

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA**

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE  
DEXAMETASONA NA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA MECÂNICA DA  
CARTILAGEM DO JOELHO, EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE  
REUMATOIDE.**

**Orlando Romano Neto**

**São Paulo, SP**

**2025**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA BIOFOTÔNICA**

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA AO USO DE  
DEXAMETASONA NA SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA MECÂNICA DA  
CARTILAGEM DO JOELHO, EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE  
REUMATOIDE.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Biofotônica

Aluno: Orlando Romano Neto

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

**São Paulo, SP**

**2025**

Romano Neto, Orlando.

Efeito da fotobiomodulação associada ao uso de dexametasona na sensibilidade e resistência mecânica da cartilagem do joelho em modelo experimental de artrite reumatoide. / Orlando Romano Neto. 2025.

62 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

1. Fotobiomodulação (PBM). 2. Artrite reumatoide. 3. Cartilagem. 4. Colágeno. 5. Propriedades mecânicas.

I. Marcos, Rodrigo Labat. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 26 de junho de 2025.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): Orlando Romano Neto

Título da Tese: "Efeito da fotobiomodulação associada ao uso de dexametasona na sensibilidade e resistência mecânica da cartilagem do joelho, em modelo experimental de artrite reumatoide".

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

Membro: PROF. DR. REBECA BOLTES CECATTO

Membro: PROF. DR. DIEGO PULZATTO CURY

Membro: PROF. DR. RENATO ARAUJO PRATES

Membro: PROF. DR. HENRIQUE ROMAN RAMOS

## **Dedicatória**

Dedico esta tese à minha esposa, Fernanda A. S. Gonnelli, cujo incentivo, apoio e encorajamento foram fundamentais não apenas nesta etapa, mas ao longo de toda a jornada.

Aos meus pais, Orlando Romano Filho (*in memoriam*) e Maria de Lourdes Barreto Romano, que, com muito esforço e dedicação, tornaram possível minha trajetória até aqui, minha eterna gratidão.

Aos meus filhos, Bianca, que já trilha seu próprio caminho; Giovanna, que em breve chegará; e, em especial, Gustavo, que abriu mão de preciosos momentos ao meu lado para que eu pudesse me dedicar a este trabalho, sem nunca questionar.

Por fim, dedico aos meus irmãos, Luiz, Marcio e Karen, com a certeza de que se sentirão orgulhosos por esta conquista.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, a Ele, Razão Maior, e ao Seu Primogênito, o Caminho, a Verdade e a Vida, por sustentarem minha fé e guiarem meus passos ao longo desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, expresso minha profunda gratidão pela dedicação, paciência, disponibilidade e generosidade em compartilhar parte de seus vastos conhecimentos. Sua orientação foi essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço também às colegas de pesquisa e amigas, Patrícia de Viveiros Tavares e Dominique Cavalcanti Mello. A presença, parceria e apoio de ambas tornaram esta caminhada muito mais leve e possível.

Estendo meus agradecimentos aos funcionários do Biotério da Uninove, pelo suporte técnico e colaboração ao longo das etapas experimentais, em especial a Nurya Bustamante, cuja dedicação e comprometimento foram fundamentais para o bom andamento deste projeto.

Agradeço, ainda, à Diretora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Biofotônica da Uninove, Prof. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes, e a todos os professores que, com excelência e dedicação, contribuíram para minha formação acadêmica e científica ao longo deste percurso.

E, mais uma vez, a Orlando e Lourdes. Muito obrigado!

## **Epígrafe**

*“Não há mal nenhum em mudar de opinião. Contanto que seja para melhor. Os homens tropeçam por vezes na verdade, mas a maior parte torna a levantar-se e continua depressa o seu caminho, como se nada tivesse acontecido” - Winston Churchill.*

## RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica, autoimune, sistêmica e progressiva, que causa danos irreversíveis às articulações. O tratamento tradicional é farmacológico, com uso de anti-inflamatórios, porém efeitos adversos são observados. A terapia por fotobiomodulação (PBM) está associada ao controle do processo inflamatório e doloroso, sendo uma opção para o tratamento da AR. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da PBM no processo doloroso, a partir da alodinia mecânica, no controle do reparo tecidual, observando aspectos histológicos pela proporção de colágeno, e funcionais, pela avaliação biomecânica da cartilagem, em modelo experimental de AR induzida em ratos. **Metodologia:** Ratos Wistar machos foram distribuídos em 5 grupos: sem AR (CTL) ou com AR, sem tratamento (NT) ou tratados com Fotobiomodulação com aplicação local no joelho (PBM), tratados com Dexametasona (DEX) ou com terapia associada (PBM+DEX). Depois de anestesiados, os animais foram induzidos a AR com injeções de Colágeno Tipo II e adjuvante de Freund. Os animais foram tratados 3 vezes por semana durante 1 mês com PBM (808nm; 4J; 100mW) ou Dexametasona intraperitoneal. O teste de alodinia mecânica foi realizado 1 vez por semana. No final do tratamento, os animais foram eutanasiados e a cartilagem recuperada e armazenada para análises biomecânicas e morfológicas. **Resultados:** Todos os grupos com AR demonstraram redução da resistência e da capacidade de deformação ( $p<0,001$ ) comparados ao CTL. Somente o grupo PBM apresentou melhora na capacidade de deformação comparado ao grupo NT. Todos os grupos tratados apresentaram aumento na proporção de colágeno total comparado ao grupo NT ( $p<0,05$ ). O grupo PBM apresentou melhora na alodinia mecânica na 3<sup>a</sup> semana, comparado ao grupo NT ( $p<0,01$ ). **Conclusão:** A PBM irradiada de forma local promove manutenção da proporção de colágeno com melhora da capacidade de deformação tecidual. O tratamento associado PBM+DEX manteve melhora na proporção de colágeno, porém, sem efeito adicional nas propriedades mecânicas ou na sensibilidade à dor pelo teste de alodinia mecânica.

Palavras-chave: fotobiomodulação, artrite reumatoide, cartilagem, colágeno, propriedades mecânicas.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune, systemic, and progressive disease that causes irreversible joint damage. The conventional treatment is pharmacological, typically involving anti-inflammatory drugs, though these are often associated with adverse effects. Photobiomodulation therapy (PBM) has been linked to the modulation of inflammation and pain and represents a potential therapeutic alternative for RA. This study aimed to evaluate the effects of PBM on pain modulation—through mechanical allodynia—tissue repair, assessed by collagen proportion, and functional recovery, evaluated via biomechanical analysis of cartilage, in an experimental model of RA induced in rats. **Methodology:** Male Wistar rats were divided into five groups: healthy controls without RA (CTL), RA-induced without treatment (NT), RA treated with PBM applied locally to the knee (PBM), RA treated with dexamethasone (DEX), and RA treated with a combination of PBM and dexamethasone (PBM+DEX). RA was induced using injections of type II collagen and Freund's adjuvant. Treatments were administered three times per week for one month: PBM (808 nm; 4 J; 100 mW) applied locally or intraperitoneal dexamethasone. Mechanical allodynia was assessed weekly. At the end of the treatment, animals were euthanized, and cartilage was harvested for biomechanical and histological analyses. **Results:** All RA groups showed a significant reduction in resistance and deformation capacity compared to the CTL group ( $p < 0.001$ ). Only the PBM group exhibited a significant improvement in deformation capacity compared to the NT group. All treated groups showed an increased proportion of total collagen compared to the NT group ( $p < 0.05$ ). The PBM group was the only one to show consistent improvement in mechanical allodynia across all time points compared to the other RA groups ( $p < 0.01$ ). **Conclusion:** Local PBM irradiation promotes the maintenance of collagen proportion and improves the tissue's deformation capacity. While combined PBM+DEX therapy maintained the collagen proportion, it did not provide additional benefits regarding mechanical properties or pain sensitivity as assessed by the mechanical allodynia test.

**Keywords:** photobiomodulation, rheumatoid arthritis, cartilage, collagen, mechanical properties.

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Etapas do desenvolvimento da AR .....	19
Figura 2. Estágios evolutivos de uma articulação com artrite reumatoide. 1- Sinovite e início das alterações progressivas. 2- Progressão da inflamação com formação de pannus; início da destruição da cartilagem. 3- Diminuição da inflamação; anquilose fibrosa (seta). 4- Anquilose óssea. Iannotti JP. Coleção Netter de Ilustrações Médicas - Sistema Musculoesquelético - Biologia e Doenças Sistêmicas - Parte III. (2nd edição). [Brasil]: Grupo GEN; 2014 (30).....	20
Figura 3. Grupos experimentais. ....	33
Figura 4. Protocolo de indução do modelo de artrite reumatoide. ....	34
Figura 5. Tratamento com PBM na articulação do joelho (Arquivo pessoal).....	35
Figura 6. Em A: Algômetro Randall Selito (Universidade Nove de Julho); Em B: Medidor em gramas do aparelho, definindo a carga limite da alodinia mecânica (Arquivo pessoal). ....	38
Figura 7. Cartilagem posicionada entre pastilhas sendo submetida ao teste de compressão universal (Arquivo pessoal).....	39
Figura 8. Gráfico da alodinia mecânica em joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide (N=7). Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). * p<0,05 vs NT .....	41
Figura 9. Gráfico da força máxima de ruptura em cartilagem de joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide (N=7). Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). *** p<0,001 vs CTL. ....	42
Figura 10. Gráfico da Deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem (N=7). Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). *** p<0,001 vs CTL. # # p<0,01 vs PBM. ....	43
Figura 11. Gráfico de relação entre força máxima de ruptura e deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem. Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). *** p<0,001 vs CTL. # # p<0,01 vs PBM. ....	44

Figura 12. Gráfico demonstrando a proporção total de colágeno. Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). * p<0,05 e *** p<0,001 vs CTL. # p<0,05 vs NT.....	45
Figura 13. Prancha histológica com imagens representativas de cartilagem coradas com Picosirius. Coloração rosa / vermelha = colágeno. Corte transversal. Aumento 100X.....	46

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Parâmetros do laser de baixa potência utilizados para irradiação dos grupos experimentais.....	36
Tabela 2. Linha do tempo.....	36

## **Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos**

- ADAMTS- desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina
- AINE- anti-inflamatório não-esteroidal
- AR- artrite reumatoide
- CAT- catalase
- CIA- artrite induzida por colágeno
- COX- ciclo-oxigenase
- CTL- grupo experimental controle
- CXCL12- quimiocina CXCL12, conhecida como fator 1 derivado do estroma, ligante de CXCR4
- CXCR4- gene codificador de uma proteína CXC receptora de quimiocina
- DEX- grupo experimental tratado com dexametasona
- DMARD- droga antirreumática modificadora da doença
- DMax- deformação máxima no momento da ruptura
- FMax- força máxima de ruptura
- Ga-Al-As- gálio-alumínio-arsênio
- GPx- glutationa peroxidase
- IL- interleucina
- J- Joule
- LASER- amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
- LERA- artrite reumatoide inicial tardia
- MEC- matriz extracelular complexa
- MMP- metaloproteinase de matriz
- MTX- metotrexato

mW- miliwatt

NF- fator nuclear

nm- nanometros

NT- grupo experimental sem tratamento

OA- osteoartrite

PBM- fotobiomodulação; grupo experimental tratado com fotobiomodulação

PG- prostaglandina

SOD- superóxido dismutase

TNF- fator de necrose tumoral

TIMP- inibidor de metaloproteinase tecidual

VERA- artrite reumatoide muito inicial

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1.	ARTRITE REUMATOIDE:.....	18
2.2.	ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS DA CARTILAGEM NA ARTRITE REUMATOIDE: .....	21
2.3.	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA ARTRITE REUMATOIDE: .....	22
2.3.1.	<i>Agentes anti-inflamatórios não esteroides (AINES).....</i>	22
2.3.2.	<i>Glicocorticoides.....</i>	22
2.3.3.	<i>Drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) de moléculas pequenas.....</i>	23
2.3.4.	<i>DMARDs biológicos ou de moléculas grandes .....</i>	24
2.4.	USO DA FOTOBIMODULAÇÃO EM DOENÇAS ARTICULARES:.....	24
3.	JUSTIFICATIVA .....	29
4.	HIPÓTESES DO TRABALHO .....	30
5.	OBJETIVOS .....	31
5.1.	OBJETIVO GERAL.....	31
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
6.	MATERIAL E MÉTODOS .....	32
6.1.	ANIMAIS E FATORES ÉTICOS.....	32
6.2.	GRUPOS EXPERIMENTAIS. ....	32
6.3.	MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA). .....	33
6.4.	TRATAMENTOS. ....	34
6.4.1.	<i>Tratamento com dexametasona. ....</i>	34
6.4.2.	<i>Tratamento com terapia de fotobiomodulação. ....</i>	35
6.5.	EUTANÁSIA E PROCEDIMENTO DE COLETA .....	37
6.6.	ANÁLISES .....	37
6.6.1.	<i>Teste de alodinia mecânica. ....</i>	37
6.6.2.	<i>Análise Biomecânica. ....</i>	38
6.6.3.	<i>Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica). ....</i>	39
6.6.4.	<i>Análise estatística. ....</i>	40
7.	RESULTADOS.....	41
7.1.	AVALIAÇÃO DO LIMIAR DE DOR, PELO TESTE DE ALODINIA MECÂNICA. ....	41
7.2.	AVALIAÇÃO DE FORÇA MÁXIMA DE RUPTURA (FMAX). ....	42
7.3.	AVALIAÇÃO DA DEFORMAÇÃO MÁXIMA NO MOMENTO DA RUPTURA DA CARTILAGEM (DMAX). ....	43

7.4.	RELAÇÃO ENTRE FMAX E DMAX.....	44
7.5.	QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TOTAL.....	45
7.6.	IMAGENS REPRESENTATIVAS DA CARTILAGEM APÓS INDUÇÃO DA ARTRITE REUMATOIDE.....	46
8.	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
9.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
10.	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, sistêmica e progressiva, com alta incidência, que acomete 0,5 a 1% da população mundial, e que pode chegar a 5% dependendo do grupo e da faixa etária estudados, mais comum no sexo feminino, numa proporção de 2,5-3:1, e, sobretudo em pessoas entre a 4<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> décadas de vida, mas que pode acontecer em qualquer idade, sem distinção de etnias (1-3).

Os principais sintomas da doença, que causa destruição óssea e cartilaginosa irreversíveis, são dor crônica, edema, aumento de volume articular, rigidez e aumento da temperatura local em várias articulações. Cursa, também, com problemas de sono e sensação de fadiga, prejudicando a qualidade de vida e a produtividade (1,4-6). A progressão da AR leva a redução da capacidade em realizar as atividades diárias e profissionais, causando danos financeiros para o paciente e para a sociedade (7).

A dor é o sintoma mais comum da AR, presente em 97% dos pacientes com a doença em estágio inicial, e a dor intensa é o motivo da primeira consulta para 90,4% dos pacientes. Não há dúvidas em relação ao papel do processo inflamatório na origem da dor; no entanto, a dor relatada pelos pacientes não apresenta correlação com a atividade inflamatória avaliada pelos médicos e, entre pacientes em remissão, a gravidade da dor não está associada de forma significativa à atividade inflamatória da doença (8).

Na artrite reumatoide, mesmo na ausência de inflamação local persistente ou de evidências de destruição tecidual nas articulações acometidas, observa-se uma redução do limiar de dor nos tecidos adjacentes. Essa sensibilidade dolorosa pode irradiar-se para regiões cefálicas, caudais e contralaterais à articulação inicialmente afetada. A ampla disseminação da hiperalgesia observada nesses casos sugere a participação de mecanismos centrais de modulação da dor, indicando que a persistência do quadro álgico pode estar mais relacionada à sensibilização central do que à ativação periférica de nociceptores (8).

A AR é uma das doenças autoimunes mais relatadas. Apesar de ser mais comum entre a 4<sup>a</sup>. e a 6<sup>a</sup>. décadas, pode ocorrer em qualquer faixa etária (9,10). Além de fatores ambientais, a susceptibilidade genética também desempenha um papel importante no desenvolvimento desta doença. Na presença dessa susceptibilidade genética, e na presença de fatores ambientais patogênicos, pode ocorrer a ativação do sistema imunológico, desencadeando processos altamente complexos e coordenados, e que perpetuam uma resposta autoimune (5), cujo alvo, na AR, é a membrana sinovial, em seguida proliferando na cartilagem articular.

Na AR, componentes da matriz são liberados na circulação, desencadeando reação autoimune em organismos susceptíveis. As células auto-reactivas do sistema imunológico, em seguida, envolvem as articulações e atacam seus抗ígenos correspondentes. Ocorre, então, o recrutamento de macrófagos para as articulações, onde liberam citocinas inflamatórias, incluindo IL (interleucina)-1, TNF (fator de necrose tumoral) - $\alpha$  (que exacerba ainda mais a inflamação), IL-6, IL-8 e fatores de crescimento (11,12). As MMPs (metaloproteinases de matriz) também têm sua expressão induzida pelas citocinas, sendo as grandes mediadoras da degradação de colágeno e agrecano (13), danificando o tecido conjuntivo, sendo responsáveis pela destruição irreversível de tendões, osso e cartilagem nas articulações.

O colágeno tipo II é o principal componente da cartilagem hialina, e possui pouca capacidade de regeneração. As fibrilas de colágeno tipo II formam a estrutura da cartilagem, e após sua destruição, são substituídas por fibrocartilagem de colágeno tipo I (11), reduzindo sua capacidade de permitir movimento quase sem atrito, e influenciando diretamente em sua capacidade de neutralizar as forças de compressão produzidas durante o uso da articulação, promovendo redução da resistência mecânica e da capacidade de deformação da cartilagem articular (13).

Mesmo sendo uma das doenças autoimunes mais relatadas, devido à escassez de evidências, não há consenso em relação ao melhor tratamento (14,15). Além das medidas terapêuticas para controle sintomático, como o uso de analgésicos centrais para controle da dor, entre as opções para tratamento específico temos quatro classes de agentes (anti-inflamatórios não esteroides-AINES, glicocorticoides, drogas antirreumáticas modificadoras da doença- DMARDs-de moléculas pequenas e DMARDs biológicos ou de moléculas grandes), que

podem ser utilizados isoladamente ou em associações, permitindo uma ampla gama de combinações, mas sem evidências científicas de qualidade que provem ser uma delas superior em relação a outra, com o tratamento permanecendo empírico até hoje.

O objetivo do tratamento da artrite reumatoide é diminuir, se não eliminar, a inflamação, para prevenir a destruição do tecido, e controlar a dor. Os anti-inflamatórios não esteroidais são utilizados tanto para controle da dor quanto para redução do processo inflamatório; no entanto, seu uso por tempo prolongado possui efeitos colaterais que tornam o proibitivo. Os glicocorticoides, como a dexametasona, ainda são bastante utilizados, inclusive nos tratamentos de longo prazo (16,17), provavelmente por sua inquestionável eficácia terapêutica, suas amplas atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras, apesar da possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais, que podem ser graves (18).

Devido à baixa capacidade de regeneração da cartilagem articular e à lentidão no processo, altamente complexo, novas alternativas são necessárias (19). A terapia por fotobiomodulação (PBM) demonstra vantagens no tratamento de diversas doenças, com poucos efeitos adversos, e tem sido utilizada no tratamento de tendinopatias e lesões musculares, por exemplo, proporcionando uma cicatrização mais rápida do tecido muscular, e assim, reduzindo os sintomas e sinais clínicos. Demonstra, ainda, efeitos positivos na modulação da inflamação, com resultados significativos na AR (20,21). Dependendo dos parâmetros utilizados, é possível reduzir a dor, a inflamação e melhorar a função em articulações reumatoïdes (22). Estudos demonstraram que a terapia por fotobiomodulação reduz o estresse oxidativo, regula citocinas inflamatórias e metaloproteinases, entre outros eventos associados à AR (11,20).

Até o momento, são escassos os trabalhos que avaliem o efeito da terapia combinada entre corticoides como a Dexametasona e a PBM na resistência mecânica e proporção de colágeno, com reflexo na alodinia mecânica, em modelo experimental de AR induzida.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Artrite Reumatoide:

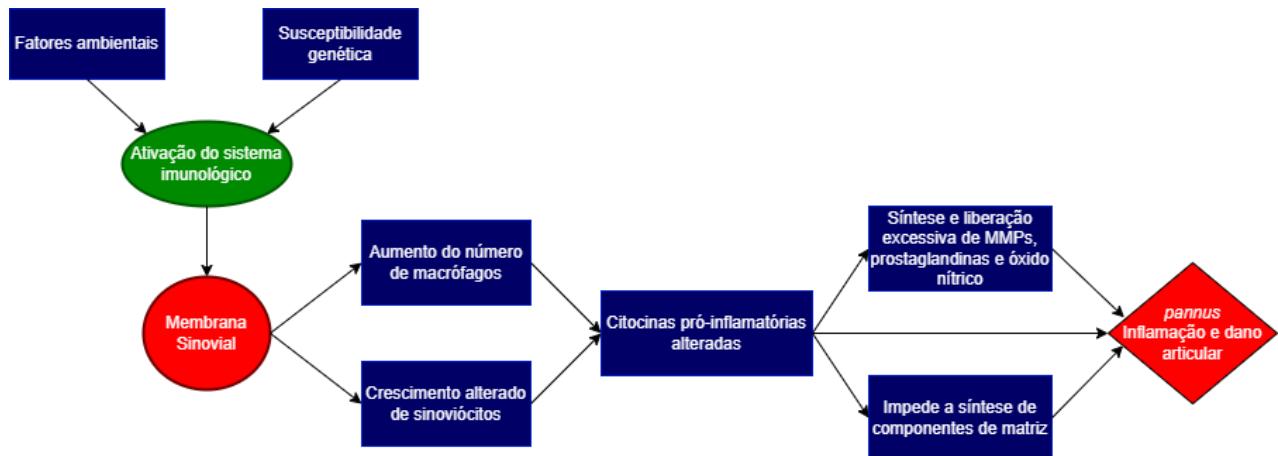
O alvo da resposta imune, na AR, é a membrana sinovial. Os sinoviócitos e macrófagos são células de linhagem fibroblástica, que compõem uma fina camada que recobre a cápsula articular de articulações diartrodiais normais. Na AR, o revestimento sinovial aumenta significativamente, e simultaneamente ocorre um crescimento alterado dos sinoviócitos. A proliferação de fibroblastos sinoviais residentes é impulsionada por fatores de crescimento na sinóvia inflamada e, juntamente com os macrófagos recrutados e as células imunes, formam uma massa celular, denominada *pannus*. A cartilagem, os tendões e o osso são invadidos e destruídos pelo *pannus*.

No processo patológico primário da AR, que ocorre após a ativação do sistema imunológico, a abundância de citocinas e quimiocinas leva à infiltração de imunócitos na sinóvia, o que resulta na displasia dos sinoviócitos e na diferenciação dos osteoclastos (23). O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina (IL)-1 $\beta$  e as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são catabólitos, estão todos aumentados (13,24).

As citocinas, acredita-se, são responsáveis por manter a inflamação crônica na AR, assim como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 são críticos no processo inflamatório e no dano articular. Além disso, intermediam a destruição de ossos e cartilagens, são responsáveis pela síntese e liberação excessiva de MMPs inflamatórias, prostaglandinas e óxido nítrico, e impedem a síntese de componentes da matriz. A IL-6 é outra citocina que participa do processo inflamatório na AR; seus níveis estão aumentados no líquido sinovial. Essa elevação provoca incremento no recrutamento de células inflamatórias (25,26) (Figura 1).

As MMPs são as responsáveis pela destruição irreversível de tendões, osso e cartilagem nas articulações. Os inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs) controlam a atividade das MMPs; porém, em situações patológicas, os níveis elevados de MMPs superam os dos TIMPs, tornando sua ação ineficaz (27).

Figura 1. Etapas do desenvolvimento da AR.



O corpo inicia uma cascata inflamatória autoimune, autodestrutiva, provocando dano articular. Fragmentos de componentes da matriz são liberados na circulação, desencadeando reação autoimune em organismos susceptíveis. As células auto-reactivas do sistema imunológico, em seguida, envolvem as articulações e atacam seus抗ígenos correspondentes. Ocorre, então, o recrutamento de macrófagos para as articulações, onde liberam citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, TNF- $\alpha$  (que exacerba ainda mais a inflamação), IL-6, IL-8 e fatores de crescimento (11,12).

Os diferentes fenótipos celulares presentes nas articulações (osteoblastos, osteoclastos, condroctos, macrófagos, células B e células T) desempenham papéis distintos, complexos e relacionados entre si, na origem e na progressão das lesões articulares associadas à AR. Essas lesões articulares caracterizam-se por esclerose óssea subcondral, erosão e degradação da cartilagem articular, levando à redução do espaço articular (28,29) (Figura 2).

Figura 2. Estágios evolutivos de uma articulação com artrite reumatoide. 1- Sinovite e início das alterações progressivas. 2- Progressão da inflamação com formação de *pannus*; início da destruição da cartilagem. 3- Diminuição da inflamação; anquilose fibrosa (seta). 4- Anquilose óssea. Iannotti JP. Coleção Netter de Ilustrações Médicas - Sistema Musculoesquelético - Biologia e Doenças Sistêmicas - Parte III. (2nd edição). [Brasil]; Grupo GEN; 2014 (30)



A degradação do colágeno, outro evento relacionado à AR, é em grande parte mediada pelas metaloproteinases, que são as principais responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo. De forma mais específica, uma desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina (ADAMTS) e as MMPs são as principais mediadoras da destruição cartilaginosa na AR (19,31,32).

Com o avanço no entendimento da fisiopatologia da doença que ocorreu nas últimas décadas, foi estabelecido o conceito de artrite reumatoide inicial, um período no qual existe uma janela de oportunidade terapêutica, com um melhor prognóstico desde que iniciado o tratamento. Portanto, diagnóstico e tratamento precoces modificariam o curso da doença (33). Simultaneamente, ocorreram avanços nos métodos diagnósticos laboratoriais e por imagem, que possibilitam o diagnóstico mais precoce, o que melhoraria o prognóstico na artrite reumatoide (34).

Embora tenha alta prevalência e tenham ocorrido esses avanços, o grande fator limitante para a boa resposta terapêutica continua sendo o diagnóstico tardio e, consequentemente, o retardo no início do tratamento (35). Esse atraso no diagnóstico ocorre em grande parte porque não há, na artrite reumatoide inicial, características que sejam patognomônicas e que a difiram de outras doenças articulares degenerativas. Mesmo os critérios para classificação da artrite reumatoide baseiam-se na fase em que já existe a doença estabelecida, e não apresentam bom desempenho na artrite reumatoide inicial (36–39).

Há uma variação ampla na literatura em relação à duração dos sintomas para caracterização da artrite reumatoide como inicial; contudo, com relação à janela de oportunidade terapêutica, é estabelecido como sendo de 2 anos, com ênfase nos primeiros 12 meses, e considerando como período crítico as primeiras 12 semanas.

Assim, chamamos de artrite reumatoide muito inicial ou muito precoce (VERA- do inglês, very early rheumatoid arthritis) aquela com até 12 semanas de início dos sintomas, e aquela com mais de 12 semanas e menos de 12 meses de início dos sintomas articulares de artrite reumatoide inicial tardia (LERA- do inglês, late early rheumatoid arthritis) (40,41).

Outros fatores que influenciam na dificuldade em estabelecer o diagnóstico precocemente são a dificuldade dos pacientes em estabelecer com precisão o início dos sintomas, a dificuldade de acesso ao especialista, e as divergências entre os próprios especialistas em definir a condição (42).

## **2.2. Aspectos bioquímicos e funcionais da cartilagem na Artrite Reumatoide:**

A cartilagem articular normal tem uma estrutura anatômica distinta, com tecido avascular e aneural altamente estruturado. É lisa para facilitar o movimento e a transmissão de carga. Sua matriz extracelular é muito densa, com baixa densidade celular, e possui pouca capacidade de regeneração, o que pode levar à perda da função articular (31,32).

Sabe-se que o colágeno tipo II é o principal componente da cartilagem hialina e, juntamente com o proteoglicano agrecano, é o principal alvo da degradação na AR, sendo substituído por fibrocartilagem de colágeno tipo I (11), reduzindo a capacidade de deformação e a resistência mecânica da cartilagem articular.

Os condrócitos são o único tipo celular encontrado na cartilagem articular, e representam 1% do volume da matriz. Eles são responsáveis pela produção da matriz extracelular complexa (MEC), que inclui colágeno tipo II e agrecano (26,32). Sinoviócitos ativados, células mononucleares e a própria cartilagem articular

produzem citocinas, como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , que aumentam significativamente a expressão do gene das MMPs. Além disso, essas citocinas inibem as vias de síntese compensatória de condróцитos, que são necessários para a restauração da integridade da matriz extracelular danificada. A síntese irregular de agrecanos reduz a resposta dos condróцитos às citocinas, o que impede a integridade estrutural da cartilagem. A apoptose de condróцитos articulares tem sido sugerida como uma das principais causas da doença articular na AR, embora existam várias outras causas complexas (26,43,44).

### **2.3. Tratamento Farmacológico da Artrite Reumatoide:**

O tratamento da artrite reumatoide é baseado em medidas objetivas da atividade da doença, com o objetivo de diminuir, se não eliminar, a inflamação, para prevenir a destruição do tecido. Tais medidas são escores de sensibilidade e inchaço de articulações, e contagens de marcadores laboratoriais de inflamação (45).

Atualmente, o tratamento da AR envolve quatro classes de agentes que podem ser usados isoladamente ou em associações para reduzir a atividade da doença:

2.3.1. Agentes anti-inflamatórios não esteroides (AINES) - Inibidores seletivos da ciclo-oxigenase (COX) I e da COX II. Porém, seu uso inspira cuidados, por se tratar de condição crônica, e apresentar conhecidos efeitos colaterais quando usados por tempo prolongado;

2.3.2. Glicocorticoides - Com amplas atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras, que resultam da inibição dos principais sistemas de sinalização imunológica, como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Além do uso sistêmico, a administração intra-articular de esteroides suprime a inflamação em uma articulação específica. Foi sugerido que a administração não sistêmica poderia limitar a incidência de efeitos adversos sistêmicos; no entanto, há boas evidências documentando a biodisponibilidade sistêmica e os efeitos adversos (notadamente a

supressão adrenal) associados à administração de glicocorticoides por todas as vias (46–52). Em particular, a administração intra-articular e o uso oral foram todos especificamente associados a um risco aumentado de efeitos adversos (53).

A terapia com glicocorticoides permanece bastante utilizada, inclusive com aumento nas prescrições de longo prazo de mais de 30% nos últimos 20 anos (16,17). Provavelmente, isso acontece por sua inquestionável eficácia terapêutica, suas amplas atividades anti-inflamatórias e imunossuppressoras, apesar da conscientização sobre seus efeitos colaterais. Quando usados especialmente em altas doses e por um período prolongado (maior que 2 semanas), e em um regime circadiano reverso (doses mais altas à noite, em comparação com a manhã), o tratamento está associado a efeitos adversos significativos (18), que incluem aumento da mortalidade geral, efeitos metabólicos (intolerância à glicose ou diabetes mellitus, dislipidemia) e distúrbios musculoesqueléticos (osteoporose, osteonecrose, miopatia, sarcopenia), além de hipertensão, supressão adrenal e risco aumentado de infecção (14).

A variedade e a gravidade potencial dos possíveis efeitos adversos tornam desafiadora a decisão, tanto para os clínicos quanto para os pacientes, que ao mesmo tempo em que se beneficiam do tratamento, aceitam o perfil significativo de efeitos colaterais que podem ocorrer (14,15,54).

Se por um lado, graças à sua inquestionável eficácia terapêutica e à falta de tratamentos alternativos, o uso de glicocorticoides continua a aumentar, por outro, existe o dano associado aos seus efeitos adversos, ao mesmo tempo que alternativas para combater esses efeitos têm feito progressos relativamente lentos, apesar da necessidade clínica (16).

2.3.3. Drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) de moléculas pequenas - Com efeitos imunomoduladores. O modo real de ação dessas drogas não é conhecido. Nesse grupo, o metotrexato (MTX) emergiu como preferido para terapia inicial, quando a opção é por DMARD. Outros exemplos são lefunomida, sulfassalazina, hidroxicloroquina, azatioprina e ciclosporina, que podem serem usados como adjuvantes ou substitutos do metotrexato, isoladamente ou em combinações.

2.3.4. DMARDs biológicos ou de moléculas grandes - Como os bloqueadores de TNF. Vêm sendo amplamente utilizados, frequentemente em associação com metotrexato. Os bloqueadores de TNF incluem anticorpos monoclonais (infliximabe, adalimumabe, certolizumabe, golimumabe), bem como um receptor solúvel (etanercept) (29,55). Um grande entrave à utilização desses medicamentos é o seu custo, além da necessidade de prescrição por um especialista, muitas vezes inacessível (56). Além disso, nos pacientes cuja dor não tenha como causa principal a atividade inflamatória, o tratamento com DMARD pode não apenas ser ineficaz, mas também expor os pacientes ao risco de eventos adversos desnecessários (8,57).

Dado a esse arsenal de agentes, e à possibilidade de usar múltiplos medicamentos e combinações, o número de tratamentos possíveis é virtualmente ilimitado; no entanto, ensaios clínicos de tamanho adequado não foram realizados até o momento, e o tratamento permanece empírico.

Embora seja uma das doenças autoimunes mais relatadas, devido à escassez de evidências de qualidade, não há consenso em relação ao melhor tratamento. Devido à baixa capacidade de regeneração da cartilagem articular e à lentidão no processo, altamente complexo, novas alternativas são necessárias (19).

## **2.4. Uso da fotobiomodulação em doenças articulares:**

A palavra LASER é um acrônimo, cujo significado é *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação). Uma fonte de luz transforma uma forma de energia, mais comumente energia elétrica, em energia radiante.

A luz laser difere de outras fontes de luz por ter como propriedade ser coerente. Por coerência, entende-se que as ondas eletromagnéticas do feixe de luz estão em fase entre si, no espaço e no tempo. A coerência diferencia o laser das demais fontes de luz, sendo sua propriedade fundamental (58).

Ao irradiar tecidos, a luz laser pode ser refletida e refratada, espalhada, absorvida ou transmitida (59), dependendo das propriedades ópticas do tecido, como refletividade, coeficientes de absorção e dispersão, tamanho de partícula (60), e dos parâmetros do laser, como comprimento de onda, energia, perfil espectral de saída e modo de operação (61,62).

Da mesma forma que não existe uma única dose, nem um único medicamento, que seja adequado para tratar todas as doenças, não há um dispositivo a laser universal ou um protocolo de parâmetros de dosimetria para todos os distúrbios, sendo necessária uma melhor compreensão para a escolha adequada dos valores de energia da luz laser para um tratamento específico.

São vários os mecanismos de interação do laser com tecidos já conhecidos. Estes mecanismos de interação que dependem do comprimento de onda são a interação fototérmica, a terapia fotodinâmica, a fotobiomodulação e a terapia de fotoablação (61). A interação fototérmica é o mecanismo de interação mais frequentemente usado na medicina, convertendo a energia de fótons em calor e provocando aquecimento, possibilitando coagulação, vaporização, corte, etc.

A terapia fotodinâmica é mediada por fotossensibilizadores, que são moléculas de cromoesferas exógenas que absorvem a energia do laser em baixas intensidades de luz. Neste caso, a luz é usada para ativação de moléculas ou medicamentos por um comprimento de onda específico da luz do laser, e esta molécula pode transferir a energia para outra molécula, que após esta ativação pode causar reações químicas no tecido circundante (61).

A fotobiomodulação é a aplicação de energia de luz vermelha monocromática, próxima aos comprimentos de onda do infravermelho, para estimular células do fator de crescimento e melhorar a cicatrização de tecidos moles, servindo como estímulo para proliferação celular e promovendo processo de reparação em diferentes tecidos, como pele, tendões, ligamentos, ossos e cartilagens, em animais experimentais, bom como ferimentos de várias etiologias em humanos (61,63).

Na terapia de fotoablação, o material é decomposto quando exposto à irradiação de laser de alta intensidade. A remoção de tecido é feita de forma muito limpa e precisa, sem qualquer aparência de dano térmico, como coagulação ou vaporização (61).

O mecanismo de ação presumido, pelo qual a fotobiomodulação reduz o estresse oxidativo, regula as citocinas inflamatórias e as metaloproteinases, é pela alteração do metabolismo celular pela luz, devido à absorção pela mitocôndria e pelo citocromo-C-oxidase. Inicialmente, a interação do laser com o tecido biológico pode liberar substâncias como histamina, serotonina e bradicinina. As reações enzimáticas normais podem ser alteradas, sofrendo aceleração ou diminuição em sua velocidade (21,22).

Conforme relatado por Alves *et al* (19), é possível encontrar outros métodos de tratamento que sejam capazes de reduzir a degradação da cartilagem.

Em uma variedade de situações clínicas e experimentais, a terapia por fotobiomodulação demonstrou eficácia no controle do dano às articulações. Foi demonstrado, por vários estudos (19,20), que a terapia por fotobiomodulação atua como bioestimulante celular, tendo a capacidade de alterar uma variedade de processos biológicos em modelos animais e humanos, como auxiliar na cicatrização de feridas e na síntese de colágeno, promover a regeneração de músculos lesionados, reduzir a resposta inflamatória e estimular a neoformação de vasos sanguíneos em feridas (63–65).

A terapia por fotobiomodulação demonstra vantagens no tratamento de diversas doenças, e tem sido utilizada no tratamento de tendinopatias e lesões musculares (63), por exemplo, proporcionando uma cicatrização mais rápida do tecido muscular, e assim, reduzindo os sintomas e sinais clínicos.

Demonstra, ainda, efeitos positivos na modulação da inflamação, com resultados significativos na AR (20,21). Dependendo dos parâmetros utilizados, é possível reduzir a dor, a inflamação e melhorar a função em articulações reumatoïdes (22).

Estudos demonstraram que a terapia por fotobiomodulação reduz o estresse oxidativo, regula citocinas inflamatórias e metaloproteinases, entre outros eventos associados à AR (11,20).

Em um estudo conduzido por Lin Zhang *et al* (66), o modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) foi usado para a indução de AR em ratos. O objetivo da pesquisa foi investigar como o laser diodo Ga-Al-As, com comprimento de onda de

830 nm, afetava a expressão gênica do receptor de quimiocinas CXCR4 e seu ligante CXCL12, bem como sua expressão proteica na membrana sinovial das articulações. Os pesquisadores descobriram que a produção de CXCR4 diminuiu, afetando o processo de transcrição nos tecidos da membrana sinovial. Isso sugere que este pode ser um dos mecanismos moleculares pelos quais a terapia por fotobiomodulação diminui a inflamação e a dor causadas pela AR.

A pesquisa de Dos Santos *et al* (20) utilizou colágeno tipo 2 diluído em ácido acético e emulsionado com Adjuvante Completo de Freund para criar um modelo de AR. Os animais receberam duas injeções intradérmicas com a solução aplicada na cauda e uma terceira injeção foi aplicada intra-articular nos joelhos. Foi observado que a terapia de fotobiomodulação com parâmetros de comprimento de onda de 808 nm e doses de 2 e 4 Joules (J), em dias alternados, reduziu a peroxidação lipídica e aumentou a expressão das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), Glutationa Peroxidase (GPx) e Catalase (CAT), na AR.

O laser reduz a proliferação de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . É uma alternativa aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), reduzindo e/ou inibindo prostaglandina (PGE2), cicloxigenase-2 (COX-2) e histamina (19,67).

Os lasers de baixa potência têm demonstrado resultados positivos e muito promissores, independentemente da doença e do tecido tratado. Isso é especialmente verdadeiro em relação à regulação do processo inflamatório, à capacidade de reparação tecidual e à redução de danos articulares. Estudos como Alves *et al* (68), Hamblin (69), e Silva Tomazoni *et al* (70), observaram o impacto do laser no processo inflamatório em tecidos e doenças distintos, e alcançaram redução no processo inflamatório em suas pesquisas.

No estudo de Stancker *et al* (24), foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade isoladamente e em associação com a administração intra-articular de células-tronco mesenquimais no processo inflamatório, em amostras *in vivo* e *in vitro* de osteoartrite. Foram feitas análises de citocinas inflamatórias, MMPs 1, 2 e 13, TIMPs 1 e 2, colágeno tipo II, expressão gênica e proteica. Foi concluído pelos autores que a associação entre PBM e injeção intra-articular de células-tronco mesenquimais modulou processos inflamatórios pela redução de citocinas e MMPs e

preveniu alterações degenerativas de colágeno tipo II em ratos com osteoartrite (OA).

O laser de baixa intensidade controla com sucesso o processo inflamatório, de acordo com achados na literatura, em uma variedade de situações clínicas (44,63,70). Além disso, é um tratamento de baixo custo e com poucas reações adversas.

Até a realização deste artigo, não encontramos na literatura nenhum trabalho em modelo experimental de AR, *in vivo*, relacionando os efeitos da PBM na manutenção do colágeno e seus reflexos nas propriedades mecânicas da cartilagem articular, associada ou não à terapia com glicocorticoides.

### 3. JUSTIFICATIVA

Tratamentos para AR visam interromper ou evitar a erosão articular, controlar os sintomas da doença e reduzir a incapacidade funcional. Embora existam diversos medicamentos, com diferentes mecanismos de ação, não há consenso em relação à terapêutica adequada. Além disso, apresentam muitos efeitos colaterais, que podem inclusive causar comorbidades e obrigar a interrupção do tratamento. Soma-se, ainda, a questão econômica, especialmente no uso de DMARDs de grandes moléculas, que têm custo consideravelmente elevado, e têm baixa eficácia no controle da dor, quando a principal causa do sintoma não for inflamatória (8). No Brasil, algumas dessas drogas são fornecidas pelo SUS, facilitando o acesso à terapêutica, mas elevando o custo da saúde pública (56).

Apesar dos avanços significativos no tratamento da artrite reumatoide (AR) nas últimas décadas — que resultaram em melhor controle da atividade inflamatória e da progressão do dano articular — os níveis de dor autor referidos por pacientes diagnosticados nos anos 2000 não apresentaram redução expressiva em comparação àqueles diagnosticados na década de 1990, mesmo após oito anos de acompanhamento clínico (8,71).

Na AR avançada, onde é comum a destruição articular, frequentemente a alternativa para redução da limitação é o tratamento cirúrgico através de artroplastias de substituição, contudo, com riscos elevados para os pacientes (13,72).

Estudos pré-clínicos observaram que a terapia com fotobiomodulação, em parâmetros bem definidos, possui efeitos positivos no controle do processo inflamatório (24,63,68).

Contudo, são escassos os trabalhos que associam a PBM com o uso de fármacos corticoides no tratamento da AR e seu impacto no controle da dor e na preservação da cartilagem.

#### **4. HIPÓTESES DO TRABALHO**

H0- a terapia por fotobiomodulação associada ao uso de corticoides não auxilia no controle da dor ou na resistência da cartilagem em modelo de artrite reumatoide induzida.

H1- a terapia por fotobiomodulação associada ao uso de corticoides auxilia no controle da dor pela manutenção da alodinia mecânica além de ajudar na resistência da cartilagem, reduzindo a degradação de colágeno e melhorando suas propriedades mecânicas, em modelo de artrite reumatoide induzida.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo geral

Estudar o efeito da terapia por fotobiomodulação local (PBML) associada ao uso de anti-inflamatórios corticoides no controle da dor e da resistência mecânica da cartilagem, em modelo experimental de artrite reumatoide.

### 5.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da terapia por fotobiomodulação local (PBML) associada ao uso do anti-inflamatório corticoide Dexametasona:

- I. No controle da dor, pela análise da alodinia mecânica;
- II. Na proporção de colágeno total e seu reflexo na resistência mecânica pela avaliação da Força Máxima de Ruptura e Capacidade de Deformação Máxima antes da Ruptura da cartilagem articular.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Animais e fatores éticos.

Para o presente estudo foram utilizados o total de 35 ratos Wistar “*Rattus Norvegicus Albinus*”, machos, com idade aproximada de 500 dias, peso total variando de 430 a 645 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade e com ração e água em “*ad libitum*”.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (NA 1021240821) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e os procedimentos foram realizados conforme as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle Experimentação Animal (CONCEA) e Check-list experimentação animal – Arrive.

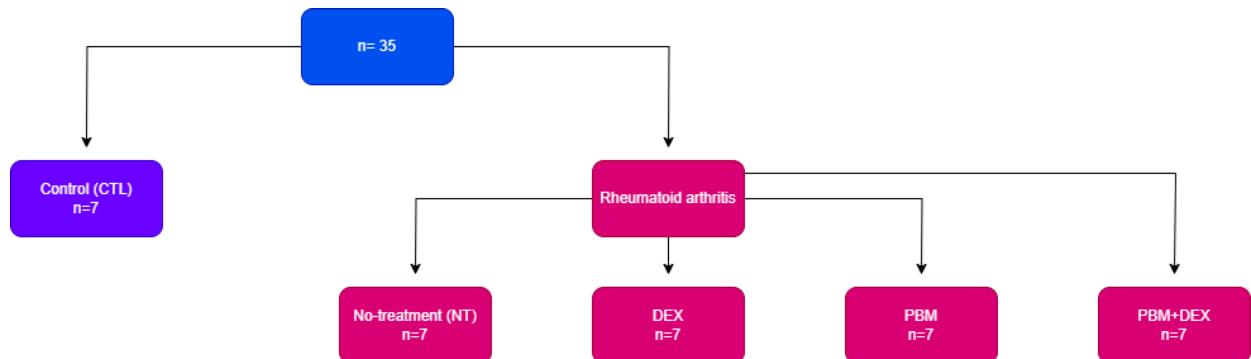
### 6.2. Grupos experimentais.

Os 35 animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais (N=7) (Figura 4), a saber:

- Grupo controle (CTL): animais saudáveis, sem artrite reumatoide;
- Grupo de artrite reumatoide (NT): animais com AR induzida e não tratados.
- Grupo AR + terapia com fotobiomodulação local (PBM): animais com AR e tratados com PBM local (808nm; 4J; 100mW; 2 irradiações por semana);
- Grupo AR + dexametasona (DEX): animais com AR induzida e tratados com dexametasona (Decadron 4 mg/ml injetável – Aché), via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg, 2 vezes por semana;
- Grupo AR + dexametasona + terapia com fotobiomodulação local (PBM+DEX): animais com AR e tratados com PBM local e em seguida com dexametasona (Decadron 4 mg/ml injetável – Aché), via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg, 2

vezes por semana.

Figura 3. Grupos experimentais.

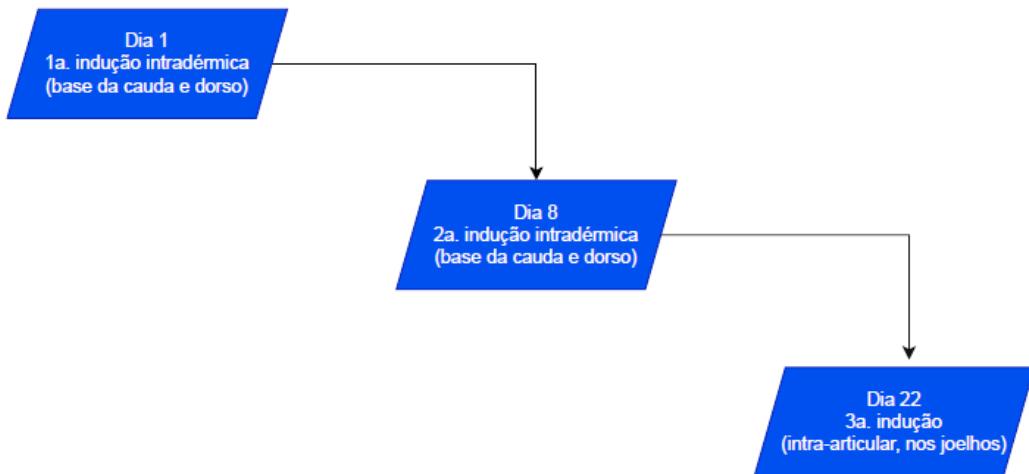


### 6.3. Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA).

O modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) teve como base estudos anteriores (20,73–75). O colágeno tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em ácido acético a 0,05 M a 4 mg/ml. A substância permaneceu a uma temperatura de 4° C durante a noite e foi emulsionada em adjuvante completo de Freund CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no dia seguinte.

A primeira infiltração da substância foi realizada por duas vias, subcutânea no dorso dos animais e na cauda, no dia 1 (D1). A segunda infiltração foi realizada seguindo a mesma metodologia, oito dias depois (D8). A terceira infiltração foi realizada intra-articular, em ambos os joelhos, após 14 dias da segunda indução (D22). Antes da terceira infiltração da substância indutora da lesão, os animais foram anestesiados com uma mistura de Quetamina (7%) e Xilazina (0,3%) em uma proporção de 2:1, administrada por via intraperitoneal em 0,1 ml por 100 gramas.

Figura 4. Protocolo de indução do modelo de artrite reumatoide.



Para todos os animais, assim que começaram a apresentar sinais de desenvolvimento de doença articular, como edema e eritema, foi administrado Dipirona sódica para analgesia, na dose de 1 gota/kg, a cada 6 horas, diluída na água.

#### 6.4. Tratamentos.

O tratamento foi iniciado no mesmo dia após a 3<sup>a</sup>. infiltração da solução indutora da lesão (D22), e foi realizado de acordo com as associações descritas nos grupos, com as doses e parâmetros a seguir.

Primeiramente, foi realizado o teste de alodinia mecânica para avaliação da sensibilidade e em seguida os tratamentos propostos em cada grupo experimental.

##### 6.4.1. Tratamento com dexametasona.

Os animais dos grupos DEX e PBM+DEX receberam tratamento nos dias:

D22 (imediatamente após a indução final), D25, D28, D31, D35, D38 e D43. Foi administrada dexametasona, via intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg. O produto utilizado foi de nome comercial Decadron, fabricado pelo laboratório Aché, na apresentação injetável, na concentração de 4 mg/ml.

#### **6.4.2. Tratamento com terapia de fotobiomodulação.**

Os animais pertencentes aos grupos PBM e PBM+DEX receberam tratamento nos dias: D22 (imediatamente após a indução final), D25, D28, D31, D35, D38 e D43. Os animais foram imobilizados por contenção antes de serem irradiados com laser por via transcutânea em um ângulo de 90º em relação à superfície do tecido (20) (Figura 5). O tratamento foi aplicado aos joelhos, em dois pontos: medial e lateral.

Figura 5. Tratamento com PBM na articulação do joelho (Arquivo pessoal).

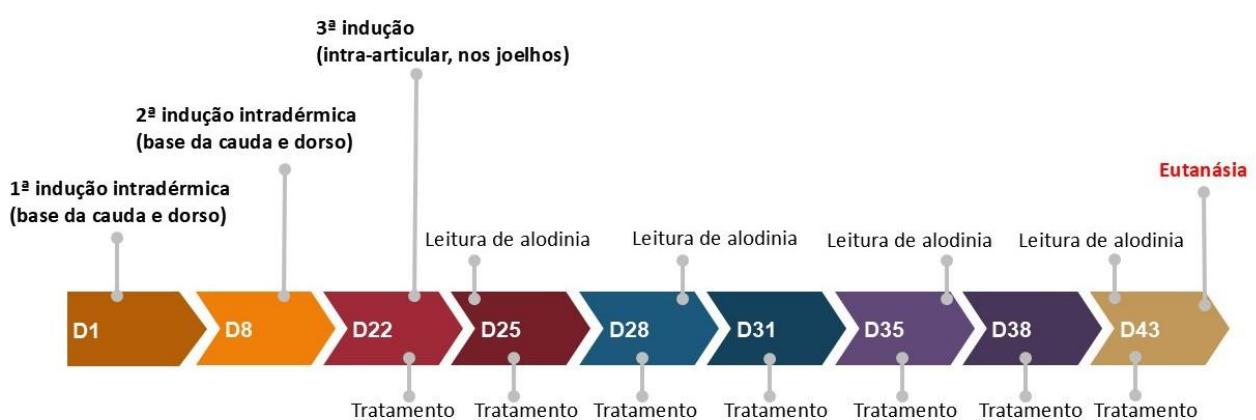


O modelo Therapy EC da DMC®, com meio ativo de AsGaAl e potência de 100 mW ± 20%, com um comprimento de onda de 808 nm ± 10 nm, foi utilizado (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros do laser de baixa potência utilizados para irradiação dos grupos experimentais.

<b>Parâmetros Dosimétricos para Irradiação Local</b>	
<b>Emissor de Luz Laser - Diodo</b>	<b>AsGaAI</b>
<b>Comprimento de onda</b>	<b>808 nm</b>
<b>Potência</b>	<b>100 mW</b>
<b>Modo de emissão</b>	<b>Contínuo</b>
<b>Energia por ponto</b>	<b>2J</b>
<b>Dois pontos de aplicação</b>	<b>Contato</b>
<b>Tempo de exposição por ponto</b>	<b>20 s</b>

Tabela 2. Linha do tempo.



## 6.5. Eutanásia e procedimento de coleta

Os animais foram eutanasiados 21 dias após 3<sup>a</sup> indução, por hiperdose da associação de anestésicos Cloridrato de Cetamina (270mg/kg) e Xilazina (30mg/kg). Foram coletadas as articulações de ambos os joelhos, e posteriormente transferidos para tubos tipo Eppendorf e Falcon, sendo imediatamente armazenado em freezer a - 80º C, para posterior análise histológica e de propriedades mecânicas.

## 6.6. Análises

### 6.6.1. Teste de alodinia mecânica.

Foi utilizado o Algômetro da marca Insight, modelo Randall Selito, fornecido pela Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (Figura 6), que é um dispositivo de pressão, com registro em gramas (70,76). Antes do experimento os animais foram adaptados ao equipamento 1 vez por semana por 3 semanas consecutivas.

Para realização do teste, a articulação do joelho da pata traseira do animal foi posicionada, o aparelho zerado e acionado, comprimindo a articulação, o teste finaliza quando o animal puxa a pata de forma espontânea, sendo esse seu limiar de dor (77). O teste foi repetido 3 vezes por joelho em ambas as patas, por 3 semanas consecutivas antes e após indução. Este teste foi realizado em todos os 28 animais (N=7 por grupo) antes e depois da indução da AR.

Figura 6. Em A: Algômetro Randall Selito (Universidade Nove de Julho); Em B: Medidor em gramas do aparelho, definindo a carga limite da alodinia mecânica (Arquivo pessoal).

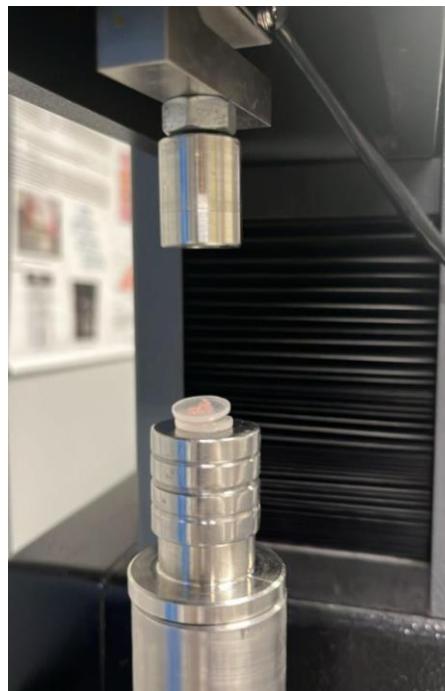


#### 6.6.2. Análise Biomecânica.

Para dissecção dos joelhos, foi retirado do freezer um por vez, previamente lavado com NaCl 0,9% (LBS) para remoção de sangue residual e hidratação, colocado em placa de Petri, foi utilizado pinça Kelly, pinça “dente de rato”, cabo de bisturi, lâmina 10 de bisturi e meniscótomo de Smillie. O fragmento da cartilagem do joelho (N=5) foi colocado em Eppendorf, ambos pesados em balança, o Eppendorf fixado com peso de 1.014g, a cartilagem foi posicionada entre pastilhas e submetida ao teste em máquina de ensaio mecânico de compressão universal, propriedade do laboratório da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) (20,70,76).

O deslocamento foi controlado após os ciclos de carga e descarga a uma velocidade constante de 1mm / min. Em cada ciclo, o deslocamento máximo aplicado a cartilagem foi aumentado de 10% de L<sub>0</sub> e a força de tração F foi liberada até 0,1 N. A sequência foi repetida até a ruptura. O pré-condicionamento mecânico foi realizado durante os primeiros ciclos do ensaio (20,70,76). A partir do ensaio foi avaliada a Força Máxima (F<sub>max</sub>) e a Deformação Máxima (D<sub>max</sub>) para a ruptura do tecido. Na relação entre (F<sub>max</sub>) e (D<sub>max</sub>) foi calculada a resistência do tecido cartilaginoso (20,70,76).

Figura 7. Cartilagem posicionada entre pastilhas sendo submetida ao teste de compressão universal (Arquivo pessoal).



#### 6.6.3. Análise Histológica – Microscopia de luz (óptica).

As amostras do tecido cartilaginoso ( $N=5$ ) foram fixadas em formaldeído a 10% por um período de 72 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas e submetidas a uma série gradativa de banhos de álcool, começando com 50% e progredindo até o álcool absoluto 100% (SYNTH). Em seguida, o tecido foi diafanizado com Xilol por 4 horas (SYNTH) para impregnação (embebição) e inclusão em Paraplast® das amostras. Em seguida, foram colocadas em recipientes de alumínio adequados, com Paraplast® fundido por 4 horas.

Após a impregnação, as amostras foram colocadas em um pequeno recipiente coberto com parafina e deixadas para solidificar, formando um bloco contendo o tecido. Para a microtomia foram realizados cortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo LEICA RM 2125 RT. Uma vez procedido o preparo das amostras, os cortes foram colocados em lâminas, para serem corados com Picosirius. Após a coloração, os cortes foram montados em lâminas permanentes, para posteriores análises em microscópio óptico, e fotografados através de sistema

de microfotografia (Olympus System Microscope Model CX 41 – Olympus PM10SP Automatic Photomicrographic System).

Pela coloração com *Picosirius*, foi avaliada a proporção de colágeno total da cartilagem nos diferentes grupos experimentais.

#### 6.6.4. Análise estatística.

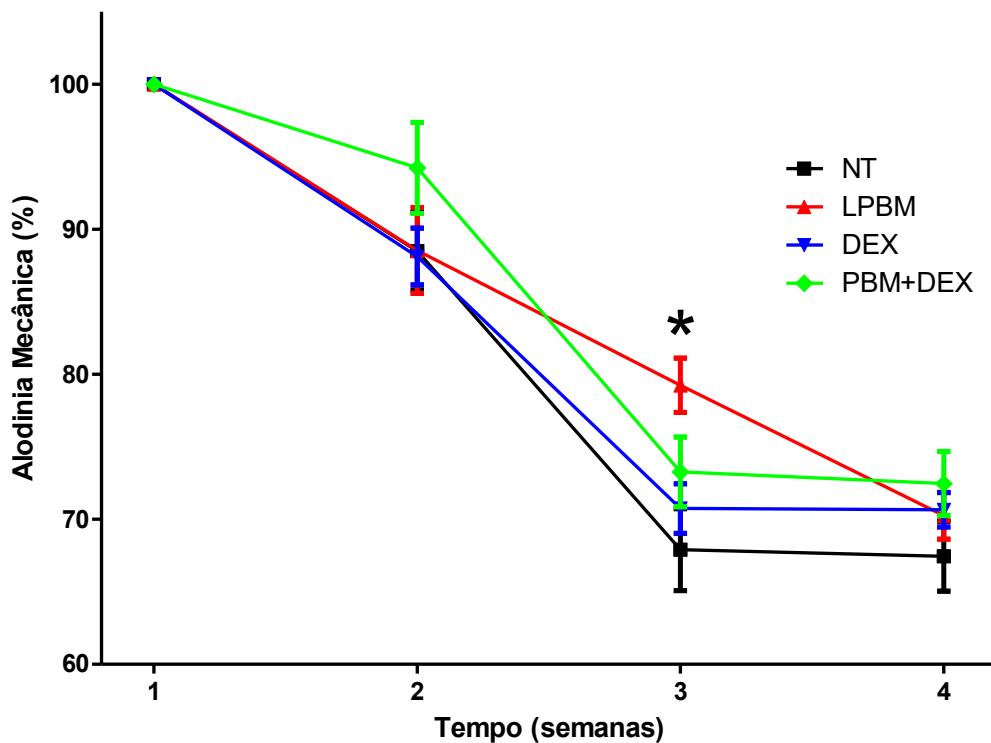
Os dados encontrados foram distribuídos normalmente (teste de Shapiro-Wilk), e para comparar cada grupo, o teste post hoc de Tukey e ANOVA de uma via foram utilizados. Cada dado foi representado como a média  $\pm$  desvio padrão (SD). O programa de software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi usado, e valores significativos para P <0,05 foram considerados.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Avaliação do limiar de dor, pelo teste de alodinia mecânica.

Na figura abaixo, podemos observar o limiar de dor, a partir do teste de alodinia mecânica no joelho de animais com artrite reumatoide induzida. Podemos observar que o grupo PBM apresentou melhora da resistência a dor na terceira medida, após a indução da AR quando comparado ao grupo NT ( $p<0,05$ ). Ambos os grupos, tratados com terapia isolada de Dexametasona (DEX), e o grupo tratado com terapias associadas (PBM+DEX), apresentaram resultados similares ao grupo NT, em todas as medidas.

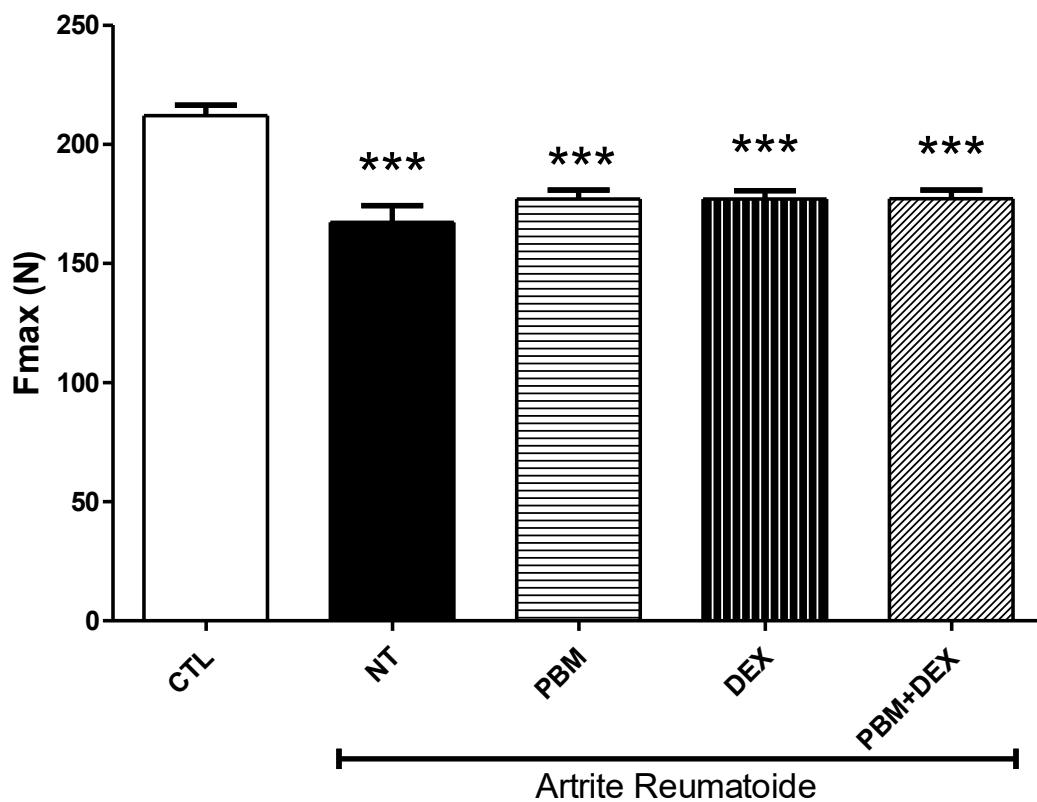
Figura 8. Gráfico da alodinia mecânica em joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide (N=7). Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). \*  $p<0,05$  vs NT



## 7.2. Avaliação de força máxima de ruptura (Fmax).

Na figura abaixo foi apresentado a força máxima de ruptura em Newtons, em cartilagens de joelhos de ratos, após indução da artrite reumatoide. Todos os grupos com AR induzida apresentaram redução de Fmax, quando comparados ao grupo CTL ( $p<0,001$ ). Não foi observada diferença entre os grupos com AR induzida e tratados (PBM, DEX ou PBM+DEX).

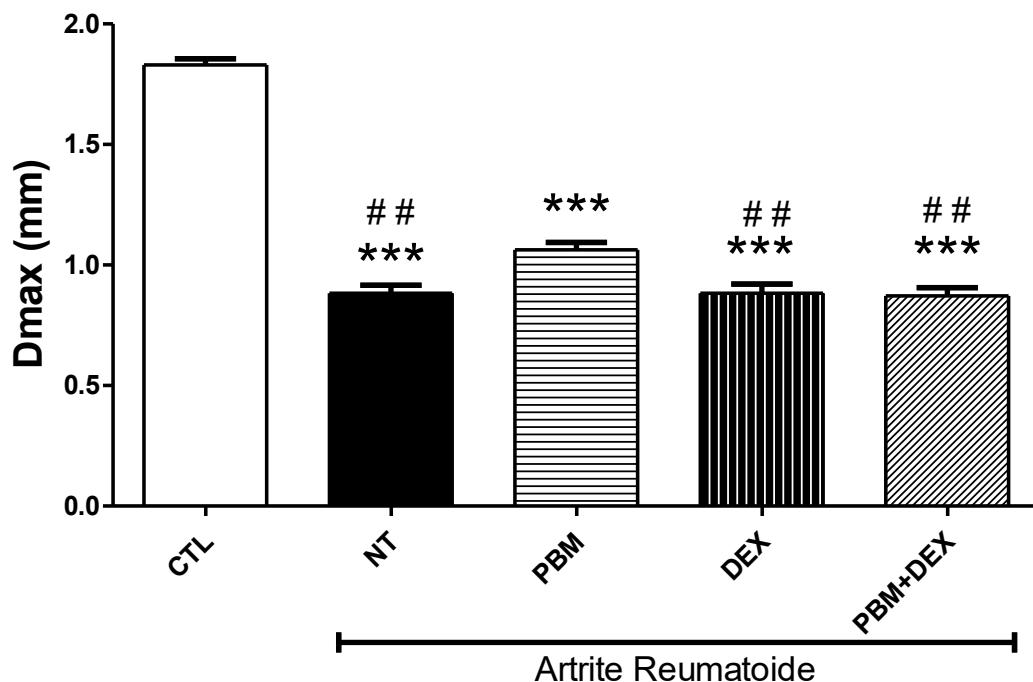
Figura 9. Gráfico da força máxima de ruptura em cartilagem de joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide (N=7). Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). \*\*\*  $p<0,001$  vs CTL.



### 7.3. Avaliação da deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem (Dmax).

No gráfico da figura abaixo foi apresentada a deformação máxima de ruptura em milímetros, em cartilagens de joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide. Foi observado aumento em Dmax do grupo PBM ( $p<0,01$ ) quando comparado aos demais grupos experimentais. Os grupos NT, DEX ou PBM+DEX não apresentaram diferenças significativas entre si.

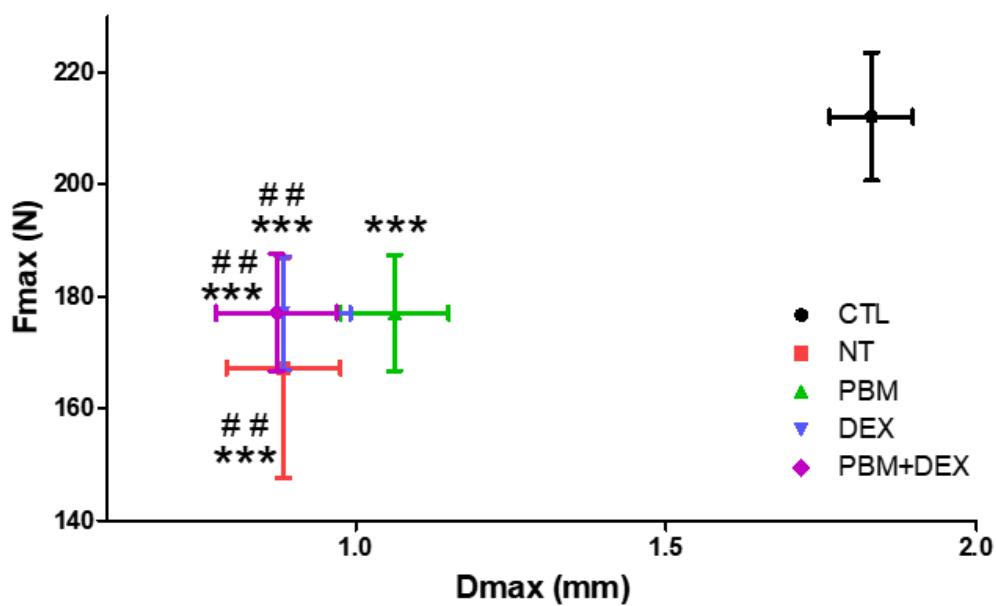
Figura 10. Gráfico da Deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem (N=7). Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). \*\*\*  $p<0,001$  vs CTL. # #  $p<0,01$  vs PBM.



#### 7.4. Relação entre Fmax e Dmax.

No gráfico da figura abaixo, podemos observar a relação entre a força máxima de ruptura (Fmax), em Newtons, e a deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem (Dmax), em milímetros, em cartilagens de joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide. Podemos observar a redução de ambos, Fmax e Dmax ( $p<0,001$ ), em todos os grupos tratados, quando comparados ao grupo CTL. O grupo PBM apresentou aumento de Dmax ( $p<0,01$ ) quando comparado ao grupo NT. O tratamento farmacológico (DEX) ou associado com fotobiomodulação (PBM+DEX) não apresentou diferença em Dmax quando comparado ao grupo NT.

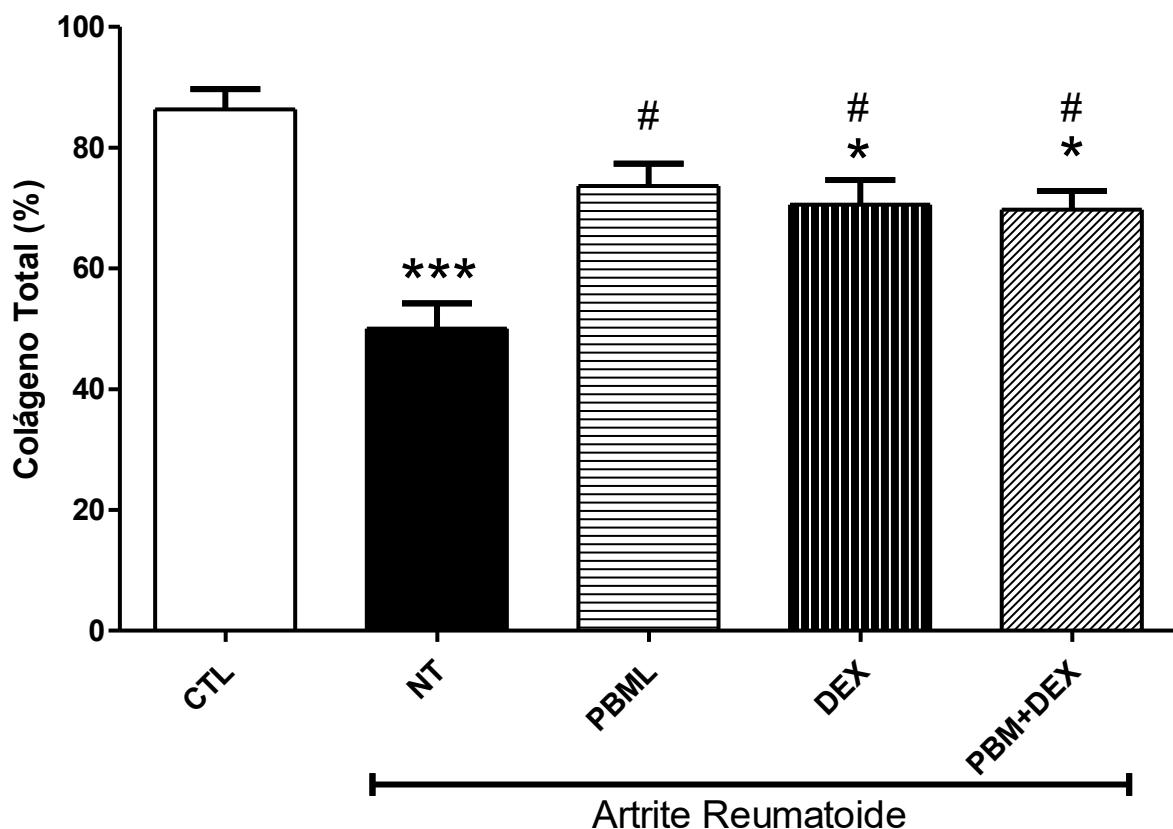
Figura 11. Gráfico de relação entre força máxima de ruptura e deformação máxima no momento da ruptura da cartilagem. Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). \*\*\*  $p<0,001$  vs CTL. # #  $p<0,01$  vs PBM.



### 7.5. Quantificação de Colágeno Total.

No gráfico da figura abaixo, apresentamos a proporção de colágeno total em cartilagens de joelhos de ratos após indução da artrite reumatoide. Observamos uma redução do colágeno total no grupo NT ( $p<0,001$ ) e nos grupos DEX e PBM+DEX ( $p<0,05$ ), quando comparados ao grupo controle. O grupo NT apresentou a maior redução na proporção de colágeno total ( $p<0,001$ ). Entre os grupos que receberam tratamento, notamos um aumento da proporção de colágeno nos grupos tratados com Dexametasona (DEX) ( $p<0,05$ ) e terapia combinada de Dexametasona e Fotobiomodulação (PBM+DEX) ( $p<0,05$ ), comparados ao grupo NT, além de uma manutenção na proporção de colágeno total no grupo tratado com Fotobiomodulação (PBM) ( $p<0,05$ ) quando comparado ao grupo CTL.

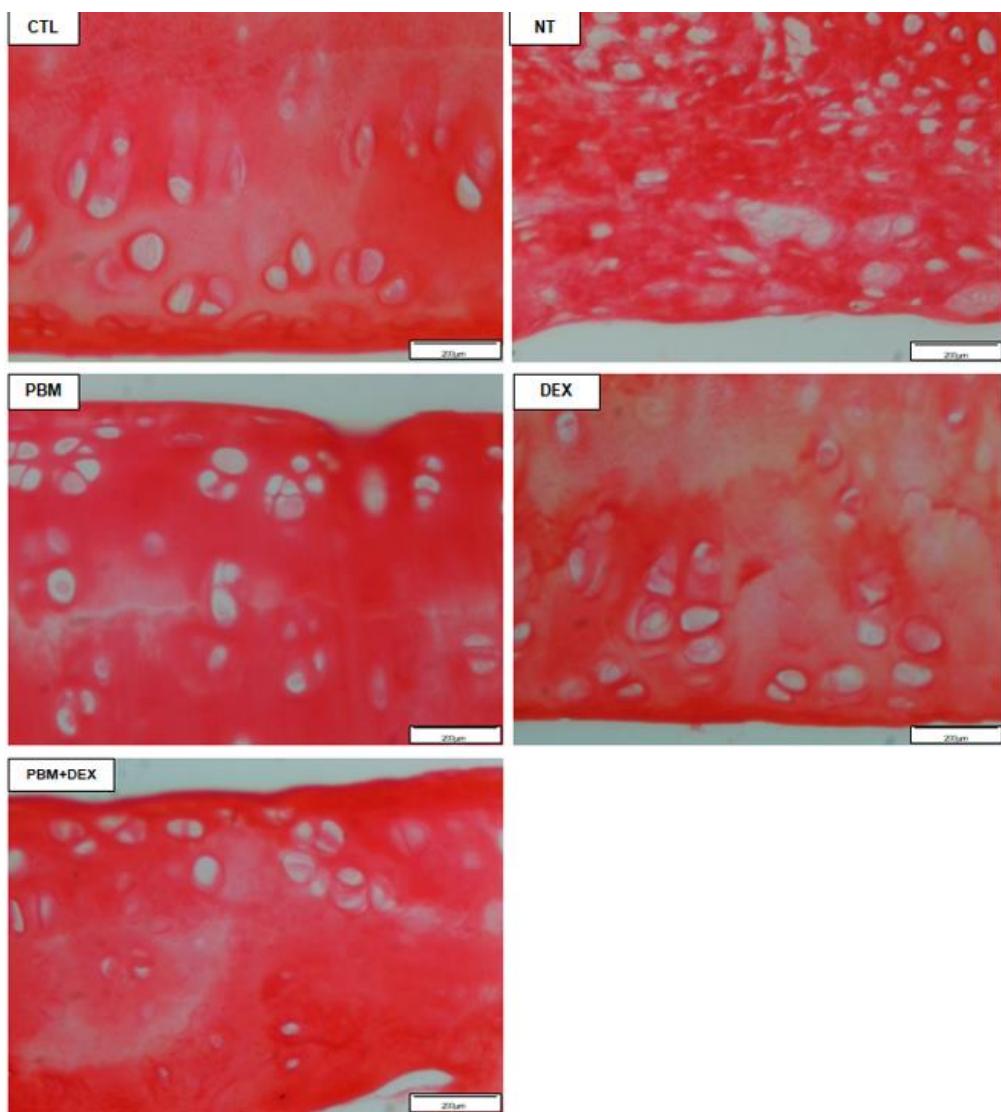
Figura 12. Gráfico demonstrando a proporção total de colágeno. Grupos artrite sem tratamento (NT) ou tratados com fotobiomodulação (PBM), Dexametasona (DEX) ou com terapias associadas (PBM+DEX). \*  $p<0,05$  e \*\*\*  $p<0,001$  vs CTL. #  $p<0,05$  vs NT.



## 7.6. Imagens representativas da cartilagem após indução da artrite reumatoide.

As imagens histológicas da figura 13 mostram a cartilagens de joelho coradas com *Picosirius*. A coloração rosa/ vermelha representa o colágeno total.

Figura 13. Prancha histológica com imagens representativas de cartilagem coradas com Picosirius. Coloração rosa / vermelha = colágeno. Corte transversal. Aumento 100X.



## 8. DISCUSSÃO

Neste trabalho, estudamos o efeito da fotobiomodulação, associada ao uso de glicocorticoide, no controle do processo inflamatório articular, em modelo experimental de artrite reumatoide, avaliando aspectos funcionais pela alodinia, e propriedades mecânicas e sua relação com aspectos morfológicos, pela proporção de colágeno total. Foram utilizados 5 grupos experimentais, com animais saudáveis (CTL) ou com artrite reumatoide, sem tratamento (AR), tratado com Dexametasona (DEX) ou Fotobiomodulação local (PBM), além das terapias associadas (PBM+DEX).

O modelo experimental de indução da artrite reumatoide utilizado neste estudo foi adaptado de estudos anteriores, sendo bem estabelecido na literatura (20,73–75). A indução inicia-se a partir de injeções articulares (joelho) e subcutâneas (no flanco do animal) com solução de colágeno tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em ácido acético, somado à solução emulsionada em adjuvante completo de Freund CFA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Neste trabalho, todos os animais dos grupos experimentais desenvolveram sinais clínicos da doença, como edema, aumento do volume articular, rigidez e eritema articular.

Com relação à escolha do protocolo de tratamento da PBM, foram utilizados os parâmetros descritos no estudo de Dos Santos *et al* (20), que usou o comprimento de onda de 808 nm, Energia de 2J por ponto (02 pontos: medial e lateral, em cada joelho), potência de 100 mW com duração de 20 segundos por ponto, 3 vezes por semana (20).

A primeira análise realizada nos animais de todos os grupos experimentais foi a determinação da alodinia mecânica, que pode ser traduzida como a avaliação da sensibilidade local à dor após aplicação de pressão no joelho dos animais.

A avaliação da dor é uma análise importante, considerando que é a principal queixa dos pacientes com AR, acompanhada de edema, aumento de volume articular, rigidez e aumento da temperatura local em várias articulações, prejudicando o sono, levando à sensação de fadiga crônica, e causando redução da capacidade em realizar atividades diárias (1,4–7).

Neste estudo, ao avaliar a alodinia mecânica nas 4<sup>a</sup> leituras, durante a progressão da doença, foi observada a redução da alodinia em todos os grupos

experimentais. No grupo NT foi observada piora dos sinais da doença, refletindo na diminuição da alodinia mecânica no joelho, sinalizando o aumento da dor. O tratamento único com Dexametasona (DEX) ou associado à PBM (PBM+DEX) não apresentou melhora da alodinia. Somente o grupo PBM apresentou melhora na alodinia mecânica na terceira semana da doença, quando comparado aos demais grupos com AR induzida.

Tal achado reveste-se de grande relevância clínica, uma vez que a dor constitui a principal queixa dos indivíduos com artrite reumatoide, acompanhada por edema, aumento do volume articular, rigidez matinal e elevação da temperatura local em múltiplas articulações, prejudicando o sono, levando a sensação de fadiga crônica e causando redução da capacidade em realizar atividades diárias (1,4,7). No entanto, observa-se que essa redução na hiperalgesia não se manteve na semana subsequente.

Estudos pré-clínicos que avaliam o processo doloroso em modelos de lesão articulares são escassos, o que dificulta a comparação dos resultados deste trabalho. Contudo, são observados na clínica alteração na sensibilidade em pacientes com AR e limitação no movimento (13,29,78,79). Possivelmente, a redução da atividade dos animais com AR, bem como a limitação dos movimentos articulares, está diretamente relacionada com a progressão da doença.

Ao avaliar os efeitos do tratamento com Dexametasona, não foi observada melhora, tanto na alodinia mecânica quanto nas propriedades mecânicas da cartilagem. Neste caso, o grupo DEX apresentou resultados semelhantes ao grupo NT. Ademais, ambos os grupos, DEX e PBM+DEX, apresentaram redução na alodinia mecânica em todos os tempos de mensuração da dor, sugerindo manutenção da hiperalgesia, similar ao grupo NT. Este fator é importante, visto que o uso de glicocorticoides ainda é recomendado para o tratamento da AR (16,17).

Estudos demonstraram que a PBM pode modular a dor a partir da redução do processo inflamatório, pela diminuição de moléculas como as prostaglandinas (PGE2), conhecida pelo seu papel no processo álgico (19,66,67). Contudo, a PBM poderia agir em outros mecanismos da dor, principalmente os de ação central, refletindo no controle rápido da dor, antes mesmo do seu efeito anti-inflamatório (22).

Alterações morfológicas também são observadas em pacientes com AR, e geralmente estão relacionados com o aumento da dor, ou ainda a redução da sensibilidade, em casos mais graves da doença (78,79).

O tratamento tradicional da AR ainda está relacionado ao uso de corticoides, justificado pelos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, que resultam na inibição dos principais sistemas de sinalização imunológica. Contudo, sua utilização por tempo prolongado gera efeitos adversos significativos, sem capacidade de recuperação da cartilagem articular, podendo inclusive acelerar a progressão da doença, pois entre os efeitos adversos estão osteoporose, osteonecrose, miopatia, sarcopenia (14,18), aumentando assim a carga nas articulações e acelerando o processo degenerativo.

O efeito da PBM no controle da dor é um importante resultado, visto que, em uma variedade de situações clínicas e experimentais, a terapia por fotobiomodulação tem demonstrado sua eficácia no controle do dano articular. Estudos pré-clínicos já demonstraram a capacidade da PBM na manutenção de processos biológicos, promovendo o reparo tecidual pela melhora da cicatrização e na manutenção da síntese de colágeno (19,20). A PBM também auxilia no processo inflamatório, melhorando a qualidade de feridas (64,65). Dependendo dos parâmetros utilizados, também é observado efeito analgésico com controle da inflamação, fator fundamental para o tratamento da AR (22). Os mecanismos de ação da PBM no processo doloroso ainda não foram totalmente esclarecidos, mas sua capacidade de modular a dor a partir de seus efeitos anti-inflamatórios já foi relatada (11,20,21).

Outro fator importante observado nos pacientes com AR é o comprometimento funcional com alteração da força e do movimento articular (13,31,32,72). Neste trabalho, foram realizadas análises de algumas propriedades mecânicas da cartilagem articular em ensaios cíclicos de compressão, como a força máxima ( $F_{max}$ ) e a capacidade de deformação ( $D_{max}$ ) no momento da ruptura.

Foi observada redução da força máxima de ruptura ( $F_{max}$ ) em todos os grupos com AR, com ou sem tratamento, quando comparado ao grupo CTL. Somente o grupo PBM apresentou aumento da capacidade de deformação máxima da cartilagem quando comparada aos grupos NT, DEX e PBM+DEX. Ambos os grupos DEX e PBM+DEX não apresentaram diferença em  $D_{max}$  quando

comparados ao grupo NT. Quando avaliamos a relação entre Fmax e Dmax, observamos a redução da resistência mecânica nos grupos com AR induzida. Somente o grupo PBM apresentou resultados positivos na manutenção da resistência da cartilagem.

A manutenção da capacidade de deformação é outra propriedade importante para a cartilagem, que está sujeita continuamente a forças de tração e compressão do próprio corpo. A hidratação dos glicosaminoglicanos confere ao agrecano propriedades biomecânicas especiais de resistência à compressão (13). Em condições de grande carga, por exemplo, aquela sofrida pelas cartilagens articulares dos ossos dos membros inferiores, moléculas de água ligadas a moléculas de agrecano são deslocadas, diminuindo o volume da molécula. Após a redução da carga, a água volta ao agrecano, que retoma seu volume inicial, funcionando, dessa maneira, como uma mola biomecânica. Quando há agrecano suficiente, seu intumescimento é equilibrado pelas forças de tração que ele induz ao esticar as fibrilas de colágeno. Para que a função ideal da cartilagem esteja presente, é essencial que haja integridade da estrutura proporcionada pelas fibrilas de colágeno tipo II (13).

O deslocamento de água no interior da cartilagem articular, resultante da aplicação de cargas compressivas cíclicas, é amplamente reconhecido como um mecanismo essencial para a manutenção da nutrição dos condróцитos. Dada a natureza avascular da cartilagem, o aporte de nutrientes ocorre predominantemente por difusão a partir do líquido sinovial que a envolve, sendo que a eliminação dos metabólitos também depende desse processo difusional. A aplicação de forças compressivas promove a saída de água do tecido, favorecendo a remoção de resíduos, enquanto a subsequente descompressão permite o retorno do fluido, facilitando o transporte de nutrientes. Por sua vez, cargas estáticas não contribuem para esse mecanismo de troca, evidenciando a importância das cargas dinâmicas. Todavia, os efeitos benéficos dessas cargas dependem diretamente de parâmetros como a magnitude, a frequência e a duração da aplicação. Quando aplicadas de forma excessiva, tais cargas podem comprometer a integridade celular, provocando apoptose dos condróцитos e degradação da matriz extracelular (MEC) (13).

A cartilagem articular tem uma estrutura anatômica distinta, com tecido avascular e aneural altamente estruturado. É lisa para facilitar o movimento e a

transmissão de carga. Sua matriz extracelular é densa, mas a densidade celular é baixa, limitando sua capacidade de regeneração, o que pode levar a perda da função articular (13,31,32). Assim, alterações na resistência mecânica, como observado no grupo NT, representariam alteração funcional, comum nos casos de AR.

Sabe-se que o colágeno tipo II é o principal componente da cartilagem hialina e, juntamente com o proteoglicano agrecano, é o principal alvo da degradação na AR. A matriz de colágeno da cartilagem humana é permanente na idade adulta, e pode ser alterada em situações como a doença articular ou por cargas mecânicas (80). Devido a essa limitada capacidade de regeneração, ocorre substituição por fibrocartilagem de colágeno tipo I (11), o que influencia diretamente em suas propriedades mecânicas, reforçando a ideia de que o tratamento deve ser iniciado antes que ocorram danos estruturais.

Neste trabalho, foi observada a redução da proporção de colágeno total no grupo NT, comparado ao grupo saudável. O tratamento único com Dexametasona (DEX) ou associado (PBM+DEX) apresentou menor redução da proporção de colágeno total comparado ao grupo NT. Já a PBM promoveu a manutenção de colágeno total, para valores similares ao grupo CTL. Outros estudos pré-clínicos também observaram a ação da PBM na atividade celular, regulando não só a proliferação e viabilidade celular, mas também a síntese de matriz extracelular, regulando enzimas como as Metaloproteinases de Matriz (MMPs), controlando a degradação do colágeno (11,20). Este efeito da PBM na manutenção da proporção de colágeno poderia justificar a melhora nas propriedades mecânicas deste grupo, como na capacidade de deformação da cartilagem com valores similares ao grupo saudável (CTL).

O mecanismo de ação da PBM no tratamento da AR ainda não foi totalmente esclarecido, uma vez que a doença possui características inflamatórias e imunológicas. Até o momento é conhecido que a PBM auxilia no tratamento da AR a partir do controle do estresse oxidativo, pela redução da peroxidação lipídica e aumento de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), Glutationa Peroxidase (GPX) e Catalase (CAT) (66). A PBM também controla a produção de metaloproteinases como MMPs 1, 2 e 13, além de aumentar TIMPs 1 e 2, com manutenção do colágeno tipo II (68–70). Os efeitos anti-inflamatórios da PBM

também estariam relacionados com a resolução do processo inflamatório, a partir de mecanismos específicos relacionados à expressão de lipoxinas (63).

O uso da PBM ainda encontra resistência pelos profissionais da saúde e um dos motivos vai além do desconhecimento dos mecanismos de ação. Existem muitas dúvidas com relação aos parâmetros de irradiação, que ainda são confusos. São necessários estudos pré-clínicos que promovam o conhecimento dos mecanismos de ação da PBM no tratamento de doenças autoimunes, mas também estudos clínicos com dosimetria customizados às características dos pacientes com artrite reumatoide.

Finalmente, este estudo experimental com modelo de artrite reumatoide reafirma os efeitos nocivos da AR no aumento da dor, bem como na redução da proporção de colágeno total, com reflexo na piora das propriedades mecânicas da cartilagem. O tratamento farmacológico com Dexametasona, apesar de melhorar a proporção de colágeno total, não foi suficiente na manutenção das propriedades mecânicas da cartilagem, bem como não melhorou a alodinia mecânica. A PBM promoveu melhora da sensibilidade na terceira medida de alodinia. Também manteve proporção de colágeno total e capacidade de deformação da cartilagem melhor que o grupo sem tratamento. Contudo, não foi observado efeito aditivo no tratamento associado (PBM+DEX), tanto na alodinia, como na resistência mecânica.

Considerando a especificidade do tipo de colágeno presente nas cartilagens, seria relevante avaliar se os tratamentos com DEX ou PBM influenciam a proporção de colágeno tipo II, o que poderia contribuir para a melhora da resistência mecânica. Em relação à dor, levando em conta as diferentes vias envolvidas no processo doloroso, seria importante investigar a alodinia mecânica em momentos mais próximos à aplicação dos tratamentos, bem como analisar seus efeitos sobre os mecanismos relacionados ao controle da dor central. Consideramos importante, também, aprofundar a investigação sobre a melhora da dor no grupo PBM na terceira semana, bem como compreender os fatores que podem ter contribuído para a não sustentação desse efeito analgésico na semana subsequente.

Além disso, considerando que a AR compromete a cartilagem em diversas regiões do corpo, estudos futuros poderiam explorar a aplicação vascular da PBM como estratégia terapêutica, visando facilitar sua utilização clínica. Outro aspecto

relevante a ser considerado em pesquisas futuras é a resposta imunológica desencadeada por esses tratamentos, uma vez que a AR também resulta de alterações no sistema imunológico.

## 9. CONCLUSÃO

O tratamento com Dexametasona isolado ou associado com fotobiomodulação não apresentou efeito sinérgico, mantendo a alodinia, a proporção de colágeno e as propriedades mecânicas similares ao grupo com artrite reumatoide e sem tratamento. A terapia por fotobiomodulação (808nm; 2J; 100mW) aplicado em 2 pontos no joelho de ratos com artrite reumatoide, contribuiu para a manutenção do colágeno e melhora das propriedades mecânicas, especificamente na manutenção da capacidade de deformação da cartilagem, auxiliando na alodinia mecânica.

## 10. REFERÊNCIAS

1. Mota LMH da, Laurindo IMM, Santos Neto LL dos. Artrite reumatoide inicial: conceitos. Rev Assoc Médica Bras. 2010;56(2):227–9.
2. Alarcón GS. Epidemiology of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. agosto de 1995;21(3):589–604.
3. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. Arthritis Res. 2002;4 Suppl 3(Suppl 3):S265-72.
4. Yamaura M, Yao M, Yaroslavsky I, Cohen R, Smotrich M, Kochevar IE. Low level light effects on inflammatory cytokine production by rheumatoid arthritis synoviocytes. Lasers Surg Med. 3 de abril de 2009;41(4):282–90.
5. Conigliaro P, Benson RA, Patakas A, Kelly SM, Valesini G, Holmdahl R, et al. Characterization of the anticollagen antibody response in a new model of chronic polyarthritis. Arthritis Rheum. agosto de 2011;63(8):2299–308.
6. Walsh DA, McWilliams DF. Pain in Rheumatoid Arthritis. Curr Pain Headache Rep. 30 de dezembro de 2012;16(6):509–17.
7. Wang Z, Bao H wei, Ji Y. A systematic review and meta-analysis of rituximab combined with methotrexate versus methotrexate alone in the treatment of rheumatoid arthritis. Medicine (Baltimore). fevereiro de 2020;99(8):e19193.
8. Cao Y, Fan D, Yin Y. Pain Mechanism in Rheumatoid Arthritis: From Cytokines to Central Sensitization. Mediators Inflamm. 12 de setembro de 2020;2020:1–11.
9. Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Del Río Nájera D, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. BioMed Res Int. 2016;2016:1–14.
10. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2004;6(6):265.
11. Burrage P S. Matrix Metalloproteinases: Role In Arthritis. Front Biosci. 2006;11(1):529.

12. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36(2):175–84.
13. Roughley PJ, Mort JS. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J Exp Orthop.* 16 de dezembro de 2014;1(1):8.
14. Seibel MJ, Cooper MS, Zhou H. Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives. *Lancet Diabetes Endocrinol.* setembro de 2013;1(1):59–70.
15. Crowley RK, Argese N, Tomlinson JW, Stewart PM. Central Hypoadrenalinism. *J Clin Endocrinol Metab.* novembro de 2014;99(11):4027–36.
16. Pofi R, Caratti G, Ray DW, Tomlinson JW. Treating the Side Effects of Exogenous Glucocorticoids; Can We Separate the *Good* From the *Bad*? *Endocr Rev.* 9 de novembro de 2023;44(6):975–1011.
17. Fardet L, Petersen I, Nazareth I. Prevalence of long-term oral glucocorticoid prescriptions in the UK over the past 20 years. *Rheumatol Oxf Engl.* novembro de 2011;50(11):1982–90.
18. Minnetti M, Hasenmajer V, Pofi R, Venneri MA, Alexandraki KI, Isidori AM. Fixing the broken clock in adrenal disorders: focus on glucocorticoids and chronotherapy. *J Endocrinol.* agosto de 2020;246(2):R13–31.
19. Alves ACA, Vieira R de P, Leal-Junior ECP, dos Santos SA, Ligeiro AP, Albertini R, et al. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 12 de setembro de 2013;15(5):R116.
20. dos Santos SA, dos Santos Vieira MA, Simões MCB, Serra AJ, Leal-Junior EC, de Carvalho P de TC. Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. *Lasers Med Sci.* 21 de julho de 2017;32(5):1071–9.
21. Moges H, Vasconcelos OM, Campbell WW, Borke RC, McCoy JA, Kaczmarczyk L, et al. Light therapy and supplementary riboflavin in the SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Lasers Surg Med.* 13 de janeiro de 2009;41(1):52–9.
22. Hsieh YL, Cheng YJ, Huang FC, Yang CC. The Fluence Effects of Low-Level Laser Therapy on Inflammation, Fibroblast-Like Synoviocytes, and Synovial Apoptosis in Rats with Adjuvant-Induced Arthritis. *Photomed Laser Surg.* dezembro de 2014;32(12):669–77.

23. Wang Q, Wang L, Wu L, Zhang M, Hu S, Wang R, et al. Paroxetine alleviates T lymphocyte activation and infiltration to joints of collagen-induced arthritis. *Sci Rep.* 28 de março de 2017;7(1):45364.
24. Stancker TG, Vieira SS, Serra AJ, do Nascimento Lima R, dos Santos Feliciano R, Silva JA, et al. Can photobiomodulation associated with implantation of mesenchymal adipose-derived stem cells attenuate the expression of MMPs and decrease degradation of type II collagen in an experimental model of osteoarthritis? *Lasers Med Sci.* 8 de julho de 2018;33(5):1073–84.
25. LU QY, HAN QH, LI X, LI ZC, PAN YT, LIU L, et al. Analysis of differentially expressed genes between rheumatoid arthritis and osteoarthritis based on the gene co-expression network. *Mol Med Rep.* julho de 2014;10(1):119–24.
26. Zhou R, Wu X, Wang Z, Ge J, Chen F. Interleukin-6 enhances acid-induced apoptosis via upregulating acid-sensing ion channel 1a expression and function in rat articular chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* dezembro de 2015;29(2):748–60.
27. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Em* 2017. p. 1–73.
28. Tuna Z, Duger T, Atalay-Guzel N, Aral A, Basturk B, Haznedaroglu S, et al. Aerobic exercise improves oxidant-antioxidant balance in patients with rheumatoid arthritis. *J Phys Ther Sci.* 2015;27(4):1239–42.
29. Pisetsky DS, Ward MM. Advances in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* abril de 2012;26(2):251–61.
30. Iannotti JP. Coleção Netter de Ilustrações Médicas - Sistema Musculoesquelético - Biologia e Doenças Sistêmicas - Parte III. (2nd edição). Vol. Parte III. Grupo GEN; 2014. 171–171 p.
31. Pretzel D, Linss S, Ahrem H, Endres M, Kaps C, Klemm D, et al. A novel in vitro bovine cartilage punch model for assessing the regeneration of focal cartilage defects with biocompatible bacterial nanocellulose. *Arthritis Res Ther.* 14 de maio de 2013;15(3):R59.
32. Khan I, Gilbert S, Singhrao S, Duance V, Archer C. Evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater.* 3 de setembro de 2008;16:26–39.
33. van der Horst-Bruinsma I. Diagnosis and course of early-onset arthritis: results of a special early arthritis clinic compared to routine patient care. *Rheumatology.* 1º de outubro de 1998;37(10):1084–8.

34. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. Am J Med. novembro de 2007;120(11):936–9.
35. Cabral D, Katz JN, Weinblatt ME, Ting G, Avorn J, Solomon DH. Development and assessment of indicators of rheumatoid arthritis severity: Results of a Delphi panel. Arthritis Care Res. 15 de fevereiro de 2005;53(1):61–6.
36. Symmons DPM, Hazes JMW, Silman AJ. Cases of early inflammatory polyarthritis should not be classified as having rheumatoid arthritis. J Rheumatol. maio de 2003;30(5):902–4.
37. Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2 de julho de 2003;48(7):1771–4.
38. Saraux A, Berthelot JM, Chalès G, Le Henaff C, Thorel JB, Hoang S, et al. Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. Arthritis Rheum. novembro de 2001;44(11):2485–91.
39. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 29 de março de 1988;31(3):315–24.
40. Mitchell KL, Pisetsky DS. Early rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. maio de 2007;19(3):278–83.
41. Nell VPK. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. Rheumatology. 4 de maio de 2004;43(7):906–14.
42. Aletaha D, Eberl G, Nell VPK, Machold KP, Smolen JS. Attitudes to early rheumatoid arthritis: changing patterns. Results of a survey. Ann Rheum Dis. outubro de 2004;63(10):1269–75.
43. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Syed-Abdul S, Wang JR, Wang PD, et al. Combating Osteoarthritis through Stem Cell Therapies by Rejuvenating Cartilage: A Review. Stem Cells Int. 2018;2018:1–13.
44. dos Santos SA, Alves ACA, Leal-Junior ECP, Albertini R, Vieira R de P, Ligeiro AP, et al. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. Lasers Med Sci. 31 de outubro de 2013;

45. Prevoo MLL, Van'T Hof MA, Kuper HH, Van Leeuwen MA, Van De Putte LBA, Van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* janeiro de 1995;38(1):44–8.
46. Hopkins RL, Leinung MC. Exogenous Cushing's Syndrome and Glucocorticoid Withdrawal. *Endocrinol Metab Clin North Am.* junho de 2005;34(2):371–84.
47. Lipworth BJ. Systemic Adverse Effects of Inhaled Corticosteroid Therapy. *Arch Intern Med.* 10 de maio de 1999;159(9):941.
48. Patel R, Naqvi SA, Griffiths C, Bloom CI. Systemic adverse effects from inhaled corticosteroid use in asthma: a systematic review. *BMJ Open Respir Res.* 2 de dezembro de 2020;7(1):e000756.
49. Phan K, Smith SD. Topical corticosteroids and risk of diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *J Dermatol Treat.* 3 de abril de 2021;32(3):345–9.
50. Wood Heickman LK, Davallow Ghajar L, Conaway M, Rogol AD. Evaluation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Suppression following Cutaneous Use of Topical Corticosteroids in Children: A Meta-Analysis. *Horm Res Paediatr.* 2018;89(6):389–96.
51. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* janeiro de 2006;54(1):1–15.
52. Pofi R, Feliciano C, Sbardella E, Argese N, Woods CP, Grossman AB, et al. The Short Synacthen (Corticotropin) Test Can Be Used to Predict Recovery of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1º de agosto de 2018;103(8):3050–9.
53. Broersen LHA, Pereira AM, Jørgensen JOL, Dekkers OM. Adrenal Insufficiency in Corticosteroids Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1º de junho de 2015;100(6):2171–80.
54. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *The Lancet.* maio de 2006;367(9522):1605–17.
55. Carteron NL. Cytokines in rheumatoid arthritis: trials and tribulations. *Mol Med Today.* agosto de 2000;6(8):315–23.

56. Oliveira ALB, Lima EC, Campos M, Luiza VL. Medicamentos para artrite reumatoide fornecidos pelo Sistema Único de Saúde em 2019 no Brasil: estudo de coorte. Ciênc Saúde Coletiva. maio de 2023;28(5):1443–56.
57. Brown P, Pratt AG, Hyrich KL. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis. BMJ. 17 de janeiro de 2024;e070856.
58. Moseley H. Non\_ionising\_Radiation\_Microwaves\_Ultrav. 31 de julho de 1988;228–36.
59. Das PK. Lasers\_and\_Optical\_Engineering. 2012;41–2.
60. Chopra S, Chawla HM. Lasers in chemical and biological sciences. New Delhi : Wiley Eastern Limited, organizador. New Delhi: Wiley Eastern Limited; 1992.
61. Jawad MM, Abdul Qade ST, Zaidan AA, Zaidan BB, Naji AW, Abdul Qade IT. An Overview of Laser Principle, Laser-Tissue Interaction Mechanisms and Laser Safety Precautions for Medical Laser Users. Int J Pharmacol. 1º de fevereiro de 2011;7(2):149–60.
62. Ashour HS. Tuning Semiconductor Laser Diode Lasing Frequency and Narrowing the Laser Linewidth Using External Oscillating Driving Field. J Appl Sci. 1º de maio de 2006;6(10):2209–16.
63. Marcos RL, Evaristo MM, de Almeida-Mattos P, Capeloa CN, Aguilera Cantero JMM, Prates RA, et al. Photobiomodulation Controls the Expression of Lipoxin Receptors, Promoting the Resolution of the Inflammatory Process in an Experimental Tendinitis Model. J Orthop Res. 5 de maio de 2025;43(5):1035–44.
64. Piva JA de AC, Abreu EM de C, Silva V dos S, Nicolau RA. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. An Bras Dermatol. outubro de 2011;86(5):947–54.
65. Assis L, Moretti AIS, Abrahão TB, Cury V, Souza HP, Hamblin MR, et al. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. Lasers Surg Med. 21 de novembro de 2012;44(9):726–35.
66. Zhang L, Kajiwara H, Kuboyama N, Abiko Y. REDUCTION OF CXCR4 EXPRESSION IN RHEUMATOID ARTHRITIS RAT JOINTS BY LOW LEVEL DIODE LASER IRRADIATION. LASER Ther. 2011;20(1):53–8.
67. Ribeiro BG, Alves AN, dos Santos LAD, Cantero TM, Fernandes KPS, Dias D da S, et al. Red and Infrared Low-Level Laser Therapy Prior to Injury with or without Administration after Injury

Modulate Oxidative Stress during the Muscle Repair Process. PLOS ONE. 15 de abril de 2016;11(4):e0153618.

68. Alves ACA, Albertini R, dos Santos SA, Leal-Junior ECP, Santana E, Serra AJ, et al. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. Lasers Med Sci. 29 de maio de 2014;29(3):911–9.

69. R Hamblin M. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. AIMS Biophys. 2017;4(3):337–61.

70. Tomazoni SS, Frigo L, dos Reis Ferreira TC, Casalechi HL, Teixeira S, de Almeida P, et al. Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats—part 2: biochemical aspects. Lasers Med Sci. 9 de novembro de 2017;32(8):1879–87.

71. Andersson MLE, Forslind K, Hafström I. Patients with Early Rheumatoid Arthritis in the 2000s Have Equal Disability and Pain Despite Less Disease Activity Compared with the 1990s: Data from the BARFOT Study over 8 Years. J Rheumatol. junho de 2017;44(6):723–31.

72. Goodman SM, Figgie MA. Arthroplasty in patients with established rheumatoid arthritis (RA): Mitigating risks and optimizing outcomes. Best Pract Res Clin Rheumatol. agosto de 2015;29(4–5):628–42.

73. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. Life Sci. outubro de 1997;61(19):1861–78.

74. Yamashita T, Hagino H, Hayashi I, Hayashibara M, Tanida A, Nagira K, et al. Effect of a cathepsin K inhibitor on arthritis and bone mineral density in ovariectomized rats with collagen-induced arthritis. Bone Rep. dezembro de 2018;9:1–10.

75. Liu Q, Nan N, Li W, Dong M, Pu W, Liu Y, et al. The Temporal Changes in Ankle Joint Pathology, Pain and Secondary Osteoporosis in Collagen-Induced Arthritis Rats. J Inflamm Res. novembro de 2024;Volume 17:9795–804.

76. Marcos RL, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Magdalou J, Lopes-Martins RÁB. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. J Mech Behav Biomed Mater. janeiro de 2014;29:272–85.

77. Ferreira DM, Zângaro RA, Villaverde AB, Cury Y, Frigo L, Picolo G, et al. Analgesic Effect of He-Ne (632.8 nm) Low-Level Laser Therapy on Acute Inflammatory Pain. Photomed Laser Surg. abril de 2005;23(2):177–81.
78. Arendt-Nielsen L, Morlion B, Perrot S, Dahan A, Dickenson A, Kress HG, et al. Assessment and manifestation of central sensitisation across different chronic pain conditions. Eur J Pain. 5 de fevereiro de 2018;22(2):216–41.
79. Iyer P, Lee YC. Why It Hurts. Rheum Dis Clin N Am. maio de 2021;47(2):229–44.
80. Heinemeier KM, Schjerling P, Heinemeier J, Møller MB, Krogsgaard MR, Grumsen T, et al. Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. Sci Transl Med. 6 de julho de 2016;8(346).

## Anexos

### **Anexo I – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais de Laboratório.**



Universidade Nove de Julho

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "ANÁLISE DOS EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DOS CONDRÓCITOS E CARTILAGEM ARTICULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO", protocolada sob o CEUA nº 1021240821 (ID 000272), sob a responsabilidade de **Rodrigo Labat Marcos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 21/09/2021.

We certify that the proposal "ANALYSIS OF THE EFFECTS OF PHOTOBIMODULATION ON THE ACTIVITY OF CHONDROCYTES AND JOINT CARTILAGE IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS: IN VITRO AND IN VIVO STUDY", utilizing 40 Heterogenous rats (40 males), protocol number CEUA 1021240821 (ID 000272), under the responsibility of **Rodrigo Labat Marcos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 09/21/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 12/2023 Área: Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde

Origem:	Biotério - Unidade Vergueiro	sex:	Machos	idade:	3 a 6 meses	Quantidade:	40
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 350 g		
Linhagem:	Wistar						

São Paulo, 08 de junho de 2025

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

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



**Anexo II – Certificado do Curso para o Uso de Animais em Ensino e Pesquisa Científica.**



**PRÓ-REITORIA DE  
EXTENSÃO E CULTURA**

*Certificado*

Certificamos que

**Orlando Romano Neto,**

portador(a) do CPF nº 133.579.148-59, participou do curso de extensão "Curso básico para a utilização de Animais em Ensino e Pesquisa Científica" , coordenado por Prof.a Dr.a DANIELA SANTORO ROSA, no período de 5/7/2023 a 7/7/2023, com carga horária total de 24 horas, sendo 12 horas de atividades práticas e 12 horas de atividades teóricas.

São Paulo, 24 de Julho de 2023.

Prof.\* Dr.\* Taiza Stumpf Teixeira  
Pró-Reitora de Extensão e Cultura

Código de Autenticação: 1VWU:MI4D:7U5U:FPOL  
Data: 24/07/2023  
Horário: 17:23:57.

A autenticidade do documento poderá ser confirmada no endereço <https://www.unifesp.br/verificacao-de-autenticidade> com as informações acima de data, hora e código.