientador: Prof. Dr^o
João Carlos Ferrari Corrêa

São Paulo, SP

2021

Fernandes, Guilherme Henrique Cardoso.

Avaliação da terapia por fotobiomodulação sobre a atividade dos condrócitos e cartilagem articular em modelo experimental de artrite reumatoide. / Guilherme Henrique Cardoso Fernandes.

62 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof. Dr. João Carlos Ferrari Corrêa.

1. Fotobiomodulação. 2. Artrite reumatoide. 3. Metaloproteínases. 4. Condrócitos. 5. Propriedades mecânicas.

I. Corrêa, João Carlos Ferrari. II. Título.

CDU 615.8

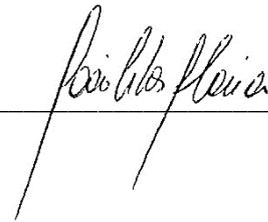
São Paulo, 16 de dezembro de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): GUILHERME HENRIQUE CARDOSO FERNANDES

Título da Tese: "Avaliação da Terapia por Fotobiomodulação sobre a Atividade dos Condrócitos e Cartilagem Articular em Modelo Experimental de Artrite Reumatoide"

Presidente: PROF. DR. JOÃO CARLOS FERRARI CORRÊA



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



Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus que está sempre presente na minha vida, iluminando, cuidando e tornando tudo possível, por toda força e sabedoria nos momentos de dor e aflição dos últimos anos e por não me deixar desanimar durante a realização deste trabalho.

Ao meu tio Paulo “in memoriam”, o qual sem seus ensinamentos e sabedoria não estaria aqui, por seus exemplos de caráter, determinação e integridade, tanto pessoal como profissional, que sigo e levo em minha vida.

A minha tia Eliete, a qual tenho muito amor e carinho, por ser essa mulher forte e inteligente que tanto admiro, por sempre estar presente em minha vida mesmo com a distância, me ensinando e apoiando em todos os momentos e decisões, com muito amor, afeto e confiança, deixo aqui minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Fernando e Leni, que com todo carinho amor e compreensão contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, mesmo distantes.

A meu irmão Fernando, minha cunhada Laila e meus sobrinhos José e João, por todo apoio e compreensão durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Ferrari Corrêa, pela oportunidade, orientação, paciência, compreensão e confiança durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho (in memoriam) e Profa. Dra. Eliete Martins Cardoso de Carvalho pela constante ajuda e preciosas contribuições, pelo tempo e paciência dispensados, sem o apoio de vocês eu não concluiria essa jornada.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Labat pelo apoio e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho e por ter aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cid André Fidelis de Paula Gomes, pelas contribuições e por ter aceitado participar da avaliação deste trabalho.

A Profa. Dra. Solange dos Santos, pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu chefe Leocir Macagnam, diretor de Produção e Logística na Topigs Norsvin do Brasil, pela compreensão e apoio que foram de suma importância para a conclusão deste trabalho.

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

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

Deixo aqui expressa minha gratidão.

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* e *in vitro* utilizando a terapia por fotobiomodulação têm demonstrado efeitos positivos sobre a modulação de fatores que causam a progressão da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da terapia por fotobiomodulação no tratamento da Artrite Reumatoide (AR) induzida *in vitro* e *in vivo*, em relação aos aspectos celulares, bioquímicos e funcionais. A Metodologia aplicada na etapa *in vitro* recuperou condrócitos derivados de cartilagem com Artrite Reumatoide induzida. Os condrócitos foram cultivados em placas de 96 poços, considerados condrócitos saudáveis (CD) ou derivados de cartilagens com AR induzida, não tratada (NT) ou tratada com PBM em diferentes parâmetros, comprimento de onda 810nm, 2J de energia e 35, 50, 100mW de potência e foi avaliada a proliferação celular. Na etapa *in vivo* foram utilizados 25 ratos machos Wistar, distribuídos em grupos, CTL (controle), AR (Artrite Reumatoide) e AR + PBM. Para a indução da AR, foi utilizado 3 injeções da solução (CIA) indutora da lesão nos dias 0, 7 e após 21 dias da última indução. Para os grupos que receberam tratamento por PBM (808nm; 2J; 100mW) a irradiação iniciou imediatamente após a última indução. Foi avaliada a força (Fmax) e deformação máxima (Dmax) suportada pela cartilagem até o momento da ruptura. E realizada a quantificação da expressão gênica das Mês 2, 9 e 13. Os resultados da avaliação da proliferação celular, demonstrou que o grupo NT apresentou redução da proliferação celular após 48h. Os grupos irradiados com as potências de 35mW e 100mW apresentaram aumento da proliferação celular. Foi observado aumento da proliferação dos condrócitos com AR tratados com PBM e redução da Fmax e Dmax nos grupos com AR. A PBM reduziu as alterações biomecânicas provocadas pela AR e a expressão das MMPs 2,9 e 13 evitando a progressão da doença. Conclusão: A PBM promoveu melhora nas características funcionais e bioquímica, reduzindo o impacto na resistência cartilagem e redução da expressão de MMPs. Os comprimentos de onda 810nm na energia de 2J foram eficientes no aumento da proliferação celular e manutenção da viabilidade. Sugerindo ser uma importante terapia no tratamento da artrite reumatoide com ausência de efeitos colaterais conhecidos.

Palavras Chaves: Fotobiomodulação. Artrite Reumatoide.
Metaloproteínases. Condrócitos. Propriedades Mecânicas.

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic inflammatory, autoimmune, systemic and progressive disease that leads to irreversible destruction of cartilage and bone. In vivo and in vitro experimental studies using photobiomodulation therapy have shown positive effects on the modulation of factors that cause disease progression. The objective of this work was to evaluate the effects of photobiomodulation therapy in the treatment of induced Rheumatoid Arthritis (RA) in vitro and in vivo, in relation to cellular, biochemical and functional aspects. Methodology applied in the in vitro step recovered cartilage-derived chondrocytes with induced Rheumatoid Arthritis. Chondrocytes were cultured in 96-well plates, considered healthy chondrocytes (CD) or derived from cartilages with induced RA, untreated (NT) or treated with PBM at different parameters, wavelength 810nm, 2J energy and 35, 50, 100mW of power and cell proliferation was evaluated. In the in vivo step, 25 male Wistar rats were used, divided into groups, CTL (control), RA (Rheumatoid Arthritis) and RA + PBM. For the induction of RA, 3 injections of the lesion-inducing solution (CIA) were used on days 0, 7 and 21 days after the last induction. For groups that received PBM treatment (808nm; 2J; 100mW) irradiation started immediately after the last induction. The strength (Fmax) and maximum deformation (Dmax) supported by the cartilage until the moment of rupture were evaluated. The quantification of the gene expression of MMPs 2, 9 and 13 is performed. Results: The results of the evaluation of cell proliferation showed that the NT group showed a reduction in cell proliferation after 48 hours. The groups irradiated with powers of 35mW and 100mW showed increased cell proliferation. Increased proliferation of RA chondrocytes treated with PBM and reduced Fmax and Dmax were observed in RA groups. PBM reduced the biomechanical changes caused by RA and the expression of MMPs 2,9 and 13, preventing disease progression. Conclusion: PBM promoted an improvement in the functional and biochemical characteristics, reducing the impact on cartilage resistance and reducing the expression of MMPs. The 810nm wavelengths at 2J energy were efficient in increasing cell proliferation and maintaining viability. Suggesting that it is an important therapy in the treatment of rheumatoid arthritis with no known side effects.

Key Words: Photobiomodulation. Rheumatoid Arthritis.
Metalloproteinases. Chondrocytes. Mechanical Properties.

Sumário

1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1	Artrite Reumatoide	13
1.2	Cartilagem Articular e Condrócitos	15
1.3	Mediadores inflamatórios na AR.....	16
1.4	Terapia por Fotobiomodulação	18
1.4.1	Características gerais	18
1.4.2	Terapia por fotobiomodulação na AR	21
1.4.3	Terapia por fotobiomodulação nos moduladores inflamatórios.....	23
2.	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivo Específico	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Geral.....	27
3.1.1	Animais de experimentação.....	27
3.1.2	Modelo de Artrite Induzida por Colágeno (CIA)	27
3.1.3	Evolução da Artrite Reumatoide	28
3.1.4	Equipamentos utilizados para terapia por fotobiomodulação.....	29
3.2	ETAPA IN VITRO	29
3.2.1	Experimentação <i>in vitro</i>	29
3.2.2	Indução da artrite reumatoide (AR) etapa <i>in vitro</i>	30
3.2.3	Evolução da artrite reumatoide modelo <i>in vitro</i>	30
3.2.4	Extração e cultivo dos condrócitos	30
3.2.5	Protocolo experimental para os ensaios <i>in vitro</i>	32
3.2.6	Tratamento por terapia de fotobiomodulação <i>in vitro</i>	32

3.2.7	Ensaio de descolamento celular	33
3.3	ETAPA <i>IN VIVO</i>	34
3.3.1	Experimentação <i>in vivo</i>	34
3.3.2	Indução da artrite reumatoide (AR) etapa <i>in vivo</i>	34
3.3.3	Evolução da artrite reumatoide etapa <i>in vivo</i>	35
3.3.4	Tratamento por terapia de fotobiomodulação <i>in vivo</i>	35
3.3.5	Eutanásia.....	35
3.3.6	Análise biomecânica.....	35
3.3.7	Expressão de transcritos gênicos para MMP2, MMP9 e MMP13	36
3.3.8	Análise estatística.....	37
4.	RESULTADOS	38
4.1	RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	38
4.1.1	Avaliação da proliferação celular	38
4.2	RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	39
4.2.1	Propriedades mecânicas	39
4.2.2	Expressão de transcritos gênicos (PCR)	41
5.	DISCUSSÃO.....	45
6.	CONCLUSÃO	49
7.	REFERÊNCIAS	50

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1. Score clínico de sinais artríticos.....	28
Tabela 1. Parâmetros dos lasers utilizados.....	29

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma do estudo.....	27
Figura 2. Curso temporal da Indução da Artrite Reumatoide e recuperação de condrócitos para experimentação “in vitro”	30
Figura 3. Células de Condrócitos.....	31
Figura 4. Organização dos condrócitos na placa de 96 poços	33
Figura 5: Fluxograma do estudo <i>in vivo</i>	34
Figura 6. Gráfico de proliferação de condrócitos	38
Figura 7. Gráfico de F _{máx} Grupos 7 e 14 dias NT e Tratamento.....	39
Figura 8. Gráfico de D _{máx} Grupos 7 e 14 dias NT e Tratamento.....	40
Figura 9. Gráfico da relação entre F _{max} e D _{max} 14 dias.....	41
Figura 10. Gráfico da expressão gênica relativa de MMP2.....	42
Figura 11. Gráfico da expressão gênica relativa de MMP9.....	43
Figura 12. Gráfico da expressão gênica relativa de MMP13.....	44

Tabela de Abreviaturas

AR	Artrite Reumatoide
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
MMPs	Metaloproteínases
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
IL	Interleucina
CA	Cartilagem Articular
MEC	Matriz Extra Celular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TIMPs	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
PBM	Terapia por fotobiomodulação
SOD	Superóxido Dismutase
GPx	Glutaiona Peroxidase
CAT	Catalase
CAF	Adjuvante Completo de Freund
PGE2	Prostaglandina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
mW	Miliwatts
nm	Nanômetros
J	Joules
Fmax	Força Máxima
Dmax	Deformação Máxima
CD	Condrócitos
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
FBS	Soro Fetal Bovino
DMEM	Meio de Cultura Dulbecco Modificado por EAGLE
DEPC	Dietilpirocarbonato
NT	Não Tratado
CTL	Controle

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR), é uma doença autoimune de etiologia e patogênese pouco esclarecida, atinge cerca de 0,5 a 1% da população mundial, é caracterizada por inflamação crônica recidivante. A destruição óssea e a degradação da cartilagem são os dois principais componentes do dano articular característico da AR, é altamente prevalente, causando impacto na qualidade de vida do indivíduo, na vida profissional, e prejuízo econômico para sociedade ¹⁻³. Embora o aparecimento seja mais frequente entre os 40 e 50 anos de idade a AR pode ocorrer em qualquer idade ⁴.

É uma doença predominante em mulheres, os indivíduos com AR apresentam manifestações como, rigidez matinal, edema das articulações, fadiga e perda de peso, podendo também resultar em incapacidade funcional, essa variedade de sintomas causa distúrbios do sono para essa população. Inicialmente acomete uma articulação, porém com a progressão da doença várias articulações podem ser atingidas ^{2,5-7}.

Alguns fatores tais como ambientais, suscetibilidade genética, imunológicos, nutricionais, estresse oxidativo, agentes hormonais, e doenças infecciosas contribuem para a ocorrência da doença. O sistema imune é ativado, gerando processos altamente complexos e coordenados, perpetuando assim uma resposta autoimune ^{8,9}.

Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) também são fatores de risco e aceleradores de doenças autoimunes, visto que existe uma estreita relação entre o estresse oxidativo e essas doenças. A produção de EROs aumenta cinco vezes em pacientes com AR quando comparados à indivíduos saudáveis ^{10,11}. Os radicais livres são mensageiros secundários em resposta imunológica celular em AR. A exposição de células T pode perpetuar a resposta imune anormal. Os radicais livres podem degradar diretamente a cartilagem articular, atacando os proteoglicanos e inibindo a sua síntese ¹²⁻¹⁴.

Pode-se afirmar que o principal sítio inflamatório primário na AR é a membrana sinovial, mostrando hiperplasia celular. Em condições saudáveis, a membrana sinovial é formada por poucas camadas de células de sinoviócitos semelhantes a macrófagos (= células do tipo A) e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (= células do tipo B) ^{6,15}.

Sabe-se que a face interna da membrana sinovial é delicada e está em contato com a cavidade intra-articular, na AR ocorre a invasão de uma grande quantidade de células imunes nessa estrutura, levando à proliferação celular, neovascularização e formação de folículos linfoides germinativos. Muitas citocinas responsáveis por regular a comunicação celular são expressas na membrana sinovial, estando diretamente envolvidas em processos imunológicos nos casos de AR ⁶. Mudanças na função das células T e B e uma produção anormal de citocinas e anticorpos foram reconhecidas como processos presentes na 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 ^{6,16}.

Os diferentes fenótipos celulares 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 ^{17,18}.

Além da proliferação de sinoviócitos, a articulação, incluindo o líquido sinovial, exibe intensa inflamação que resulta da interação de células B, células T, macrófagos e neutrófilos, todos operando localmente para produzir citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios ¹⁶. Muitas citocinas estão envolvidas no processo destrutivo da AR e são apontadas como as responsáveis em perpetuar

a inflamação crônica levando a um desequilíbrio entre a ação das citocinas pró-inflamatórias sobre as anti-inflamatórias ^{19,20}.

Acredita-se que o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1) sejam as citocinas responsáveis pela inflamação e dano articular que ocorre na AR. O TNF- α desempenha um papel principal na cascata de citocinas na AR, controlando a produção de IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e IL-8. Em contrapartida a IL-1 não induz a expressão de TNF- α , embora afete a liberação de IL-6 e IL-8. Ambas sintetizam e liberam metaloproteinases, prostaglandinas e óxido nítrico, e medeiam a destruição da cartilagem e osso, devido aos altos níveis dessas citocinas encontradas no fluido sinovial ²⁰.

1.2 Cartilagem Articular e Condrócitos

A cartilagem articular (CA) é um tecido bem organizado, funcional e desempenha importante papel na locomoção humana, é considerada como estrutura anatômica única, é avascularizada, possui matriz extracelular (MEC) densa e regeneração limitada ^{21,22}. As células presentes na CA são os condrocitos, que representam 1% do volume da matriz, e são responsáveis pela produção da MEC, incluindo colágeno tipo II e agrecano ^{23,24}.

Possui propriedades biomecânicas, combinando rigidez à compressão, e resistência ao cisalhamento, a carga é distribuída mantendo baixa fricção e propriedades de desgaste ^{21,25}.

Esse tecido quando está saudável é capaz de suportar as cargas impostas ao longo da vida ²⁵.

Porém no processo de envelhecimento a cartilagem fica mais fina e perde progressivamente sua integridade física e mecânica em indivíduos mais velhos ²⁶. A degradação da cartilagem é refletida pelo estreitamento do espaço articular ³.

Um dos primeiros sinais de degradação da CA é o amolecimento e rugosidade do tecido, isso acontece devido a ruptura da rede de colágeno. O colágeno II junto com o proteoglicano agrecano são os dois principais alvos da

degradação^{27,28}. Lesões da cartilagem articular, sejam traumáticas ou de degeneração, geralmente resultam na formação de fibrocartilagem mecanicamente inferior, devido à fraca resposta de cicatrização intrínseca do tecido. Quando o colágeno II é destruído, ocorre a substituição desse colágeno por uma fibrocartilagem de colágeno tipo I que possui propriedades funcionais diferentes ao do tipo II^{28,29}.

Nota-se que uma das principais características da AR é a degradação excessiva que leva a perda progressiva de proteínas da matriz e integridade articular, uma vez destruída a cartilagem não pode ser reparada^{28,30}. Os sinoviócitos contribuem para a produção local de citocinas, que são as moléculas mediadoras de inflamação e enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular. A sinóvia na AR se transforma em um tecido invasivo hiperplásico repleto de células imunocompetentes³¹.

Enquanto os condrócitos são as células arredondadas localizadas nas lacunas da matriz, responsáveis pela síntese, renovação e estabilidade da MEC, originam de células tronco mesenquimais por meio de uma série de vias de diferenciação³².

Os condrócitos anabolizam e catabolizam macromoléculas da MEC enquanto a matriz, por sua vez, mantém um estado de equilíbrio dinâmico entre o ambiente celular e a estrutura da cartilagem³².

Portanto para que ocorra a manutenção da matriz cartilaginosa é fundamental a sobrevivência dos condrócitos, o número reduzido dessas células leva a degeneração da CA³³.

1.3 Mediadores inflamatórios na AR

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, 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 articulações³⁴⁻³⁶.

Em lesões articulares como a AR, tanto em fases de agudização como nas fases de remissão, os neutrófilos também parecem estar envolvidos na perpetuação da inflamação, modulando o tônus vascular através da vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, 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^{36,37}.

Na AR, os sinoviócitos e macrófagos produzem citocinas que são responsáveis pelos danos nas articulações. Elas inibem a síntese de proteoglicanos e colágeno e aumentam sua degradação⁴.

Também ativam metaloproteinases (MMPs) e colagenases, que são enzimas proteolíticas que levam a destruição da cartilagem. As MMPs são secretadas por fibroblastos sinoviais e condrócitos. São células especializadas que residem nas superfícies das articulações e são os principais componentes da via de destruição do tecido da cartilagem. A atividade das MMPs é regulada para baixo e inibida pelos inibidores teciduais da metaloproteinase (TIMPs). As MMPs atuam como mediadores principais da reabsorção de cartilagem, osso, líquido sinovial e tecido mole adjacente, que ocorre como parte da destruição patológica do tecido articular, a MMP3, é apontada como a principal enzima produzida pelos sinoviócitos, seu nível é significativamente mais alto nos fluidos sinoviais de AR^{2,4,38}.

Estima-se que as citocinas pró-inflamatórias, como in IL-1 β , IL-6 e TNF- α , estimulam as manifestações articulares da AR por meio do aumento da infiltração de células inflamatórias, particularmente células T, células B e macrófagos, e erosão óssea^{4,8}.

Com a ativação de células T, o resultado é a produção de autoanticorpos e liberação de TNF- α e IL-6; em conseqüência, ocorre a manifestação articular

e extra articular da AR. As citocinas quimiotáticas, denominadas quimiocinas, que atraem linfócitos, monócitos e neutrófilos, possuem atividade quimiotática e desempenham um papel significativo na destruição do tecido e na sinovite ^{4,38}.

Para Zhou, R. *et. al.* ²³ existem evidências indicando que a IL-6 apresenta níveis elevados no líquido sinovial em indivíduos com AR, e esse aumento, conseqüentemente leva ao aumento de recrutamento de células inflamatórias para os tecidos, agravando a destruição articular. E 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.

E segundo Hsieh, *et. al.* ³⁸ o TNF- α é o principal regulador dominante das outras citocinas pró-inflamatórias.

De acordo com Smolen, *et. al.* ⁹ as citocinas e quimiocinas levam à indução e agravamento da resposta inflamatória quando células endoteliais são ativadas e células imunes atraídas para se acumularem no compartimento sinovial.

1.4 Terapia por Fotobiomodulação

1.4.1 Características gerais

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 1957, por dois cientistas americanos, Charles Townes e Arthur Achawlow, e em 1960, com a construção do primeiro emissor de laser a Rubi por Theodore Maiman ³⁹. A luz do raio laser apresenta propriedades específicas que se diferenciam da luz incandescente, é uma radiação eletromagnética ³⁹.

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 ⁴⁰⁻⁴².

O Laser (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) é composto por uma cavidade óptica ressonante, diferentes tipos de meios ativos, como sólidos, líquidos ou gasosos, nos quais ocorrem processos de geração de luz por meio da passagem de uma corrente elétrica ⁴³.

Os fótons dos lasers de baixa intensidade penetram profundamente no corpo através da pele, músculos, tendões, ligamentos, nervos e até mesmo ossos, identificam e atingem áreas dolorosas e danificados ⁴⁴.

A interação da luz com o tecido depende dos parâmetros como comprimento de onda e dose, também das propriedades ópticas do tecido ⁴³. A ação sobre os tecidos é atribuída à capacidade de energia da luz ser absorvida pelas células ⁴⁵.

Diversos estudos ^{1,39,41,43,46,47} relataram os efeitos bioestimulantes ao nível celular da terapia por fotobiomodulação. 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. 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.

Sabe-se que, maioria dos cromóforos celulares estão localizados na mitocôndria, portanto, a interação luz-célula é essencialmente interação luz-mitocôndria. A absorção de fótons modifica a configuração molecular dos fotorreceptores, a alteração é resultante de suas propriedades com a possível consequência de uma cascata de sinalização. A luz tem a capacidade de alterar o metabolismo celular, devido a absorção pela mitocôndria e citocromo C oxidase ^{48,49}.

Quando as células-alvo absorvem os fótons, ocorre uma cascata de eventos bioquímicos, a energia é incorporada em uma molécula com a finalidade de aumentar a energia cinética, ativa e desativa enzimas, ou pode alterar as propriedades físicas ou químicas das macromoléculas principais. Com isso a proliferação celular é melhorada. Acontece também uma cascata de efeitos

metabólicos com mudanças fisiológicas que resultam em melhor reparo do tecido, resolução mais rápida da resposta inflamatória e redução da dor ^{46,50}.

Acredita-se que efeitos derivados de reações primárias são amplificados e transmitidos para outras partes da célula, gerando fisiológicos, como alterações na permeabilidade da membrana celular levando a mudanças intracelular nos níveis de cálcio, aumento do metabolismo celular, síntese de DNA e RNA, proliferação de fibroblastos, ativação de linfócitos T, macrófagos e mastócitos, aumento da síntese de endorfinas e diminuição da bradicinina ⁴³.

Outros efeitos importantes da terapia por fotobiomodulação é a capacidade de vasodilatação, fator relevante para a inflamação articular, pois aumenta o suporte local de oxigênio e contribui para a migração de células imunes, possui propriedades reparadoras, é considerada uma terapia segura para várias doenças e lesões ⁵¹⁻⁵³.

A radiação de lasers de baixa intensidade 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 ⁵⁴:

1. O mecanismo fotobiológico de ação via ativação da cadeia respiratória, onde os fotorreceptores 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, conseqüentemente, 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.

1.4.2 Terapia por fotobiomodulação na AR

A terapia por fotobiomodulação (PBM) tem inúmeros benefícios, possui capacidade de aumentar a microcirculação, melhorar o metabolismo tecidual, ativação da angiogênese, regeneração de nervos ^{51,52,55}.

Possui efeitos favoráveis na modulação do processo inflamatório, eficiência na redução da dor, estímulo na geração de colágeno, resultados relevantes na AR ⁵¹.

Aproximadamente duas décadas atrás a terapia com fotobiomodulação foi introduzida como um tratamento não invasivo alternativo para a AR. De acordo com os parâmetros utilizados é possível reduzir a dor, inflamação, bem como alcançar a melhora funcional em articulações reumatoides ^{38,56}.

Muitos estudos demonstraram ^{1,54,56-59} resultados promissores com o uso da PBM em vários eventos da AR, foi possível comprovar a capacidade dessa terapia em diminuir o estresse oxidativo, modular as citocinas inflamatórias e MMPs.

Lin Zhang *et.al* ⁶⁰ realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar os efeitos do laser diodo Ga-Al-As com comprimento de onda de 830nm, na expressão gênica do receptor de quimiocinas CXCR4 e seu ligante CXCL12, bem como sua expressão proteica na membrana sinovial das articulações. Para isso os pesquisadores desenvolveram AR em animais utilizando o modelo CIA. Os resultados obtidos pelo grupo foi, 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 com a terapia por fotobiomodulação na AR.

No estudo de Carlos F. P., *et. al.* ⁵⁹ os autores adotaram protocolo de inflamação articular aguda, desenvolvida com o uso da substância zymosan dissolvida em solução salina. O tratamento dos animais com PBM teve início imediatamente após a indução na 1ª e 2ª hora, o comprimento de onda utilizado foi 660nm. O tratamento com PBM foi comparado com o uso de dexametasona. Foi analisado 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.

Alves *et.al*⁵⁴ concluíram que a PBM é capaz de modular resposta inflamatória em modelo experimental AR induzida por colágeno, os efeitos do laser de baixa intensidade, com comprimento de onda de 780nm é eficaz nos estágios iniciais e tardios da doença.

Em outra pesquisa realizada por Dos Santos *et. al.*¹ o modelo de AR foi desenvolvido com colágeno II dissolvido em ácido acético e emulsionado com Adjuvant Completo de Freund, os animais receberam 2 injeções intradérmica + sistêmica com a solução aplicadas na cauda, e uma terceira injeção aplicada diretamente na articulação do joelho. Foi verificado que a terapia de fotobiomodulação nas doses de 2 e 4 joules e comprimento de onda de 808nm, aplicado em dias alternados, reduz a peroxidação lipídica, e aumenta a expressão das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Catalase (CAT) na AR.

Estudos de Neves, M. *et. al.*⁶¹ utilizaram no estudo uma amostra composta por 128 ratos. O objetivo foi investigar se o tratamento com PBM e exercícios físicos poderiam modular o processo inflamatório e avaliar se o tratamento iria refletir no retorno da funcionalidade periférica em um modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos. Foram realizadas avaliações de incapacidade articular e nocicepção. A laserterapia aumentou o limiar nociceptivo do período inflamatório crônico, teve efeito positivo na modulação do processo inflamatório, reduzindo a migração de leucócitos, além de auxiliar no retorno da funcionalidade periférica por reduzir a incapacidade articular em modelo de artrite reumatoide induzida por CFA em ratos.

Issa JPM *et. al.*⁶² investigaram os efeitos da PBM, com três comprimentos de onda, (660, 808 e 905nm) em modelos de artrite aguda e crônica. Os

biomarcadores clínicos, histológicos e anatômicos previamente associado à inflamação e o desenvolvimento de AR foram avaliados pelo grupo, que induziram em camundongos artrite crônica com BSA e colágeno bovino tipo II, e para artrite aguda foi utilizado Zymosan dissolvido em solução salina. O tratamento com PBM teve a duração total de 4 semanas. Baseado nas análises estatísticas, histológicas, clínicas e imunohistoquímicas, os autores concluíram que PBM pode promover efeitos anti-inflamatório e analgésicos na AR aguda e crônica, eliminando sinais clínicos e controlando a reabsorção articular, porém é dependente do número de aplicações, comprimento de onda, formas de irradiação usadas, tipo de tecido e condições de tratamento, o melhor resultado foi nos grupos em que o laser foi aplicado em dias alternados.

Com objetivo de avaliar o perfil de citocinas e células imunes após a PBM em modelo de artrite, Dos Anjos *et.al*⁶³ desenvolveram artrite em camundongos C57BL. Foram quantificadas as citocinas por ELISA e os níveis relativos de citocinas de mRNA por qRT-PCR realizadas com tornozelo artrítico; macrófagos, células dendríticas, células natural killer, linfócitos CD4 +, CD8 +, Treg e proteínas coestimuladoras e ainda no linfonodo proximal por citometria de fluxo. Os dados revelaram diminuição em todos os níveis de citocinas após a PBM e alteração nos níveis relativos de mRNA, dependendo da densidade de energia utilizada. A PBM aumentou as células imunes analisadas no linfonodo, bem como a expressão de proteínas coestimuladoras em macrófagos e células dendríticas. Treg TCD4 + e TCD8.

1.4.3 Terapia por fotobiomodulação nos moduladores inflamatórios

Encontramos na literatura estudos clínicos e experimentais que apresentam efeitos benéficos do uso da PBM no alívio de sintomas como rigidez matinal e dor em pacientes com AR. A PBM é uma terapia não invasiva, possui propriedades biofísicas e biológicas, que são eficazes na redução do processo inflamatório^{61,63}.

É sugerido por Dos Anjos *et.al*⁶³ que os efeitos positivos da PBM na AR estão relacionados à diminuição de prostaglandina (PGE2), número de células inflamatórias, exsudato de proteína, hemorragia espinhal, hiperemia e necrose.

Observa-se através do uso dessa terapia as alterações nos níveis relativos de mRNA, de citocinas pró e anti-inflamatórias, na redução de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a PBM acelera a resolução por meio da fotobioestimulação de células imunes⁶³. A inibição de ciclooxygenase também é relatada como justificativa para modulação da inflamação pelo uso da PBM⁶².

A PBM ainda é eficaz na modulação de outros mediadores inflamatórios, como CINC-1, VEGF, MMP-3, MMP-9 e TIMP-2, bem como no aumento da produção de colágeno durante as diferentes fases do processo de regeneração tecidual, favorece a fase de proliferação e remodelação⁶⁴. Isso acontece em tecidos como, cartilagem, músculo, tendões, ossos e pele⁶⁵.

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 β e TNF- α) pode aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10⁶⁶.

Stancker *et.al*⁵⁵ pesquisaram a ação da PBM sozinha e/ou associada a injeção intra-articular de células tronco mesenquimais, sobre o processo inflamatório em amostras in vivo e in vitro, realizaram análises de expressão gênica, expressão proteica de metaloproteinases 1, 2 e 13, Timps 1 e 2, Colágeno II, os grupos tratados com PBM sozinha ou em combinação de injeção intra-articular de células tronco mesenquimais, conseguiu prevenir modificações degenerativas de colágeno II e modulou o processo inflamatórios pela diminuição de citocinas e MMPs.

Percebe-se através dos estudos que, independentemente da doença e do tecido a ser tratado, o uso da terapia com fotobiomodulação alcança resultados positivos e muito promissores, os resultados são evidentes principalmente

quando se trata de modulação do processo inflamatório, reparação tecidual e na diminuição de danos articulares. Os autores Hamblin ⁶⁷, Alves *et.al* ⁶⁸ e Silva Tomazoni *et.al* ⁶⁹, avaliaram a capacidade da PBM em modular o processo inflamatório em doenças e tecidos diferentes, os pesquisadores encontraram resultados semelhantes em relação ao uso do laser de baixa intensidade no tratamento da inflamação, os resultados foram positivos nos estudos.

Encontra-se na literatura diversos achados ^{66,69} em situações clínicas, comprovando a eficácia da terapia com fotobiomodulação em modular o processo inflamatório, reduzir os danos articulares, é um tratamento de baixo custo. Considerando os tratamentos disponíveis atualmente da AR, justifica-se, a proposta de um estudo sobre a 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 ^{55,68}, 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. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da terapia por fotobiomodulação em relação a proliferação celular e propriedades mecânicas da cartilagem de joelho em modelo experimental de Artrite Reumatoide induzida por Colágeno Tipo II.

2.2 Objetivo Específico

- I. Avaliar os efeitos da terapia por fotobiomodulação considerando diferentes potências (35, 50 e 100mW) e comprimento de onda de 810nm, energia de 2J na proliferação de condrócitos oriundos de com AR induzida.
- II. Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação considerando o comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW e 2J de energia sobre a força máxima (Fmax) e a deformação máxima (Dmax) suportada no momento da ruptura em cartilagens de animais com AR induzida após 07 e 14 dias da última indução;
- III. Verificar a relação da força máxima (Fmax) e a deformação máxima (Dmax) em cartilagens de animais com AR induzida e tratados com terapia por fotobiomodulação após 14 da última indução;
- IV. Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação considerando o comprimento de onda de 808nm, potência de 100mW e 2J de energia sobre os níveis de expressão gênica por PCR das metaloproteinases 2, 9 e 13, em cartilagens de animais com artrite reumatoide induzida após 14 dias da última indução.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Geral

3.1.1 Animais de experimentação

Para o estudo (in vivo e in vitro) foram utilizados o total de 37 ratos 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*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (AN 2063120618) 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).

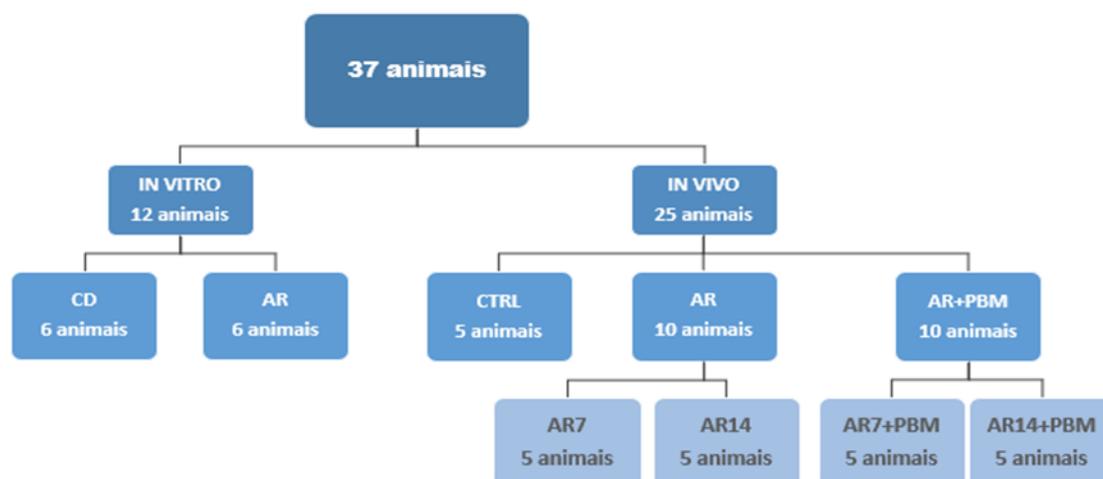


Figura 1. Fluxograma do estudo.

3.1.2 Modelo de Artrite Induzida por Colágeno (CIA)

O modelo CIA foi gerado baseado em estudos anteriores⁷⁰. 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 e seis animais foram

anestesiados antes de cada infiltração da substância indutora da lesão, com uma mistura de Quetamina (7%) e Xilazina (0,3%), de 2:1 utilizando-se 0,1 ml/100gr por via intraperitoneal. Depois de anestesiados os animais foram posicionados em decúbito ventral, cada animal foi imunizado por injeção sistêmica + 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 da substância indutora da lesão. Após vinte e um dias da segunda indução, foi realizada a última indução, a aplicação foi administrada na articulação, com 20 µl da solução, em ambos os joelhos de cada animal.

3.1.3 Evolução da Artrite Reumatoide

Os sinais artríticos das patas foram caracterizados por edema e eritema, a avaliação foi diária 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 ≥ 2 foi considerado positivo para AR ^{71,72}.

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 à pata.
3 = eritema e edema moderado que se estende desde o tornozelo até a articulação metatársica.
4 = eritema e edema severo envolvendo o tornozelo, patas e dedos.

Quadro 1. Score clínico de sinais artríticos.

3.1.4 Equipamentos utilizados para terapia por fotobiomodulação.

Foram utilizados dois equipamentos para a terapia por fotobiomodulação no estudo, sendo eles, o Laser da marca DMC®, modelo Thera Lase, meio ativo de AsGaAl, nas potências 35, 50 e 100mW e comprimento de onda 810nm no experimento *in vitro* e o Laser da marca DMC® modelo Photon Lase III, meio ativo de AsGaAl, potência de 100mW e comprimento de onda de 808 nm no experimento *in vivo*.

	Thera	Photon
Comprimento de onda (nm)	810	808
Meio ativo	AsGaAl	AsGaAl
Potência média (mW)	35 - 100	100
Feixe de área (cm ²)	0.028	0.028
Densidade de potência (W/cm ²)	1.78	1.78
Energia em joules (J)	2	2
Densidade de energia (J/cm ²)	71.4	71.4
Tempo por ponto (segundos)	67 - 20	20

Tabela 1. Parâmetros dos lasers utilizados.

3.2 ETAPA *IN VITRO*

3.2.1 Experimentação *in vitro*

Foram utilizados doze ratos Wistar machos divididos em dois grupos, (CD) condrócitos derivados de cartilagem saudáveis e (AR) condrócitos derivados de cartilagem com artrite reumatoide, para doação de cartilagem e extração dos condrócitos. As células foram obtidas a partir das cartilagens dos joelhos direito e esquerdo.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo Condrócitos Saudáveis (CD): Composto por 06 animais. Não foi realizado nenhum procedimento.
- Grupo Artrite Reumatoide (AR): Composto por 06 animais. Realização da indução da Artrite Reumatoide.

3.2.2 Indução da artrite reumatoide (AR) etapa *in vitro*

A indução da Artrite Reumatoide foi descrita no item 3.1.2. Após 14 dias da última indução, os animais foram eutanasiados com hiperdose de anestésico associado (Cloridrato de Quetamina e Xilazina) e as cartilagens dos joelhos foram dissecadas e removidas para cultivo celular.

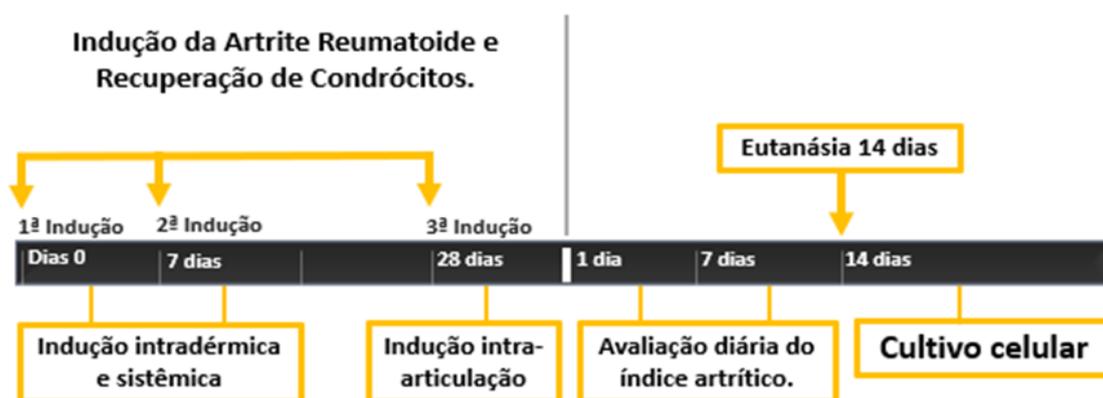


Figura 2. Curso temporal da Indução da Artrite Reumatoide e recuperação de condrocitos para experimentação “*in vitro*”.

3.2.3 Evolução da artrite reumatoide modelo *in vitro*

A avaliação dos sinais artríticos das patas foi descrita no item 3.1.3.

Score clínico ≥ 2 foi considerado positivo para AR ^{71,72}.

3.2.4 Extração e cultivo dos condrocitos

As extrações dos condrocitos das cartilagens dos animais com Artrite Reumatoide (AR) foram realizadas ao final da fase da indução, conforme identificado na Fig. 3, utilizando protocolos previamente estabelecidos por Gosset *et.al.* ⁷³ e Chen *et.al.* ⁷⁴. Os joelhos foram abertos com bisturi estéril e

auxílio de pinças. Foi realizada a dissecação do osso e a cartilagem subjacente foi removida, lavada com PBS (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; NaHPO₄ 8mM; KH₂PO 1,4mM; pH 7,4) para remover o sangue residual e transferida para placa de petri estéril preenchida com 25 mL de PBS. O PBS foi removido da placa de petri e adicionado 50 mL de tripsina 0,25% e colocada na incubadora, durante 45 minutos a 37 °C sob agitação. A tripsina foi descartada e foi adicionado 50 mL de meio contendo soro (10% de FBS) e a placa de Petri foi submetida a cinco minutos de incubação. O meio de cultura foi descartado e 40 mL de meio fresco (com FBS) adicionado. Foi preparada uma solução de collagenase: dissolvido 25 mg de collagenase em 10 mL de PBS. O meio de cultura da placa foi descartado e a solução de collagenase adicionada com 100 µL de penicilina/estreptomicina. A placa com as cartilagens foi tampada e permaneceu na incubadora durante a noite a 37 °C. A solução com a cartilagem digerida foi transferida da placa de petri para um tubo falcon e centrifugada a 1.500 RPM (RCF= 367,92 g) por oito minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 50 mL de solução tampão de lavagem. A contagem de células foi realizada com *trypan blue* e determinou-se o número de células de acordo com a seção. Em cada frasco T17 as células foram semeadas (5×10^6 células) e adicionados 25 mL de meio DMEM (Meio de cultura Dulbecco modificado por EAGLE) com FBS e penicilina/estreptomicina (100µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). O meio de cultivo foi trocado três vezes por semana.

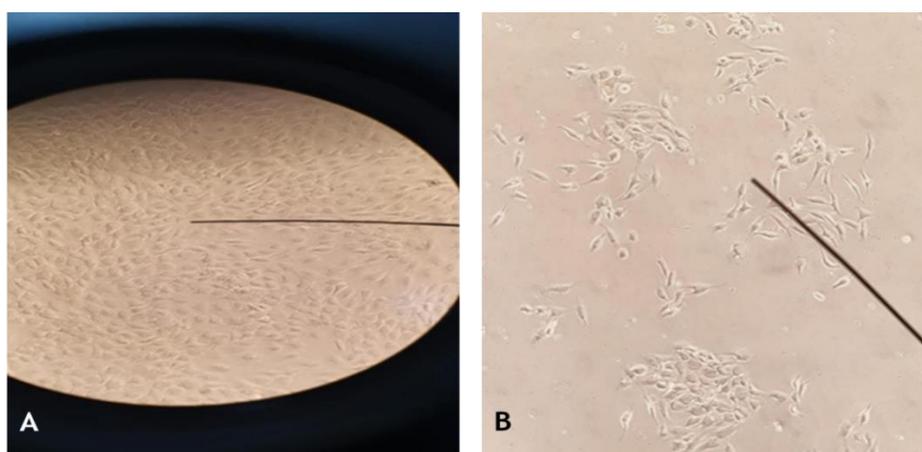


Figura 3. Células de Condrócitos. (A - Condrócitos em aumento de 40X e B – Condrócitos em aumento de 100X).

3.2.5 Protocolo experimental para os ensaios *in vitro*

O subcultivo de condrócitos foi realizado quando a monocamada dessas células atingiu 90% da etapa de subconfluência. A partir desta etapa, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com PBS e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C para o descolamento dos condrócitos. As garrafas foram lavadas com meio DMEM inativação enzimática. A seguir, toda solução foi recuperada em tubo falcon e centrifugadas a 1200 rpm a 20°C por 5 minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil). Foi realizada nova contagem das células em câmara de Neubauer, coradas com azul de Trypan (0,4%) e os ensaios de cultura com viabilidade maior que 95% foram utilizadas no experimento. As células viáveis foram transferidas para placa de 96 poços, 1x10⁴ células/poço e mantidas em uma estufa por 24 horas, com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C, para adesão ao meio. Os poços foram marcados para diferenciar os grupos. Após o término desta etapa, as células foram irradiadas com Laser de Baixa intensidade, nos parâmetros indicados na Tabela 1 e descrito no item 3.1.4.

3.2.6 Tratamento por terapia de fotobiomodulação *in vitro*

Os condrócitos foram incluídos em placas de 96 poços, na disposição indicada na Figura 4. Foi utilizado o Laser da marca DMC®, modelo Thera Lase, meio ativo de AsGaAl, nas potências 35, 50 e 100mW, nos respectivos tempos 67s, 40s e 20s e comprimento de onda de 810nm.

Após 48h da irradiação, a cultura foi interrompida e o material foi direcionado para testes de proliferação celular.

Os grupos experimentais foram descritos como:

- CD: Cultivo de condrócitos derivados de cartilagens íntegras.
- AR: Cultivo de condrócitos derivadas de cartilagens com Artrite Reumatoide induzida.

- AR tratado: Grupo irradiado com Laser 810nm; 2J nas potências de 35, 50 e 100mW.

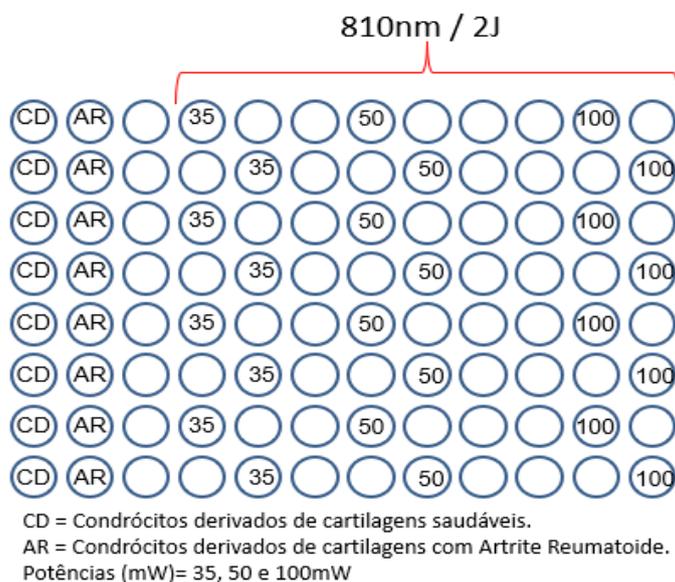


Figura 4. Organização dos condrócitos na placa de 96 poços. Condrócitos saudáveis (CD) ou derivados de animais com Artrite Reumatoide (AR). As células foram irradiadas com 810nm, 2 Joules e 35, 50 e 100mW.

3.2.7 Ensaio de descolamento celular

Quarenta e oito horas após o tratamento dos condrócitos com Laser de baixa intensidade, as placas foram separadas e as células recuperadas para os ensaios a seguir: - O meio de cultura dos poços foram removidos e lavados com 100 μ L de PBS, por 2 vezes. Em seguida foram adicionados 50 μ L do reagente Cristal Violeta e as células foram incubadas por mais 15 minutos a 37 °C. Terminado o tempo de incubação, as placas foram lavadas em água corrente para a remoção completa do azul do cristal. Em seguida foram adicionados 100 μ L de metanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm com auxílio de um leitor de Elisa (2020, Anthos, Eugendorf, Áustria).

3.3 ETAPA *IN VIVO*.

3.3.1 Experimentação *in vivo*

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 subdivididos em 2 grupos, nos seguintes tempos experimentais: 7 (AR7) e 14 dias (AR14) e não receberam nenhum tratamento.
- Grupo AR + terapia com fotobiomodulação (AR+PBM): Realização da indução da AR em 10 animais, os animais foram subdivididos em 2 grupos nos tempos experimentais de 07 dias (AR7+PBM) e 14 dias (AR14+PBM), os animais foram irradiados em dias alternados.

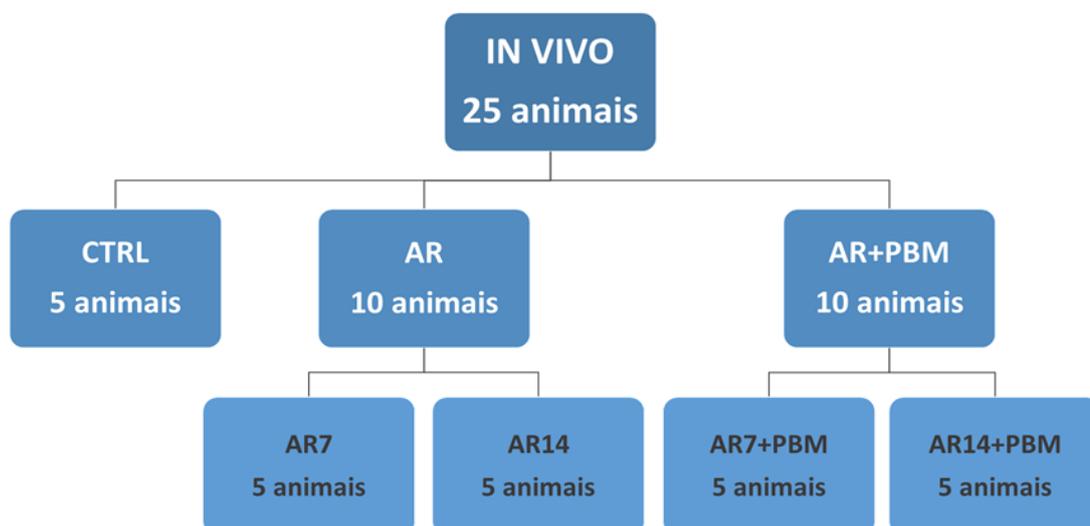


Figura 5. Fluxograma do estudo *in vivo*.

3.3.2 Indução da artrite reumatoide (AR) etapa *in vivo*

A indução da Artrite Reumatoide foi descrita no item 3.1.2.

3.3.3 Evolução da artrite reumatoide etapa *in vivo*

A avaliação dos sinais artríticos das patas foi descrita no item 3.1.3. Score clínico ≥ 2 foi considerado positivo para AR^{71,72}.

3.3.4 Tratamento por terapia de fotobiomodulação *in vivo*

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° ⁷⁰, em relação a superfície do tecido com laser por via transcutânea em dois pontos: medial e lateral, ambos joelhos receberam tratamento. Os animais do grupo AR+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 Lase III, meio ativo de AsGaAl, potência de 100mW, comprimento de onda de 808nm (Item 3.1.4).

3.3.5 Eutanásia

Os animais de cada grupo foram pesados, para administração de tiopental (THIOPENTAX - Cristália) dose de 100mg/kg e lidocaína 10mg/ml (Xylestesin - Cristália), a dose foi administrada por via intraperitoneal, o procedimento de eutanásia foi realizado ao final de cada tempo experimental. O tecido cartilaginoso foi coletado para análise.

3.3.6 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 foi medida antes de cada teste e 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 à cartilagem foi aumentado 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 ⁵¹.

A partir do ensaio foi avaliado 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.

3.3.7 Expressão de transcritos gênicos para MMP2, MMP9 e MMP13

Os tecidos congelados, foram pesados e homogeneizados em Trizol[®] Reagent para extração do RNA total conforme instruções do fabricante. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 seg. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5min. As amostras foram centrifugadas por 15min, 12000xg a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril e adicionados 500 µl de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 min, e novamente foram centrifugadas (12000xg/4°C/10min). Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com 1ml de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/10 min), e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, foram então ressuspensos com 50 µl de água DEPC e armazenados a -80 ° C até a realização da Transcrição Reversa.

As quantificações das amostras de RNA total foram realizadas utilizando o aparelho NanoDrop ND-2000 espectrofotômetro (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA), com leitura em filtro de 260nm. Foram utilizadas apenas amostras livres de contaminantes e de proteínas ($A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$).

3.3.8 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 \pm desvio padrão (SD). Foi utilizado programa de software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), e considerado significativo valor para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS *IN VITRO*

4.1.1 Avaliação da proliferação celular

O gráfico da figura 06 mostra a proliferação de condrócitos originados de cartilagens de animais com artrite reumatoide, 48 após o início do cultivo em placas de 96 poços. Os condrócitos derivados de cartilagens com AR foram divididos em grupos sem tratamento (NT) ou irradiados com Laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 810 nm e 2 Joules de energia, em 3 diferentes potências (35, 50 ou 100mW). No gráfico é possível observar que o grupo NT apresentou redução da proliferação quando comparado ao grupo CD. Todos os grupos com células derivadas de cartilagens com Artrite Reumatoide induzida e irradiadas em diferentes potências, apresentaram aumento na proliferação celular quando comparados ao grupo NT. As células irradiadas com 35 mW e 100 mW apresentaram o maior aumento na proliferação celular, quando comparada ao grupo CD e NT.

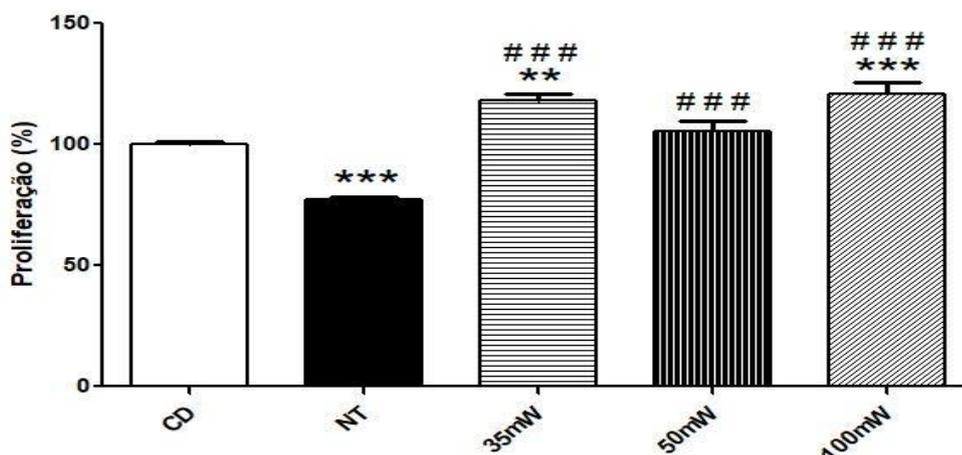


Figura 06. Gráfico de proliferação de condrócitos. Gráfico do descolamento celular e avaliação da taxa de proliferação, avaliada por marcação com Cristal Violeta, 48 horas após o início do cultivo de Condórcitos. Valores expressos em média e desvio padrão. Grupos: Controle com células saudáveis (CTL) ou células com artrite reumatoide sem tratamento (NT) ou tratado com

PBM (810nm, 2J) em potências de 35mW, 50mW ou 100mW. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ VS CTL e ### $p < 0,001$ VS AR.

4.2 RESULTADOS *IN VIVO*

4.2.1 Propriedades mecânicas

O gráfico da figura 7 mostra a Força de Compressão Máxima suportada pela cartilagem, no momento da ruptura do tecido, durante ensaio cíclico de compressão. Não foram observadas diferenças em Fmax nos grupos com AR induzida quando comparado com o grupo CTL. Somente após 14 dias, ambos os grupos AR e AR+PBM apresentaram redução em Fmax quando comparados ao grupo CTL. O grupo AR+PBM apresentou aumento de Fmax quando comparado ao grupo AR.

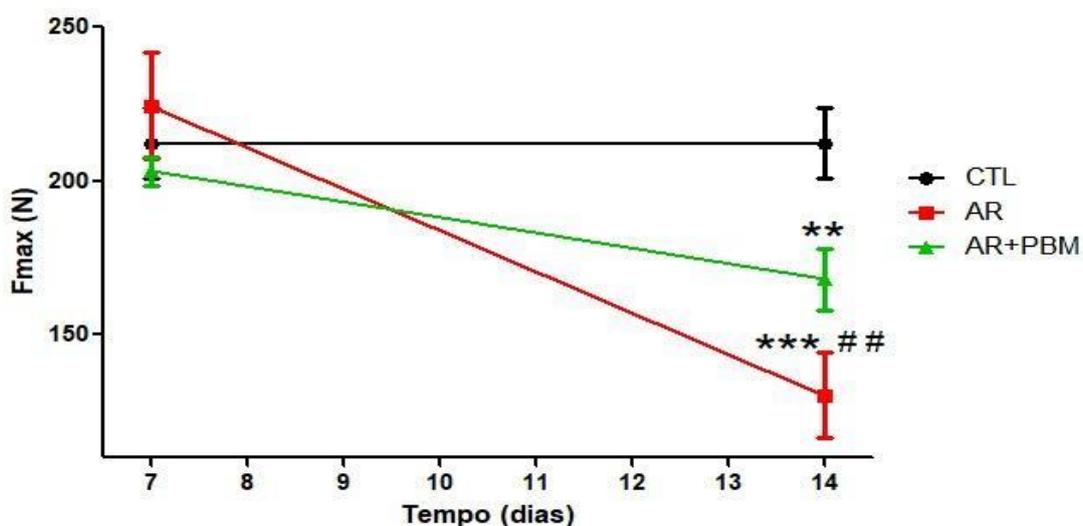


Figura 7. Gráfico de Fmáx Grupos 7 e 14 dias NT e Tratamento. Gráfico da Força de Compressão Máxima (Fmax) no momento da ruptura, durante ensaio cíclico, nos tempos de 7 e 14 dias após a indução da Artrite Reumatoide (AR). Grupos: Controle (CTL; Artrite Reumatoide (AR) e Artrite reumatoide tratado com Laserterapia (AR+PBM). Valores apresentados: Média e Desvio Padrão. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ VS CTL e ## $p < 0,01$ VS AR.

O gráfico da figura 8 mostra a Deformação máxima (Dmax) suportada pela cartilagem, no momento da ruptura do tecido, durante ensaio cíclico de compressão. Ambos os grupos AR e AR+PBM apresentaram redução em Dmax quando comparados ao grupo CTL. O grupo AR em 14 dias apresentou redução de Dmax, quando comparado ao AR em 7 dias.

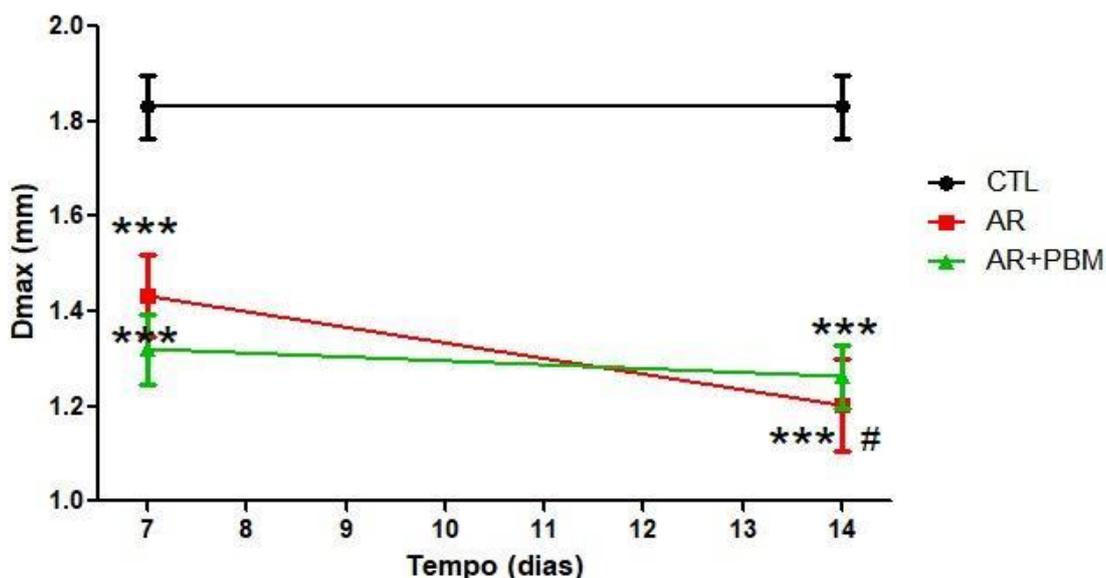


Figura 8. Gráfico de Dmáx Grupos 7 e 14 dias NT e Tratamento. Gráfico da Deformação Máxima (Dmax) no momento da ruptura, durante ensaio cíclico de compressão, nos tempos de 7 e 14 dias após a indução da Artrite Reumatoide (AR). Grupos: Controle (CTL); Artrite Reumatoide (AR) e Artrite reumatoide tratado com Laserterapia (AR+PBM). Valores apresentados: Média e Desvio Padrão. *** $p < 0,001$ VS CTL e # $p < 0,05$ VS AR (7 dias).

O gráfico da figura 9 mostra a relação entre a Força máxima e Deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem, no ensaio de ensaio mecânico cíclico de compressão, após 14 dias do início da indução da doença.

Foi observado que o grupo com Artrite Reumatoide (AR14) induzida, apresentou redução tanto na Fmax como na Dmax, distanciando do grupo CTL, quando comparado ao grupo AR14+PBM.

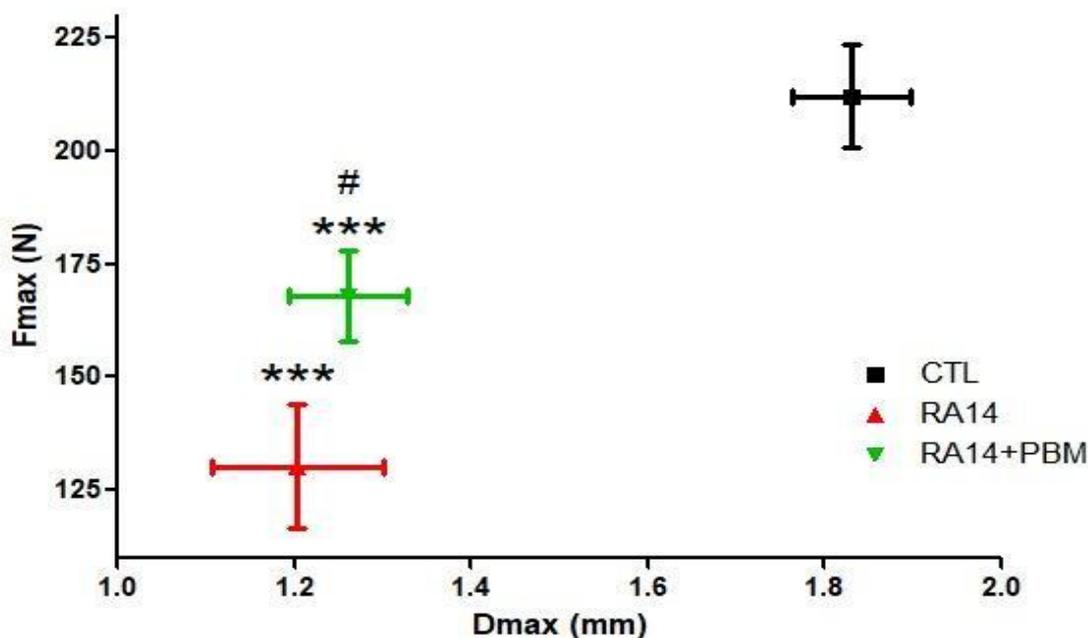


Figura 9. Gráfico da relação entre Fmax e Dmax, 14 dias após a indução da Artrite Reumatoide, em ensaio mecânico de compressão cíclica. Grupos: Controle (CTL); Artrite Reumatoide (AR14) e Artrite reumatoide tratado com Laserterapia (AR14+PBM). Valores apresentados: Média e Desvio Padrão. *** $p < 0,001$ VS CTL e # $p < 0,05$ VS AR.

4.2.2 Expressão de transcritos gênicos (PCR)

No gráfico da figura 10, é apresentado a expressão gênica de metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) na cartilagem de animais com artrite reumatoide induzida após 14 dias da última indução.

Foi observado aumento na expressão de MMP2 no grupo AR quando comparado ao grupo CTL. O grupo com artrite reumatoide e irradiado com laserterapia (AR+PBM) apresentou redução da expressão de MMP2 quando comparado ao grupo AR.

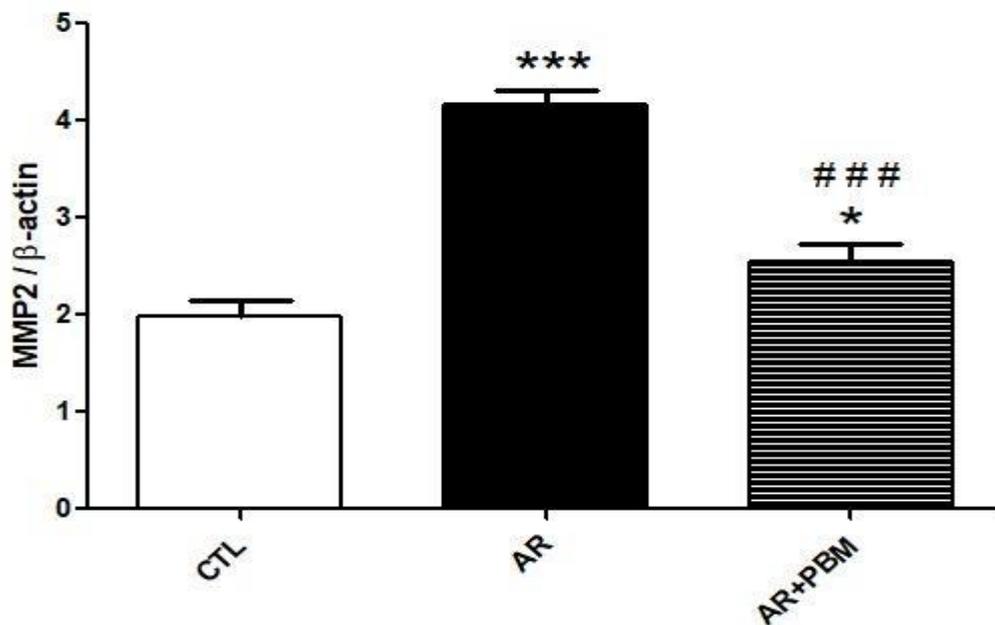


Figura 10. Gráfico da expressão gênica relativa de MMP2 em cartilagens de joelho de ratos, 14 dias após a indução da artrite reumatoide. Grupos Experimentais: Controle (CTL); Artrite Reumatoide (AR) e Artrite reumatoide tratado com Laserterapia (AR+PBM). Valores apresentados: Média e Desvio Padrão. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ VS CTL e ### $p < 0,001$ VS AR.

No gráfico da figura 11 é apresentado a expressão gênica de metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) na cartilagem de animais com artrite reumatoide induzida após 14 dias da última indução.

Foi observado aumento na expressão de MMP9 no grupo AR quando comparado ao grupo CTL. O grupo com artrite reumatoide e irradiado com laserterapia (AR+PBM) apresentou redução da expressão de MMP9 quando comparado ao grupo AR.

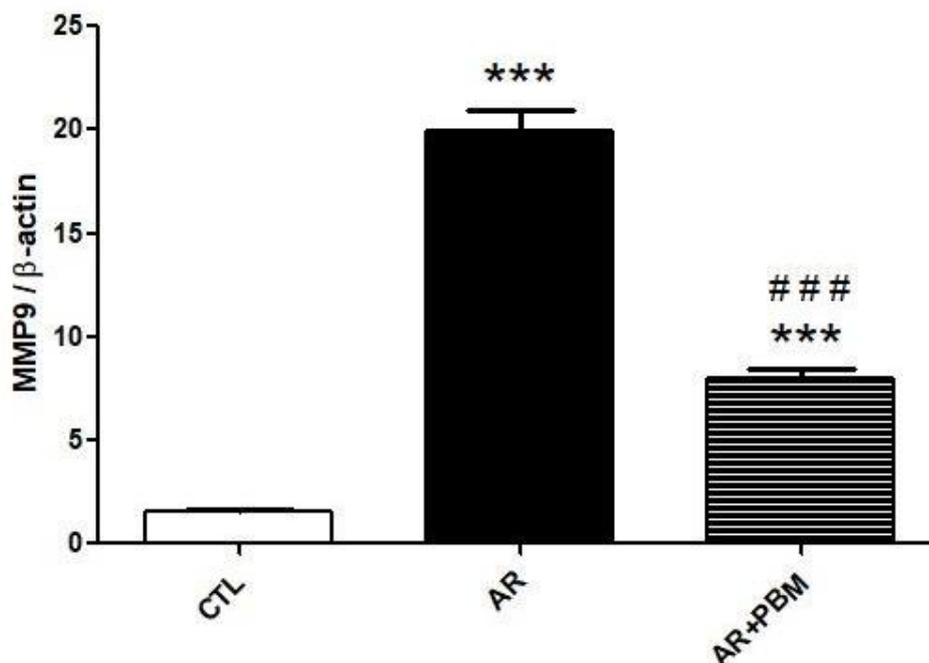


Figura 11. Gráfico da expressão gênica relativa de MMP9 em cartilagens de joelho de ratos, 14 dias após a indução da artrite reumatoide. Grupos Experimentais: Controle (CTL); Artrite Reumatoide (AR) e Artrite reumatoide tratado com Laserterapia (AR+PBM). Valores apresentados: Média e Desvio Padrão. *** $p < 0,001$ VS CTL e ### $p < 0,001$ VS AR.

O gráfico da figura 12 mostra a expressão gênica de MMP13 na cartilagem de animais com artrite reumatoide induzida após 14 dias da última indução.

Similarmente aos resultados de MMP2 e MMP9, a expressão de MMP13 no grupo AR também foi aumentada quando comparada ao grupo CTL. O grupo com artrite reumatoide e irradiado com laserterapia (AR+PBM) novamente apresentou redução da expressão de MMP13 quando comparado ao grupo AR.

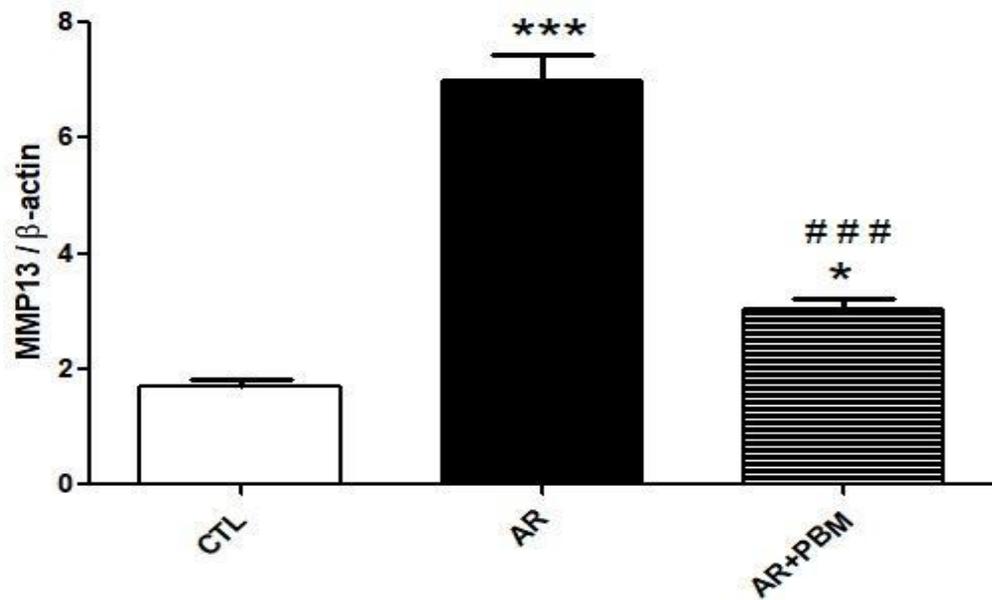


Figura 12. Gráfico da expressão gênica relativa de MMP13 em cartilagens de joelho de ratos, 14 dias após a indução da artrite reumatoide. Grupos Experimentais: Controle (CTL); Artrite Reumatoide (AR) e Artrite reumatoide tratado com Laserterapia (AR+PBM). Valores apresentados: Média e Desvio Padrão. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ VS CTL e ### $p < 0,001$ VS AR.

5. DISCUSSÃO

O tratamento para artrite reumatoide tem sido amplamente estudado, uma vez que esta doença pode levar à incapacidade funcional, porém os tratamentos disponíveis são onerosos, além disso causam reações adversas tornando os resultados insatisfatórios⁷⁵. Neste estudo, foi observado a progressão da doença em todos os aspectos avaliados do grupo artrite reumatoide (AR), em contrapartida a PBM nos parâmetros utilizados no estudo atingiu resultados positivos significativos, foi observado o aumento tanto na resistência da cartilagem ao teste cíclico de compressão, força máxima suportada até o momento da ruptura (Fmax), como na capacidade de deformação máxima suportada até a ruptura (Dmax) das cartilagens nos animais com artrite reumatoide induzida comparado aos animais saudáveis. A terapia por fotobiomodulação, (808nm; 2J; 100mW) promoveu melhora das características funcionais, reduzindo o impacto na resistência da cartilagem, na análise de expressão gênica houve a redução da expressão das MMPs 2, 9 e 13 e ainda ocorreu o aumento da proliferação de condrócitos.

Sabe-se que a artrite reumatoide é uma doença autoimune, caracterizada por uma inflamação crônica, levando a destruição irreversível da cartilagem, ossos e tecidos adjacentes^{1,50}. Neste estudo utilizou-se o modelo CIA (artrite induzida por colágeno) para desenvolver artrite reumatoide em ratos Wistar. O modelo CIA foi adaptado de acordo com os estudos de Dos Santos *et.al* (2017), a dose de colágeno foi aumentada, amplificando assim a resposta inflamatória. Foi realizado no total três induções usando Colágeno II e Adjuvante Completo de Freund com 1ª e 2ª indução intradérmica e sistêmica, e 3ª indução no joelho. Este modelo foi escolhido devido a eficácia na apresentação dos sinais clínicos característicos da doença¹.

No presente estudo foi realizado o ensaio mecânico cíclico de compressão, uma vez que ele permite a avaliação da força máxima suportada e a deformação máxima suportada pela cartilagem até o momento de sua ruptura. Este modelo foi adaptado de ensaios biomecânicos descritos por Marcos *et.al*, 2012 em que foi utilizado ensaios cíclicos de tração no tendão e de flexão em

tíbia de ratos ⁷⁶. Neste modelo é possível realizar a simulação da atividade destes tecidos ao esforço repetitivo, uma vez que a AR reduz de maneira significativa a capacidade de resistência da cartilagem. Existe na literatura diversos trabalhos que avaliaram propriedades mecânicas em outros tecidos biológicos como tendão e pele ^{76,77} mas não foram encontrados estudos que avaliaram a Fmax e Dmax, assim como a expressão gênica das MMPs 2, 9 e 13 em cartilagem articular reumatoide induzida por colágeno. Outras análises não encontradas na literatura foram a avaliação da ação de diferentes potências da PBM na proliferação e viabilidade de condrócitos derivados de cartilagem com artrite reumatoide.

Foi avaliado a proliferação celular, utilizando os seguintes parâmetros de irradiação: comprimento de onda 810nm, potência (35; 50 e 100 mW) e energia de 2 Joules. Esta etapa faz parte do projeto inicial que inclui a utilização de vários parâmetros de irradiação a fim de buscar aquele que mais apresenta resultados positivos para proliferação de condrócitos. Apesar da melhora significativa em todas as potências utilizadas, foi escolhida para etapa in vivo 100 mW, por ser a potência fixa em boa parte dos equipamentos utilizados na prática clínica. Os resultados demonstraram que a PBM aumenta a proliferação dos condrócitos. Recentemente Tim, C.R *et.al* (2021), comprovaram o aumento da proliferação de condrócitos com o uso da PBM com energia de 1,4 J em um modelo experimental de osteoartrite, e sugeriu-se que a PBM é um tratamento eficaz para o tecido articular em degeneração, e os resultados indicaram possível retorno à homeostase do tecido e efeitos condroprotetores da PBM ⁷⁸.

O tratamento farmacológico ainda é o mais utilizado para artrite reumatoide, com o uso de corticoides e medicamentos biológicos para a diminuição da atividade do TNF- α , entretanto, os efeitos adversos pelo uso prolongado são preocupantes ⁷⁸. Diante disso, aumenta-se cada vez mais a busca de tratamentos auxiliares e o uso da PBM é um deles ⁶⁷. O uso do laser de baixa intensidade vem se mostrando mais eficiente em diferentes parâmetros, por ser capaz de promover a recuperação tecidual, diminuir a dor e reduzir o processo inflamatório ^{67,77}. Este estudo demonstrou que a terapia por PBM promoveu a melhora da Fmax e Dmax mesmo com a progressão da AR. As

propriedades mecânicas dos tecidos biológicos são testes funcionais importantes, no caso deste trabalho foi observado que com a evolução da doença de 7 para 14 dias ocorreu prejuízo das propriedades mecânicas reduzindo a resistência da cartilagem, principalmente Fmax.

Outros estudos já comprovaram que a PBM promove a melhora das propriedades mecânicas de diferentes tipos de tecidos ^{77,80}. Amadio *et.al* (2021) demonstraram que a pele dos animais hipoprotéico tratado com PBM era mais resistente à tração aplicada, e sua deformação era mais lenta ⁷⁷.

De acordo com os resultados encontrados nos testes Fmax e Dmax, a progressão da doença leva a perda de resistência do tecido cartilaginoso aumentando a degradação, estes achados estão relacionados com o aumento da expressão das MMPs ⁸⁰.

Ao serem analisadas a expressão das metaloproteinases de matriz 2, 9 e 13, uma vez que alguns estudos (Stancker *et.al.*, 2018; Burrage *et.al.*, 2006) demonstraram que a inibição destas enzimas pode reduzir a degradação do colágeno e por consequência da cartilagem articular e do osso subcondral ^{28,55}. Os resultados apresentados estão de acordo com os estudos citados, com a progressão da doença houve o aumento da expressão de todas as MMPs analisadas 2, 9 e 13, e quando a PBM foi aplicada foi observado a diminuição da expressão destas enzimas.

Essas MMPs formam um grande grupo de enzimas que medeiam a degradação das proteínas extracelulares da cartilagem, resultando perda da integridade da cartilagem, desempenhando assim um importante papel na progressão da degeneração do tecido articular ^{55,79,80}.

Para Malemud (2019), a MMP-13 é uma das enzimas responsáveis pela degradação do colágeno intersticial e têm relevância particular na cartilagem articular em AR, porque degrada agressivamente o colágeno tipo II. Além disso, altos níveis de MMP-13 foram encontrados em tecidos artríticos ⁸¹. Para Marcos *et.al* (2014), o aumento significativo da MMP-13 pode ter consequências importantes na degradação do colágeno e em seu processo de cicatrização ⁸⁰.

E as MMP-2 e MMP-9 têm como alvo a membrana basal, e clivam o colágeno IV e V ^{28,83}.

O tratamento com da PBM proposto neste estudo foi capaz de reduzir a expressão das MMP-2, MMP-9 e MMP-13, sugerindo diminuição do processo degradativo, os parâmetros e protocolo para a irradiação foi escolhido de acordo com os estudos realizados anteriormente ^{1,37,55} a irradiação foi realizada em dias alternados utilizando energia de 2 J.

Como observado anteriormente, as MMPs degradam o tecido articular ^{28,55,78} com reflexo direto na redução de suas propriedades mecânicas. A perda de material articular é um problema para os pacientes com esta doença, que podem acometer a região óssea sendo muitas vezes incapacitante ^{13,28,84}. Neste sentido, terapias que auxiliem não só na redução do processo inflamatório, mas também da proliferação celular são importantes para o reparo tecidual. Neste estudo a AR reduziu a proliferação dos condrócitos, depois foi observado que a PBM aumentou a proliferação celular nos 3 parâmetros utilizados. Estes resultados sugerem que a PBM não só reduz o processo inflamatório e de degradação tecidual causado pelo aumento das MMPs, como também auxilia no reparo articular pelo aumento da proliferação de condrócitos. Anteriormente foi realizado um estudo histológico que demonstrou que o uso da PBM proporciona melhor organização celular e manutenção do espaço entre os condrócitos semelhantes ao tecido saudável.

Vale ressaltar que o presente estudo tem limitações, considerando que a AR é uma doença com características autoimunes, seria importante em estudos posteriores avaliar o processo imunológico desta doença, neste modelo experimental. Estudos com a associação de terapias farmacológicas (glicocorticóides e Anti-TNF- α) e PBM também devem ser realizados.

Até o momento, a PBM mostrou-se uma importante terapia para o controle do processo inflamatório e redução da degradação da cartilagem em modelo experimental de artrite reumatoide.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a terapia por fotobiomodulação foi eficiente no aumento da proliferação dos condrócitos nas diferentes potências utilizadas. A PBM melhora as propriedades mecânicas Fmax e Dmax e reduz as expressões das MMP-2, MMP-9 e MMP-13 em cartilagens de animais com artrite reumatoide induzida.

7. REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Kumar LD, Karthik R, Gayathri N, Sivasudha T. Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2016;79:52–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.001>
3. Hirose J, Nishioka H, Tsukano M, Matsubara S, Usuku K, Mizuta H. Matrix changes in articular cartilage in the knee of patients with rheumatoid arthritis after biological therapy: 1-year follow-up evaluation by T2 and T1 ρ MRI quantification. *Clin Radiol [Internet].* 2018;73(11):984.e11-984.e18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.crad.2018.06.020>
4. 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 Pharmacol [Internet].* 2016 Oct [cited 2018 May 11];68(10):1233–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12606>
5. Huh YH, Lee G, Lee KB, Koh JT, Chun JS, Ryu JH. HIF-2 α -induced chemokines stimulate motility of fibroblast-like synoviocytes and chondrocytes into the cartilage-pannus interface in experimental rheumatoid arthritis mouse models. *Arthritis Res Ther [Internet].* 2015;17(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0816-x>
6. Macedo RBV, Kakehasi AM, Melo de Andrade MV. IL33 in rheumatoid arthritis: potential contribution to pathogenesis. *Rev Bras Reumatol (English Ed.* 2016 Sep;56(5):451–7.

7. Goes ACJ, Reis LAB, Silva MBG, Kahlow BS, Skare TL. Rheumatoid arthritis and sleep quality. *Rev Bras Reumatol (English Ed [Internet]*. 2017;57(4):294–8. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2016.07.011>
8. Hadi V, Kheirouri S, Alizadeh M, Khabbazi A, Hosseini H. Effects of *Nigella sativa* oil extract on inflammatory cytokine response and oxidative stress status in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Avicenna J phytomedicine [Internet]*. 2016;6(1):34–43. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27247920><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4884216>
9. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet [Internet]*. 2016;388(10055):2023–38. Available from:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
10. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis. 2008;17–24.
11. Silveira P, Silva L, Tuon T, Freitas T, Streck E, Pinho R. Efeitos da laserterapia de baixa potência na resposta oxidativa epidérmica induzida pela cicatrização de feridas. *Brazilian J Phys Ther*. 2009;13(4):281–7.
12. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS One [Internet]*. 2016 Apr 1 [cited 2021 Jun 18];11(4). Available from: [/pmc/articles/PMC4820274/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27247920/)
13. 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>

14. 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>
15. Harre U, Schett G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):355–63.
16. 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.pdf>
17. Leal ECP, De Almeida P, Tomazoni SS, De Carvalho PDTC, Lopes-Martins RÁB, Frigo L, *et.al.* Superpulsed low-level laser therapy protects skeletal muscle of mdx mice against damage, inflammation and morphological changes delaying dystrophy progression. *PLoS One* [Internet]. 2014 Mar 5 [cited 2021 Jun 18];9(3):e89453. Available from: www.plosone.org
18. Hamblin MR. Can osteoarthritis be treated with light? [Internet]. Vol. 15, *Arthritis Research and Therapy.* *Arthritis Res Ther*; 2013 [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24286607/>
19. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saldenbergh-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun.* 2012;39(3):222–8.
20. Carteron NL. Cytokines in rheumatoid arthritis: Trials and tribulations. *Mol Med Today.* 2000;6(8):315–23.
21. 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>
22. Sakata R, Iwakura T, Reddi AH. Regeneration of Articular Cartilage

- Surface: Morphogens, Cells, and Extracellular Matrix Scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2020 Oct 11];21(5):461–73. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2014.0661>
23. 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* [Internet]. 2015 Dec [cited 2018 May 11];29(2):748–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576915301016>
 24. 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>
 25. Riemenschneider PE, Rose MD, Giordani M, McNary SM. Compressive fatigue and endurance of juvenile bovine articular cartilage explants. *J Biomech* [Internet]. 2019;95:109304. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2019.07.048>
 26. Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: A research perspective. *Bone*. 2003;33(1):1–13.
 27. Henao-Murillo L, Ito K, van Donkelaar CC. Collagen Damage Location in Articular Cartilage Differs if Damage is Caused by Excessive Loading Magnitude or Rate. *Ann Biomed Eng*. 2018;46(4):605–15.
 28. 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>
 29. Benjamin D. Elder, Krishanthan Vigneswaran, B.S., Kyriacos A. Athanasiou DHK. NIH Public Access. *NIH Public Access*. 2011;66(4):722–7.

30. Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: Review and perspectives. *J Formos Med Assoc [Internet]*. 2009;108(2):87–101. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646\(09\)60039-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60039-5)
31. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233(1):233–55.
32. Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The chondrocyte: Biology and clinical application. *Tissue Eng*. 2006;12(7):1971–84.
33. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26035–54.
34. Manchini MT, Serra AJ, Rds F, Santana ET, El A. Amelioration of Cardiac Function and Activation of Anti-Inflammatory Vasoactive Peptides Expression in the Rat Myocardium by Low Level Laser Therapy. *PLoS One [Internet]*. 2014 [cited 2021 Jun 18];9(7):101270. Available from: www.plosone.org
35. Barretto SR, De Melo GC, Dos Santos JC, De Oliveira MGB, Pereira-Filho RN, Alves AVF, *et.al*. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of low-level laser therapy on temporomandibular joint inflammation in rodents. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2013 Oct 18 [cited 2021 Jun 18];129:135–42. Available from: <https://europepmc.org/article/med/24231378>
36. Marinho RR, Matos RM, Santos JS, Ribeiro MAG, Smaniotto S, Barreto EO, *et.al*. Potentiated anti-inflammatory effect of combined 780 nm and 660 nm low level laser therapy on the experimental laryngitis. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2013 Apr 5 [cited 2021 Jun 18];121:86–93. Available from: <https://europepmc.org/article/med/23524249>
37. Dos Santos SA, Alves ACA, Leal-Junior ECP, Albertini R, Vieira R de P, 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* [Internet]. 2014 May 31 [cited 2018 Jul 6];29(3):1051–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-013-1467-2>
38. 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>
39. HENRIQUES. A. C. G. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação Ação. 2010;37(4):295–302.
40. Castro-e-Silva O, Zucoloto S, Marcassa LG, Marcassa J, Kurachi C, Melo CAS, *et.al.* Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. *Lasers Surg Med.* 2003;32(1):50–3.
41. Karu T. Photochemical Effects Upon the Cornea, Skin and Other Tissues PHOTOBIOLOGY OF LOW-POWER LASER EFFECTS. 1989;56(5):691–704.
42. Davidovich L. Os quanta de luz e a ótica quântica. *Rev Bras Ensino Fis.* 2015;37(4).
43. Chaves MEA, Piancastelli ACC, Araujo AR, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing : *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):616–23.
44. Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR, Damasceno Maia F, do Nascimento NRF, Driusso P, *et.al.* Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2016 Nov [cited 2018 Aug 17];164:96–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27661759>

45. Guimarães BR, Neves AA, 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>
46. 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>
47. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, *et.al.* Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008;120(3–4):112–7.
48. Passarella S, Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation This paper is devoted to the memory of Prof. Lorenzo Bolognani who was one of the pio. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2014;140:344–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>
49. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2021 Dec 4];62(8):607–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iub.359>
50. Pigatto GR, Silva CS, Parizotto NA. Photobiomodulation therapy reduces acute pain and inflammation in mice. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2019;196(March):111513. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111513>
51. 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.* 2017;32(6):1269–77.
52. Kim G, Kim Y, Kim E. Anti-inflammatory effects of low intensity laser therapy on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rat. *J Phys Ther Sci.* 2013;25(1):47–50.
 53. Dos Santos SA, Serra AJ, Stancker TG, Simões MCB, Dos Santos Vieira MA, Leal-Junior EC, *et.al.* Effects of Photobiomodulation Therapy on Oxidative Stress in Muscle Injury Animal Models: A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 17];2017:5273403. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/5273403/>
 54. 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 Oct 18]; Available from: <https://link-springer-com.ez345.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs10103-012-1102-7.pdf>
 55. 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.
 56. Silva DP, Paula De Oliveira A, Novaretti C, Baldan C. Efeito analgésico do laser de baixa intensidade (LILT) na artrite reumatóide 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>
 57. 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>
58. 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;32(12):669–77.
 59. 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. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10103-013-1413-3>
 60. Lin Zhang 1, Hiroki Kajiwara 1, Noboru Kuboyama 2 YA 1. 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/islsm
 61. Neves M, Retameiro ACB, Tavares AL de F, Reginato A, Menolli RA, Leal TS da S, *et.al.* Physical exercise and low-level laser therapy on the nociception and leukocyte migration of Wistar rats submitted to a model of rheumatoid arthritis. *Lasers Med Sci.* 2020;35(6):1277–87.
 62. 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>
 63. Dos Anjos LMJ, Salvador PA, de Souza AC, de Souza da Fonseca A, de Paoli F, Gameiro J. Modulation of immune response to induced-arthritis by low-level laser therapy. *J Biophotonics.* 2019;12(2).
 64. Fiorio FB, dos Santos SA, de Melo Rambo CS, Dalbosco CG, Serra AJ,

- de Melo BL, *et.al.* Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci.* 2017;32(8):1769–82.
65. 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.
66. 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.
67. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation [Internet]. Vol. 4, *AIMS Biophysics.* 2017 [cited 2018 Aug 17]. p. 337–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748217>.
68. 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>
69. 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.pdf>
70. Almeida S, Santos D, Ataize M, Vieira S, Cécilia M, Simões B, *et.al.*

- Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. [cited 2018 Oct 18]; Available from: <https://link-springer-com.ez345.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs10103-017-2209-7.pdf>
71. Yamashita T, Hagino H, Hayashi I, Hayashibara M, Tanida A, Nagira K, *et.al.* Effect of a cathepsin K inhibitor on arthritis and bone mineral density in ovariectomized rats with collagen-induced arthritis. *Bone Reports* [Internet]. 2018;9(May):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2018.05.006>
 72. Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Linda K, Brand DD. Collagen-Induced Arthritis. 2010;(April):1–25.
 73. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2018 May 26];3(8):1253–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714293>
 74. Chen L, Liu L. Current progress and prospects of induced pluripotent stem cells. *Sci China Ser C Life Sci* [Internet]. 2009 Jul 30 [cited 2018 May 26];52(7):622–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11427-009-0092-6>
 75. Zhang X, Dong Y, Dong H, Zhang W, Li F. Investigation of the effect of phlomiside F on complete freund's adjuvant-induced arthritis. *Exp Ther Med.* 2017;13(2):710–6.
 76. Marcos RL, Leal-Junior ECP, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, *et.al.* Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: Analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res.* 2012;30(12):1945–51.
 77. Amadio EM, Marcos RL, Serra AJ, dos Santos SA, Caires JR, Fernandes GHC, *et.al.* Effect of photobiomodulation therapy on the proliferation

- phase and wound healing in rats fed with an experimental hypoproteic diet. *Lasers Med Sci*. 2021;36(7):1427–35.
78. Tim CR, Martignago CCS, Assis L, Neves LM, Andrade AL, Silva NC, *et.al*. Effects of photobiomodulation therapy in chondrocyte response by in vitro experiments and experimental model of osteoarthritis in the knee of rats. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03417-8>
79. Kanbe K, Chiba J, Nakamura A. Decrease of CD68 and MMP-3 expression in synovium by treatment of adalimumab for rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* [Internet]. 2011 Aug [cited 2021 Nov 29];14(3):261–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21816022/>
80. 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.
81. Poeran. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2017;176(12):139–48.
82. Steffensen B, Häkkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing - Coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(5):373–98.
83. Abduch TF, da Silva PAV, de Souza ÁC, dos Anjos LMJ, de Souza da Fonseca A, de Paoli F. Evaluation of metalloproteinases-2, -9, and -13 post photobiomodulation in mice talocrural joint. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Dec 11];35(3):633–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31420795/>.
84. Feng FB, Qiu HY. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

in rat models with rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jun 1;102:1209–20.