

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE**

Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação

Tatiane Garcia Stancker

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A TERAPIA DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E  
IMPLANTADAS EM JOELHOS COM OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL**

São Paulo

2017

Tatiane Garcia Stancker

2017

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA A TERAPIA DE CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO E  
IMPLANTADAS EM JOELHOS COM OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Nove de Julho para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

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

São Paulo, SP

2017

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Stancker, Tatiane Garcia.

Efeitos da fotobiomodulação associada a terapia de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e implantadas em joelhos com osteoartrite experimental. / Tatiane Garcia Stancker.2017.

94 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

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

1. Fotobiomodulação. 2. Osteoartrite. 3. células-tronco derivadas

São Paulo, 30 de outubro de 2017.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Tatiane Garcia Stancker

Título da Dissertação: "Efeitos da fotobiomodulação associada a terapia de células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos e implantadas em joelhos com osteoartrite experimental"

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



Membro: PROF. DR. LUCIO FRIGO



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR



## **Dedicatória**

À Deus, por sua infinita misericórdia, me têm guiado neste caminho com muita paciência e amor, me ensinando, corrigindo, capacitando e permitindo que eu pudesse chegar até aqui. Ao amor da minha vida por ter sido meu porto-seguro nos momentos em que faltaram fé e junto à minha família, proporcionaram uma forte base para que eu pudesse completar mais esta etapa na minha vida, me apoiando, me incentivando, me ouvindo e lembrando que nada acontece por acaso nesta vida, pois os caminhos de Deus são perfeitos e Suas promessas sempre serão cumpridas. Dedico especialmente às minhas sobrinhas, por tornarem a vida mais colorida e me lembrar do quanto é simples ser feliz e, aos meus avós, que transbordam sabedoria e sempre me presenteiam com bons conselhos. Aos meus amigos por compartilharem as alegrias e tristezas da jornada, sempre prontos para levantar a autoestima. E por fim, às minhas companheiras de pesquisa, que tornaram as batalhas mais leves e me mostraram como um laço de amizade pode nascer e ser fortalecido frente a adversidade.

## **Agradecimentos**

Agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, projeto Nº 2015/13656-7, tornando este estudo possível através do seu incentivo e financiamento à pesquisa científica.

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho pelo conhecimento compartilhado e pela paciência frente as minhas dificuldades. Além disso, nosso projeto pôde ser concluído devido asua habilidade de vencer os obstáculos que encontramos nesta jornada, habilidade que é fruto de sua grande experiência e brilhante carreira na pesquisa científica.

## Resumo

A osteoartrite (OA) é um processo degenerativo crônico caracterizado pela degradação progressiva da cartilagem chegando a atingir o osso subcondral. As intervenções atuais para a OA exercem pouco ou quase nenhum efeito sobre a reparação da cartilagem articular. Sendo assim, a terapia através de células-tronco mesenquimais (CTM's) têm sido alvo de interesse devido a seu potencial de multilinhagem, tornando-se uma importante ferramenta na tentativa de reparação tecidual. A fotobiomodulação (PBMT) tem demonstrado favorecer a proliferação de vários tipos celulares, inclusive as CTM's. O objetivo deste estudo é determinar se a PBMT pode aumentar a retenção de células-tronco derivadas de adipócitos (ADSC's) injetadas em joelho de ratos submetidos à modelo experimental de osteoartrite e analisar os efeitos condroprotetores destas terapias. As ADSC's foram coletadas de 3 ratos Fischer-344 machos e validadas através da citometria de fluxo. A amostra foi composta de 50 ratos Fischer-344 e distribuídas em cinco grupos: grupo Controle (animais saudáveis), grupo OA (animais com OA), grupo OA PBMT (animais com OA tratados com terapia por PBMT), grupo OA ADSC's (animais com OA tratados com injeção de ADSC's), e grupo OA ADSC's PBMT (animais com OA tratados com injeção de ADSC's e PBMT). A OA foi induzida através da injeção intra-articular de solução de papaína a 4%. Os animais dos grupos OA ADSC's e OA ADSC's PBMT receberam injeção intra-articular de ADSC's ( $1 \times 10^6$ ) diluídas em  $100 \mu$ l de meio de cultura. Para os grupos que receberam PBMT (parâmetros utilizados: comprimento de onda de 808nm; potência de 50mW; energia de 2J; densidade de energia  $71,2 \text{ J/cm}^2$  e área do feixe  $0,028 \text{ cm}^2$ ) as aplicações foram realizadas em 4 pontos da linha articular do joelho em dias consecutivos. A eutanásia foi realizada no 3º e 7º dias após os tratamentos onde foram extraídas as cartilagens articulares para a quantificação da expressão gênica através de RT/PCR de SRY, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, MMP's 1 e 2, TIMP's 1 e 2 e colágeno tipo II. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA *One way* com *post hoc test* o teste de Tukey e os dados foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão com valor de  $P < 0,05$ . Os resultados mostraram que as terapias através de PBMT e ADSC's diminuíram a expressão de citocinas pró inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e das MMP's 1 e 2 quando comparados ao grupo OA. Além disso, aumentaram a expressão gênica das TIMP's 1 e 2, IL-10 e do Colágeno tipo II. E quando as terapias são associadas os efeitos são mais eficazes. A PBMT também mostrou estimular a retenção destas células no espaço intra-articular. Concluímos que a injeção intra-articular de ADSC's associada a PBMT tem ação condroprotetora, modulando o processo inflamatório, diminuindo as citocinas e MMP's.

**Palavras-chave:** fotobiomodulação, osteoartrite, células-tronco derivadas de adipócitos.

## Abstract

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative process characterized by progressive deterioration of the cartilage reaching subchondral bone. Current interventions have little or no effect on the repair of articular cartilage. Therefore, the therapy through mesenchymal stem cells (MSC's) has been a target of interest due to its multilineage potential, becoming an important tool in the attempt of tissue repair. The photobiomodulation (PBMT) has been shown to be favorable in the proliferation of various cell types, including MSC's. The aim of this study is to determine whether PBMT can increase the retention of adipocyte-derived stem cells (ADSC's) injected into the knee of the rat submitted to the experimental model of osteoarthritis and to analyze the chondroprotective effects of these therapies. ADSC's were collected from 3 male Fischer-344 rats and validated by flow cytometry. The sample was composed of 50 Fischer-344 rats and distributed into five groups: Control group (healthy animals), OA group (animals with OA), OA PBMT group (OA animals treated with PBMT therapy), OA ADSCs group (OA treated with ADSC's injection), and OA ADSC's PBMT group (animals with OA treated with ADSC's injection and PBMT). OA was induced by intra-articular injection of 4% papain solution. OA ADSC's and OA ADSC's PBMT animals received intra-articular injection of ADSC's ( $1 \times 10^6$ ) diluted in 100  $\mu$  of culture medium. For the groups that received PBMT (parameters used: wavelength of 808nm, power of 50mW, energy of 2J, density of energy 71.2J/cm<sup>2</sup> and spot size 0,028cm<sup>2</sup>) the applications were performed in 4 points of the articular line of the knee on consecutive days. The euthanasia was performed on the 3rd and 7th days after the treatments, which the articular cartilage was extracted for the quantification of the gene expression by RT/ PCR of SRY, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL- MMP-1, MMP's 1 and 2, TIMP's 1 and 2 and collagen type II. For the statistical analysis, *One way* ANOVA with Tukey's *post-hoc test* was used and all data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation with  $P < 0,05$ . The results showed that the PBMT and ADSC's therapies decreased the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and MMP's 1 and 2 when compared to the OA group. In addition, they increased the gene expression of TIMP's 1 and 2, IL-10 and Collagen type II. And the effects are more effective when therapies are associated. PBMT stimulated the retention of these cells in the intra-articular space. We conclude that the intra-articular ADSC's injection associated with PBMT has chondroprotective action, modulating the inflammatory process and decreasing the cytokines and MMP's.

**Keywords:** photobiomodulation therapy, osteoarthritis, adipose-derived stem cell.



## Lista de Abreviaturas

ADSC's: Adipose derived stem cells/Células-tronco derivadas de adipócitos

AMP: Adenosine monophosphate/Monofosfato de Adenosina

AsGa: Arseneto de Gálio

ATP: Adenosine triphosphate/Trifosfato de Adenosina

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

COL2A: Colágeno tipo II

CTM's: Células-Tronco Mesenquimais

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucleico

EGF: Epidermal growth factor/Fator de crescimento epidermal

FGF: Fibroblast growth factor/Fator de crescimento de fibroblastos

GaAlAs: Arseneto de Gálio e Alumínio

He Ne: Helium-Neon/Hélio- Neon

IGF-1: Insuline Growth factor 1/Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1beta

IL-6: Interleucina 6

MEC: Matriz extracelular

MMP's: Metaloproteinases

MMP1: Metaloproteinase 1

MMP2: Metaloproteinase 2

NF $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B

OA: Osteoartrite

PBMT: Photobiomodulation/Fotobiomodulação

PBS: Phosphate buffered saline/Tampão fosfato salino

PCR: Polymerase Chain Reaction/Reação em cadeia da polimerase

RNA: Ribonucleic acid/Ácido ribonucleio

RT/PCR: Reverse transcription polimerase chain reaction/Transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase

SRY: *Sex-determining region Y*/Região do cromossomo Y que determina o sexo

TGF- $\beta$ : Tumor growth factor beta/Fator de crescimento tumoral beta

TIMP-1: Tissue inhibitor of metalloproteinase/Inibidor de tecidos endógenos de metaloproteinases

TIMP-2: Tissue inhibitor of metalloproteinase/ Inibidor de tecidos endógenos de metaloproteinases

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis factor alpha/Fator de necrose tumoral alfa

VEGF: Vascular Endothelial growth factor/Fator de crescimento endotelial vascular

## **Lista de Figuras**

Figura 1: Coeficiente de absorção de acordo com comprimento de onda Composição dos grupos experimentais.

Figura 2: Composição dos grupos experimentais.

Figura 3: Procedimento de extração de tecido adiposo.

Figura 4: Adipócitos obtidos e colocados em tubo falcon com meio de cultura.

Figura 5: Garrafa de cultivo primário contendo meio de cultura suplementado.

Figura 6:Foto capturada da garrafa de cultura primária com alta confluência.

Figura 7:Foto capturada da garrafa de cultivo (passagem 3) sem atingir confluência.

Figura 8:Foto capturada da garrafa de cultivo (passagem 3) com alta confluência.

Figura 9:Fluxograma do protocolo da fase experimental.

Figura 10:Indução da Osteoartrite com injeção articular.

Figura 11:Procedimento de transplante celular.

Figura 12:Ilustração da aplicação da fotobiomodulação.

Figura 13: Representação dos resultados da validação das ADSC's através da citometria de fluxo.

Figura 14: Representação dos resultados da quantificação de SRY através de RT/PCR.

Figura 15:Representação dos resultados da quantificação de IL-1 $\beta$  através de RT/PCR.

Figura 16:Representação dos resultados da quantificação de IL-6 através de RT/PCR.

Figura 17:Representação dos resultados da quantificação de TNF- $\alpha$  através de RT/PCR.

Figura 18:Representação dos resultados da quantificação de IL-10 através de RT/PCR.

Figura 19:Representação dos resultados da quantificação de MMP-1 através de RT/PCR.

Figura 20:Representação dos resultados da quantificação de MMP-2 através de RT/PCR.

Figura 21:Representação dos resultados da quantificação de TIMP-1 através de RT/PCR.

Figura 22:Representação dos resultados da quantificação de TIMP-2 através de RT/PCR.

Figura 23:Representação dos resultados da quantificação de COL2A através de RT/PCR.

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Parâmetros utilizados na fotobiomodulação.

Tabela 2:Relação dos primers a serem utilizados para o RT/PCR.

## Sumário

1	CONTEXTUALIZAÇÃO .....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	OSTEOARTRITE (OA) .....	6
2.2	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM'S) .....	9
2.3	LASER.....	10
2.3.1	Histórico breve .....	10
2.3.2	Efeitos fisiológicos – Fotobiomodulação .....	11
2.3.3	Laser e proliferação celular .....	14
3	HIPÓTESE DA PESQUISA .....	16
4	OBJETIVOS.....	17
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
5	MÉTODOS.....	18
5.1	AMOSTRA .....	18
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	18
5.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	18
5.3.1	A - Experimentação in vitro .....	18
5.3.2	B - Experimentação in vivo .....	18
5.4	MANIPULAÇÕES DO TECIDO ADIPOSEO E EXTRAÇÃO DAS ADSC'S .....	19
5.4.1	Extração do tecido adiposo.....	19
5.4.2	Validação da extração de ADSC's .....	23
5.5	CULTIVO .....	24
5.6	INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE E PROCEDIMENTO DE TRANSPLANTE ....	25
5.6.1	Indução da Osteoartrite.....	25
5.6.2	Procedimentos de transplante .....	26
5.7	APLICAÇÕES DA FOTOBIMODULAÇÃO ATRAVÉS DE LASER .....	27
5.8	EUTANÁSIA.....	28
5.9	QUANTIFICAÇÃO DAS ADSC'S TRANSPLANTADAS .....	29
5.10	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA (RT/PCR) .....	29
5.10.1	Síntese de cdna - Transcrição reversa.....	30

5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
6	RESULTADOS .....	32
6.1	VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ADSC'S ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO .....	32
6.2	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA (RT/PCR) .....	33
6.2.1	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) do cromossomo Y (SRY - sex-determining region Y) .....	33
6.2.2	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de IL-1 $\beta$ .....	33
6.2.3	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de IL-6 .....	35
6.2.4	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de TNF- $\alpha$ .....	36
6.2.5	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de IL-10 .....	37
6.2.6	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de MMP-1 .....	39
6.2.7	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de MMP-2 .....	40
6.2.8	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de TIMP-1 .....	41
6.2.9	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de TIMP-2 .....	43
6.2.10	Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de Colágeno tipo II (COL2A) .....	44
7	DISCUSSÃO .....	47
8	CONCLUSÃO .....	52
9	REFERÊNCIAS .....	53
10	ANEXOS .....	68
10.1	ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UNIFESP/HSP .....	68
10.2	ANEXO 2 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNINOVE .....	71
10.3	ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO .....	78

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A osteoartrite (OA) é um processo degenerativo crônico caracterizado pela deterioração progressiva da cartilagem, remodelação óssea subcondral, diminuição do espaço articular, osteofitose e perda de função. (HAYAMI et al., 2006).

A patogênese da OA do joelho tem sido associada a alterações biomecânicas e bioquímicas na cartilagem da articulação como a incapacidade para resistir aos esforços mecânicos normais, a oferta limitada de nutrientes e oxigênio, a síntese inadequada dos componentes da matriz extracelular, o aumento da síntese de proteases tecido-destrutivo (metaloproteinases de matriz e agreganases) e a apoptose total de condrócitos) (UTH e TRIFONOV 2014).

Recentemente, inflamação sinovial também foi credenciado como um fator limitante a reparação da cartilagem do joelho. Além disso, este fator se correlaciona com sinais clínicos de OA do joelho, tais como edema no joelho e dor inflamatória (MAZOR et al., 2014).

Em condições normais, os condrócitos articulares mantêm o equilíbrio entre a síntese e a degradação dos componentes existente na matriz extracelular, entre eles o colágeno II, que se trata da proteína mais abundante da matriz cartilaginosa e quase específica para este tecido. Esta exerce o importante papel de manter as propriedades tênsil da cartilagem (HUEBNER et al., 2009; NAKATA et al., 1993).

Na OA os condrócitos apresentam um desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Dessa forma, aumenta-se a perda de tecido cartilaginoso atraindo ainda mais células de defesa para as regiões afetadas. Este cenário desencadeia processos de estresse oxidativos tornando um ambiente nocivo para as células, levando-as à apoptose (BAUER et al., 2006; LANE et al., 2011; IM et al., 2008).

As citocinas são um grande grupo de pequenas proteínas e polipeptídeos envolvidos em respostas imunes e inflamatórias que agem sobre as células. Sabe-se que o desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 $\beta$  e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) auxilia na manutenção da dor crônica (IMAMURA et al., 2014).

Uma das citocinas mais estudada na OA é a IL-1 $\beta$ , esta mostrou-se envolvida na degradação da cartilagem em diversos estudos, através da estimulação da síntese de metaloproteinases de matriz, que degradam o colágeno. A IL-1 $\beta$  juntamente com outra citocina, a TNF- $\alpha$ , estimula a produção de IL-6, aumentando ainda mais sensação dolorosa ao sensibilizar as fibras aferentes. Em contrapartida, a IL-10, interleucina também produzida pelos condrócitos, como citada

anteriormente, possui ação anti-inflamatória (BENITO et al., 2005; WOJDASIEWICZ et al., 2014).

A autorregeneração da cartilagem, que inclui condrócitos, substância fundamental (matriz da cartilagem) e fibras de elastina, é um processo lento, o que resulta numa cartilagem nova que não é estável para cargas intensas. O líquido dentro da articulação contém células-tronco mesenquimais (CTM's), que podem se diferenciar em condrócitos, mas a nova cartilagem depositada é muito frágil e pode ser destruído através da aplicação de uma quantidade mínima de estresse nas articulações (UTH e TRIFONOV 2014).

Atuais intervenções para a OA têm como principais objetivos aliviar os sintomas, reduzir a dor, e controlar a inflamação por meio de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, esteroidais, ácido hialurônico (HA) e tratamento físico (fisioterapia), sendo que todas estas terapias têm pouco impacto sobre a degeneração progressiva de tecidos articulares (BUCKWALTER et al., 2004).

As células-tronco representam um elemento importante nas estratégias regenerativas para a reparação de tecidos em virtude da sua disponibilidade em grandes números e relativa facilidade de preparação e de entrega. CTM's vêm sendo consideradas para o tratamento de uma ampla gama de patologias, e pesquisadores estão especialmente interessados em seu potencial para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, tais como osteoartrite, osteoporose e osteonecrose. (BEANE et al., 2014).

CTM's são células fusiformes capazes de proliferação rápida e auto renovação. Estão contidas dentro de certos tecidos, incluindo a medula óssea, tecido sinovial, sangue, tecido adiposo, e periósteo (DEANS E MOSELEY, 2000).

Seu potencial de multilinhagem permite a diferenciação em uma variedade de tipos de células, a fim de criar e reparar tecidos mesenquimais. CTM's foram diferenciadas em vias condrogênica, osteogênica e adipogênicas (PITTENGER et al., 1999).

De acordo com MAZOR et al. (2014), a condrogênese é um processo complexo que é iniciado pelas células-tronco mesenquimais que se aglomeram e se condensam no sítio formador de osso, seguida da maturação de condrócitos diferenciados. Esta via é acompanhada pela produção de matriz extracelular específica do estágio, sincronizados por interações celulares, com os fatores de crescimento de matriz e de diferenciação. A diferenciação condrogênica das CTM's é induzida por fatores intrínsecos e extrínsecos (COLEMAN et al., 2010).

Os fatores de crescimento desempenham o papel mais importante neste processo. Eles representam um grupo de polipeptídios biologicamente ativos produzidos pelo corpo que pode



estimular a proliferação e diferenciação de células. Um grande número destes fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  superfamília, FGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) e FGF (fator de crescimento de fibroblasto), regulam a homeostase e integridade da cartilagem, bem como o seu desenvolvimento (BEANE et al., 2014).

As terapias à base de CTM's comerciais atuais para o tratamento de osteoartrite envolvem a injeção de uma suspensão de CTM's no espaço da articulação. Porém, estudos anteriores evidenciaram que CTM's introduzidas desta forma não permitem o ingraftamento na cartilagem endógena, não sendo possível, desta forma, a reparação (HATSUSHIKA et al., 2013).

Por outro lado, Desando et al. (2013), relatam que mesmo as CTM's não aderindo à cartilagem articular, promoveram a atenuação da osteoartrite, retardando a degeneração e diminuindo a inflamação local. O mesmo foi observado nos estudos de DIEKMAN et al. (2013) e FRISBIE et al. (2009).

Mesmo sem adesão das CTM's diretamente nas cartilagens osteoartíticas estas tem demonstrado benefícios condroprotetores, diminuindo a inflamação e a expressão de citocinas pró inflamatórias como a IL1  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , interferindo também na ação das metaloproteinases de matriz (MMP's) que degrada proteoglicanos na cartilagem. Este conjunto de alterações pode retardar a progressão e destruição de cartilagem articular. No entanto, uma abordagem que permitisse a retenção das CTM's na cartilagem articular poderia ampliar os benefícios destas células nas articulações afetadas pela osteoartrite (COLEMAN et al., 2010). É importante reportar que independente do mecanismo pelo qual as células agem, a sua sobrevivência e retenção no tecido receptor são fatores que constituem fundamental importância. Frente a este panorama, a busca por alternativas que resultem em aumento da retenção das células transplantadas levou a investigações sobre os mecanismos determinantes da sobrevivência das CTM's em ambientes hostis (SAMPER et al., 2013).

Um dos pontos que despertaram interesse nestas investigações é a participação do processo inflamatório vigente no tecido hospedeiro, que pode diminuir as chances de sobrevivência das CTM's transplantadas, além de dificultar o processo de adesão das sobreviventes. Estudos (SUZUKI et al., 2004; WANG et al., 2014) confirmam este fato, demonstrando que o microambiente hostil ocasiona aumento das citocinas inflamatórias e tem relação inversa com a sobrevivência das células transplantadas. Por outro lado, ratos que receberam antagonistas de citocinas tiveram aumento da sobrevivência das CTM's, bem como atenuação da apoptose. O perfil pró-inflamatório vigente, em conjunto com o grande influxo de neutrófilos e macrófagos e a

dificuldade de adaptação das células ao novo microambiente, constitui então circunstância ideal para morte e conseqüentemente perda expressiva das CTM's transplantadas.

O conjunto de informações supracitadas é suficiente para apontar o processo inflamatório como tendo influência importante na terapia celular, sobretudo em situações de estado pró-inflamatório vigente, como na OA. Neste cenário, ferramentas capazes de aumentar a resistência das CTM's ou amenizar o microambiente hostil são instrumentos importantes para o aumento da eficácia da terapia celular. Cabe relatar a proposta de Wu et al. (2013), que vigorou neste cenário, demonstrando *in vitro* que a utilização fotobiomodulação induziu benefícios na sobrevivência de CTM's em ambientes inflamatórios, por meio da modulação dos níveis de AMP cíclico e da atividade do NFkB.

A fotobiomodulação tem sido amplamente utilizada em muitas situações clínicas para acelerar os processos de regeneração de tecidos, tendo em vista do seu efeito sobre a proliferação de vários tipos de células. A capacidade de acelerar o processo de cura está relacionada à absorção da energia laser absorvida pelos cromóforos intracelulares e convertida em energia metabólica, a qual é então utilizada pela cadeia respiratória para aumentar a atividade ATP mitocondrial e a síntese de proteínas RNA (GINANI et al., 2015).

Apesar de pouco se saber sobre a ação da fotobiomodulação em células-tronco adultas, tem sido postulado que a esta aumenta a proliferação destas células, mas os mecanismos biológicos relacionados com esse efeito bioestimulatório ainda não estão totalmente elucidados (GAO e XING 2009).

Vários pesquisadores têm relatado que a fotobiomodulação é capaz de modular processos celulares fisiológicos, bioquímicos e metabólicos, promovendo efeitos terapêuticos da proliferação celular e diferenciação destas células (LI et al., 2006; EDUARDO et al., 2015 e MVULA et al., 2010).

Vários estudos têm relatado que o sucesso da fotobiomodulação depende de parâmetros de dosimetria (ALVES et al., 2013; HUANG et al., 2011).

Ferreira et al. (2009), relatam que diferentes linhagens de células podem não responder da mesma forma a parâmetros irradiação diferente. Estudos descrevem que a fotobiomodulação é capaz de aumentar a proliferação de células e a expressão de VEGF, aumentando deste modo a angiogênese após o transplante e indução de CTM's autólogas (GAO e XING 2009; LEONIDA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015).

Diante do exposto, a fotobiomodulação poderia ser uma ferramenta de grande valia em medicina regenerativa uma vez que seus efeitos promovem uma melhor diferenciação e

proliferação celular e, ainda acreditamos na hipótese que além de melhorar suas ações, aPBMT poderia aumentar a retenção das CTM's na cartilagem articular e sua ação quando a finalidade é o tratamento da OA.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 OSTEOARTRITE (OA)

A Osteoartrite (OA) é a doença musculoesquelética mais frequente e a causa mais comum de incapacitação física da população idosa, gerando altos custos com medicamentos e cuidados médicos, prejudicando significativamente a qualidade de vida do indivíduo acometido (BUCKWALTER et al., 2004). Estudos (KOTLARZ et al., 2009; PEREIRA et al., 2011) apontam como referência que a OA acarreta um grande impacto econômico para a sociedade norte-americana, onde os custos com a saúde chegam à 60 bilhões por ano. Porém, ao somar os gastos com a OA esse valor aumenta para 185 bilhões por ano.

Oliviero et. al. (2010) afirma em seu estudo que o comportamento das autoridades civis e profissionais da saúde frente a OA, consiste num importante fator para o crescimento da patologia. O equívoco consiste em focar nos exames radiológicos, esquecendo-se, na maioria das vezes, as características clínicas da OA. Dessa forma, como as alterações radiológicas se apresentam em fase tardia da doença, torna-se ainda mais complicado encontrar uma terapia eficiente para o paciente. Os autores dizem ser imprescindível a identificação precoce da OA assim como sua prevenção, visto que, ela pode acarretar e/ou estar associada com outras doenças como a obesidade e doenças cardiovasculares.

Em 1953, autores já afirmavam que a tentativa persistente e vigorosa do corpo em reparar o tecido é mais prejudicial do que a degeneração cartilaginosa (HARRISON et al., 1953).

Atualmente a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI - The Osteoarthritis Research Society International) definiu recentemente que:

A osteoartrite é uma doença que envolve as articulações móveis caracterizada por estresse celular e degradação da matriz extracelular iniciada por micro e macro lesão que ativam respostas de reparação inadequadas, incluindo caminhos pró-inflamatórios da imunidade inata. A doença manifesta primeiramente como uma degeneração molecular (metabolismo anormal do tecido articular) seguido de distúrbios anatômicos e/ou fisiológicos (caracterizado pela degradação da cartilagem, remodelação óssea, formação de osteófitos, inflamação das articulações e perda da função comum da articulação), que pode culminar na doença (KRAUS et al., 2015).

As opções de tratamento atuais não cirúrgicas para OA são de curto prazo ou ineficazes não conseguindo intervir adequadamente sobre o processo fisiopatológico, dor articular e nos mecanismos bioquímicos envolvidos na degeneração da cartilagem. Dessa forma, as

investigações se concentram na compreensão desses processos para que assim seja possível desenvolver novas terapias que possam diminuir ou reverter a degeneração da cartilagem (LEE et al., 2013).

Em um estudo de 2010, os autores Sellam e Berenbaum, concluíram que a fisiopatologia da OA se inicia com a inflamação do tecido sinovial, sugerindo que devemos considerar como doença o acometimento de toda a articulação: tecido sinovial, cartilagem e osso subcondral. Estas estruturas comunicam-se entre si através da interação entre suas células, mediadores químicos e sinais mecânicos. Os autores acrescentam que claramente a inflamação sinovial está envolvida na perda da capacidade de manutenção da cartilagem e, portanto, na progressão da doença. O tecido sinovial funciona como a primeira barreira de proteção para a cartilagem articular, onde a sua inflamação serve para atrasar e prevenir danos à cartilagem.

O acometimento do tecido sinovial é importante visto que sua membrana é composta de células com alto potencial metabólico, os sinoviócitos, que possuem a importante função de nutrir os condrócitos e remover os metabólitos e produtos da degradação da matriz pois diferentemente do tecido cartilaginoso, a membrana sinovial é altamente vascularizada e nutrida (DOUGADOS, 1996).

A sinovite apresenta em seus sintomas clínicos o edema articular e a dor inflamatória. Os macrófagos sinoviais produzem catabólitos e citocinas pró inflamatória, iniciando o processo inflamatório. Este afeta o equilíbrio entre a degradação e reparação do tecido cartilaginoso, que por sua vez aumenta o acometimento da membrana sinovial, tornando-se um ciclo vicioso (BONDENSON et al, 2006).

Os condrócitos são células que sintetizam os componentes e mantêm a matriz extracelular, como o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos (ARCHER e FRANCIS-WEST, 2003). Esta atividade pode ser alterada por fatores químicos e mecânicos. Entre os fatores, podemos destacar como os mais importantes as citocinas pró-inflamatórias e os fatores de crescimento que possuem efeitos anabolizantes e catabólicos, desempenhando um importante papel na degradação e síntese dos componentes da matriz (AKKIRAJU e NOHE, 2015).

Podemos encontrar na literatura diversos mediadores químicos envolvidos nesta patologia. A IL-1 $\beta$  é considerada a citocina chave da OA, induzindo reações inflamatórias e efeitos catabólicos. Sua síntese na articulação é regulada pelos condrócitos, osteoblastos, sinoviócitos e células mononucleares presentes na articulação ou que se infiltraram durante a resposta inflamatória (LANGE-BROKAAR et al.,2012). Foram encontrados níveis elevados de IL-1 $\beta$  no fluido e membrana sinoviais, cartilagem e no osso subcondral (MASSICOTTE et al.,2002;

FARAHAT et al., 1993; SOHN et al., 2012). Estudos confirmam que a IL-1 $\beta$  bloqueia a produção dos componentes da matriz extracelular realizada pelos condrócitos e estimulam a produção de metaloproteinases da matriz que têm como principal função a degradação do colágeno (BENITO et al., 2005; SHAKIBAEI et al., 2005; STÖÖVE et al., 2000). López-Armada et al. (2006) ao submeterem condrócitos à IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  notaram que as células tendem a envelhecer mais rápido e induzir à apoptose.

O TNF- $\alpha$ , através de receptores específicos, ativa as fibras sensoriais locais e inicia a cascata a inflamatória estimulando a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6. Esta última tem importante papel na degeneração da cartilagem e é associada à hiperalgesia e hipersensibilidade dos tecidos articulares (BRENN et al., 2007). Frente aos resultados de Obreja et al. (2005), onde mostraram que a IL-6 desencadeia respostas nas fibras aferentes primárias, pode-se concluir que esta interleucina é uma das grandes responsáveis por desencadear a dor articular.

Juntas, estas três citocinas, que apesar de serem secretadas por condrócitos e sinoviócitos, exercem um importante papel na interrupção da homeostase da cartilagem, modulando os condrócitos a aumentarem a expressão de MMP's e inibindo a produção das TIMP's (inibidoras de MMP's) acelerando a degradação articular (KAPOOR et al., 2011).

As metaloproteinases além de regular a arquitetura dos tecidos atuando na matriz extracelular e nas junções intercelulares, em condições normais, exercem funções como: criação de espaços para migrações celulares através da proteólise, produção fragmentos específicos de clivagem de substratos induzindo atividade biológica independente e podem ativar, desativar ou modificar a atividade dos sinalizadores químicos (STERNLICHT e WERB, 2001).

A atividade das MMP's são controladas por ativadores fisiológicos que atuam como seus inibidores, as TIMP's. Na OA observa-se um desequilíbrio entre esses fatores, resultando num processo de degradação maior do que a síntese da matriz articular (BUCKWALTER et al., 2013). A manutenção do equilíbrio entre essas proteínas envolve diversos fatores como reguladores de expressão gênica, ativadores de zimógenos e inibidores específicos de atividade enzimática. Os fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas podem regular a expressão gênica das MMP's e TIMP's (CLARK et al., 2008).

Dessa forma, é importante conhecer as particularidades destes mecanismos e os fatores que podem afetá-los para encontrar maneiras de modulá-los na tentativa de devolver a homeostase para a articulação e conseqüentemente interromper a degradação tecidual.

## 2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTM'S)

As células estaminais ou células-tronco podem ser divididas em dois principais grupos: embrionárias e adultas. As células-tronco embrionárias são originadas da massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto e possuem o potencial de se diferenciar em todos os tipos de célula do organismo, chamado de pluripotência. Já as células adultas são encontradas na maioria dos tecidos, desempenhando as funções de manutenção e reparação destes. Entre as células-tronco adultas, as células com maior interesse de pesquisa devido ao seu potencial terapêutico são as células do estroma mesenquimal ou CTM's (Células-tronco mesenquimais) (WHITWORTH EBANKS,2014).

As CTM's podem ser obtidas em tecidos como a polpa dentária (GRONTHOS et. Al,2000); cordão umbilical (SECCO et Al.,2007), medula óssea (KUZNETSOV et al., 1997) e tecido adiposo (ADSC's – Adipose derived stem cells) (ZUK PA et Al.,2002).

Além da capacidade de proliferação rápida e auto renovação, Pittenger et al. (1999) descrevem a propriedade de diferenciar-se em variados tipos celulares, como as células condrogênicas, osteogênicas e adipocitárias, chamando de potencial de multilinhagem. Em estudo mais recente, os autores descrevem que estas células podem ser cultivadas sem perder este potencial, ou seja, sua capacidade de diferenciação, mostrando que as CTM's permitem se desenvolver em células condrogênicas através de técnicas *in vivo* e *in vitro* (PITTENGER et al., 2004).

Além do potencial de multilinhagem, estas células são fáceis de serem cultivadas e oferecem um tratamento menos invasivo, diminuindo os custos e morbidades dos pacientes. Estas características atraíram a atenção dos pesquisadores (FEKRAZAD et al., 2016).

Mirskyet al. (2002) afirmam em seu estudo que as células-tronco produzem um efeito anti-apoptótico e pró-angiogênico pois estimulam o aumento da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Di Marino et al. (2013), acrescentam efeitos anti-bactericidas e anti-fibróticos. Outro benefício elucidado é a função de modulador imunológico, onde as CTM's são potentes reguladores da inflamação, atuando na resposta imune inata e adaptativa (GRIFFIN et al.,2010). O mesmo foi observado no estudo de Djoud et al. (2009), aumentando o interesse para o uso dessas células nas doenças autoimunes, incluindo a OA.

Além do potencial imunomodulatório e da capacidade de diferenciação,

as CTM's mostraram expressar citocinas essenciais como TGF- $\beta$  (Fator de crescimento tumoral beta), VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), EGF (Fator de crescimento epidermal) e outras moléculas bioativas que estimulam a reparação tecidual. Estes fatores

tróficos e o contato direto entre as CTM's e condrócitos, demonstraram influenciar a condrogênese e a formação de matriz cartilaginosa (WU et al., 2011; DE WINDT et al., 2015). O grande desafio, ao considerar as CTM's para o reparo da cartilagem articular, é gerar células com características de condrócitos estáveis, que são resistentes à hipertrofia e diferenciação terminal, conforme encontrado na cartilagem articular hialina. Os protocolos *in vitro* comuns para a diferenciação condrogênica das CTM's induzem com sucesso a expressão de múltiplas moléculas específicas da cartilagem, incluindo o colágeno tipo II e o agregano, e resultam em um fenótipo semelhante ao condrócito (PELTTARI et al., 2008; STECK et al., 2009). Hatsushika et al. (2013) salientam também que as CTM's introduzidas apresentam dificuldade de ingrafamento no local da lesão na cartilagem endógena impedindo o reparo efetivo. Frente à estas observações, torna-se necessário maior conhecimento sobre os mecanismos de ação destas células para que possamos desenvolver maneiras de facilitá-los, tornando esta terapia mais eficiente no tratamento de patologias, incluindo a OA.

## **2.3 LASER**

### **2.3.1 Histórico breve**

A palavra laser é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Teve seu princípio descrito por Albert Einstein em 1917, quando postulou o fenômeno físico da emissão estimulada de fótons de um meio ativo excitado (KARU et al., 2004).

Somente após 43 anos os princípios descritos por Einstein foram colocados em prática, quando o físico Dr. Theodore Harold Maiman em 1960 desenvolveu o primeiro laser de rubi disponível comercialmente (GROSS e HERRMANN, 2007).

De acordo com Schawlow e Townes (1995), os princípios que diferem a luz laser de uma lâmpada são a monocromaticidade, colimação e coerência. A monocromaticidade é o princípio que o caracteriza como biomodulador e consiste no agrupamento da maior parte da radiação emitida pelo aparelho em torno de um comprimento de onda. Este princípio determina os efeitos terapêuticos do laser sobre os tecidos. Por meio desta característica o laser de baixa potência é capaz de alterar o comportamento celular sem que seja necessária a produção de calor.

A colimação ou princípio da unidirecionalidade relaciona-se ao fato de haver pouca ou nenhuma divergência da radiação emitida durante a propagação ao longo da distância



percorrida. Isto porque os feixes de laser permanecem paralelos por conta da coerência espacial (SCHAWLOW e TOWNES, 1995).

Já a coerência é uma das propriedades da luz laser definida como o sincronismo entre tempo e espaço dos fótons emitidos pelo laser, denominadas coerência temporal e espacial respectivamente (BAXTER et al., 1998).

Esses dois últimos princípios, apesar de importantes não são determinantes durante a irradiação cutânea uma vez que ao atingir a pele, a luz perde essas características pelo espalhamento nas primeiras camadas (COTTON, 2004).

A terapia por fotobiomodulação é utilizada para referir à vários tipos de terapias que por meio da oferta de luz induz alterações biológicas no organismo através da interação dos fótons com átomos ou moléculas (HAMBLIN et al., 2017). Esta interação é capaz de alterar o comportamento celular sem que seja necessária a produção de calor (ARRUDA et al., 2007).

Anders et al. (2015) postularam que a terapia por fotobiomodulação trata-se de uma terapia que utiliza formas não ionizantes de luz fontes, incluindo lasers e LEDs (*Light Emitting Diode* – diodo emissor de luz), no espectro visível e infravermelho. É um processo não-térmico que envolvem cromóforos endógenos provocando efeitos fotofísicos (linear e não-linear) e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Este processo resulta em benefícios terapêuticos, incluindo, entre outros, o alívio de dor ou inflamação, imunomodulação, promoção de cicatrização de feridas e regeneração de tecidos.

A monocromaticidade, propriedade anteriormente descrita, determina quais as biomoléculas específicas absorverão a radiação. A radiação visível tem uma via mitocondrial e a invisível (infravermelho) tem ação sobre os cromóforos da membrana celular (BASFOR, 1995; BAXTER et al., 1998).

Ortiz et al. (2001) descrevem que para o uso terapêutico desta ferramenta são necessários parâmetros específicos para cada objetivo como: comprimento de onda, densidade de energia, área do feixe, forma de aplicação (contato ou varredura), área irradiada, polaridade, potência média e de pico e forma de onda (contínua e pulsada).

### **2.3.2 Efeitos fisiológicos – Fotobiomodulação**

A ação do laser tem sido o foco de pesquisa desde 1960. O mecanismo de ação sobre os tecidos tem sido atribuído à capacidade de absorção de energia da luz pelas células. (CHUNG et al., 2012).

Para Huang et al., (2011) a interação do laser com os tecidos biológicos depende do comprimento de onda, da densidade de energia e da potência do laser. As energias depositadas pelo fóton nos tecidos biológicos podem gerar processos vibracionais, rotacionais e eletrônicos que imediatamente se transformam em outro tipo de energia ou efeito biológico. O efeito bioelétrico estimula o aumento da produção e quantidade de ATP produzida pela célula atuando diretamente na mobilidade iônica, e dessa forma potencializa a bomba de sódio e potássio, mantendo com maior eficácia a diferença de potencial de ação intracelular e extracelular (PAGÈS et al., 1999; TUBY et al., 2007).

Alguns autores sugerem que os componentes celulares podem absorver fótons fornecidos através da energia do laser de baixa potência (fotorreceptores) e acelerar a produção de ATP fornecendo energia para a célula, que por sua vez pode modular a resposta inflamatória (ALBERTINI et al., 2004).

As mitocôndrias exercem importante função no metabolismo energético e na apoptose celular. Dessa forma, esta organela geralmente se torna alvo dos estímulos extracelulares e parece intimamente relacionadas com os efeitos biológicos da fotobiomodulação (FENG et al., 2016; FREITAS e HAMBLIN, 2016).

Os componentes da cadeia respiratória, presentes na mitocôndria, são postulados como fotorreceptores primários, principalmente o citocromo c oxidase. Quando as células são irradiadas com várias faixas de luz, esta é absorvida pela cadeia respiratória. Portanto, os primeiros eventos fotoquímicos e fotofísicos acontecem na mitocôndria de células eucariontes e na membrana citoplasmática (KARU, 1999).

A capacidade individual do tecido de absorver a energia de acordo com o comprimento de onda, afetando a permeabilidade da membrana celular é uma explicação aceita para a interação do laser com o tecido biológico (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

De acordo com Baxter et al. (1998), a base fotobiológica da laserterapia são as biomoléculas com capacidade de excitação pelos fótons incidentes da luz laser. Os aminoácidos têm alta absorção intermediária do espectro ultravioleta e em comprimentos de onda menores; os ácidos nucleicos têm espectro de absorção nas mesmas faixas dos aminoácidos, além da região vermelha e os cromóforos como a hemoglobina e melanina absorvem luz na região visível do espectro.

Cada comprimento de onda e seu respectivo cromóforo determinam a absorção, sendo que para lasers de 488 e 515nm (Argônio) tem-se a hemoglobina e no caso do laser de CO<sub>2</sub>, cujo comprimento de onda é de 10.600nm, a biomolécula é a água. Já para os lasers com

comprimento de onda na região do vermelho e infravermelho, como o HeNe (632,8nm), GaAlAs (630 a 830nm) e AsGa (904nm), cujo espectro é intermediário, há maior capacidade de penetração por não haver fortes cromóforos (Figura. 1) (BASFORD, 1995; COTTON, 2004).

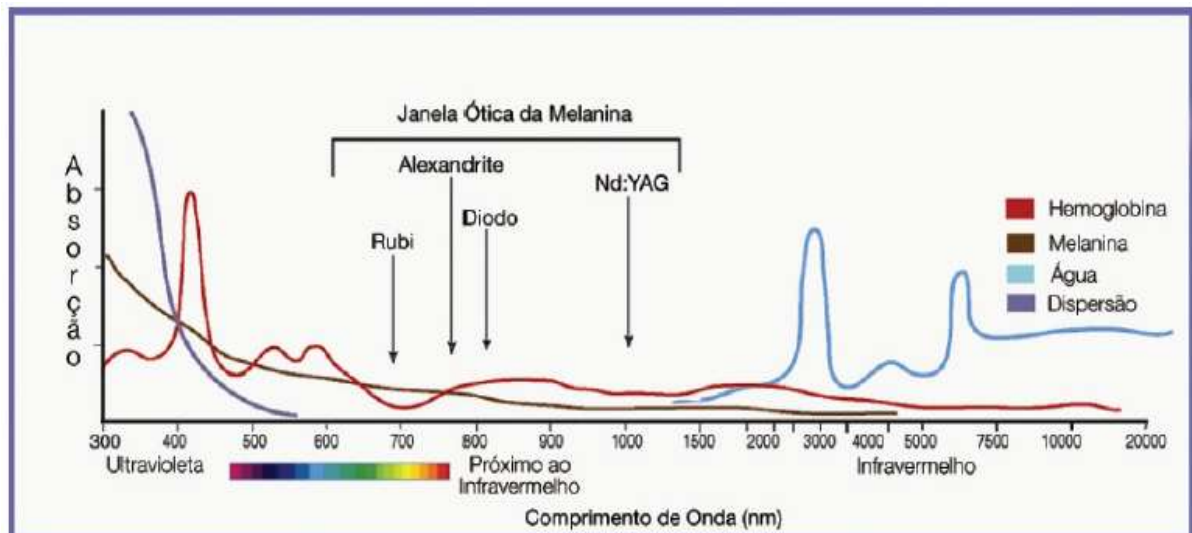


Figura 1: Coeficiente de absorção de acordo com comprimento de onda.  
 Fonte: CAMPOS et al, 2009.

Para Karu et al. (2004) a ativação do metabolismo celular ocasionada pela radiação visível (vermelho) ocorre decorrente da absorção da luz pela enzima citocromo-c-oxidase da mitocôndria, acelerando o transporte de elétrons na cadeia respiratória, elevando o potencial elétrico da membrana e ativando a síntese de adenosina trifosfato (ATP).

O aumento da síntese de ATP afeta os níveis de hidrogênio da célula, ativando outros íons como o sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) e alterando o fluxo de cálcio entre mitocôndria e citoplasma, além de estimular a atividade enzimática para obter restauração de processos fisiológicos (KARU, 1988).

A cadeia respiratória, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase e o N<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> “*exchangers*” (grupo de proteínas transmembrana responsáveis pelo PH intracelular, volume celular, transporte de íons e proliferação celular) são os sinalizadores entre membrana plasmática, mitocôndria e núcleo celular. Estes estão envolvidos na adesão celular que é uma condição importante para a síntese de ATP (KARU et al., 2004).

Klebanov et al. (2001) consideraram como cromóforos da irradiação do laser vermelho as porfirinas endógenas, atuando como fotossensibilizadoras, e induzindo as reações de radicais livres. Os autores observaram aumento da permeabilidade da membrana plasmática aos íons

cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) em leucócitos após a absorção de energia, ativando processos dependentes de cálcio e incrementando o potencial funcional das células.

O aumento do potencial funcional de leucócitos também é acompanhado pela produção de agentes bioativos como oxigênio ( $\text{O}_2$ ), água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), cloro ( $\text{ClO}$ ) e várias citocinas, podendo afetar microcirculação sanguínea ou apresentar propriedades bactericidas (KLEBANOV et al., 2001).

De acordo com Vladimirov et al. (2004) os efeitos anti-inflamatórios do laser de baixa potência, a melhora da circulação sanguínea e seus benefícios relacionados a regeneração tecidual devem-se aos seguintes efeitos: ativação da síntese de proteínas e citocinas; vasodilatação; aceleração da divisão e crescimento celular; aumento de atividade celular (leucócitos, fagócitos) e de cálcio no citoplasma celular. Colls (1984) considerou que os efeitos anti-inflamatórios devem ser atribuídos a dois fatores: interferência na síntese de prostaglandinas e estímulo à microcirculação, garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para a região lesionada, favorecendo sua resolução.

Os efeitos cicatrizantes da fotobiomodulação são considerados o de maior destaque (RODRIGUES e GUIMARÃES, 1998) e são caracterizados por estimular neoangiogênese, elevar microcirculação, elevar a síntese de proteínas por intermédio das mitocôndrias e a produção de ATP, aumentando a atividade mitótica (COLLS, 1984; HERRERO, 1988; RODRIGUES GUIMARÃES, 1998).

Frente a estas ações, busca-se elucidar os efeitos da fotobiomodulação sobre populações de células-tronco.

### **2.3.3 Laser e proliferação celular**

A capacidade da terapia por fotobiomodulação de estimular a proliferação de uma variedade de tipos de células tem sido considerada como o efeito fisiológico mais importante. Estudos demonstraram que a PBMT promove um aumento na taxa de proliferação de células tais como fibroblasto, células endoteliais, osteoblastos, células epiteliais e linfócitos. Quanto à proliferação de células estaminais mesenquimais, efeitos positivos da PBMT na medula óssea e células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC's) também foram relatados na literatura (KUSHIBIKI et al., 2015)

Quando a célula é submetida à irradiação laser observa-se um aumento na produção de ATP, maior atividade da enzima fosfatase alcalina, o que incrementa a proliferação celular e a

expressão de mediadores químicos. Assim, foi sugerido que a irradiação laser tem um efeito terapêutico adicional por estimular a produção de citocinas, promovendo a comunicação intercelular, migração e proliferação, para auxiliar no processo de cicatrização tecidual (HAWKING-EVANS e ABRAHAMSE, 2006). De acordo com Stein et al. (2005), a laserterapia pode induzir a fosforilação de proteínas quinases MAPK/ERK nas células, as quais estão associadas ao mecanismo de proliferação celular, podendo ser umas das justificativas para este mecanismo de ação.

Além disso, a fotobiomodulação demonstrou que pode inibir a apoptose destas células, aumentando o tempo de sobrevivência no local da lesão e a produção de fatores de crescimento, desde que sejam utilizados parâmetros adequados para cada tipo de célula (ZANG, et al., 2009; KARU, 1989).

Os achados de Liu e Zhang (2016) confirmaram estas informações, onde notaram que a fotobiomodulação pode aumentar a sobrevivência de CTM's implantadas, porém não se sabe os mecanismos exatos desta ação.

Fekrazad et al. (2016) concluem em seus estudos que o laser possui um efeito positivo sobre a proliferação de CTM's, mas não exerce ação significativa sobre a diferenciação dessas células quando aplicado sem a associação de fatores de indução à diferenciação.

O mesmo foi observado no estudo de Cavalcanti et al. (2015) onde as culturas de células-tronco irradiadas não apresentaram nenhuma diferenciação, porém notou-se uma relação positiva entre a densidade de energia e a proliferação onde, notou-se que quanto maior a densidade de energia maior efeito proliferativo a terapia por fotobiomodulação exerceu sobre as células.

Park et al. (2015) relatam que é possível que a PBMT possa estimular melhores respostas celulares em termos de expressão gênica, gerando aumento da secreção de fatores de crescimento e proliferação destas células através do aumento do potencial de membrana mitocondrial e dos níveis de ATP e AMPc. Os autores dizem que PBMT desencadeia um aumento significativo no número inicial de células-tronco antes da diferenciação, aumentando assim o número de células diferenciadas para exercer a função da reparação tecidual.

### **3 HIPÓTESE DA PESQUISA**

A fotobiomodulação poderia otimizar a ação da terapia celular por meio de células-tronco derivadas de adipócitos, aumentando sua retenção e otimizando suas ações quando utilizadas com a finalidade de tratar a degeneração articular provocada pela osteoartrite.

## **4 OBJETIVOS**

Determinar se a fotobiomodulação pode aumentar a retenção de células-tronco derivadas de adipócitos injetadas em joelho de ratos submetidos à modelo experimental de osteoartrite assim como analisar os efeitos condroprotetores destas terapias.

### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a ação da fotobiomodulação e da injeção de células-tronco em joelho de ratos submetidos à modelo experimental de osteoartrite, assim como a associação das terapias na inflamação e na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como a IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e anti-inflamatória (IL-10);
- Avaliar a ação da fotobiomodulação e da injeção de células-tronco em joelho de ratos submetidos à modelo experimental de osteoartrite, assim como a associação das terapiasna expressão de metaloproteinases de matriz (MMP 1 e 2);
- Avaliar a ação da fotobiomodulação e da injeção de células-tronco em joelho de ratos submetidos à modelo experimental de osteoartrite, assim como a associação das terapias na expressão gênica de TIMP-1 e TIMP-2;
- Avaliar a ação da fotobiomodulação e da injeção de células-tronco em joelho de ratos submetidos à modelo experimental de osteoartrite, assim como a associação das terapiasna expressão do colágeno II;

## **5 MÉTODOS**

### **5.1 AMOSTRA**

A amostra foi composta de animais isogênicos tendo em vista que utilizamos CTMsextraídas de ratos machos e implantamos em ratas fêmeas, para tanto foram utilizados 50 *Rattus norvegicus* da linhagem FISHER-344 fêmeas e 3 animais machos com idade aproximada de 90 dias com peso corporal variando de 160 a 200 gramas, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB. Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade e temperatura, com água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais estão dentro das normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e aos padrões de experimentação animal do International Council for Laboratory Animal Science sendo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Paulista – UNIFESP (CEUA N4987090316 e da Universidade Nove de Julho – UNINOVE (CEUA AN0006/2016).

### **5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Para compor os grupos experimentais do projeto foi realizado um cálculo amostral com base nos estudos de Murat, et al., (2007) e Lin et al., (2004), considerando a aplicação do teste estatístico ANOVA para 3 tratamentos, com poder de teste de 80 e nível alfa de 0,05 resultando em uma amostra mínima de 50 animais, sendo 10 por grupo.

### **5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os experimentos podem ser divididos em dois grupos: A - experimentação *in vitro* (cultura celular), e B- experimentação *in vivo*.

#### **5.3.1 A - Experimentação *in vitro***

Três animais machos foram destinados ao experimento de cultura celular, onde as células obtidas após a cultura foram implantadas no espaço articular dos joelhos direito e esquerdo dos animais pertencentes aos Grupos OA ADSC's PBMT e OA ADSC's.

#### **5.3.2 B - Experimentação *in vivo***

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em cinco grupos distintos, 1, 2, 3,4 e 5 contendo 10 animais em cada grupo, sendo que: Grupo Controle: animais saudáveis injetados



apenas com DMEM (*Control*); Grupo Osteoartrite: induzidos à OA receberam apenas uma injeção de DMEM sem qualquer tratamento (OA); Grupo Osteoartrite+fotobiomodulação: receberam injeção de DMEM e tratamento por fotobiomodulação (OA PBMT); Grupo Osteoartrite+células-tronco: receberam tratamento por injeção de CTM's (OA ADSC's); Grupo Osteoartrite+células-tronco+fotobiomodulação: receberam tratamento por injeção de CTM's associado a fotobiomodulação (OA ADSC's PBMT).

Todos os grupos foram subdivididos de acordo com o período analisado, ou seja, 3 e 7 dias após a injeção de CTM's ou DMEM. (Figura.2)

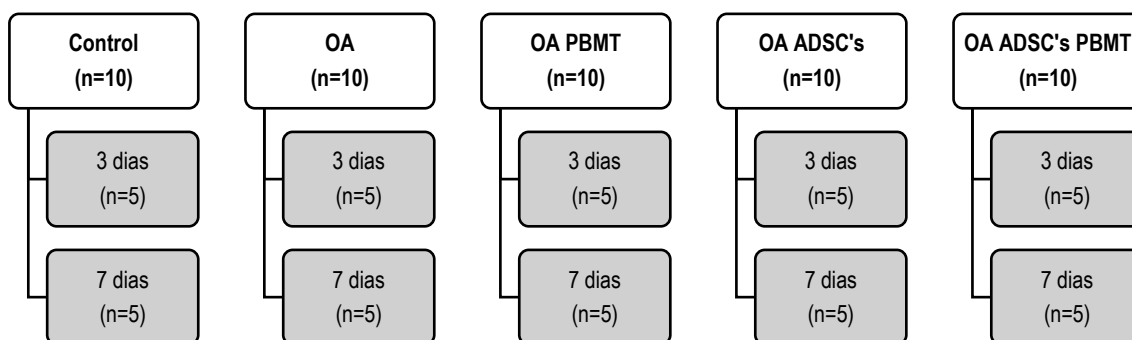


Figura 2. Composição dos grupos experimentais. Grupo *Control*: animais saudáveis; grupo OA: animais com OA; grupo OA PBMT: animais com OA tratados com PBMT; grupo OA ADSC's: animais com OA tratados com injeção de ADSC's; grupo OA ADSC's PBMT: animais com OA tratados com injeção de ADSC's e PBMT.

## 5.4 MANIPULAÇÕES DO TECIDO ADIPOSEO E EXTRAÇÃO DAS ADSC'S

### 5.4.1 Extração do tecido adiposo

Após o procedimento anestésico com mistura de cetamina (50mg/Kg, Dopalen®, Vertebrands, Paulínia, SP, BRA) e xilazina (10mg/Kg, Anesadan®, Vertebrands, Paulínia, SP, BRA), foi realizada a tricotomia no abdômen dos ratos isogênicos machos e higienizados com álcool 70%. Em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil), os ratos foram seccionados na região inguinal de onde foi retirado o tecido adiposo e armazenado em PBS (phosphate-buffered saline) a 4°C. O tecido foi digerido mecanicamente até chegar aproximadamente em partículas

de 1mm. Posteriormente, foi submetido à digestão enzimática em solução de colagenase tipo 1A a 0,075% a 37°C por 45-60 minutos (100mg – C2674, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA) diluída em PBS. O tecido foi incubado à 37°C por 45 minutos em agitador horizontal. Para inativar a digestão enzimática foi adicionado 5ml de soro fetal bovino e em seguida, centrifugado à 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet obtido foi ressuspensionado em DMEM-Low suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), 1% penicilina G e estreptomicina (P/S). As células foram transferidas para a garrafa de cultivo e levada para estufa à 37°C. Dessa forma, esta se constitui a passagem zero do cultivo celular. Após 24 horas a cultura foi lavada com PBS 1x (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1,4mM; pH 7.4) para remoção de metabólitos e outras células não aderidas. Realizou-se a re-incubação em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Invitrogen, EUA) a cada dois dias. Quando as células atingiram confluência de 80%, usualmente 5-7 dias após o plaqueamento inicial (passagem zero), foram desaderidas da garrafa com solução de tripsina-EDTA 0,25% e replaqueadas a  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> de acordo com protocolos descrito por ZUK, 2002; TUBY et al., 2007 e BASSANEZE, 2010. O cultivo foi realizado até a passagem 3 para serem injetadas no espaço intra-articular do joelho das ratas isogênicas Fishe-344.

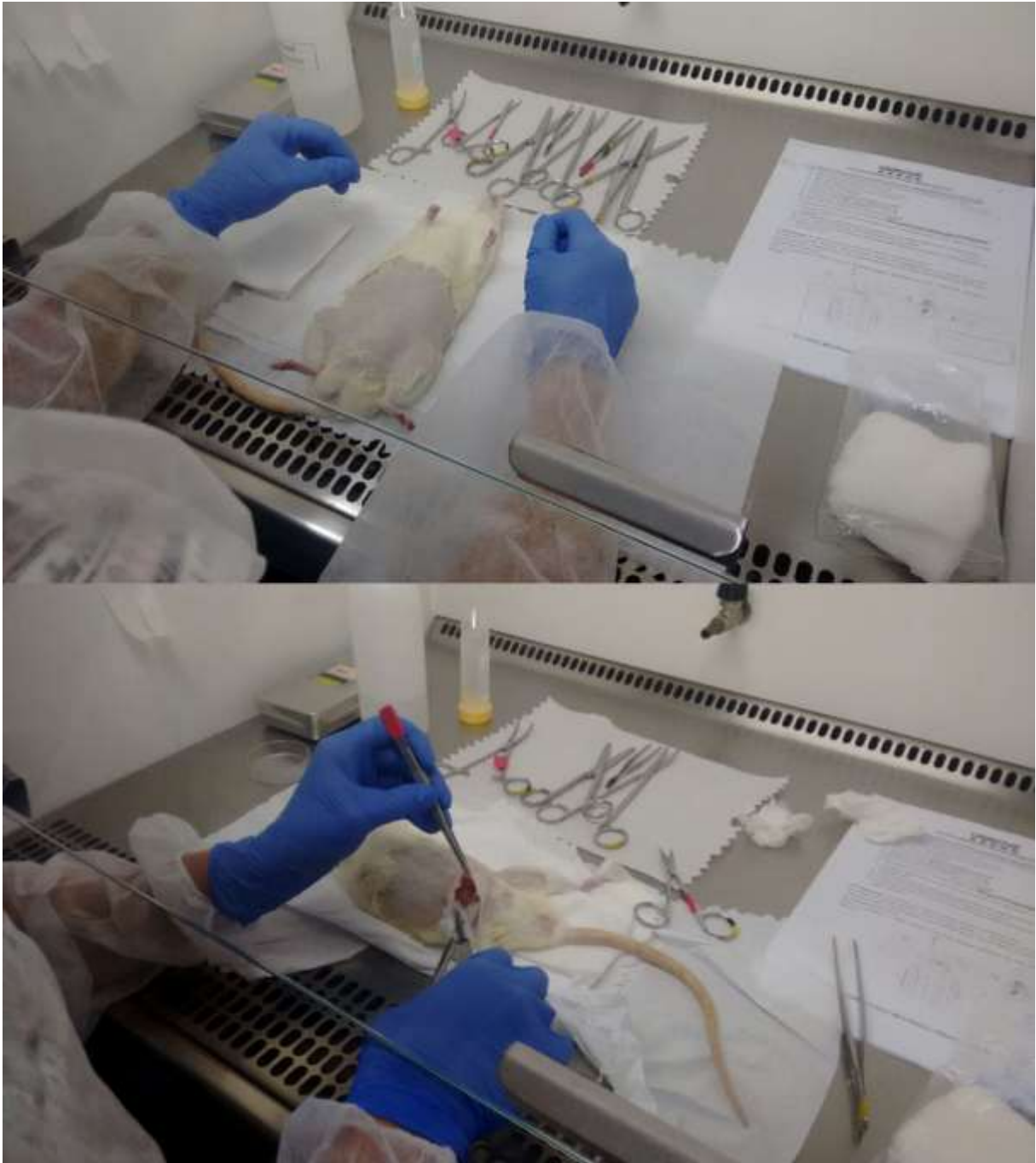


Figura 3. Procedimento de extração de tecido adiposo em ratos Fischer 344, macho para posterior isolamento de cultura de células tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (ADSC's).



Figura 4. Adipocitos obtidos e colocados em tubo falcon com meio de cultura.



Figura 5. Garrafa de cultivo primário contendo meio de cultura suplementado.

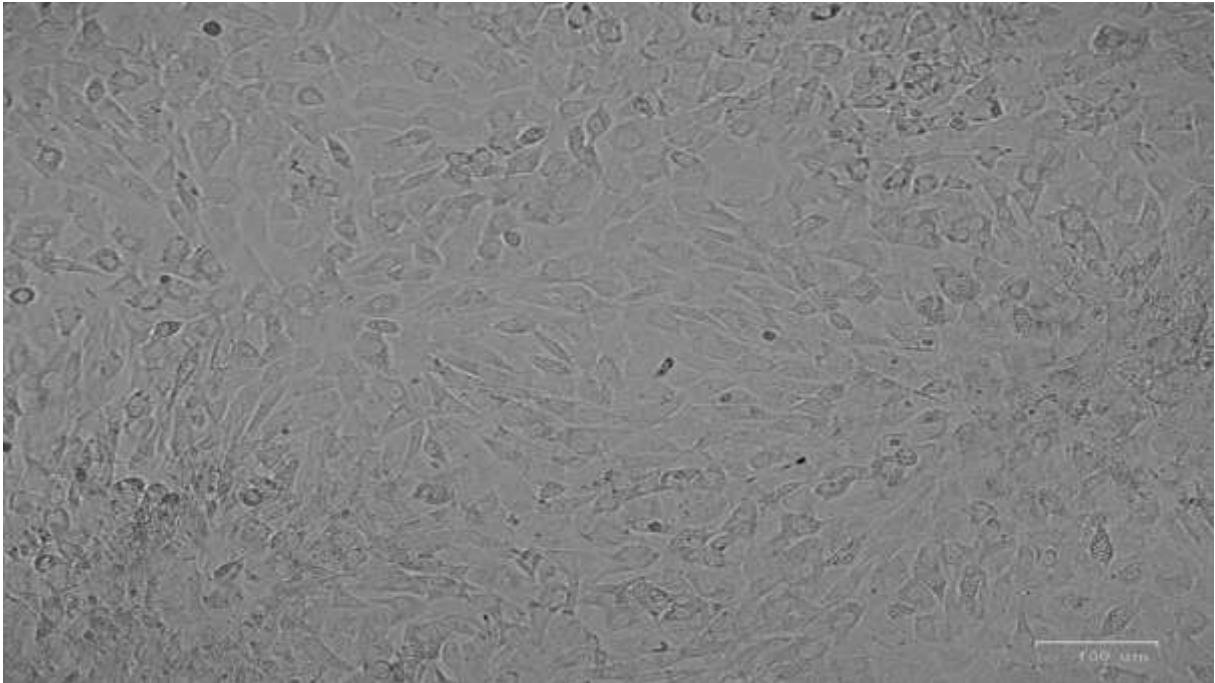


Figura 6. Foto capturada da garrafa de cultura primária com alta confluência através do equipamento ZOE™ Fluorescent Cell Imager, Biorad®.

#### 5.4.2 Validação da extração de ADSC's

As células foram removidas da placa com tripsina-EDTA 0,25% e  $1 \times 10^6$  de células foram divididas em dois tubos de  $5 \times 10^5$  e ressuspendidas em 200  $\mu$ l de PBS. Em seguida, foram incubadas com 1 mg de isotiocianato de fluoresceína e ficoeritrina (PE) conjugados com anticorpos monoclonais de superfície CD45 FITC e CD90 PE (Becton Dickinson - BD®, East Rutherford, NJ, EUA) para caracterização fenotípica e 7AAD (Biolegend®, San Diego, CA, EUA) para avaliar as células em necrose, durante 30 min a 7°C. Prosseguiu-se com três lavagens em PBS contendo 2% de SFB e 0,1% de azida de sódio. O anticorpo primário CD90 (BD Biociências) foi analisado como marcador positivo para ADSC's, para controle negativo, foi utilizado para a marcação das ADSC's o anticorpo primário CD45 (BD Biociências). Estes marcadores de membrana fazem parte dos critérios proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e são específicos para ADSC's (The International Society for Cellular Therapy). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo Accuri C6 (Accuri Cytometers, Inc. Ann Arbor, MI USA) e os dados analisados utilizando o Software Accuri (CFlow Plus, Ver. 1.0.202.1) (OLIVEIRA et al., 2014).

## 5.5 CULTIVO

O cultivo foi realizado em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Invitrogen, EUA) suplementado com 9% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (1000UI/ml-1000mg/ml; GIBCO BRL, Gaithersburg). As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A monitorização do crescimento celular foi conduzida a cada 48 horas em microscópio de fase invertida (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) quando a monocamada celular atingiu 90% de confluência. Para isto, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com tampão PBS 1x (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM; pH 7.4) e tratadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% por 3 min a 37°C para desprendimento das células aderidas à garrafa. Em seguida, foi realizada a lavagem com meio para inativação enzimática e posterior centrifugação a 1500 rpm a 20°C por 5 min (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil).

Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado celular desfeito e as células foram novamente suspensas em meio DMEM descrito acima. A viabilidade celular foi determinada com *Trypan Blue* 0,4% (Sigma, St. Louis, MO, USA) e a contagem das células foi realizada por avaliação microscópica em câmara de Neubauer.





Figura 7. Foto capturada da garrafa de cultivo (passagem 3) sem atingir confluência em microscópio invertido.

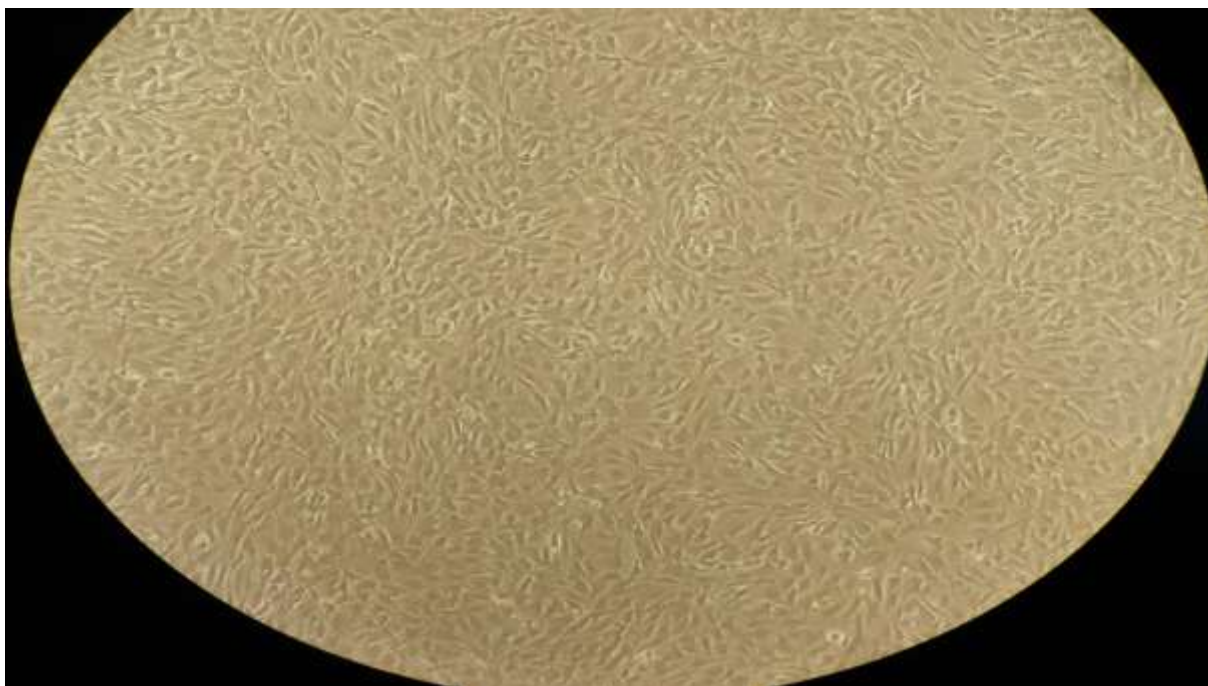


Figura 8. Foto capturada da garrafa de cultivo (passagem 3) com alta confluência em microscópio invertido.

## **5.6 INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE E PROCEDIMENTO DE TRANSPLANTE**

### **5.6.1 Indução da Osteoartrite**

Os animais foram anestesiados antes de cada infiltração da substância indutora da lesão cartilaginosa, com uma mistura de cetamina(50mg/Kg, Dopalen®, Vetbrands, Paulínia, SP, BRA) e xilazina (10 mg/Kg, Anesadan®, Vetbrands, Paulínia, SP, BRA) por via peritoneal.

Após o procedimento anestésico foram realizadas três infiltrações no joelho direito e esquerdo da pata traseira de cada animal com solução de papaína 4%, dissolvida em 10µl de solução salina e adicionado 10 µl solução de cisteína (0,03 M). Essa solução foi utilizada como ativadora para produzir a lesão sendo injetada por três vezes. Onde houve um intervalo de 15 dias entre a primeira e a segunda infiltração e dez dias para a terceira infiltração (DA ROSA et al., 2012; ALVES et al., 2013). Após cinco dias o tratamento foi iniciado (Figura 9). Foi utilizado como medicamento analgésico o Tramadol por 3 dias após a indução da lesão na dose de 0,1 ml/animal, de 4/4 horas para evitar que os animais sintam dor.

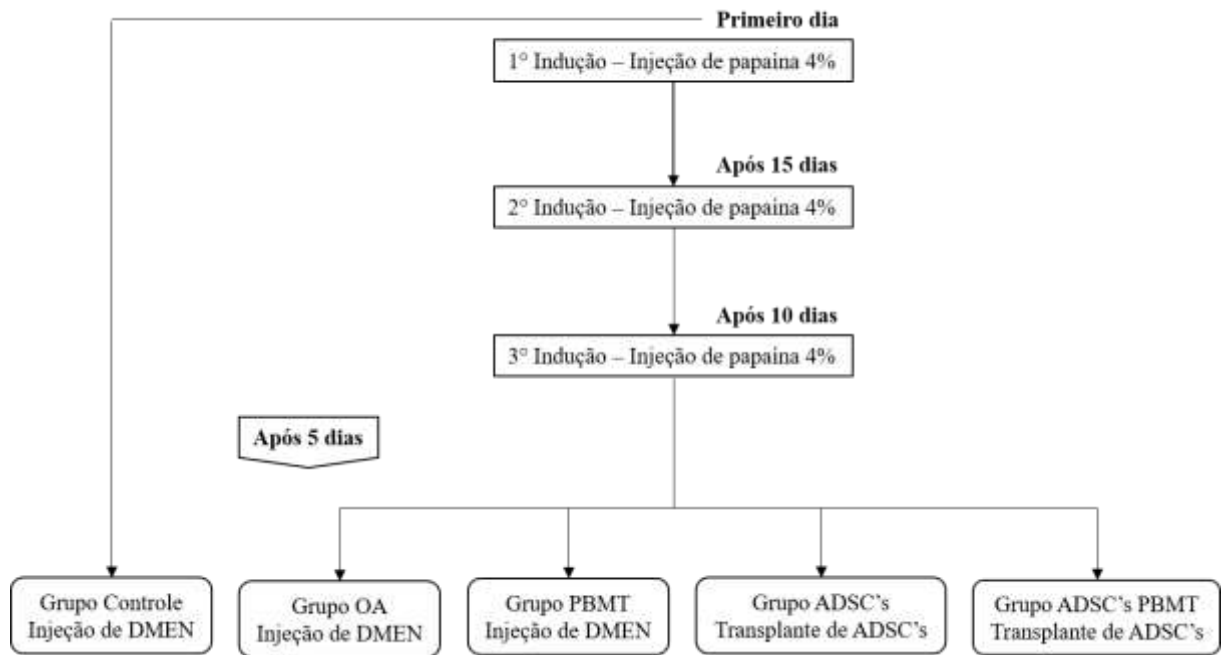


Figura 9. Fluxograma do protocolo da fase experimental



Figura 10. Indução da Osteoartrite com injeção articular de 20 microlitros de papaína 4% associada à cisteína.

### 5.6.2 Procedimentos de transplante

O transplante celular foi conduzido após 5 dias após a terceira infiltração de papaína para permitir que a fase inflamatória inicial cessasse e o dano estrutural articular possa ocorrer. Cerca



de  $1 \times 10^6$  de células-tronco foram diluídas em 100 $\mu$ l de meio DMEM modificado com SFB e penicilina-estreptomicina. Após anestesia com cetamina (50mg/Kg, Dopalen®, Vertbrands, Paulínia, SP, BRA) e xilazina (10 mg/Kg, Anesadan®, Vetbrands, Paulínia, SP, BRA), foi injetado 20 $\mu$ l desta solução no espaço articular dos joelhos direito e esquerdo dos ratos (MATSUMOTO et al. 2009). Animais dos Grupos Sham, Osteoartrite e Osteoartrite+FBM receberam somente meio DMEM em seus joelhos.

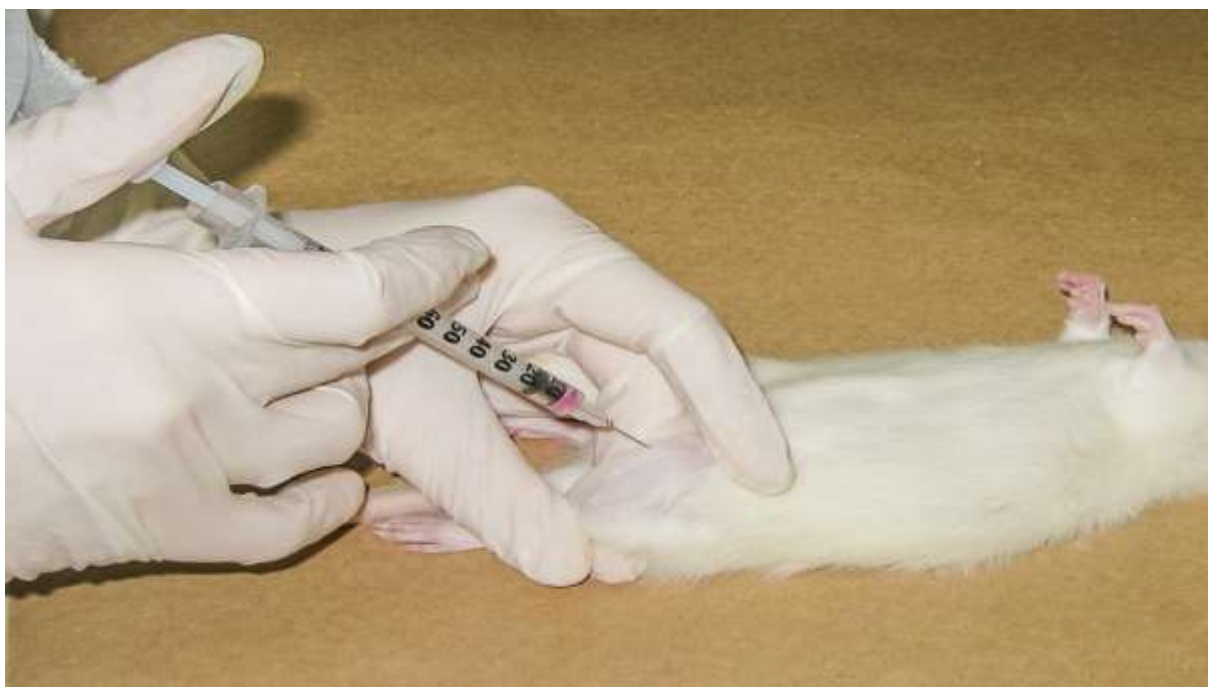


Figura 11. Procedimento de transplante celular.

## 5.7 APLICAÇÕES DA FOTOBIMODULAÇÃO ATRAVÉS DE LASER

Foi utilizado o Laser da marca DMC® modelo Photon Laser III, meio ativo de Fosfeto Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) onde a descrição dos parâmetros se encontram na Tabela 1. A aplicação foi realizada através de quatro pontos pelo método transcutâneo seguindo a linha articular nos compartimentos: medial, lateral, anterior e posterior da articulação do joelho direito e esquerdo de cada animal. A aplicação foi realizada em dias consecutivos pelo período de 7 dias.

<b>Parâmetros Utilizados</b>	
<b>Potência</b>	50mW
<b>Densidade de Potência</b>	3,5W/cm <sup>2</sup>
<b>Densidade de energia</b>	71,2J/cm <sup>2</sup>

<b>Comprimento de onda</b>	$\lambda 808\text{nm}$
<b>Meio ativo</b>	Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP)
<b>Área do feixe</b>	$0,028\text{cm}^2$
<b>Energia</b>	2J
<b>Tempo</b>	40s por ponto
<b>Aplicação</b>	4 pontos: lateral, medial, anterior e posterior

Tabela 1. Parâmetros utilizados na fotobiomodulação



Figura 12. Ilustração da aplicação da fotobiomodulação.

## 5.8 EUTANÁSIA

De acordo com o período experimental (3 e 7 dias) os animais foram identificados, pesados e, posteriormente, sofreram eutanásia através da administração de Pentobarbital de sódio com dose de  $200\text{mg/kg}$  (DL) por via intraperitoneal associado à lidocaína  $10\text{mg/ml}$  (Xylestesin - Cristália).

Após a eutanásia foi realizada a tricotomia dos joelhos direitos e esquerdos com lâmina de barbear. O animal então foi posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução. As articulações dos joelhos, direito e esquerdo, de cada animal foram retiradas, onde se obteve 10 cartilagens articulares por tempo experimental. Estas foram

imediatamente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriormente se realizar as análises através de RT/PCR.

## 5.9 QUANTIFICAÇÃO DAS ADSC'S TRANSPLANTADAS

A presença das CTMs transplantadas foi analisada em amostra de tecido articular provindo de animais dos grupos Osteoartrite+CTMs e Osteoartrite+FBM+CTMs. Para acompanhamento temporal da presença na cartilagem das CTM's, amostras foram coletadas após 3 e 7 dias de implantação. A detecção do gene Sry (*sex-determining region Y*), localizado especificamente no cromossomo Y das ADSC'ss, realizada através do RT/PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) em tempo real conforme método descrito adiante.

## 5.10 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA (RT/PCR)

O RNA total foi extraído da cartilagem articular. Os tecidos congelados, pesando entre 20 e 40 mg, foram homogeneizadas em Trizol<sup>®</sup> Reagent para extração do RNA total conforme instruções do fabricante. Em seguida, 200  $\mu\text{l}$  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,  $12000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril, e foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10min, e foram novamente centrifugadas ( $12000\times g/4^{\circ}\text{C}/10$  min). 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 ( $12000\times g/4^{\circ}\text{C}/10$  min), e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 50  $\mu\text{l}$  de água DEPC, e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  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 260 nm. Foram utilizadas apenas amostras livres de contaminantes e de proteínas ( $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ ).

### 5.10.1 Síntese de cdna - Transcrição reversa

650 ng de RNA total foi utilizado para síntese de cDNA e para análise de expressão gênica por PCR em tempo real. Inicialmente, o DNA contaminante foi removido através DNase I (Invitrogen), na concentração de 1uni/μg RNA na presença 1 ul de solução contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 8 ul de RNA por 15 min a 37 °C, seguido de incubação a 65°C durante 10 minutos para inativação da enzima, totalizando 10 ul. Logo após a purificação, foram realizadas as reações de transcrição reversa (RT), para a síntese do cDNA. Ao RNA foram adicionados 2 μl de tampão de incubação (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,4, 20 mM e MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM), 1 unidade de transcriptase reversa (Invitrogen), 2μl de Randon Primer (Invitrogen) 0,8 μl de oligonucleotideos (DNTPs, 100 mM) e 4,2 ul de H<sub>2</sub>O ultrapura para uma reação final de 20 μl. As amostras foram então submetidas às seguintes incubações: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min. Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C. Todas as amostras foram submetidas a um PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green (Applied Biosystems) para a detecção dos genes alvo. A reação foi realizada em um sistema de PCR em tempo real (modelo 7500 FAST, Applied Biosystems, EUA), seguindo o seguinte protocolo: a 2,0 μl de cDNA, foram adicionados 1μl de primer iniciador senso (10 μM), 1 ul de primer iniciador antisenso (10μM), 10μl de Master Mix 2X (Applied Biosystems) e água suficiente para 20μl de reação. As condições dos ciclos térmicos foram: uma fase inicial de 50°C por 20 segundos, 95 ° C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 ° C durante 15 s e 60 ° C durante 1 min. As análises foram realizadas em duplicata para cada ponto de dados. Os genes diferencialmente expressos foram normalizados pelo nível de expressão dos genes *housekeeping* Beta Actina, cuja expressão mostrou-se inalterada nas condições experimentais. Os *primers* utilizados para o PCR em tempo real foram:

Description Gene/Protein	Accession	Forward primer	Reverse primer
Beta Actina	NM_031144.3	5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3'	ACATCTGCCTGGAAGGTGGAC-3'
IL-6	NM_012589.2	5'-GAGGAGACTTCACAGAGGAT-3'	5'-TCCTTAGCCACTCCTTCTGT-3'
TNF-α	NM_012675.3	5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3'	5'-GCAGCCTGTCCCTTGAAGA-3'
IL-1β	NM98820.1	5'-CAGGAAGGCAGTGTCACTCA-3'	5'-GGGATTTTGTCTGTTGCTTGT-3'
IL-10	NM_012854.2	5'-TTGAACCACCCGGCATCTAC-3'	5'-CCAAGGAGTTGCTCCCGTTA-3'
MMP-1	NM_001134530.1	5'-CAGCTCATA CAGTTTCCCCGT-3'	5'-TTAGCTTGGACGTCTTCACCC-3'
MMP-2	NM_031054.2	5'-TCCCAGATCTGCAAGCAAG-3'	5'-TGTCACGTGGTGTCACTGTC-3'
TIMP-1	NM_053819.1	5'-GACACGCTAGAGCAGATACCA-3'	5'-AGAAAGCTGTCTGTGGGTGG-3'
TIMP-2	NM_021989.2	5'-GCTGGACGTTGGAGGAAAGA-3'	5'-TGATGCTAAGCGTGTCCAG-3'
COL2AL	NM_012929.1	5'-GGCCAGGATGCCCGAAAATTA-3'	5'-GTCACCTCTGGGTCTTGTTC-3'

---

<b>SRY</b>	NM_012772.1	5'-CTTTGCAGCGTGAAGTTGCC-3'	5'-AGCCCAGTCCTGTCCGTAT-3'
------------	-------------	----------------------------	---------------------------

---

Tabela 2. Relação dos primers a serem utilizados para o RT/PCR

### 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2007 e inicialmente avaliados quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, concluindo como resultado a distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA One Way e “*post hoc test*” o teste de Tukey. Para a análise dos dados foi utilizado o Software GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Adotando um nível de significância de 5%.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ADSC'S ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

As células isoladas dos ratos machos Fisher-344 foram caracterizadas na passagem 0 através da análise por citometria de fluxo. A análise resultou num perfil fenotípico para a população de células-tronco mesenquimais derivadas de adipócitos onde foram caracterizadas como: CD90<sup>+</sup> com 99,6% e CD45<sup>-</sup> com 0,2% (Figura 16 - B), marcadores de membrana específicos para CTM's. Estes resultados se enquadram nos critérios proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (The Internacional Society for Cellular Therapy). Na Figura 13. (A) podemos observar a diferença entre as marcações dos anticorpos, onde o CD45 foi significativamente menor que o CD90 ( $p < 0,001$ ).

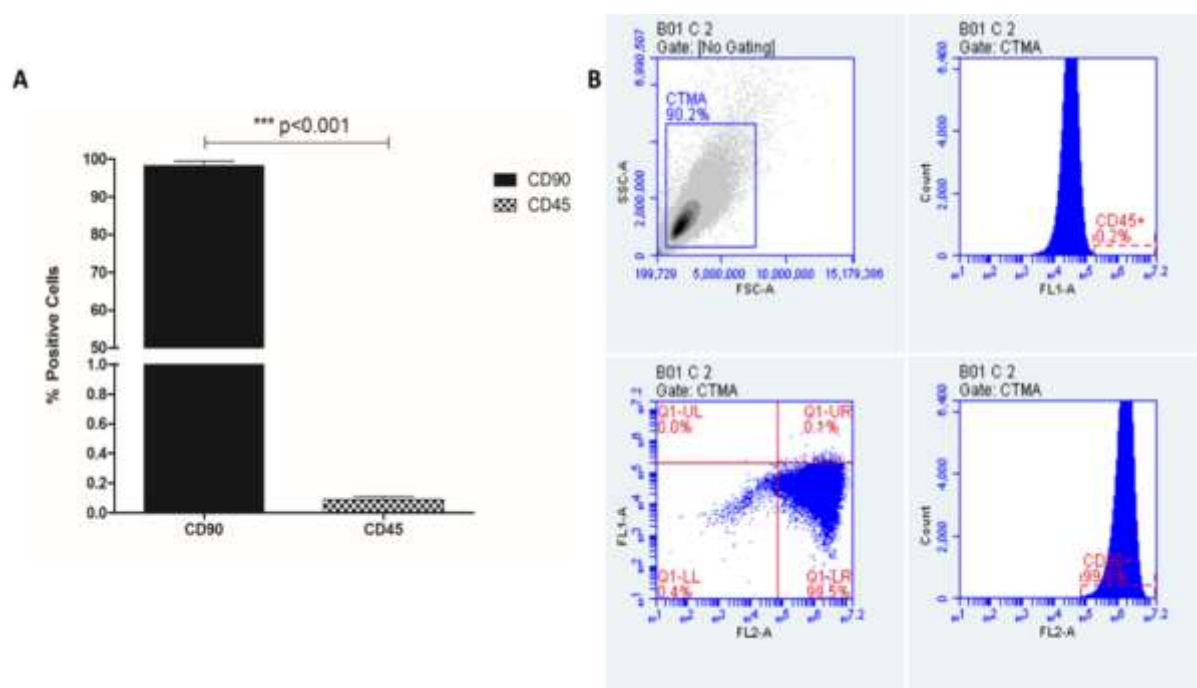


Figura 13. As características das ADSC's foram determinadas através da citometria de fluxo. Em (A), pode-se observar a diferença entre células marcadas com CD90 e CD45. O teste t de Student foi utilizado para determinar os valores de p. \*\*\* indica  $p < 0,0001$  para comparações com CD90. (B) Validação e fenotipagem por citometria de fluxo usando anticorpos anti-CD45 e anti-CD90. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 6.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA (RT/PCR)

### 6.2.1 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) do cromossomo Y (SRY - *sex-determining region Y*)

A análise do cromossomo Y através do PCR demonstrou redução significativa da sobrevivência das ADSC's após 7 dias do transplante ( $p < 0,0001$ ). Foram detectadas células um dia após a injeção nos grupos OA ADSC's ( $0,523 \pm 0,03$ ) e OA ADSC's PBMT ( $0,45 \pm 0,37$ ). Após 7 dias estes valores diminuíram, com uma queda percentual de 63,1% para o grupo OA ADSC's, isto é,  $0,12 \pm 0,02$  e 56,4% para o grupo OA ADSC's PBMT equivalente à  $0,2 \pm 0,06$ , como mostra a figura abaixo.

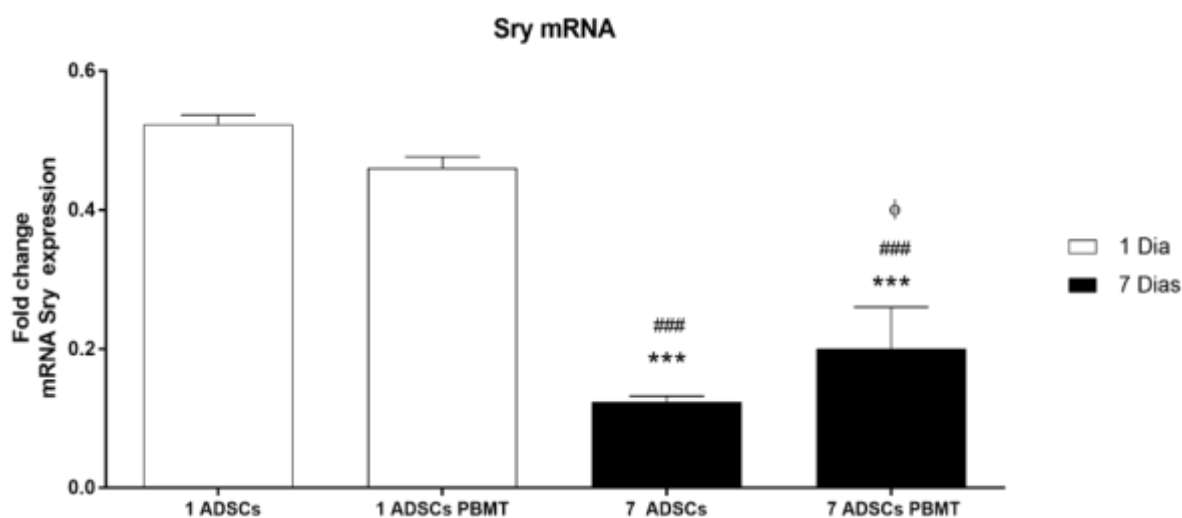


Figura 14. Amplificação RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) das células provenientes de ratos machos, transplantadas nos grupos tratados com a terapia por células-tronco, onde foi analisado o gene SRY específico localizado no cromossomo Y em amostras selecionadas de ambos os grupos (OA ADSCs e OA ADSC PBMT) após 1 e 7 dias de transplante celular. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*\*\* denota  $p < 0,001$  para comparações com o grupo OA ADSC analisadas 1 dia após o transplante; ### indica  $p < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC's PBMT analisadas 1 dia após o transplante;  $\phi$  indica  $Pp < 0,05$  para comparações com o OA ADSC's analisadas 7 dias após o transplante. Os valores de p foram determinados usando o teste de Tukey.

### 6.2.2 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de IL-1 $\beta$

Na análise da expressão gênica de IL-1 $\beta$  no tempo experimental de 3 dias podemos observar na Figura 15 (A) diferenças mais elevadas ( $p < 0,0001$ ) do grupo OA ( $3,49 \pm 0,38$ ) e do grupo OA PBMT ( $2,84 \pm 0,30$ ) em relação ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ). O grupo OA ADSC's ( $1,97 \pm 0,39$ )

também mostrou aumento significativo quando comparado ao grupo Controle, assumindo um valor de  $p < 0,001$ . Já o grupo OA ADSC's PBMT ( $1,18 \pm 0,14$ ) foi o único a não ter diferença estatística em relação ao grupo Controle. Quando comparados ao grupo OA todos os grupos intervencionais apresentaram diminuição significativa da expressão de IL-1 $\beta$ , o grupo OA PBMT com valor  $p < 0,05$  e os grupos com injeção de células-tronco com  $p < 0,0001$  mostrando mais eficiência na modulação desta citocina. O grupo ADSC's PBMT apresentou maior eficiência na diminuição da expressão gênica de IL-1- $\beta$  em relação ao grupo OA PBMT ( $p < 0,0001$ ) e ao grupo OA ADSC's ( $p < 0,01$ ). A diferença entre estes dois últimos grupos, mostrou que num primeiro momento, o tratamento com injeção de células-tronco tem maior eficiência, visto que houve maior diminuição da expressão no grupo OA ADSC's ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo OA PBMT.

Já no tempo experimental de 7 dias, manteve-se a diferença entre o grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) e o grupo OA ( $3,60 \pm 0,35$ ) ( $p < 0,0001$ ). Comparando com os grupos intervencionais o grupo OA ADSC's PBMT continuou não apresentando diferença estatística em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Já os grupos OA PBMT ( $1,77 \pm 0,16$ ) ( $p < 0,05$ ) e OA ADSC's ( $1,99 \pm 0,71$ ) ( $p < 0,01$ ) apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Controle. Ao comparar os grupos intervencionais com o grupo OA, todos apresentaram diminuição significativa na expressão gênica de IL-1 $\beta$  ( $p < 0,0001$ ). O grupo que associou as terapias, apresentou melhores resultados, com diferença estatística em comparado aos outros tratamentos, assumindo um valor de  $p < 0,01$  em relação ao grupo OA ADSC's e de  $p < 0,05$  para o grupo OA PBMT. A comparação entre os dois últimos grupos não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Frente a estes resultados podemos observar que o grupo OA ADSC's PBMT obteve maior eficiência na modulação da citocina. Pode-se ressaltar também que o grupo que utilizou a fotobiomodulação demonstrou melhor modulação quando irradiado por mais dias (Figura 15.B).



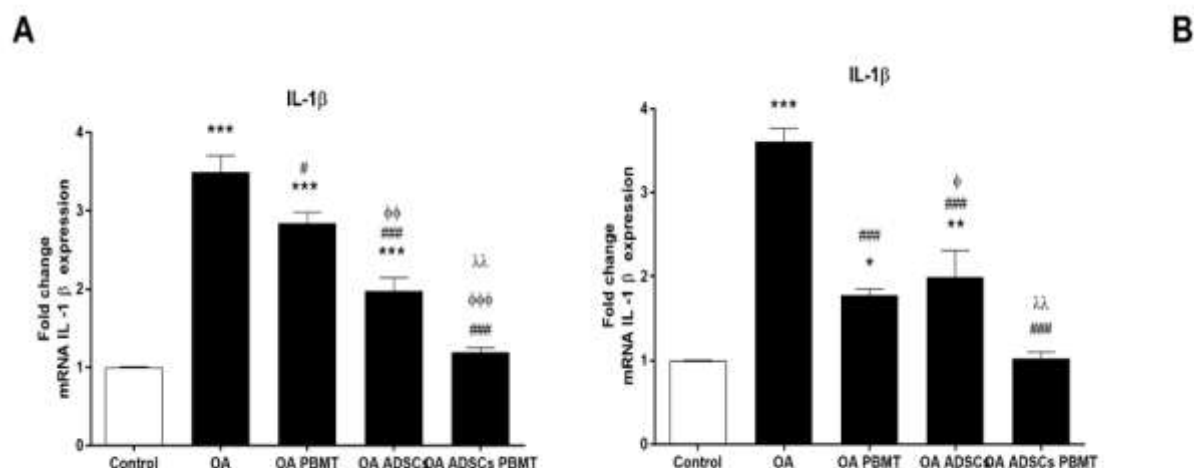


Figura 15. Comparação dos níveis de expressão gênica de IL-1 $\beta$  na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*: P < 0,05, \*\*: P < 0,001, \*\*\*: P < 0,0001 para comparações com o grupo de controle; #: P < 0,05, ##: P < 0,001, ###: P < 0,0001 para comparações com o grupo OA;  $\phi$ : P < 0,05,  $\phi\phi$ : P < 0,001,  $\phi\phi\phi$ : P < 0,001 para comparações com o grupo OA PBMT.  $\lambda$ : P < 0,05,  $\lambda\lambda$ : P < 0,001,  $\lambda\lambda\lambda$ : P < 0,0001 para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey.

### 6.2.3 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de IL-6

Analisando a expressão gênica de IL-6 no tempo experimental de 3 dias, podemos observar (Figura 16.A) diferença estatística entre os grupos Controle (1,0 $\pm$ 0,15) e OA (3,04 $\pm$ 0,40) com  $p < 0,0001$ . Quando comparado aos grupos intervencionais, não houve diferença significativa em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, ao comparar os grupos que receberam tratamento ao grupo OA, podemos observar diminuição significativa da expressão gênica de IL-6 ( $p < 0,0001$ ). Entre eles, o grupo OA ADSC's PBMT (1,18 $\pm$ 0,14) mostrou diminuição acentuada na expressão de IL-6, porém sem diferença estatística quando comparado aos grupos OA PBMT (0,91 $\pm$ 0,08) e OA ADSC's (1,17 $\pm$ 0,10) ( $p > 0,05$ ).

No tempo experimental de 7 dias, o comportamento foi o mesmo que o tempo anterior, onde o grupo Controle (1,0 $\pm$ 0,15) apresentou diferença significativa em relação ao grupo OA (1,70 $\pm$ 0,17) com  $p < 0,01$ . Os grupos que receberam tratamento, continuaram a modular a expressão gênica de IL-6 não apresentando diferença significativa em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Já em relação ao grupo OA, os grupos OA PBMT (1,19 $\pm$ 0,50) e OA ADSC's (1,19 $\pm$ 0,19) apresentaram diminuição da expressão assumindo um valor de  $p < 0,05$ . Enquanto o grupo OA ADSC's PBMT (0,58 $\pm$ 0,08) mostrou-se mais eficiente na modulação de IL-6,

diminuindo acentuadamente, assumindo um valor de  $p < 0,0001$ . Este último, quando comparado aos demais tratamentos apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O mesmo não foi observado na relação entre os grupos OA PBMT e OA ADSC's ( $p > 0,05$ ). Desta forma, sabendo o papel da citocina IL-6, podemos sugerir que todos os tratamentos foram eficientes em diminuir a dor articular, característica da osteoartrite, sendo o mais eficiente, o grupo que associou as terapias.

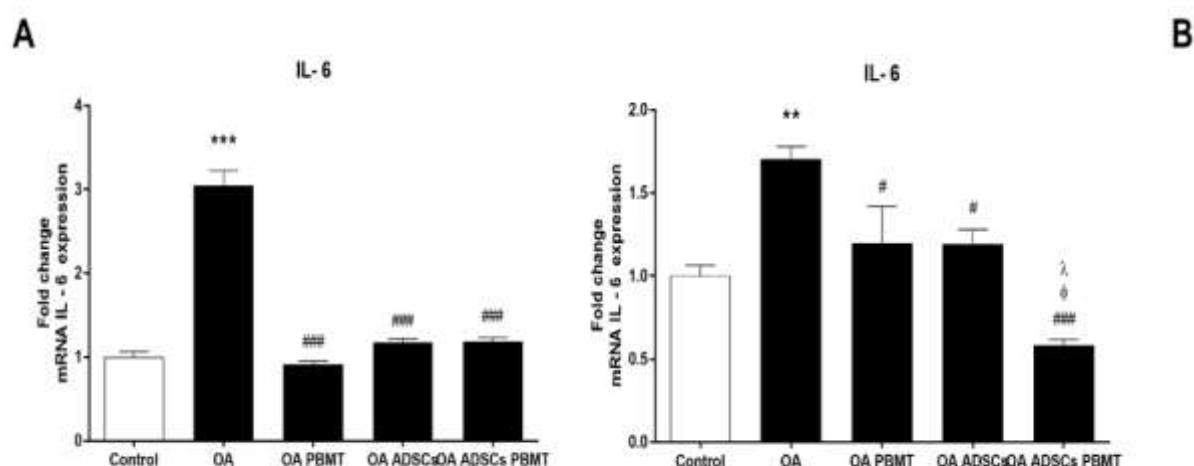


Figura 16. Comparação dos níveis de expressão gênica de IL-6 na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA; φ:  $P < 0,05$ , φφ:  $P < 0,001$ , φφφ:  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT. λ:  $P < 0,05$ , λλ:  $P < 0,001$ , λλλ:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

#### 6.2.4 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de TNF- $\alpha$

No tempo experimental de 3 dias, quando comparados ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ), o grupo OA ( $2,46 \pm 0,31$ ) apresentou aumento elevado na expressão de TNF- $\alpha$  com diferença estatística ( $p < 0,0001$ ). O mesmo foi observado em relação aos grupos OA PBMT ( $1,86 \pm 0,06$ ) e OA ADSC's ( $1,83 \pm 0,24$ ) ( $p < 0,0001$ ). O grupo OA ADSC's PBMT ( $1,14 \pm 0,13$ ) foi o único a não apresentar diferença significativa em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Quando comparados ao grupo OA, todos os grupos que receberam tratamento apresentaram diminuição significativa com  $p < 0,001$  para os grupos OA PBMT e OA ADSC's e  $p < 0,0001$  para o grupo OA ADSC's PBMT. Entre os grupos OA PBMT e OA ADSC's não foi observado diferença significativa

( $p > 0,05$ ), mas quando comparamos estes dois ao grupo OA ADSC's PBMT podemos observar diferença estatística ( $p < 0,001$ ).

Analisando o tempo experimental de 7 dias, apenas os grupos OA ( $4,82 \pm 0,19$ ;  $p < 0,0001$ ) e OA ADSC's ( $1,80 \pm 0,50$ ;  $p < 0,01$ ) apresentaram diferença estatística em relação ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ). Quando comparados ao grupo OA, todos os grupos que receberam tratamento foram efetivos na diminuição da expressão de TNF- $\alpha$ , como pode ser observado na Figura 17 abaixo ( $p < 0,0001$ ). Entre os grupos OA PBMT ( $1,42 \pm 0,17$ ) e os que receberam a injeção de células-tronco não houve diferença estatisticamente significativa, porém, ao comparar os grupos OA ADSC's e OA ADSC's PBMT ( $1,17 \pm 0,17$ ) houve diferença entre os valores assumindo o valor de  $p < 0,05$ . Podemos sugerir que os tratamentos diminuíram a degradação da cartilagem, visto que a TNF- $\alpha$  exerce um importante papel estimulando a síntese de II-1 $\beta$  e das MMP's.

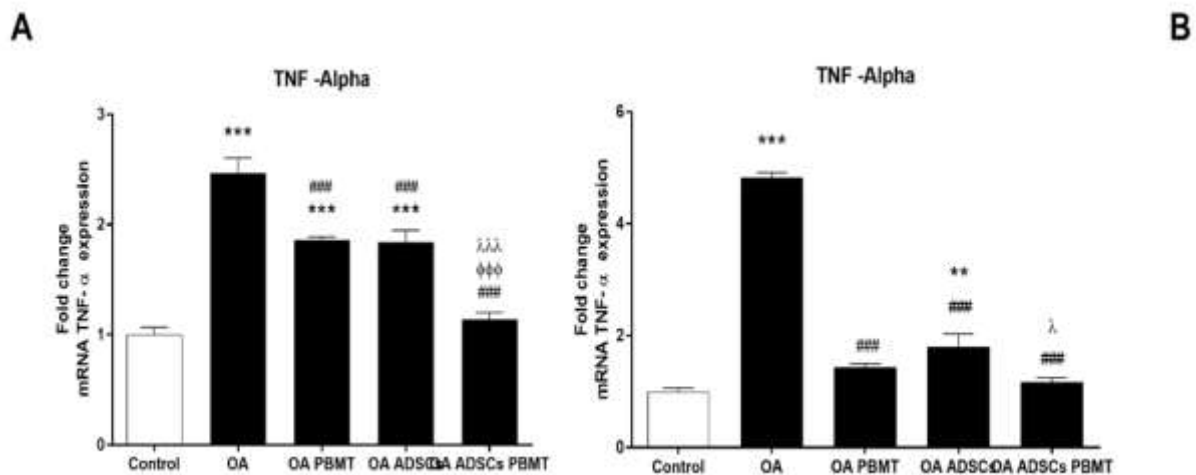


Figura 17. Comparação dos níveis de expressão gênica de TNF- $\alpha$  na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA;  $\phi$ :  $P < 0,05$ ,  $\phi\phi$ :  $P < 0,001$ ,  $\phi\phi\phi$ :  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT.  $\lambda$ :  $P < 0,05$ ,  $\lambda\lambda$ :  $P < 0,001$ ,  $\lambda\lambda\lambda$ :  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

### 6.2.5 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de IL-10

Podemos observar no tempo experimental de 3 dias uma diminuição acentuada no grupo OA ( $3,47 \pm 0,07$ ) em relação ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) com valor de  $p < 0,0001$ . Porém, os grupos que receberam tratamento não mostraram diferença em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Quando comparados ao grupo OA, os grupos OA PBMT ( $0,92 \pm 0,23$ ) e OA ADSC's ( $0,84 \pm 0,05$ )

aumentaram a expressão gênica de IL-10 com  $p < 0,001$ , e em relação ao grupo OA ADSC's PBMT ( $1,24 \pm 0,22$ ) o aumento foi ainda maior, assumindo um valor de  $p < 0,0001$ . Houve diferença significativa quando comparado o grupo OA ADSC's PBMT aos grupos OA PBMT ( $p < 0,05$ ) e OA ADSC's ( $p < 0,01$ ), porém, estes dois últimos não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ).

No tempo experimental de 7 dias, como pode ser observado na Figura 18 (B), podemos observar uma queda na expressão gênica de IL-10, quando comparamos os grupos OA ( $0,54 \pm 0,07$ ;  $p < 0,0001$ ) e OA ADSC's ( $0,74 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) em relação ao Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ). Já os demais grupos não apresentaram diferença significativa quando comparados ao Controle. Os grupos OA e OA ADSC's não mostraram diferença significativa entre si, porém os grupos OA PBMT e OA ADSC's PBMT demonstraram aumento acentuado na expressão gênica de IL-10 em relação ao grupo OA ( $p < 0,0001$ ). Estes dois últimos não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ), mas quando comparados ao grupo OA ADSC's mostraram valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ). Desta forma, podemos observar que os grupos que receberam a fotobiomodulação apresentaram melhores resultados no aumento da expressão gênica desta interleucina anti-inflamatória, com valores iguais ou maiores aos do grupo Controle.

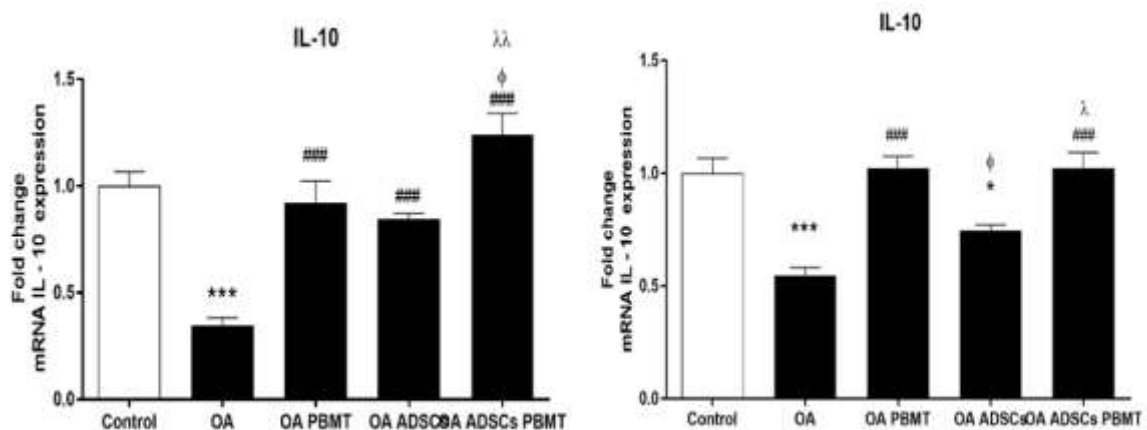


Figura 18. Comparação dos níveis de expressão gênica de IL-10 na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA;  $\phi$ :  $P < 0,05$ ,  $\phi\phi$ :  $P < 0,001$ ,  $\phi\phi\phi$ :  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT.  $\lambda$ :  $P < 0,05$ ,  $\lambda\lambda$ :  $P < 0,001$ ,  $\lambda\lambda\lambda$ :  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

### 6.2.6 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de MMP-1

A expressão gênica de MMP-1 do tempo experimental de 3 dias do grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) apresentou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) comparado com o OA ( $1,83 \pm 0,09$ ). Os grupos OA PBMT ( $0,66 \pm 0,07$ ), OA ADSC`s ( $0,6 \pm 0,09$ ), OA ADSC`s PBMT ( $0,24 \pm 0,03$ ) também apresentaram diminuição estatisticamente significativa onde os tratamentos com transplante de células assumiram um valor de  $p < 0,0001$  em relação ao grupo Controle e o grupo OA PBMT com  $p < 0,001$ . Quando comparados com o grupo OA os grupos que receberam intervenção OA PBMT, OA ADSC`s e OA ADSC`s PBMT apresentaram diminuição significativa na expressão gênica de MMP-1 ( $p < 0,0001$ ). Porém, quando comparados entre si, o grupo OA ADSC`s PBMT mostrou-se mais eficaz na redução da expressão apresentando diferença significativa em relação aos grupos OA PBMT e OA ADSC`s ( $p < 0,0001$ ). Entre os grupos OA PBMT e OA ADSC`s não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

No tempo experimental de 7 dias, o grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) demonstrou diferença significativa ( $p > 0,0001$ ) em relação ao grupo OA ( $1,59 \pm 0,17$ ), e quando comparado aos grupos grupos OA PBMT ( $0,65 \pm 0,07$ ), OA ADSC`s ( $0,51 \pm 0,06$ ) e OA ADSC`s PBMT ( $0,22 \pm 0,02$ ) houve diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) na expressão gênica de MMP-1 nos grupos que receberam intervenção. O mesmo foi observado ao comparar os grupos OA PBMT, OA ADSC`s e OA ADSC`s PBMT com grupo OA ( $p < 0,0001$ ). Os grupos intervencionais continuaram com a tendência de diminuir a expressão gênica de MMP-1, onde o grupo OA ADSC`s PBMT ainda mostrou-se o mais eficaz, apresentando diferença significativa em relação aos grupo OA PBMT ( $p < 0,0001$ ) e OA ADSC`s ( $p < 0,01$ ). Estes últimos continuaram sem apresentar diferença entre si ( $p > 0,05$ ). Desta forma, podemos ver que as intervenções tendem a diminuir expressão de gênica de MMP-1, onde a associação das terapias mostrou-se mais eficaz em diminuir a degradação da matriz cartilaginosa.

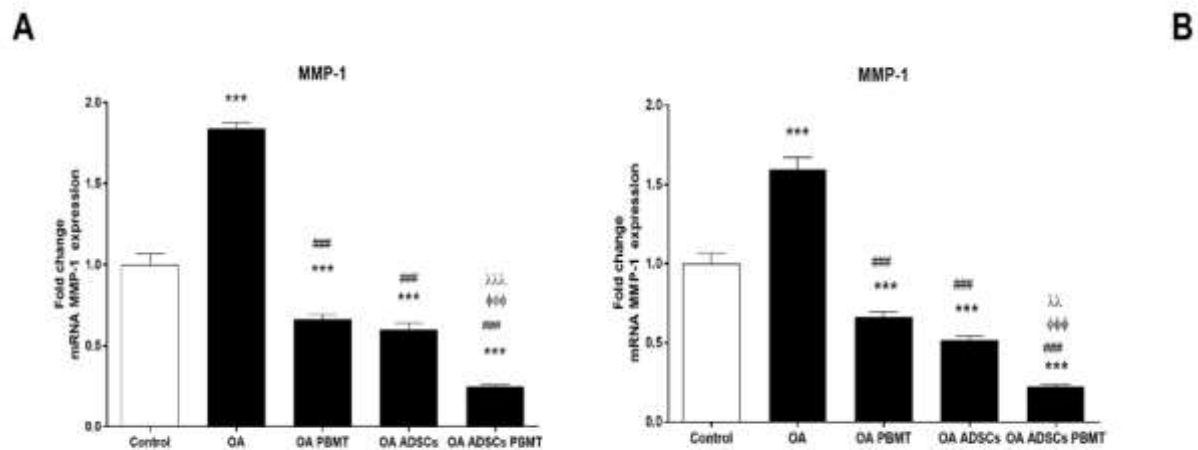


Figura 19. Comparação dos níveis de expressão gênica de MMP-1 na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA;  $\phi$ :  $P < 0,05$ ,  $\phi\phi$ :  $P < 0,001$ ,  $\phi\phi\phi$ :  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT.  $\lambda$ :  $P < 0,05$ ,  $\lambda\lambda$ :  $P < 0,001$ ,  $\lambda\lambda\lambda$ :  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

### 6.2.7 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de MMP-2

A expressão gênica de MMP-2 do grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) no período de 3 dias mostrou-se acentuadamente inferior ( $p < 0,0001$ ) quando comparada ao grupo OA ( $11,10 \pm 1,3$ ) sugerindo que o modelo foi eficiente em iniciar um aumento na degeneração da matriz. Quando comparado com os grupos intervencionais OA PBMT ( $4,95 \pm 0,46$ ) e OA ADSC's ( $6,68 \pm 1,4$ ), também foi observado diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, o grupo OA ADSC's PBMT ( $2,46 \pm 0,5$ ) apresentou maior eficiência na diminuição da expressão gênica de MMP-2 não apresentando diferença significativa em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Quando comparados ao grupo OA todos os grupos modularam a expressão de MMP-1 ( $p < 0,0001$ ). Quando comparados entre si, os grupos que receberam fotobiomodulação exerceram maior atenuação sobre a expressão gênica de MMP-2, apresentando diferença significativa em relação ao grupo OA ADSC's com  $p < 0,05$  para o grupo OA PBMT e  $p < 0,0001$  para o grupo OA ADSC's PBMT. Estes últimos apresentaram diferença entre si ( $p > 0,001$ ). Ao avaliar o tempo experimental de 7 dias vemos que a diferença entre os grupos Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) e os Grupos OA ( $12,72 \pm 1,2$ ) foram acentuadas como pode ser observado na Figura

20.( $p < 0,0001$ ). Todos os grupos intervencionais OA PBMT ( $5,94 \pm 0,56$ ) e OA ADSC's ( $8,04 \pm 1,59$ ) apresentaram diferença estatística em relação ao Controle ( $p < 0,0001$ ) e com  $p < 0,001$  para o grupo OA ADSC's PBMT ( $3,73 \pm 0,6$ ). O mesmo pôde ser observado ao comparar os grupos intervencionais com o grupo OA, onde apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,001$ ). Ao compará-los entre si, novamente os grupos que receberam fotobiomodulação apresentaram diminuição significativa na expressão de MMP-2, apresentando diferença em relação ao grupo OA ADSC's. Entre os grupos com terapia através da fotobiomodulação houve diferença estatística entre eles com  $p < 0,0001$ . Como pode ser observado na Figura 20 estes resultados nos sugerem a que a presença da fotobiomodulação pode influenciar a diminuição da degeneração da matriz cartilaginosa e a associação entre as duas terapias tende a ser ainda mais eficaz.

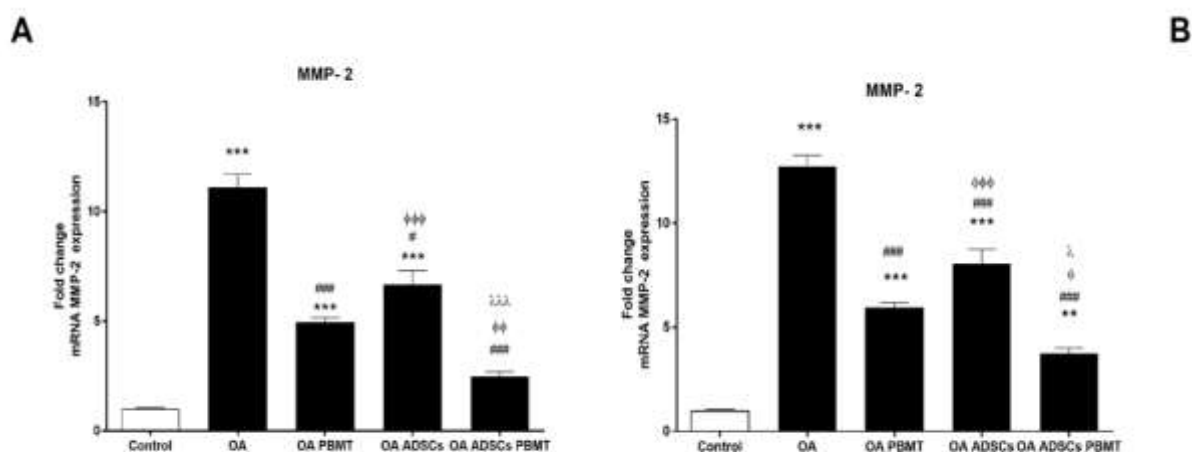


Figura 20. Comparação dos níveis de expressão gênica de MMP-2 na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA;  $\phi$ :  $P < 0,05$ ,  $\phi\phi$ :  $P < 0,001$ ,  $\phi\phi\phi$ :  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT.  $\lambda$ :  $P < 0,05$ ,  $\lambda\lambda$ :  $P < 0,001$ ,  $\lambda\lambda\lambda$ :  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

### 6.2.8 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de TIMP-1

Na análise da expressão gênica de TIMP-1 do tempo experimental de 3 dias observamos que em relação ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) houve uma diminuição da expressão nos grupo OA ( $0,62 \pm 0,19$ ) com  $p < 0,01$ , indicando um aumento na ação das metaloproteinases, ou seja,

aumento na degradação da matriz. Já os grupos OA PBMT ( $0,93 \pm 0,07$ ) e OA ADSC's ( $1,25 \pm 0,20$ ) não apresentaram diferença estatística em relação ao Controle. Porém, no grupo OA ADSC's PBMT ( $1,75 \pm 0,05$ ), houve um acentuado aumento na expressão gênica de TIMP-1, com valor de  $p < 0,0001$  em relação ao Controle. Ao comparar os grupos intervencionais com o grupo OA, os grupos OA ADSC's e OA ADSC's PBMT mostraram maior eficiência no aumento da expressão de TIMP-1 assumindo um valor de  $p < 0,0001$ , enquanto o grupo OA PBMT, também mostrou aumento considerável mas com  $p < 0,05$ . Os grupos que receberam transplante celular demonstraram maior eficiência no aumento da expressão de TIMP-1 apresentando diferença significativa quando comparados com o grupo OA PBMT, sendo maior em relação ao grupo OA ADSC's PBMT ( $p < 0,0001$ ) do que o grupo OA ADSC's ( $p < 0,05$ ). Quando comparados entre si, o grupo OA ADSC's PBMT teve maior eficácia no aumento da expressão gênica de TIMP-1 em relação ao grupo OA ADSC's ( $p < 0,001$ ).

Já no tempo experimental de 7 dias, como pode ser observado na Figura 21 (B), quando comparado ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ), o grupo OA ( $0,54 \pm 0,09$ ) ainda expressaram menor quantidade gênica de TIMP-1, apresentando diferença significativa ( $p < 0,0001$ ). Por sua vez, o grupo OA PBMT ( $1,06 \pm 0,05$ ) não apresentou diferença estatística em relação ao grupo Controle ( $p > 0,05$ ). Os grupos que receberam transplante celular foram mais eficazes aumentando significativamente a expressão gênica de TIMP-1 com  $p < 0,0001$ . Todos os grupos que receberam tratamento apresentaram aumento significativo em relação ao grupo OA ( $p < 0,0001$ ). Quando comparados entre si, os grupos OA ADSC's ( $1,58 \pm 0,11$ ) e OA ADSC's PBMT ( $1,91 \pm 0,06$ ) mostraram-se mais eficazes apresentando diferença significativa em relação ao grupo OA PBMT ( $p < 0,0001$ ). Entre os grupos com terapia celular, o grupo OA ADSC's PBMT manteve o alto valor na expressão de TIMP-1 e apresentando diferença estatística em relação ao grupo OA ADSC's ( $p < 0,001$ ). Dessa forma, podemos sugerir que a terapia com células-tronco exerce grande influência na expressão gênica da TIMP-1 e, quando associada à fotobiomodulação, eleva ainda mais a expressão de TIMP-1, no qual pode diminuir a degeneração da matriz cartilaginosa, visto que sua função é inibir as metaloproteinases.



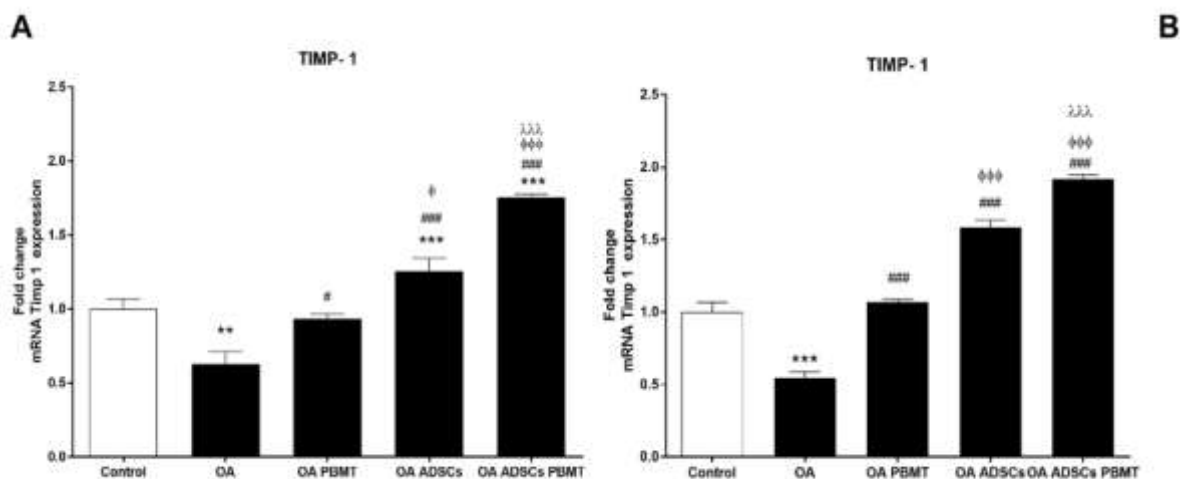


Figura 21. Comparação dos níveis de expressão gênica de TIMP-1 na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA; φ:  $P < 0,05$ , φφ:  $P < 0,001$ , φφφ:  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT. λ:  $P < 0,05$ , λλ:  $P < 0,001$ , λλλ:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

### 6.2.9 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de TIMP-2

Analisando os dados de expressão gênica da TIMP-2 no tempo experimental de 3 dias, podemos observar que quando comparados ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) os grupos OA ( $0,35 \pm 0,07$ ) e OA PBMT ( $0,70 \pm 0,05$ ) demonstraram valores significativamente menores ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$  respectivamente). Já em relação ao grupo OA ADSC's PBMT ( $2,72 \pm 0,13$ ) a diferença em relação ao grupo Controle foi inversa, apresentando um acentuado aumento na expressão gênica de TIMP-2 com valor de  $p < 0,0001$ . O grupo OA ADSC's ( $0,87 \pm 0,13$ ) não apresentou diferença significativa em relação ao Controle ( $p > 0,05$ ). Quando comparados ao grupo OA, todos os grupos que receberam tratamento apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). O grupo OA ADSC's PBMT em relação aos outros grupos intervencionais demonstrou acentuado aumento na expressão gênica de TIMP-2 com valor de  $p < 0,0001$ . Não houve diferença significativa entre os grupos OA ADSC's e OA PBMT ( $p > 0,05$ ).

Podemos observar uma mudança nas relações do tempo experimental de 7 dias onde, em relação ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) o grupo OA ( $0,47 \pm 0,14$ ) apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) diferentemente do grupo OA ADSC's ( $1,40 \pm 0,14$ ) ( $p > 0,05$ ). Já os grupos OA PBMT

( $0,47 \pm 0,14$ ) e OA ADSC's PBMT ( $3,27 \pm 0,48$ ) apresentaram valores maiores com diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,0001$ ). Todos os grupos tratados demonstraram aumento significativo de TIMP-2 em relação ao grupo OA ( $p < 0,0001$ ). Os valores do grupo OA ADSC's PBMT foi evidentemente maiores que os demais grupos intervencionais ( $p < 0,0001$ ). A expressão gênica de TIMP-2, também foi mais elevada no grupo OA PBMT em relação ao grupo OA ADSC's ( $p < 0,01$ ).

A associação das duas terapias mostrou-se superior no estímulo de expressão gênica da TIMP-2 em ambos os tempos experimentais. Podemos observar também, que num primeiro momento, o grupo OA PBMT teve valores inferiores do que os grupos com injeção de CTM's, porém, este cenário mudou, podendo sugerir que os resultados melhoram quando se oferece mais tempo de irradiação.

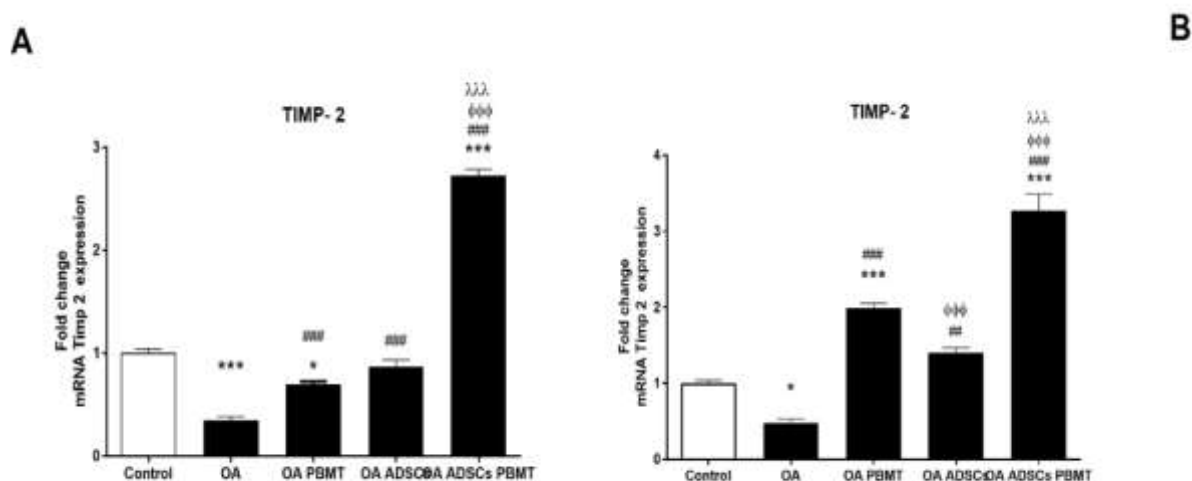


Figura 22. Comparação dos níveis de expressão gênica de IL-6 na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA; φ:  $P < 0,05$ , φφ:  $P < 0,001$ , φφφ:  $P < 0,001$  para comparações com o grupo OA PBMT. λ:  $P < 0,05$ , λλ:  $P < 0,001$ , λλλ:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

### 6.2.10 Quantificação da Expressão Gênica (RT/PCR) de Colágeno tipo II (COL2A)

A expressão gênica de Colágeno II no tempo experimental de 3 dias mostrou que em relação ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) todos os grupos OA ( $0,35 \pm 0,05$ ) e OA PBMT ( $0,62 \pm 0,04$ ) apresentaram diminuição significativa na expressão de COL2A ( $p < 0,001$ ). O grupo OA ADSC's também mostrou diminuição na expressão gênica do colágeno assumindo um valor de

$p < 0,01$ . O único que não teve diferença estatística em relação ao Controle foi o grupo OA ADSC's PBMT ( $0,95 \pm 0,02$ ) com  $p > 0,05$ . Quando comparados ao grupo OA ambos os grupos que receberam células-tronco apresentaram aumento na expressão de COL2A ( $p < 0,001$ ). O grupo OA PBMT também apresentou diferença estatística em relação ao grupo OA ( $p < 0,001$ ). Além disso, pôde-se observar diferença significativa quando comparado o grupo OA ADSC's PBMT com os grupos OA PBMT ( $p < 0,001$ ) e OA ADSC's ( $p < 0,05$ ). Entretanto, sem diferença significativa entre estes dois últimos grupos ( $p > 0,05$ ).

No tempo experimental de 7 dias, quando comparados ao grupo Controle ( $1,0 \pm 0,15$ ) podemos observar que ocorreu uma elevação geral na expressão de COL2A, não havendo diferença relação ao grupo OA ( $0,21 \pm 0,08$ ) ( $p > 0,05$ ). Já em relação aos grupos OA PBMT ( $3,83 \pm 0,09$ ), OA ADSC's ( $5,17 \pm 0,19$ ) e OA ADSC's PBMT ( $6,96 \pm 1,10$ ) houve diferença estatística ( $p < 0,0001$ ). O mesmo foi observado quando comparamos os grupos intervencionais com o grupo OA ( $p < 0,0001$ ). Quando analisados entre si, novamente o grupo que associou as terapias apresentou melhores resultados, com diferença estatística em relação aos grupos OA PBMT ( $p < 0,0001$ ) e OA ADSC's ( $p < 0,001$ ). Porém, o grupo OA ADSC's apresentou significativamente maior expressão de COL2A em relação ao grupo OA PBMT ( $p < 0,01$ ). Frente à estes resultados, podemos ver que a terapia com CTM's parece influenciar positivamente na expressão de colágeno II, e quando associada à fotobiomodulação, mostra-se ainda mais eficiente. Sugerindo um possível reparo tecidual, visto que aumentam o comando para a produção do componente mais abundante da matriz cartilaginosa.

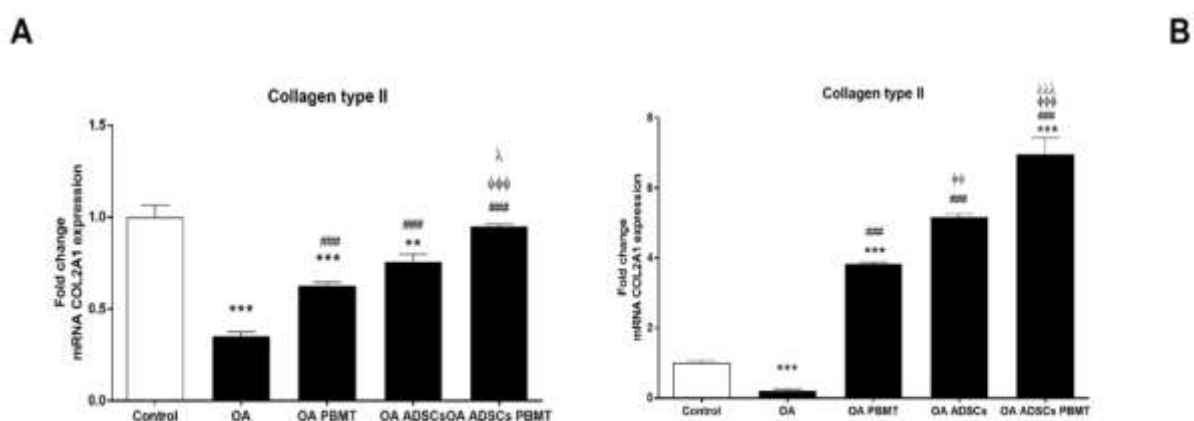


Figura 23. Comparação dos níveis de expressão gênica de COL2A na cartilagem articular dos grupos experimentais através da análise de PCR em tempo real. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo de controle; #:  $P < 0,05$ , ##:  $P < 0,001$ , ###:  $P < 0,0001$  para comparações com o grupo

OA;  $\phi$ : P <0,05,  $\phi\phi$ : P <0,001,  $\phi\phi\phi$ : P <0,001 para comparações com o grupo OA PBMT.  $\lambda$ : P <0,05,  $\lambda\lambda$ : P <0,001,  $\lambda\lambda\lambda$ : P <0,0001 para comparações com o grupo OA ADSC. Os valores P foram determinados usando o teste de Tukey. A – tempo experimental de 3 dias; B – tempo experimental de 7 dias.

## 7 DISCUSSÃO

A Osteoartrite (OA) é uma patologia articular crônica caracterizada pela degeneração progressiva da cartilagem articular e do osso subcondral (BENITO et al., 2005). Consiste na forma mais comum de acometimento articular e a principal causa de incapacidade em idosos (MAZOR et al., 2017). As citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 exercem papel importante na OA (MEI et al., 2017). Estas citocinas estimulam a degradação da matriz extracelular (MEC) e são responsáveis pela dor articular através da hipersensibilização das fibras aferentes (OBREJA et al., 2005). Em estudos anteriores do nosso grupo, reportamos que a fotobiomodulação pode promover proteção para o tecido cartilaginoso contra a degeneração na fase aguda da inflamação em modelo experimental de OA (ALVES et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2014; ALVES et al., 2013).

Frente a estes mesmos resultados, foi possível determinar os parâmetros da fotobiomodulação para este estudo, visto que a potência de 50mW e a energia de 2J foram mais efetivas na diminuição de citocinas inflamatórias e metaloproteinases da matriz (DOS SANTOS et al., 2014; ALVES et al., 2014).

As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  induzem os condrócitos à produzirem proteases catabólicas, com sinalização autócrina aumentando ainda mais a liberação de MMP's. Estas formam um grande grupo de enzimas que degradam a matriz extracelular que desempenham um importante papel no início e progressão da degeneração do tecido articular durante a OA (MEI et al., 2017; PLATAS et al., 2013; VAN BULL et al., 2012).

As metaloproteinases são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam várias proteínas da matriz extracelular (MEC). As MMP's também podem regular a atividade dos receptores de membrana e seus mecanismos de sinalização afetando a função celular (FREEMONT et al., 1997). Os inibidores de metaloproteinases também são usados para avaliar o papel das MMP's em diferentes processos biológicos e condições patológicas. A atividade das MMP's são reguladas por inibidores de tecidos endógenos de metaloproteinases (TIMP's) e o equilíbrio entre MMP/TIMP pode determinar a atividade e liberação de MMP's, o volume de MEC e a remodelação dos tecidos articulares (TONG et al., 2015; MALEMUD 2006; LIU e KHALIL, 2017).

O colágeno II é o componente de maior importância e predominância da MEC e interage com as proteoglicanas, promovendo à cartilagem elasticidade e capacidade de deformação. A degeneração da cartilagem é acompanhada por uma diminuição do colágeno II. Wang et al.

(2017) demonstraram que a expressão de MMP's pelos condrócitos é significativamente elevada em modelo experimental de OA.

Em nosso estudo, o modelo experimental de OA utilizado, permitiu a confirmação das alterações relatadas acima quando analisado os resultados do grupo OA, onde houve aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e diminuição na expressão gênica de IL-10 (citocina anti-inflamatória). Também foi possível verificar um aumento na expressão gênica das metaloproteinases 1 e 2 bem como a diminuição de RNAm da TIMP-1 e TIMP-2. Em relação ao colágeno tipo II, o grupo OA mostrou diminuição na expressão gênica quando comparado ao grupo Controle, composto de animais saudáveis. Estes resultados proporcionaram uma boa comparação entre o grupo OA e os grupos tratados com ADSC's associados ou não ao PBMT.

As terapias não cirúrgicas atuais, não exercem efeitos significativos na reparação do tecido cartilaginoso e condral, tornando-se necessária a busca de novas intervenções para o tratamento desta patologia, visto ao número de acometidos por esta doença(LEE et al., 2013). Uma das apostas consiste na terapia por células-tronco.

Para a realização deste trabalho a linhagem Fischer-344 foi escolhida por ser de fácil manuseio e de grande similaridade com respostas fisiológicas obtidas em seres humanos. Além disto, por serem isogênicos, ou seja, geneticamente idênticos, formam uma amostra homogênea e de imunidade compatível, permitindo a infiltração das células-troncos, visto que o transplante não foi autólogo. Diminuindo assim o risco de rejeição (BAPTISTA et al., 2011).

Vários pesquisadores mostraram que a injeção de células-tronco diretamente no espaço articular acometido pela OA promoveu benefícios condroprotetores, reduzindo a inflamação e a expressão de citocinas inflamatórias como as citadas anteriormente. Além disto, exerceu influência sobre a ação das metaloproteinases, que têm como função a degradação das proteoglicanas da matriz, mesmo não ocorrendo total adesão das CTM's nos locais de lesão. Dessa forma, os efeitos benéficos do transplante de CTM's podem ser ainda maiores caso haja a descoberta de uma intervenção capaz de aumentar a adesão celular nos sítios lesionais (MEI et al., 2017; PLATAS et al., 2013; VAN BULL et al., 2012).

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar se a PBMT poderia aumentar a retenção das células-implantadas. Para que a identificação destas fosse possível, foram retiradas do tecido adiposo de ratos machos e transplantadas em fêmeas, para que através da análise de RT/PCR o SRY do cromossomo Y pudesse ser quantificado.

Através desta análise podemos observar que a fotobiomodulação promoveu maior retenção destas células, desencadeando uma menor perda significativa das ADSC's transplantadas no espaço articular durante os tempos experimentais, em relação ao grupo que não recebeu a PBMT. Frente a isto, podemos sugerir que a fotobiomodulação exerceu efeitos positivos sobre as células-tronco, além disso, pode tornar o ambiente menos hostil, diminuindo a apoptose celular e consequentemente aumentando a sobrevivência das ADSC's.

Alguns estudos forneceram informações sobre o papel das CTM's na supressão de imunorreações, sugerindo seu possível uso na diminuição da inflamação local em várias doenças músculo-esqueléticas (DESANDO et al., 2013).

Nosso estudo também mostrou que o grupo transplantado com ADSC's apresentou uma diminuição na expressão gênica de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  quando comparado com o grupo OA, confirmando os resultados obtidos por outros estudos. Também foram analisadas as expressões gênicas das metaloproteinases 1 e 2, e as TIMP's 1 e 2, onde nossos resultados mostraram que a injeção intra-articular de ADSC's, em animais com OA, foi capaz de diminuir a expressão de ambas MMP's e aumentar a as TIMP's, contribuindo para um aumento na expressão de colágeno II.

De acordo com Mei et al., (2017), a expressão de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória, contribui para os processos degenerativos catabólicos subsequentes da OA e estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. Os pesquisadores relatam que, em seu estudo, as ADSC's regularam as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, e aumentaram a proteína anti-inflamatória de citocinas IL-10, cenário semelhante ao obtido em neste presente estudo.

Nossos resultados também correspondem aos achados de Kuroda et al. (2015), que descreve em seu estudo, que as ADSC's injetadas intra-articularmente inibiram a progressão da degeneração da cartilagem em um modelo de OA de exercendo efeitos condroprotetores, como a regulação da viabilidade dos condrócitos e proteção da matriz da cartilagem. Outros estudos relataram que os ADSCs indiretamente estimulam a secreção de fatores bioativos, como citocinas e fatores de crescimento (BORA 2017; DESANDO et al., 2013; KOH et al., 2012; FRISBIE et al., 2009). Desando et al., (2013) relatam que existe uma estreita correlação com a redução de TNF- $\alpha$  e uma diminuição do nível de MMP-1 no tecido da cartilagem, responsável pela degradação dos proteoglicanos, o mesmo foi observado em grupos tratados com ADSC's.

Podemos determinar dois possíveis mecanismos de ação eficácia das células-tronco que podem justificar sua eficiência no tratamento da OA. Primeiro, as células transplantadas se diferenciam em condrócitos e preenchem as lesões da cartilagem, desencadeando a regeneração tecidual. Em

segundo lugar, as células transplantadas podem influenciar o microambiente através de ações autócrinas secretando várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, solúveis e insolúveis, para mediar os efeitos antiinflamatórios, anti-fibróticos, anti-apoptóticos e tróficos nos condrócitos. Tornando o ambiente menos hostil para que se consiga alcançar a homeostase e facilitar as funções dos condrócitos.

Também deve notar-se que nossos resultados ainda apontam para um efeito muito similar ao obtido pelas ADSC's quando comparado ao grupo OA que não recebeu os ADSC's, mas foi irradiado com PBMT. Estudos anteriores do nosso grupo (DOS SANTOS et al., 2014; ALVES et al., 2014; ALVES et al., 2013) e de outros pesquisadores (PALLOTA et al., 2012; ASSIS et al., 2016) já apontaram o efeito modulador do PBMT em citocinas pró-inflamatórias e MMPs. Quando avaliamos os resultados, podemos observar que todos os grupos intervencionais, independente do tratamento, apresentaram ações positivas em relação ao tratamento da OA.

De acordo com Park et al. (2015) é possível que a PBMT melhore as respostas celulares em termos de expressão gênica, secreção de fatores de crescimento e proliferação celular por meio do aumento do potencial de membrana mitocondrial e dos níveis de ATP e AMPc. A terapia com laser (PBMT) permite um aumento significativo no número inicial de células-tronco antes da diferenciação, aumentando assim o número de células diferenciadas para a engenharia de tecidos, processos regenerativos e cicatrizantes.

A fotobiomodulação (PBMT) pode induzir um conjunto de diferentes moduladores biológicos, tanto in vitro como in vivo. Evidências apontam o papel dos efeitos da luz sobre os mecanismos relacionados à inflamação, apoptose e autofagia (BARBOZA et al., 2014).

De acordo com Fekrazad et al. (2016), a PBMT aumenta a proliferação das CTM's. Esses resultados dependem de fatores como densidade de energia, potência, frequência de radiação, tipo de fonte de luz e tipo de célula. Este estudo descobriu que as doses de 0,7-4 J/cm<sup>2</sup> e os comprimentos de onda visíveis de 600 a 700nm foram os mais apropriados para aumentar a proliferação celular.

Dessa forma, encontrar ferramentas que melhorem a atividade destas células torna-se crucial. Nosso estudo revelou que as ADSC's associadas à PBMT também regularam negativamente as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e aumentaram a regulação da citocina anti-inflamatória IL-10 em cartilagens submetidas à um protocolo experimental de OA. Da mesma forma a expressão das MMP's (MMP-1 e MMP-2) foram diminuídas, bem como um aumento do RNAm do colágeno tipo II e TIMPs 1 e 2, sugerindo diminuição no processo degenerativo, seguindo o mesmo comportamento que os outros tratamentos. Porém, nossos achados mostram



que associando as terapias por PBMT e ADSC's apresentou melhores resultados quando comparado a qualquer outro grupo experimental com ou sem tratamento, com resultados semelhantes aos do grupo controle composto por animais saudáveis. Esses resultados sugerem que as ADSC's podem secretar citocinas solúveis para proteger a cartilagem articular contra os danos induzidos pelo fator inflamatório e que essa proteção se torna efetiva quando os ADSC's são irradiadas com PBMT.

Para um futuro uso clínico, estes resultados significariam a reversão da degeneração do tecido cartilaginoso de forma menos invasiva, onde a associação destas terapias poderia melhorar a qualidade de vida do paciente, tornando-o funcional novamente, principalmente para aqueles em que a doença se encontra em estágio bastante avançado.

## 8 CONCLUSÃO

Concluimos que os achados deste estudo sugerem:

- A PBMT pode aumentar a retenção de ADSC's injetadas no espaço intra-articular e as duas terapias associadas exerceram efeitos condroprotetores impedindo modificações degenerativas articulares no colágeno tipo II e diminuindo o processo inflamatório modulado por meio de regulação negativa de citocinas e MMP's em ratos com OA de forma mais efetiva.
- A associação das terapias mostrou-se mais eficiente na diminuição da expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e no aumento da expressão gênica da citocina anti-inflamatória IL-10;
- A associação das terapias foi mais eficiente em diminuir a expressão gênica de MMP-1 e MMP-2;
- A associação das terapias foi mais eficiente em aumentar a expressão gênica de TIMP-1 e TIMP-2.
- A associação das terapias foi mais eficiente em aumentar a expressão gênica de colágeno II.

No entanto, nosso estudo pré-clínico precisa de estudos adicionais para compreender a interação molecular de ambas as terapias na presença de doenças articulares degenerativas.

## 9 REFERÊNCIAS

- Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. *J. Dev. Biol.* 2015, 3, 177-192.
- Albertini R, Aimbire FS, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E et al. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum- arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan -induced rat paw o edema. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2004;74:101–107
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001;29(2):179-84.
- Alves AC, Albertini R, Dos Santos Sa, Leal-Junior EC, Santana E, Serra AJ, Silva JA Jr, De Carvalho P de T. 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.* 2014 May;29(3):911-9.
- Alves AC, Vieira R, Leal-Junior E, Dos Santos S, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, De Carvalho P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R116
- Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-Level Light/Laser Therapy Versus Photobiomodulation Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery.* Volume 33, Number 4, 2015.
- Aoki Y, Ohtori S, Ino H, Douya H, Ozawa T, Saito T, Moriya H, Takahashi K. Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats. *Spine.* Dec.2004 vol. 29(no. 23):2621–2626. doi: 10.1097/01.brs.0000146051.11574.b4.
- Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; 35:401–404.
- Arruda ERB, Rodrigues NC, Taciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após

tenotomia. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2007-11(4),283-288. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-35552007000400007>.

Baker EN, Baker HM, 2009. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie* 91 (1), 3–10.

Baptista AB, Morita EL, Passos CC, Ferreira AO, Alves FR, Alves AJ, Miglino MA, Guerra RR. Efeito da fotoperiodicidade na taxa de prenhez em ratos isogênicos (F344). *Ciência Rural*, v.41, p.171- 175, 2011. Disponível em: Acesso em: 14 ago. 2012. doi: 10.1590/ S0103-84782011000100028.

Barboza CAG, Ginani F, Soares DM, Henriques ÁCG, Freitas RA. Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein* 2014;12(1):75–81. doi: <http://doi.org/10.1590/S1679-45082014AO2824>.

Basford JR. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. *Lasers Surg. Med.*, 16: 331–342. 1995 doi:10.1002/lsm.1900160404

Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, Felson D, Heinegård D, Jordan JM, Kepler TB, Lane NE, Saxne T, Tyree B, Kraus VB. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthr. Cartil.* Aug. 2006 14 (8), 723–727.

Baxter G, Barth HD, Orr BJ. Laser spectroscopy with a pulsed, narrowband infrared optical parametric oscillator system: a practical, modular approach *Appl Phys B* (1998) 66: 653. <https://doi.org/10.1007/s003400050451>

Beane OS, Fonseca VC, Cooper L, Koren G, Darling EM. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One*. 2014 Dec 26;9(12):e115963.

Benito M.J, Veale DJ, Fitzgerald O, Van Den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. Sep. 2005 *Ann. Rheum. Dis.* 64(9), 1263–1267.

Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes Ce. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and

other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R187.

Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem cell research & therapy* 2017;8(1):145. doi: 10.1186/s13287-017-0598-y.

Brenn D, Richter F, Schaible H. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin- 6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum.* 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/art.22282>.

Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res.* 2004 Oct;(427 Suppl):S6-15. Review

Campos V, Mattos RA, Fillippo A, Torezan LA. Laser no rejuvenescimento facial. *Surgical & Cosmetic Dermatology* 2009;1(1):29-36.

Cavalcanti MFXB, Maria DA, de Isla N, Leal-Junior ECP, Joensen J, Bjordal JM, Lopes-Martins RAMB, Diomedede F, Trubiani O, Frigo L. Evaluation of the Proliferative Effects Induced by Low-Level Laser Therapy in Bone Marrow Stem Cell Culture. *Photomedicine and Laser Surgery* Volume 33, Number 12, 2015.

Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther.* 2011 Jan;22(1):3-17.

Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy *Ann Biomed Eng* (2012) 40: 516. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>

Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008;40(6–7):1362–78. doi: 10.1016/j.biocel.2007.12.006.

Coleman CM, Curtin C, Barry FP, O'flatharta C, Murphy JM. Mesenchymal stem cells and osteoarthritis: remedy or accomplice? *Hum Gene Ther.* 2010 Oct;21(10):1239-50.

COLLS J. La terapia laser hoy. Centro de documentación laser de meditec. Barcelona, v. 15, p. 1-5, 1984.

Cotton AM. A Review of the Principles and Use of Lasers in Lower Limb Problems. The International Journal of Lower Extremity Wounds. Vol 3, 2004 Issue 3, pp. 133 - 142

Da Rosa AS, Dos Santos AF, Da Silva MM, Facco GG, Perreira DM, Alves AC, Leal Junior EC, De Carvalho P de T. Effects of lowlevel laser therapy at wavelengths of 660 and 808 nm in experimental model of osteoarthritis. Photochem Photobiol. 2012 Jan-Feb;88(1):161-6

Da Rosa AS, Dos Santos AF, Da Silva MM, Facco GG, Perreira DM, Alves ACA Leal Junior EC, de Carvalho Pde T. Effects of Low-level Laser Therapy at Wavelengths of 660 and 808 nm in Experimental Model of Osteoarthritis. Photochemistry and Photobiology 2012;88:161–6. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.01032.x.

Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, Dos Santos-Junior GR, Saint-Clair D, Bajgelman MC, Faé KC, Kalil J, Miyakawa AA, Krieger JE. tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. Stem Cells Dev. 2011 Apr;20(4):661-70

De Lange-Brokaar BJE, Ioan-Facsinay A, Van Osch GJVM, Zuurmond AM, Schoones J, Toes REM, Huizinga TWJ, Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review; Osteoarthritis Cartilage, vol. 20, no. 12, pp. 1484–1499, 2012.

De Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT, Bassaneze V, Krieger JE, Carvalho P de TC, Antunes DE, Bocalini DS, Ferreira Tucci PJ, Silva JA Jr. Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. Lasers Med Sci. 2015 Jan;30(1):217-23.

De Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT, Bassaneze V, Krieger JE, de Tarso Camillo de Carvalho P, Antunes DE, Bocalini DS, Tucci PJF, Silva Jr JA. Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. Lasers in medical science 2015;30:217–23.

De Windt TS, Saris DB, Slaper-Cortenbach IC, Van Rijen MH, Gawlitta D, Creemers LB, De Weger RA, Dhert WJ, Vonk LA. Direct cell–cell contact with chondrocytes is a key mechanism in multipotent mesenchymal stromal cell-mediated chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(19-20):2536–47.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000 Aug;28(8):875-84. Review.

Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, Fini M, Giardino R, Facchini A, Grigolo B. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Research & Therapy* 2013;15(1):R22.<http://doi.org/10.1186/ar4156>.

Diekman BO, Guilak F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol*. 2013 Jan;25(1):119-26.

Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cell: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5:392–9.

Dos Santos SA, Alves AC, Leal-Junior EC, Albertini R, Vieira RP, Ligeiro AP, Albertini R, Junior J, de Carvalho P. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Lasers in medical science* 2014;29(3):1051–8. doi: 10.1007/s10103-013-1467-2.

Dougados, M. Synovial fluid cell analysis. *Baillieres Clin. Rheumatol*. 10, 519–534 (1996).

Eduardo FdeP, Bezinelli LM, De Carvalho DL, Lopes RM, Fernandes JF, Brumatti M, Vince CS, De Azambuja AM, Vogel C, Hamerschlak N, Correa L. Oral mucositis in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: Clinical outcomes in a context of specialized oral care using low-level laser therapy. *Pediatr Transplant*. 2015 May;19(3):316-25

Eduardo FdP, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a pre-liminary study. *Lasers Surg Med* 2008;40:433–438.

Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 52, no. 12, pp. 870–875, 1993.

Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KA. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. *Photomedicine and laser surgery* 2016;34(11):533–42.

Feng B, Qiu L, Ye C, Chen L, Fu Y, Sun W. (2016). Exposure to a 50-Hz magnetic field induced mitochondrial permeability transition through the ROS/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Int J Radiat Biol* 92:148-155.

Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphidelaser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):901- 6.

Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Annals of the rheumatic diseases* 1997;56(9):542–9

Freitas LFD, Hamblin MR. (2016). Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 22:348-364.

Frisbie DD, Kisiday JD, Kawcak CE, Werpny NM, McIlwraith CW. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrowderived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2009 Dec;27(12):1675-80.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009 Jan 12;16:4.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of Biomedical Science.* 2009;16(1):4. doi:10.1186/1423-0127-16-4.

Ginani F, Soares DM, Barreto MP, Barboza CA. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2015 Mar 13.



- Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Human Gene Therapy. November 2010, 21(12): 1641-1655. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.156>
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 13625–13630.
- Gross AJ, Herrmann TR. History of lasers. World J Urol (2007) 25: 217. <https://doi.org/10.1007/s00345-007-0173-8>
- Hamblin MR, Sousa MVP, Agrawal T. Handbook of low-level laser therapy 1 ed. Grã Bretanha: Pan Stanford Publishing, 2017.
- Harrison MH, Shajowicz F, Trueta J. Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. J. Bone Joint Surg. Br. 35B, 598–626 (1953).
- Hatsushika D, Muneta T, Horie M, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Intraarticular injection of synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit massive meniscal defect model. J Orthop Res. 2013 Sep;31(9):1354-9.
- Hawkins-Evans D, Abrahamse H. Efficacy of three laser wavelengths for in vitro wound healing. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2008; 24(4):199-210
- Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong Le T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. Bone. 2006 Feb;38(2):234-43.
- Herrero C. Os efeitos terapêuticos. Boletim do Centro de Documentación Láser de Meditec. n. 15-16, p. 22-26. 1988.
- Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. Dose Response. 2011;9(4):602-18.
- Huebner J, Williams JM, Deberg M, Henrotin Y, Kraus VB. Collagen fibril disruption occurs early in primary guinea pig knee osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2009;18:397–405.
- Im HJ, Li X, Muddasani P, Kim GH, Davis F, Rangan J, Forsyth CB, Ellman M, Thonar EJ. (2008). Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine

pathway in human adult articular chondrocytes. *J. Cell. Physiol.*, 215: 452–463. doi:10.1002/jcp.21317

Imamura M, Targino RA, Hsing WT, Imamura S, Azevedo RS, Villas Boas LS, Battistella LR. (2014). Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 939–944. <http://doi.org/10.2147/CIA.S60330>

In vivo identification and induction of articular cartilage stem cells by inhibiting NF- $\kappa$ B signaling in osteoarthritis. *Stem cells* 2015;33(10):3125–37. doi: 10.1002/stem.2124.

injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy* 2013;29:748–55. doi: 10.1016/j.arthro.2012.11.017.

Jin R, Shen M, Yu L, Wang X, Lin X. Adipose-Derived Stem Cells Suppress Inflammation Induced by IL-1 $\beta$  through Down-Regulation of P2X7R Mediated by miR-373 in Chondrocytes of Osteoarthritis. *Molecules and cells* 2017;40(3):222–9. doi:10.14348/molcells.2017.2314.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011; 7:33–42.

Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B Biol* 1989;3:638.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells, In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 49, Issue 1, 1999, Pages 1-17, ISSN 1011-1344, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X).

Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment *viacytochrome c oxidase*. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004,3, 211-216 doi: 10.1039/B306126D

Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.* V.2, n.1, p.53-71, 1988.

Klebanov GI, Kreinina MV, Poltanov EA, Khristoforova TV, Vladimirov YA. Mechanism of therapeutic effect of low-intensity infrared laser radiation. *Bull Exp Biol Med.* 2001 Mar;131(3):239-41

Koh YG, Jo SB, Kwon OR, Suh DS, Lee SW, Park SH, Choi YJ. Mesenchymal stem cell

Kotlarz H, Gunnarsson CL, Fang H, Rizzo JA, Dec. 2009. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: evidence from national survey data. *Arthritis Rheum.* 60 (12), 3546–3553. <http://dx.doi.org/10.1002/art.24984>.

Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23(8):1233 e 41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.036>.

Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, Maeda T, Kajino Y, Iwai S, Fujita K, Hasegawa K, Inoue D, Sugimoto N, Tsuchiya H. (2015). The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2015;16:236. <http://doi.org/10.1186/s12891-015-0701-4>

Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Low Reactive Level Laser Therapy for Mesenchymal Stromal Cells Therapies. *Stem cells international* 2015;974864. doi:10.1155/2015/974864

Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. (1997), Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *J Bone Miner Res*, 12: 1335–1347. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.9.1335

Lane NE, Brandt K, Hawker G, Peeva E, Schreyer E, Tsuji W, Hochberg MC, 2011. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. Presented at 446 A.S. Lee et al. / *Gene* 527 (2013) 440–447 the Osteoarthritis and cartilage/OARS. , Vol. 19. Osteoarthritis Research Society, pp. 478–482.

Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, Van Wijnen AJ, Im HJ. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* 527 (2013) 440–447

Leonida A, Paiusco A, Rossi G, Carini F, Baldoni M, Caccianiga G. Effects of low-level laser irradiation on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells seeded on a threedimensional biomatrix: in vitro pilot study. *Lasers Med Sci.* 2013 Jan;28(1):125

Li Y, Chen Y, Tian J, Qiu J, Zhu J, Zhang XF. Screening of differentially expressed genes in rats with cardiomyopathy after bone marrow mesenchymal stem cell transplantation. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2006 Oct;44(10):787-91

Lin YS, Huang MH, Chai CY, Yang RC. Effects of helium-neon laser on stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. *Am J Phys Med Rehabil* 2004;83:758–765.

Liu Y, Zhang H. Low-level laser irradiation precondition for cardiac regenerative therapy. *Photomed Laser Surg* 2016;34:572–579.

López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ. Cytokines, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 14, no. 7, pp. 660–669, 2006.

Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in bioscience* 2006;11:1696–701.

Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier JP, Hilal G, Duval N, Martel-Pelletier J. Can altered production of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E2 by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 10, no. 6, pp. 491–500, 2002.

Matsumoto T, Cooper GM, Gharaibeh B, Meszaros LB, Li G, Usas A, Fu FH, Huard J. Cartilage repair in a rat model of osteoarthritis through intraarticular transplantation of muscle-derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 4 and soluble Flt-1. *Arthritis Rheum*. 2009 May;60(5):1390-405.

Mazor M, Cesaro A, Ali M, Best TM, Lespessaille E, Toumi H. Progenitor Cells from Cartilage: Grade Specific Differences in Stem Cell Marker Expression. *International journal of molecular sciences* 2017;18(8):E1759. doi: 10.3390/ijms18081759.

Mazor M, Lespessailles E, Coursier R, Daniellou R, Best TM, Toumi H. Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J Cell Mol Med*. 2014 Dec;18(12):2340-50.

Mei L, Shen B, Ling P, Liu S, Xue J, Liu F, Shao H, Chen J, Ma A, Liu X. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS one* 2017 12(4):e0176107. doi: 10.1371/journal.pone.0176107.

Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D. Schwann cells as regulators of nerve development, In *Journal of Physiology-Paris*, Volume 96, Issues 1–2, 2002, Pages 17-24, ISSN 0928-4257, [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00076-6).

Murat N, Karadam B, Ozkal S, Karatosun V, Gidener S. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2007;41(3):233-7.

Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2010 Jan;25(1):33-9

Nakata K, Ono K, Miyazaki J, Olsen BR, Muragaki Y, Adachi E, Yamamura K, Kimura T. Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. 90 (7), 2870–2874.

Obreja O, Biasio W, Andratsch M, Lips KS, Rathee PK, Ludwig A, Rose-John S, Kresset M. Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain* 128 (7), 1634–1641, 2005. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awh490>.

Oliviero F, Ramonda R, Punzi L. New horizons in osteoarthritis. *Swiss Med Wkly.* 2010;140:w13098. doi: 10.4414/smw.2010.13098

ORTIZ MCS, CARRINHO PM, SANTOS AAS, GONÇALVES RC, PARIZZOTO NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades - Parte 1. *Fisioterapia Brasil*, v. 2, n. 1, p. 221-240, 2001.

Pagès JC, Gailloud-Matthieu MC, Egloff DV. Principles of physics and application of the laser in plastic surgery. *Rev Med Suisse Romande.* 1999 Sep;119(9):739-42.

Park IS, Chung PS, Ahn JC. Enhancement of Ischemic Wound Healing by Spheroid Grafting of Human Adipose-Derived Stem Cells Treated with Low-Level Light Irradiation. *PLoS one* 2015;10(6):e0122776. doi:<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122776>.

Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice, *Arthritis Rheum.* 54 (2006)3254–3266.

Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E, Nov. 2011. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthr. Cartil.* 19 (11), 1270–1285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.08.009>.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.

Platas J, Guillén MI, del Caz MD, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ. Conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin-1 $\beta$  in osteoarthritic chondrocytes. *Mediators of inflammation* 2013;2013:357014. doi: 10.1155/2013/357014.

Rodrigues EM, Guimarães CS. *Manual de Recursos Fisioterapêuticos*. Editora Revinter, 1998, cap.03, p.30

Samper E, Diez-Juan A, Montero JA, Sepúlveda P. Cardiac cell therapy: boosting mesenchymal stem cells effects. *Stem Cell Rev.* 2013, 9(3):266- 280.

Schawlow AL, Townes CH. (1958) Infrared and optical masers. *Phys Rev* 112:1940–1949

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça L, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells Express*, 2007; doi:10.1634/stemcells.2007-0381

Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, John T, Mobasheri A. Curcumin protects human chondrocytes from IL-1 $\beta$ -induced inhibition of collagen type II and  $\beta$ 1-integrin expression. and activation of

caspase-3: an immunomorphological study, *Annals of Anatomy*, vol. 187, no. 5-6, pp. 487–497, 2005.

Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, Lindstrom TM, Hwang I, Boyer KA, Andriacchi TP, Robinson WH. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4,” *Arthritis Research and Therapy*, vol. 14, no. 1, article R7, 2012.

Steck E, Fischer J, Lorenz H, Gotterbarm T, Jung M, Richter W. *Stem Cells and Development*. September 2009, 18(7): 969-978. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0213>

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. *Photomedicine and Laser Surgery*. May 2005, 23(2): 161-166.<https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.161> Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts *in Vitro*

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463–516.

Stöove J, Huch K, Günther KP, Scharf HP. Interleukin-1 $\beta$  induces different gene expression of stromelysin, aggrecan AND tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro, *Pathobiology*, vol. 68, no.3, pp. 144–149, 2000.

Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Brand NJ, Barton PJ, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppin SR, Partridge TA, Yacoub MH. Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation*. 2004, 110(11 Suppl 1):II219-II224.

Tong W, Geng Y, Huang Y, Shi Y, Xiang S, Zhang N, Qin L, Shi Q, Chen Q, Dai K, Zhang X.

Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med*. 2007 Apr;39(4):373-8.

Uth K, Trifonov D. Stem cell application for osteoarthritis in the knee joint: A minireview. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):629-36.

Van Buul GM, Villafuertes E, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, Narcisi R, Weinans H, Verhaar JA, Bernsen MR, van Osch GJ. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit

inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20(10):1186–96. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.003.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jan;69(1):81-90.

Wang L, Wei FX, Cen JS, Ping SN, Li ZQ, Chen NN, Cui SB, Wan Y, Liu SY. Early administration of tumor necrosis factor-alpha antagonist promotes survival of transplanted neural stem cells and axon myelination after spinal cord injury in rats. *Brain Res*. 2014, 1575:87-100.

Wang M, Shen J, Jin H, Im HJ, Sandy J, Chen D. Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1240:61–9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06258.x.

Whitworth DJ, Banks TA, Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature? In *The Veterinary Journal*, Volume 202, Issue 3, 2014, Pages 416-424, ISSN 1090-0233, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.024>.

Wojdasiewicz P, Poniatowski AA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis Hindawi Publishing Corporation, *Mediators of Inflammation*, V 2014, Art. ID 561459.

Wu JY, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Yeh ML, Wang Y. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NFκB activity. *Plos One*. 2013, 8(1): 1-9.

Wu L, Leijten JC, Georgi N, Post JN, Van Blitterswijk CA, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Eng*. 2011;17(9-10):1425–36.



Zhang L, Xing D, Gao X, Wu S. Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol* 2009;219:553–562.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279- 95.

## **10 ANEXOS**

### **10.1 ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UNIFESP/HSP**





**10.2 ANEXO 2 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS –  
UNINOVE**















### **10.3 ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO**