



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOSÉ CARLOS RAPOZO MAZULO NETO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE LASER DE
BAIXA INTENSIDADE EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE**

Parnaíba-PI

2019

JOSÉ CARLOS RAPOZO MAZULO NETO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE LASER DE
BAIXA INTENSIDADE EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal do Piauí, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Linha de Pesquisa: Farmacologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira

**Parnaíba-PI
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde –
Campus Parnaíba Serviço de Processamento
Técnico

M476a Mazulo Neto, José Carlos Rapozo

Avaliação do efeito de diferentes doses de laser de baixa intensidade em modelo experimental de artrite [recurso eletrônico] / José Carlos Rapozo Mazulo Neto. – 2019.

1 Arquivo em pdf.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.

1. Laser. 2. Artrite. 3. Inflamação. I. Título.

CDD: 616.7

JOSÉ CARLOS RAPOZO MAZULO NETO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE LASER DE
BAIXA INTENSIDADE EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

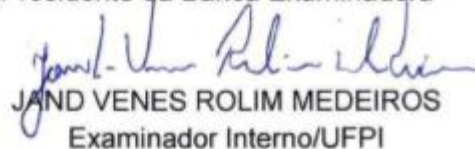
Aprovada em: 01/07/2019

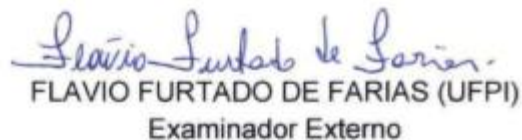
BANCA EXAMINADORA

Parnaíba, 01 de julho de 2019


MARCELO DE CARVALHO FILGUEIRAS (UFPI)
Co-orientador

Presidente da Banca Examinadora


JAND VENES ROLIM MEDEIROS
Examinador Interno/UFPI


FLAVIO FURTADO DE FARIAS (UFPI)
Examinador Externo


JOSÉ CARLOS RAPOZO MAZULO NETO
Discente

*Elevo os meus olhos para os montes; de onde me vem o socorro? O meu socorro vem do Senhor, que fez os céus e a terra. Não deixará vacilar o teu pé; aquele que te guarda não dormitará. Eis que não dormitará nem dormirá aquele que guarda a Israel. O Senhor é quem te guarda; o Senhor é a tua sombra à tua mão direita. De dia o sol não te ferirá, nem a lua de noite. O Senhor te guardará de todo o mal; ele guardará a tua vida. O Senhor guardará a tua saída e a tua entrada, desde agora e para sempre.
(Salmo 121)*

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade e por sempre estar comigo, a minha eterna gratidão. Agradeço em especial o meu avô Francisco Vitorino (*in memoriam*), minha avó Orminda, minha mãe Márcia e minha tia Rosangela, que se sacrificaram, se dedicaram e abdicaram de tempo para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional e moral. Também agradeço de forma especial a minha irmã Rafaella pelo apoio em todos os momentos e por estar sempre ao meu lado, a meu filho José Henrique que foi meu porto seguro e meu maior incentivo para essa concretização e a minha namorada Erica Tais que esteve ao meu lado e nunca deixou de me apoiar.

Ao meu orientador Gilberto Santos Cerqueira por acreditar no projeto e me proporcionar esta oportunidade, ao meu co-orientador Marcelo de Carvalho Filgueiras, que desde a graduação me acompanha, da Iniciação Científica até a Dissertação de Mestrado.

Aos professores Daniel Vasconcelos e Flávio Furtado o meu agradecimento, que de forma direta contribuíram para o projeto.

Aos meus colegas do LAMFIM (Laboratório de Morfologia e Fisiologia Muscular) e LAPHIS (Laboratório de Histologia e Morfologia) e todos os meus amigos ao longo dessa jornada.

RESUMO

Introdução: Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune caracterizada por degeneração crônica das articulações sinoviais, compreendendo um conjunto de processos inflamatórios simétricos que afetam essas articulações e estruturas periarticulares. A Terapia a Laser de Baixa Intensidade (LBI) é um procedimento terapêutico amplamente utilizado no meio clínico, tendo em vista seus efeitos biológicos no tecido de maneira não térmica e sendo uma opção terapêutica eficaz e com menos efeitos colaterais. Apesar dos efeitos clínicos já relatados em diversos estudos, seu mecanismo de ação e parâmetros dosimétricos não são totalmente compreendidos, havendo grande divergência sobre dose e efeito. **Objetivos:** Avaliar o efeito do laser terapêutico de baixa intensidade (904 nm) nas doses de 1J e 5J em modelo experimental de artrite. **Metodologia:** Os animais foram distribuídos em 5 grupos de 6 animais cada. No primeiro grupo (Salina) foi administrado apenas 0,9% de salina estéril. Grupo que recebeu agente flogístico (Zymosan); Grupo Laser 1 (recebeu a injeção de agente flogístico e tratamento com Laser 1J/cm² (L1) e Grupo Laser 5 (L5- recebeu agente flogístico e tratamento com Laser 5J/cm²), grupo (Dexa) foi pré tratado meia hora antes com dexametasona induzida intraperitoneal 4mg/kg e posteriormente submetido a indução da artrite. Foram avaliados variação de volume de pata, avaliação da dor (nocicepção), avaliação da destruição articular (HE), espessura da cartilagem (Azul de Toluidina) e quantificação do colágeno total (picrossirius). **Resultados:** Obtivemos redução do edema e melhora estatística na redução da dor, sendo eficaz na dose de 1j/cm². Na análise morfológica, foi obtido redução na destruição articular, redução na espessura da cartilagem e aumento na quantidade total de colágeno, sendo mais efetivo na dose de 5j/cm². **Conclusão:** A partir dos resultados expostos podemos sugerir que a terapia Laser de Baixa Intensidade na dose de 1J/cm² tem ação mais significativa na fase aguda da doença, no que se refere a sinais clássicos do processo inflamatório, edema e dor. Enquanto a dose de 5J/cm², apesar de ser eficaz na fase aguda é no estágio crônico da doença que apresenta resposta significativa, quando avaliado sua ação na cartilagem articular e seus componentes.

Palavras-chave: Laser. Artrite. Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease characterized by chronic degeneration of the synovial joints, comprising a set of symmetric inflammatory processes that affect these joints and periarticular structures. Low Intensity Laser Therapy (LBI) is a therapeutic procedure widely used in the clinical environment, considering its biological effects on the tissue in a non-thermal way and being an effective therapeutic option and with fewer side effects. Despite the clinical effects already reported in several studies, its mechanism of action and dosimetric parameters are not fully understood, with great divergence on dose and effect. **Objectives:** To evaluate the effect of low intensity therapeutic laser (904 nm) at doses of 1J and 5J in an experimental model of arthritis. **Methodology:** The animals were distributed in 5 groups of 6 animals each. In the first group (Saline), only 0.9% of sterile saline was administered. Group that received phlogiston agent (Zymosan); Laser Group 1 (received the injection of flogistic agent and treatment with Laser 1J / cm² (L1) and Group Laser 5 (L5 received flogistic agent and treatment with Laser 5J / cm²), group (Dexa) was pretreated half an hour before with paw volume variation, pain evaluation (nociception), evaluation of joint destruction (HE), thickened cartilage (Toluidine Blue), and quantification of total collagen (picrossirius) **Results:** We obtained reduction of edema and a statistical improvement in the reduction of pain, being more effective in the dose of 1j / cm². **Conclusion:** From the results presented, it can be suggested that low-intensity laser therapy at a dose of 1J / cm² has the highest total amount of collagen, being more effective in the dose of 5j / cm². Will be more significant in the acute phase of the disease, as regards the classic signs of inflammation, swelling and pain. While the dose of 5J / cm², despite being effective in the acute phase is in the chronic stage of the disease that is present a significant response.

Keywords: Lasers. Arthritis. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES- Anti-inflamatórios não-esteroidais
AR- Artrite Reumatoide
AT- Azul de Toluidina
ATM- Articulação temporomandibular
ATP- Trifosfato de adenosina
COX- Ciclo-oxigenase
DMARDs- Drogas modificadoras do curso da doença
Ga-Al-As- Arseneto de gálio e alumínio
Ga-As- Arseneto de gálio
HE- Hematoxilina e Eosina
HeNe- Hélio-neônio
IL- Interleucina
J/cm²- Joule/cm²
LBI- Laser de baixa intensidade
nm- nanômetro
NO- Oxido nítrico
PGs- Proteoglicanos
PGE- Prostaglandinas
ROS- Espécies reativas de oxigênio
TNF- Fator de necrose tumoral
TLR- Receptores toll-like
µm- Micrometro

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Parâmetros utilizados na Terapia com LBI.....	27
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos utilizados durante a pesquisa.....	26
Tabela 2. Efeito da Fotobiomodulação sobre a cartilagem articular.....	34
Tabela 3. Efeito da Fotobiomodulação sobre a porcentagem de fibras de colágeno.....	36
Tabela 4. Efeito da Fotobiomodulação na avaliação da medida linear quantificando a espessura da cartilagem.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático representando as citocinas e células imunes envolvidas na AR.....	16
Figura 2. Anatomia óssea e articular do pé e tornozelo humano (A) e da pata de rato (B)....	17
Figura 3. Comprimento de onda (λ , nm) e potência máxima de saída (mW) de Lasers e LEDs utilizados na terapia Laser de Baixa Intensidade.....	19
Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental.....	25
Figura 5. Cronograma experimental usado para edema e avaliação da dor (Fase aguda)	26
Figura 6. Cronograma experimental usado para a análise morfológica (Fase crônica)	27
Figura 7. Avaliação do Edema articular induzido por zymosan.....	32
Figura 8. Avaliação nociceptiva induzida por zymosan.....	33
Figura 9. Efeito do Laser na dose 1 e 5J/cm ² nos escores de degeneração articular.....	34
Figura 10. Região da articulação dos diferentes grupos.....	35
Figura 11. Efeito da Fotobiomodulação nas doses de 1 e 5(J/cm ²) sobre a porcentagem de fibras de colágeno.....	36
Figura 12. Região da articulação dos diferentes grupos mostrando a expressão de colágeno...37	
Figura 13. Efeito da Fotobiomodulação nas doses de 1 e 5(J/cm ²) sobre espessura da cartilagem articular.....	38
Figura 14. Região da articulação dos diferentes grupos mostrando a espessura da superfície.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2.REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Artrite Reumatoide.....	15
2.2. Laser.....	17
2.3 Lasers e Processo Inflamatorio	20
2.4. Modelo experimental de Artrite	23
3 OBJETIVOS E METAS.....	24
3.1 Objetivos	24
3.2 Geral.....	24
3.3 Específicos	24
4.MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Animais	25
4.2 Delineamento Experimental.....	25
4.3 Indução da Artrite.....	26
4.4 Grupos experimentais.....	26
4.4 Tratamento com o Laser.....	27
4.7 Eutanásia	28
4.8 Análise.....	28
4.8.1 Avaliação do efeito antinociceptivo.....	28
4.8.2 Avaliação do edema articular	28
4.8.3 Análise Histopatológica e Morfométrica	29
4.8.4 Coloração em Hematoxilina e Eosina	29
4.8.5 Coloração em Picrossirius.....	30
4.8.6 Coloração em Azul de Toluidina	30
4.8.7 Análises Estatísticas	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 Avaliação do efeito sobre o edema articular induzido por Zymosan	32
5.2 Avaliação do efeito do laser sobre o efeito antinociceptivo.....	33
5.3 Avaliação do efeito do laser na cartilagem articular.....	33
5.4 Avaliação do efeito do laser na quantificação do colágeno	36
5.5 Avaliação do efeito do laser na espessura da cartilagem articular.....	36
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO	45
8 REFERÊNCIAS	46
ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune caracterizada por degeneração crônica das articulações sinoviais, compreendendo um conjunto de processos inflamatórios simétricos que afetam essas articulações e estruturas periarticulares. Apresenta diversas manifestações sistêmicas que comprometem a membrana sinovial, a qual representa o sítio inflamatório primário da artrite, com sinais de hiperplasia celular e de processo inflamatório, configurando a sinovite. Quando essa condição não é tratada, pode apresentar destruição articular progressiva, com perda cartilaginosa e óssea, deficiência funcional e complicações sistêmicas (CROSS *et al.*, 2014).

A prevalência da AR é cerca de 1% da população mundial, quando comparada ao sexo masculino as mulheres são três vezes mais acometidas. A doença tem como característica ser heterogênea e sua ocorrência é observada em diversos grupos, sendo os primeiros sintomas da AR descritos entre os 40 e os 60 anos, em indivíduos com a idade inferior a 45 anos as mulheres apresentam maior prevalência (VAZ *et al.*, 2013).

A terapia da AR tem sido focada na desaceleração da progressão degenerativa da doença por meio do uso de medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), corticosteróides, drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs), drogas imunossupressoras, usadas sozinhas ou em combinação (SMOLEN *et al.*, 2017). Embora efetivos no tratamento da AR, estes medicamentos podem causar sérios efeitos colaterais tais como úlceras gastrointestinais, problemas cardiovasculares, nefrotoxicidade, toxicidade pulmonar e cirrose (CHOUDHARY *et al.*, 2015; RUSCITTI *et al.*, 2017). Portanto, torna-se importante identificar outras estratégias de tratamento para um efeito anti-inflamatório. Neste contexto, a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) poderia ser considerada uma alternativa não farmacológica promissora no tratamento da AR devido à sua ação anti-inflamatória (SHAKOURI. *et al.*, 2010; TIM *et al.*, 2016).

O LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) funciona com a amplificação de luz por emissão estimulada de radiação e foi utilizado pela primeira vez em 1960. Seu uso tem sido adotado, por exemplo, no campo da periodontia, por conta de seus efeitos benéficos adjuvantes no tratamento periodontal convencional. Quando a irradiação do LASER atinge células ou tecidos, os valores da densidade de energia e o comprimento de onda podem fazer diferença biológica (AHN *et al.*, 2014). Nos últimos anos, a terapia com LASER vem se tornando um agente terapêutico promissor no tratamento de várias condições

musculoesqueléticas e inflamatórias, tais como a artrite, as tendinopatias, a dor de garganta, a dor lombar e a fadiga muscular devido à sua capacidade de estimulação da cicatrização óssea, modulação do processo inflamatório e efeitos de alívio da dor (ALMEIDA *et al.*, 2014).

O efeito do laser de baixa intensidade está baseada sobre sua ação no tecido que está relacionada à possibilidade de inibir o aparecimento de fatores quimiotáticos nos estágios iniciais da inflamação, de interferir com os efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação, inibir a síntese das prostaglandinas, alguns efeitos benéficos foram observados com o uso terapêutico de lasers de baixa intensidade (LOPES, 2008). O efeito analgésico justifica-se, pelo caráter anti-inflamatório, por interferência na mensagem elétrica, pelo estímulo à liberação de β -endorfina, por evitar a redução do limiar de excitabilidade dos receptores dolorosos, pela eliminação de substâncias algógenas e pelo favorecimento do equilíbrio energético local (ENWEMEKA, 2004).

Na literatura não existe consenso sobre a potência e a densidade do laser mais efetivos na terapia da AR, e portanto não há ainda padronização nos protocolos empregados. Segundo Guirro e Weis (2009), a densidade de energia ou dose deve ser calculada precisamente para estabelecer diretrizes de tratamento em lesões específicas. O *laser* pode possuir vários efeitos de acordo as dosagens escolhidas: efeito analgésico – de 2 a 4J/cm²; efeito anti-inflamatório – de 1 a 3J/cm²; efeito regenerativo – de 3 a 6J/cm²; efeito circulatório– de 1 a 3J/cm².

Assim sugerir parâmetros para tratamento com o laser de baixa intensidade é controverso, devido as diferentes repostas provocadas pelos diferentes tipos de laser, em diferentes doses e comprimentos de onda, variando seus efeitos de acordo com o quadro patológico. Fazem-se necessários estudos que busquem padronizar o tipo, a dose e o comprimento de onda a serem utilizado em diferentes condições patológicas para assim fazer uma dose resposta do laser a ser utilizada. Desta forma se justifica a investigação dos efeitos do laser de baixa potência (904nm), nos parâmetros propostos, em modelo de artrite induzida, pela falta de evidencias científicas que avaliem os benefícios dessa modalidade de laser em parâmetros inflamatórios, ação antioxidante, via do óxido nítrico e na morfologia da cartilagem articular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica e progressiva caracterizada por inflamação sinovial e hiperplasia, produção de auto anticorpos e destruição de cartilagem e osso. Na AR, a membrana sinovial é transformada em um tecido inflamatório hipertrófico, em consequência do influxo de células inflamatórias, incluindo monócitos, células T e B oriundas da circulação sanguínea e células sinoviais residentes hiperplásicas. Essa doença pode afetar 1% da população mundial e pode chegar a 5% dependendo do grupo e da faixa etária estudada. No Brasil, estudos de prevalência mostram uma variação de 0,2 a 1% em adultos, e está associada com morbidade significativa e aumento da mortalidade em regiões desenvolvidas do mundo (ANDRADE *et al.*, 2016).

A principal característica da AR a inflamação, que ocorre como uma resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo dinâmico e mediado que visa destruir, diluir ou isolar o agente nocivo desencadeando uma série de eventos que tentam curar e reconstituir o tecido danificado. Quando ocorre um estímulo nocivo no organismo são acionados os mecanismos de defesa, respostas imunes inatas e adquiridas. A imunidade inata utiliza células fagocíticas (neutrófilos, monócitos macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células “natural killer”, já a imunidade adquirida envolve a proliferação de células do tipo linfócitos T e B, quando os receptores de superfície dessas células se ligam aos antígenos (DELVES; ROITT, 2000). Os macrófagos secretam um amplo espectro de mediadores, incluindo enzimas hidrolíticas, lipídios bioativos, quimiocinas e citocinas, além de espécies reativas do oxigênio (ROS) resultando no estresse oxidativo, que é uma condição caracterizada pelo aumento da resposta oxidante, devido ao aumento da produção de (ROS), sem o aumento equivalente da resposta antioxidante (GORDON, 2007). Diversas subpopulações celulares produzem citocinas durante a inflamação sinovial e o padrão desta produção pode variar de acordo com o estágio da doença (figura 1).

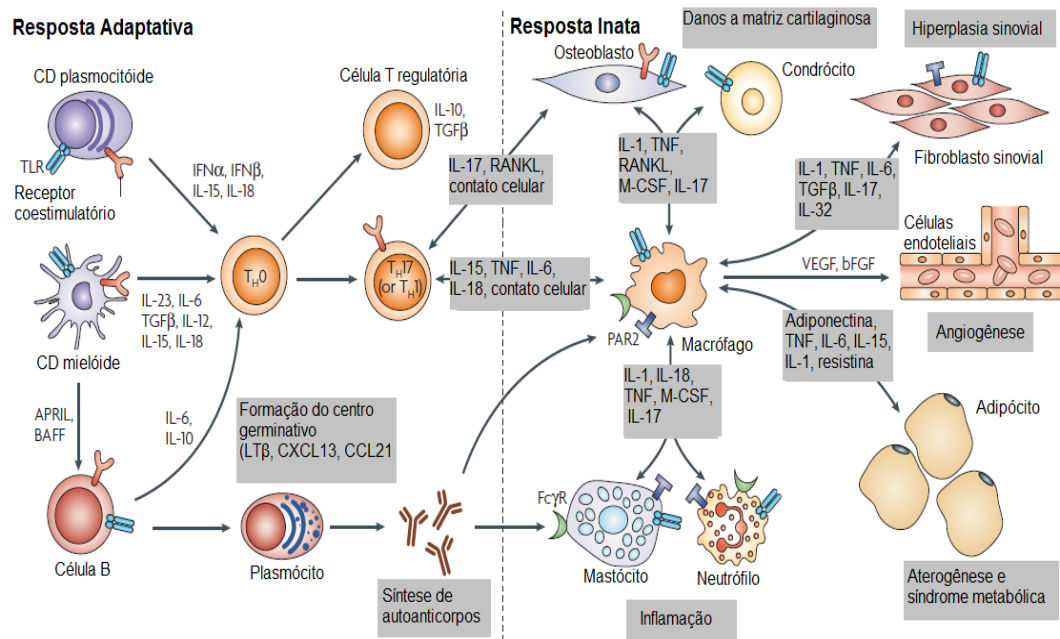


Figura 1. Desenho esquemático representando as citocinas e células imunes envolvidas na AR. (DOS ANJOS, 2016).

Outra importante característica do tecido inflamatório sinovial é a degeneração de estruturas adjacentes, como cartilagem e osso. A formação do *pannus* sinovial é causada por diferentes processos, dentre eles: a proliferação de células sinoviais semelhantes a fibroblastos e sinoviócitos, angiogênese, acúmulo de macrófagos, linfócitos e migração de células polimorfonucleares para o tecido sinovial. Além disso, as interações célula-célula entre sinoviócitos, linfócitos e monócitos levam à produção de diversos mediadores inflamatórios e à produção de grandes quantidades de colagenase, que são enzimas que causam danos diretos ao tecido articular (TRAWITZKI *et al.*, 2016). As manifestações podem ser divididas em articulares e extra articulares, a manifestação articular pode ser revestida na sua fase inicial, porém a sinovite persistente e não controlada determina destruição óssea e cartilaginosa, assim caracterizando a fase crônica (DEODHAR *et al.*, 2016).

Existem várias articulações sinoviais que podem ser afetadas pela AR. O acometimento destas articulações está presente em 80-90% das pessoas que apresentam AR, sendo as articulações do tornozelo (como a talocrural e a subtalar) observada em 10-20% (MICHELSON *et al.*, 1994). O desenho esquemático abaixo (figura 2) representa a anatomia óssea e articular do pé e tornozelo comparada de humano e camundongo.

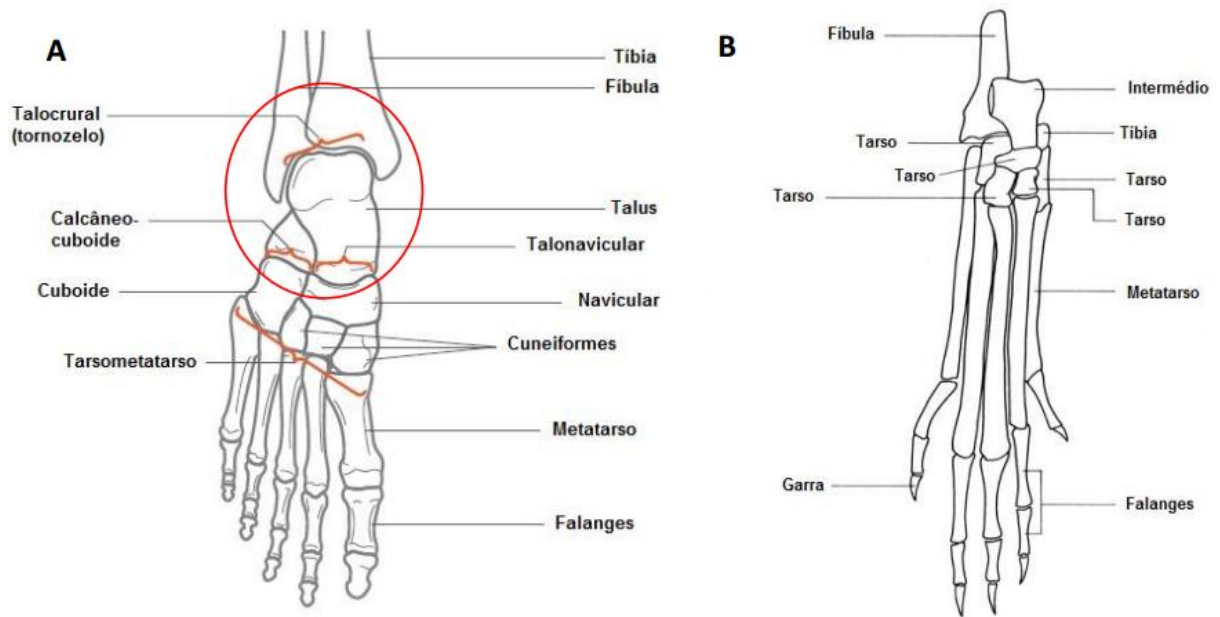


Figura 2-Anatomia óssea e articular do pé e tornozelo humano (A) e da pata de rato (B). Adaptado de HELLIWELL *et al.*, 2011.

O tratamento de pacientes com AR é baseado na administração de medicamentos anti-inflamatórios modificadores da doença (DMARDs), como metotrexato e agentes inibidores de IL-1 β e TNF- α . Porém, a recidiva da doença ativa e o aumento concomitante da dor articular não é incomum. Outros fármacos usados são os corticosteroides e anti-inflamatórios, entretanto os anti-inflamatórios tem perdido seu papel como primeira opção farmacológica do tratamento devido seu efeito limitado, incapacidade de modificar o curso da doença a longo prazo e por conta de seus efeitos colaterais tóxicos, em especial o cardíaco e gastrointestinal. Já os corticosteroides são eficazes na supressão da inflamação e diminuição da destruição articular, quando utilizado no período inicial da doença, entretanto o uso na fase tardia deve ser moderado devido aos seus significantes danos colaterais (SMOLEN; ALETAHA; REDLICH, 2012).

Novas terapias têm sido investigadas a fim de reduzir ou evitar os danos colaterais, assim, um método de tratamento promissor é o uso do laser de baixa intensidade. Ao longo das últimas décadas, esse recurso foi introduzido como alternativa não invasiva para o tratamento da artrite reumatoide, por propiciar reações fotoquímicas favoráveis à resolução do processo inflamatório e dano tecidual, contudo existem controvérsias sobre as doses e potências e seus mecanismos efetores não são completamente conhecidos (BROSSEAU *et al.*, 2005).

2.2. Fotobiomodulação

O termo LASER é um acrônimo para *Light Amplification by Emission of Radiation* (Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada da Radiação), nisto, algumas características lhe concernem, visto que difere da luz normal ou ambiente, como monocromaticidade, colimação e coerência (ALBERTINE, 2002). Estas características também se fazem dependentes de outros fatores para produzir efeitos estimulantes de forma correta, no caso o comprimento de onda, dose e intensidade da luz utilizada na radiação. Para a emissão do LASER também se considera o material que compreende o diodo, sendo ele composto de vários elementos químicos, assim sendo, alguns comprimentos de onda LASER utilizado por fisioterapeutas são HeNe (632.8nm), Ga-Al-As (805 ou 650nm) e Ga-As (904nm) (GUIRRO; WEISS, 2009).

A partir do desenvolvimento do laser em 1960, houve um interesse por parte da comunidade científica, a fim de investigar essa tecnologia e suas possíveis aplicações nas áreas da Biologia, Medicina e Odontologia. O entendimento das interações da luz laser com os tecidos biológicos parte dos mesmos princípios básicos da interação da luz com a matéria em geral, ou seja, a radiação pode ser refletida, transmitida, absorvida e/ou espalhada. A luz laser, por outro lado, tem características próprias, tais como alta monocromaticidade e coerência temporal e espacial (que leva a conhecida capacidade de colimação desta luz). A monocromaticidade vem do fato dos sistemas lasers emitirem luz em uma banda estreita de frequências. A coerência temporal indica que as diferentes ondas mantêm relação fixa entre as respectivas fases, no tempo. A coerência espacial é dependente da geometria do sistema laser, que em geral origina um feixe com relação também fixa entre as fases espaciais das ondas. As características de coerência são, na maioria dos lasers, muito maiores que em fontes tradicionais de luz. (RIBEIRO, 2016).

Os lasers terapêuticos mais usados na práticas clínicas e laboratorial encontram-se em uma faixa espectral variada entre o visível e infravermelho, com destaque para o de Hélio-néon (He-Ne), na faixa visível, e os de arseneto de gálio (Ga-As) e arseneto de gálio e alumínio (Ga-Al-As), também denominados de semicondutores ou diódico, com emissão na faixa do infravermelho ou visível. O intervalo espectral mais utilizado se encontra entre os comprimentos de onda de 630 e 940nm (nanômetro), constituindo a chamada “janela terapêutica” para tecidos biológicos (KITCHEN, 2003). De acordo com Lopes (2008), os processos fisiológicos estimulados pela fotobiomodulação podem se manifestar, clinicamente, em três modos: (I) diretamente na célula – produzindo um efeito primário ou imediato, que aumenta o metabolismo celular, ou a síntese de endorfinas e diminuindo a liberação de transmissores nociceptivos, como a bradicinina e a serotonina; (II) na estabilização da

membrana celular – clinicamente, observa-se uma ação estimulativa e analgésica dessa terapia, havendo também um efeito secundário ou indireto do aumento do fluxo sanguíneo e da drenagem linfática (dessa forma, constata-se uma ação mediadora do laser na inflamação); e (III) na ativação do sistema imunológico – efeitos terapêuticos gerais ou tardios. A figura a seguir apresenta esquematicamente os tipos de dispositivos terapêuticos de luz, possíveis comprimentos de onda e a potência de saída máxima (KARU, 2003)

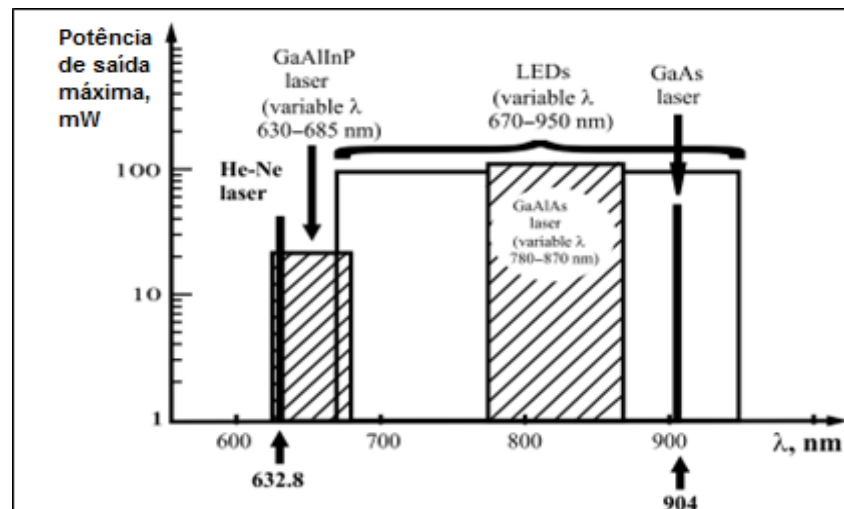


Figura 3. Comprimento de onda (λ , nm) e potência máxima de saída (mW) de Lasers e LEDs utilizados na terapia Laser de Baixa Intensidade. Fonte: KARU, 2003.

A ação do LBI está baseada na absorção da luz pelas células, nas quais modulam reações bioquímicas e estimulam a atividade mitocondrial. Esses efeitos tanto podem acelerar a síntese de DNA, RNA e de proteínas regulatórias do ciclo celular, promovendo assim tanto proliferação, quanto aumentar a produção de ROS, o que poderia desencadear alterações em enzimas responsáveis pelos mecanismos de reparo do DNA e conseqüentemente, danos subletais e até mesmo irreversíveis no DNA (FONSECA *et al.*, 2015; SERGIO *et al.*, 2012).

Pesquisas recentes têm demonstrado que os efeitos do LBI em células animais podem ser representados por uma parábola. Com o aumento da energia os efeitos estimulantes sobre a célula são diminuídos gradualmente e, quando o limiar é atingido, os efeitos inibitórios sobre as células emergem (WANG *et al.*, 2014). A inibição celular causada pelo LBI em doses elevadas tem sido relatada em diversos trabalhos, esses pesquisadores relacionaram a apoptose celular pela via mitocondrial com os seguintes eventos celulares: (i) geração imediata de ROS mitocondrial, (ii) despolarização mitocondrial e (iii) ativação de caspase-3, levando assim a morte celular. Porém, outros mecanismos para ativação da via mitocondrial e conseqüente

permeabilização da membrana da mitocôndria, também podem estar envolvidos no processo apoptótico induzido por LBI em doses elevadas, como ativação de Bax e inibição de Akt pela proteína glicogênio sintase quinase 3 β (HUANG *et al.*, 2011).

A resposta bifásica em relação à dose, que pode ser explicada pela lei de “Arndt-Schulz”, tem seu princípio afirmando que um fraco estímulo acelera ligeiramente a atividade, e estímulos mais fortes aumentam ainda mais essa atividade, até que um pico seja atingido e um estímulo mais forte ainda poderá suprimir a atividade, ou seja se a luz aplicada não é de irradiância suficiente ou o tempo de irradiação é demasiado curto, então não há nenhuma resposta. Se a irradiância é muito alta ou tempo de irradiação é muito longo, em seguida, a resposta pode ser inibida (MARTIUS, 1923). Então, por meio dessa dosagem bifásica, foi demonstrado que não existem parâmetros de irradiação e dose ideais ainda estabelecidos, estes provavelmente ainda irão variar de acordo com a doença, superfície da mucosa ou pele (variando nas camadas celulares e profundidades a partir da superfície de aplicação) e fatores individuais associados ao paciente (HUANG, 2011).

2.3 Fotobiomodulação e Processo Inflamatório

Terapias utilizando LBI têm demonstrado resultados interessantes no controle do processo inflamatório, através da redução da dor, do edema e promovendo o reparo dos tecidos lesionados (ALBERTINI *et al.*, 2007). Outra vantagem que vem sendo descrita é quantidade mínima de efeitos adversos observados em diversas terapias medicamentosas. A hipótese de redução da duração da fase aguda inflamatória e estimulação da reparação tecidual foi inicialmente elaborada para explicar o alívio da dor obtido com o tratamento com o laser. Embora a eficácia anti-inflamatória do tratamento com laser de baixa potência seja controversa para alguns autores, estudos têm demonstrado efeitos no nível de prostaglandinas E2 (PGE2), importante marcador inflamatório, e na formação do edema articular, tanto *in vitro* (SAKURAI *et al.*, 2000) quanto *in vivo* (ALBERTINI *et al.*, 2004).

A utilização de LBI é sugerida como alternativa em curto prazo para redução da dor e da rigidez matinal na AR (BROSSEAU *et al.*, 2005), entretanto estudos recentes reportaram resultados diversos sobre a terapia. Meireles *et al.* (2010) aplicaram LBI ($\lambda= 785$ nm, dose de 3 J/cm² e potência de 70 mW) na mão de pacientes com AR e não observou efeitos positivos relacionados a diminuição da dor ou rigidez articular. Em outro estudo, Castano *et al.* (2007) aplicaram LBI ($\lambda= 810$ nm, dose de 3-5 J/cm² e potência de 5-50 mW) em joelho de ratos com AR induzida e observaram diminuição do edema articular, relacionando com a diminuição do

nível de prostaglandina (PGE₂). Já Alves e et al (2013), também utilizando articulação do joelho de ratos com AR induzida, aplicaram LBI ($\lambda = 780$ nm, dose de 7,7 J/cm² e potência de 22 mW) e observaram que o laser foi eficaz na modulação inflamatória, ao diminuir, entre outros, o número de células mononucleares inflamatórias, o exsudato proteico, a hemorragia medular, a hiperemia e a necrose.

Matera *et al.* (2003) demonstraram a eficácia da ação antiinflamatória e analgésica da LBI sobre os tecidos, onde sua irradiação estimula as mitocôndrias celulares, promovendo um aumento na produção de ATP intracelular; favorece a produção de ácido araquidônico e a transformação de prostaglandina em prostaciclina, justificando sua ação antiedematosa e antiinflamatória; promove aumento da endorfina circulante (beta endorfina) proporcionando o efeito analgésico na dor não inflamatória. ALBERTNI *et al.* (2002) propôs investigar o efeito da LTBI no processo inflamatório agudo, em modelo clássico de edema de pata em ratos. O edema foi induzido por injeção suplantar de carragenina, o volume da pata foi mensurado antes da indução do edema e após intervalos de uma hora, num total de quatro horas utilizando hidroplestimógrafo. A irradiação laser baseou-se em diferentes 23 protocolos para determinar densidade de energia, período e taxa de repetição. Os resultados demonstraram que a densidade de energia para obter o efeito anti-inflamatório com laser de AsGaAl é de 1 J/cm² e 2,5 J/cm², reduzindo o edema em 27% e 45,47%, respectivamente.

Andrade *et al.* (2016) em seu estudo, analisou a dose resposta do laser de baixa potência na produção de óxido nítrico pelos macrófagos, utilizando potência de 30, 50 e 100 mW, para durações de 10, 30 e 60 s, produzindo um total de nove combinações de energia de densidade ,11, 18, 32, 36, 54, 64, 107 (50 mW-60 s), 107 (100 mW-30 s) e 214 J / cm² , em seu resultado sugere que é necessário doses mais elevadas para estimular uma maior produção de NO, que a LBI pode ser uma ferramenta resposta imunológica, colaborando com a resposta anti-inflamatória produzida por macrófagos. Martins *et al.* (2006) descreveram um efeito inibitório do LBI (650 nm – 2,5 mW) sobre a migração de leucócitos (neutrófilos) para o espaço pleural no modelo de pleurisia em camundongos induzida por carragenina, com densidades de energia de 1 J/cm², 2,5 J/cm² e 5 J/cm² aplicadas na 1^a, 2^a e 3^a hora após a indução inflamatória. Boschi (2008) em seu estudo sobre o efeito anti-inflamatório da terapia laser de baixa potência (660 nm) na pleurisia em ratos, observou que o laser de 660 nm induziu um efeito anti-inflamatório caracterizado por inibição do influxo leucocitário total e diferencial, proteína total, NO, IL-6, IL-10 e TNF- α , mas mantendo altamente dependente da dose. Nessas condições, o tratamento a laser com 2,1 joules foi mais eficaz do que 0,9 joule e 4,2 joules.

Outras funções do laser de baixa potência (632,8nm), em modelo experimental de osteoartrite, é o aumento na produção de mucopolissacarídeos, os quais são responsáveis por manter as fibras de colágeno juntas e assegurar a integridade da cartilagem, também aumenta a produção de proteínas de choque preservadoras dos condrócitos da cartilagem sinovial. De acordo com Haapala *et al.* (2001), o laser melhora as características histopatológicas da cartilagem, o que é de extrema importância em casos de sinovite, visto que o componente inflamatório é importante na patogênese da lesão da cartilagem articular.

Gum, Reddy, Bittel e Enwemeca (1997), descreveram um acréscimo de 23% na concentração de colágeno em tendões de coelhos tratados com o LBI quando comparados ao grupo controle. O aumento da concentração de colágeno foi correlacionado com a melhora da cicatrização. Ainda Reddy, Bittel e Enwemeca (2001) utilizaram o laser durante cinco dias por semana, durante três semanas em peles de pé de ratos diabéticos. Nesse estudo, o laser acelerou o reparo tecidual, sendo evidente o incremento a síntese de colágeno.

Lin *et al.* (2004) avaliaram a cartilagem articular, em seu estudo observaram em joelhos de coelhos que receberam injeção intra-articular de solução de papaína, usaram a LBI no comprimento de onda 632 nm e potência de $3\text{w}/\text{cm}^2$, aplicada três vezes na semana por 8 semanas, observando na cartilagem a presença de proteínas que previnem a morte de condrócitos. Gottlieb *et al.* (2006) aplicaram o laser com comprimento de onda de 692,6 nm nas doses de $1\text{j}/\text{cm}^2$ e $4\text{j}/\text{cm}^2$ na cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a lesão no ligamento, observaram o aumento da síntese de proteoglicanas nos animais irradiados com a maior densidade de energia.

Outros dados relatados por Pallota *et al.* (2012), utilizando um laser de comprimento de onda de 810nm apontam uma redução na contagem de neutrófilos nos tratamentos com doses de 3J, 6J e 10J, 3h após a indução da inflamação no joelho de ratos, não havendo o mesmo efeito para o grupo tratado com 1J. Por outro lado, estudos demonstram que em doses menores há maior redução de citocinas e de migração de células inflamatórias (ALMEIDA *et al.*, 2014)

Desta forma, tendo conhecimento desses resultados, fica claro que há muito a ser pesquisado para compreender os efeitos da Fotobiomodulação nos parâmetros sugeridos, visto que em outros comprimentos de ondas, potências e doses diferentes apresentaram resultados positivos no processo inflamatório, como redução de mediadores inflamatórios. Assim o laser de 904nm pode apresentar uma ação anti-inflamatória em modelo experimental de artrite em camundongo interferindo diretamente na liberação de mediadores inflamatórios, via do óxido nítrico e na morfologia da cartilagem, tudo isso podendo variar de acordo com a dose aplicada.

2.4. Modelo Experimental da Artrite

Atualmente existem diversos modelos experimentais, cada qual com suas peculiaridades. Modelos experimentais de AR não autoimunes têm sido utilizados com o objetivo de caracterizar o processo inflamatório associado às articulações, incluindo a formação de edema articular, migração de leucócitos, incapacitação articular (PENIDO *et al.*, 2006).

Neste estudo, foi utilizado o modelo de artrite induzida por zimosan, que é caracterizado por uma reação inflamatória articular restrita à articulação estimulada com zimosan (monoartrite). As partículas de zimosan atuam como ativadores locais da via alternativa do complemento, disparando a ativação local do sistema imune inato, levando à secreção de enzimas lisossomais no interior da cavidade sinovial. Ao ser fagocitado preferencialmente por monócitos e macrófagos, ligando-se aos receptores TLR2 (do inglês, *toll-like receptor 2*), o zimosan leva, dentre outros: à ativação celular, liberação de hidrolases lisossomais, espécies reativas de oxigênio e produção de citocinas (ex.:TNF- α).

Em consequência disso, a injeção de zimosan na articulação produz um quadro de sinovite erosiva grave, que durante a fase aguda é caracterizado por um aumento significativo da permeabilidade vascular e do influxo celular, predominantemente neutrófilos, para a cavidade estimulada (PENIDO *et al.*, 2006). Posteriormente, ocorre uma sinovite progressiva caracterizada pelo acúmulo predominante de células mononucleares e intensa proliferação de fibroblastos assemelhando-se ao *pannus* reumatóide característico do quadro degenerativo de sinovite crônica reumatóide de pacientes com AR.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos

3.2 Geral

Comparar o efeito da Fotobiomodulação (904 nm) nas doses de 1J e 5J em modelo experimental de artrite.

3.3 Específicos

- Analisar histologicamente a ação do LBI na destruição articular causado pela artrite.
- Investigar o efeito do LBI em fibras de colágeno e na espessura da cartilagem.
- Descrever a ação do LBI sobre a hiperalgesia.
- Avaliar o efeito do LBI no edema induzida pela fase inicial.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 60 camundongos Swiss *Mus musculus* fêmeas, com 8 a 10 semanas de vida, pesando entre 25 e 30g, fornecidos pelo Biotério de Manutenção de animais destinados a Experimentação do departamento de Morfofisiologia Veterinária CCA/UFPI. Foram alocados em ambiente sob temperatura controlada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro/escuro (12/12h) com comida e água *ad libitum*, os animais foram acondicionados numa sala especial (apenas para habitação dos mesmos) em gaiolas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí sob protocolo n°.406/17. (ANEXO 1)

4.2 Delineamento Experimental

Representação Esquemática do delineamento experimental

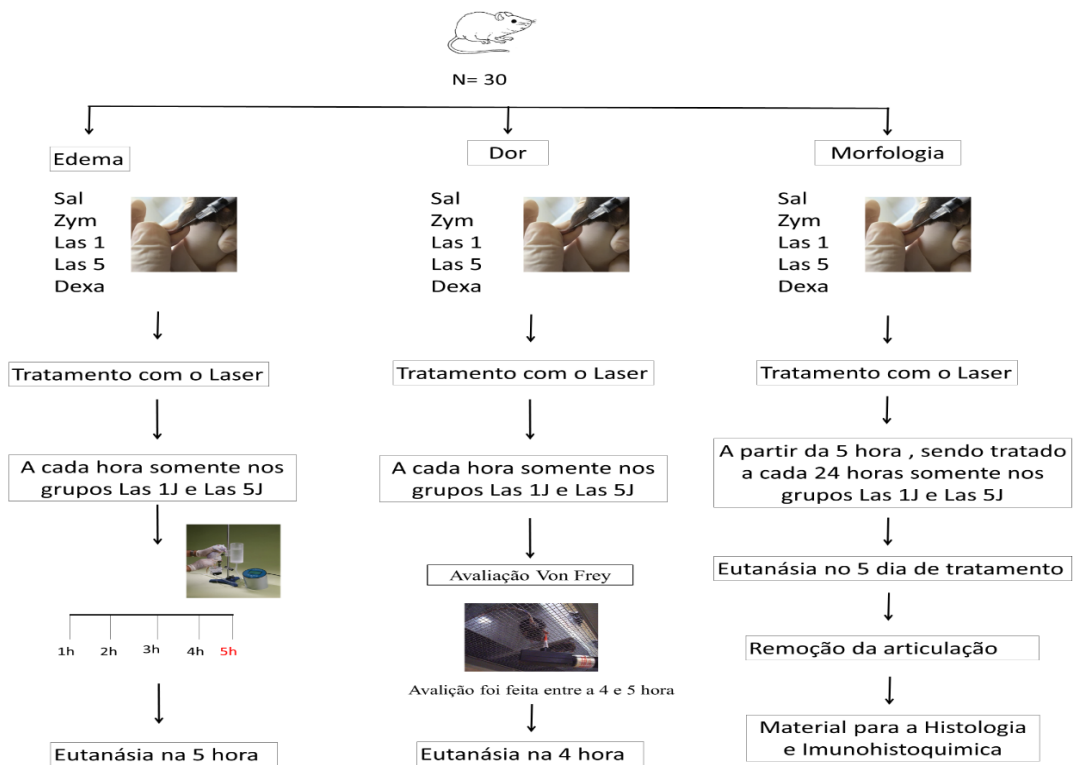


Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental

4.3 Indução da Artrite

A artrite experimental foi induzida em camundongos através da injeção de 200µg de zymosan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvido em 10µL de solução salina estéril, na região da articulação talocrural (esquerda) do membro posterior (DOS ANJOS, 2016).

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 5 grupos de 6 animais cada. No primeiro grupo (Salina) foi administrado apenas 0,9% de salina estéril; os grupos (Dex, Zym, Las 1 e Las 5) receberam indução por injeção talocrural de 200µg de zymosan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvido em 10µL de solução salina estéril, na região da articulação talocrural (esquerda) do membro posterior; os grupos (Las 1) e (Las 5) foram submetidos a indução da artrite como descrito anteriormente e comitantemente tratados com LBI com dose de 1J/cm² e 5J/cm², nas primeiras cinco horas e para análise morfológica a cada 24 horas (fase crônica) foi utilizado o tratamento com laser terapêutico de baixa potência AsGa de comprimento de onda de 904 nm, o grupo (Dexa) foi pré tratado meia hora antes com dexametasona induzida intraperitoneal 4mg/kg e posteriormente submetido a indução da artrite como descrito anteriormente.

Tabela 1. Grupos experimentais

SAL- Grupo que recebeu apenas salina estéril
DEXA- Grupo pré tratado com a dexametasona meia hora antes + zymosan
ZYM- Grupo que recebeu apenas a indução de zymosan e não foi tratado
LAS1- Administração do zymosan + tratamento com o laser na dose de 1J/cm ²
LAS5- Administração do zymosan + tratamento com o laser na dose de 5J/ cm ²

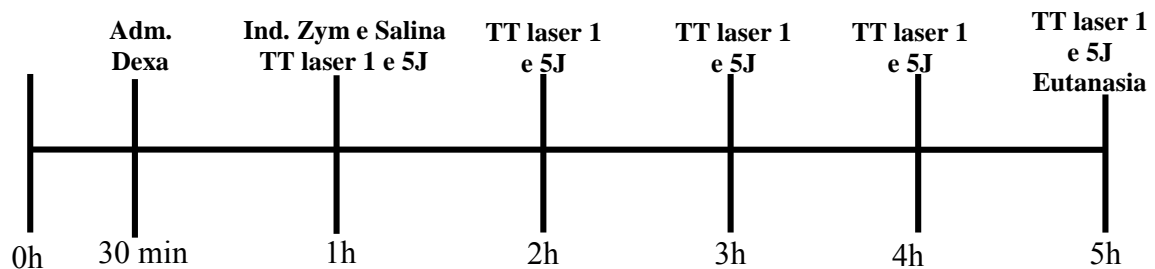


Figura 5. Cronograma experimental usado para edema e avaliação da dor. Trinta minutos antes da indução da artrite com o Zymosam, foi administrado a Dexametasona como pré tratamento no grupo DEXA. Após 30 min da aplicação da Dexametasona, foi administrado uma solução salina no grupo SAL, e o Zymosam nos seguintes grupos ZYM, DEXA, LAS 1J, LAS 5J. Em seguida os grupos LAS 1J e LAS 5J, receberam tratamento com o laser de baixa intensidade a cada hora até a 5 hora onde sofreram a eutanásia e foram coletadas amostras para análise dos 5 grupos.

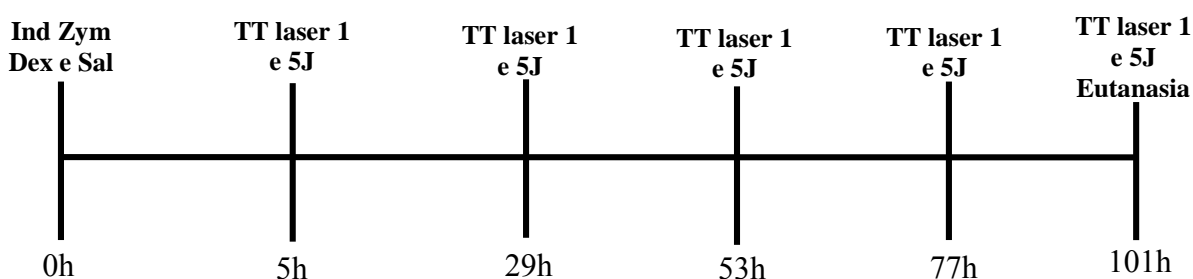


Figura 6. Cronograma experimental usado para a análise morfológica. Foram administrados o zymosan nos grupos (ZYM, LAS1, LAS 5), solução salina no grupo (SAL) e dexametasona no grupo (DEXA), após 5 horas foi iniciado o tratamento com irradiação de laser nos grupos LAS 1 e LAS 5. O tratamento ocorreu a cada 24 horas até o quinto dia para posterior eutanásia, onde foram coletadas amostras para análise dos 5 grupos.

4.4 Tratamento com o Laser

O equipamento Laser AsGa de baixa intensidade (Gallium Arsenium, KLD Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda., Brasil; Modelo LLT 0107), operando em comprimento de onda em 904nm foram usados em todo o experimento para irradiação das patas dos animais. Os parâmetros do laser são os seguintes: frequência de 80 Hz, potência de 50mW, tempo de irradiação de 12 e 60s, área irradiada de 0,01cm²; o qual corresponde a dose de 1J/cm² e 5J/cm², energia total do tratamento foi de 0,078J na dose de 1J/cm² e de 0,384J na dose de 5J/cm². A potência óptica do laser foi calibrada usando um Medidor Óptico Multifuncional Newport (modelo 1835-C).

Quadro 1- Parâmetros utilizados na Terapia com o Laser de Baixa Intensidade

PARÂMETROS	GRUPO LAS 1	GRUPO LAS 5
Comprimento de Onda (nm)	904	904
Tipo de Laser Diodo	AsGa	AsGa
Frequência (Hz)	80	80
Potência (mW)	50	50
Tempo de Irradiação (s)	12	60

Área irradiada (cm ²)	0,01	0,01
Dose (J/cm ²)	1	5

4.7 Eutanásia

Todos os animais foram submetidos à eutanásia de acordo com o protocolo descrito, sendo utilizado doses de cetamina e xilazina. Injeção intraperitoneal de solução de Cetamina (concentração 10%, dose 320mg/kg) e Xilazina (concentração de 2%, dose 30mg/kg), conforme resolução n°37 do CONCEA.

4.8 Análise

4.8.1 Avaliação do efeito antinociceptivo

A análise comportamental do efeito nociceptivo acarretado pelo Zymosan foi realizada pelo método de determinação da hipernocicepção articular, utilizando-se o teste de *Von Frey* eletrônico. Para a realização do teste, os animais foram colocados em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas. Os animais foram colocados nas gaiolas 30 minutos antes do início dos testes, para adaptação comportamental. Neste experimento, uma medida de pressão eletrônica ira ser mensurado através de um transdutor de pressão adaptado por um cabo a um contador digital de força (em gramas) (Insight Equipamentos Ltda., Ribeirão Preto, Brasil). O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com área de 4.15 mm² que permite avaliar a hipernocicepção articular. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar do membro posterior direito dos animais, para indução da região talocrural, seguida da retirada da pata. O aparelho de medida de pressão eletrônica registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o membro é retirado. O teste foi repetido até a obtenção de três medidas subsequentes. Os animais foram submetidos à análise da sensibilidade dolorosa na 5 hora no primeiro dia, correspondente a fase aguda. (PINTO *et al.*, 2010)

4.8.2 Avaliação do edema articular

O volume articular dos animais foi mensurado com um pletismômetro (PanLab LE 7500) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). O volume da articulação foi avaliado 1, 2, 3 ,4 e 5 horas após a injeção do zymosan. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido por zymosan ocorre na 3^a h após a injeção desse estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

Então, meia hora depois de cada mensuração, os grupos experimentais foram tratados com Laser, com os parâmetros já citados. Depois da quarta hora, os animais foram sacrificados como descrito no tópico eutanásia.

A avaliação da variação de volume articular foi calculado como a inibição percentual relativa do volume da pata dos controles tratados com salina usando a fórmula seguinte (CHAVES, 2013):

$$\% \text{inibição do edema} = \frac{(Vt-V0)_{\text{control}} - (Vt-V0)_{\text{tratado}}}{(Vt-V0)_{\text{controle}}} \times 100 . \text{ Em que } V_0 \text{ é o volume}$$

basal e V_t é o volume final mensurada nos tempos já indicados.

4.8.3 Análise Histopatológica e Morfométrica

Para a análise Histopatológica e Morfométrica, após a eutanásia dos animais, as articulações talocrural de ambos os membros posteriores foram removidas, lavadas em água destilada estéril para retirada do excesso de sangue e dissecadas. Durante a dissecação, a pele foi retirada, bem como as falanges, a região da articulação talocrural foi fixada em paraformaldeído tamponado 4%, pH 7,4, durante 24 horas, em seguida passaram por um processo de descalcificação utilizando ácido nítrico a 4% durante 1 semana, em seguida conservação em álcool a 70%, lavados e submetidos à desidratação gradual crescente com soluções alcoolicas ascendentes de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de uma hora cada e por fim no álcool absoluto por uma hora e meia. O processo de diafanização foi feito em xilol I por 45 minutos e em xilol II por mais 45 minutos, inclusão em parafina líquida para banho I durante 15 a 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Quando derretida e resfriada a parafina, a mesma foi aparada em um bloco posteriormente cortado com lâmina de aço pelo micrótomo (LUPETEC®, MRP09). A desparafinização foi feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Seguiu-se a hidratação com álcool absoluto por 7 minutos, álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e água destilada II por dois minutos cada.

Na análise histopatológica foi realizado um estudo-cego e randomizado, por um histopatologista experiente, de forma a avaliar a severidade da artrite, por meio dos aspectos relativos à arquitetura da cartilagem, foram realizados três cortes com 7µm de espessura de cada amostra

4.8.4 Coloração em Hematoxilina e Eosina

As lâminas contendo os cortes histológicos foram mergulhadas em solução de Hematoxilina por 40 segundos, lavadas em água corrente, e posteriormente mergulhadas em

Eosina por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma sequência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas com lamínulas em Bálsamo do Canadá. Esta coloração nos permite uma visualização geral de todo o tecido (KIERNAN, 1981). Foi realizada uma análise descritiva quanto a presença de alterações no côndilo mandibular, disco articular, tecido retrodiscal e osso temporal. As análises foram realizadas por um único examinador treinado e, três cortes por articulação foram avaliados.

A destruição óssea / cartilaginosa foram determinadas usando uma escala graduada, como: nenhum sinal de inflamação ou degeneração recebeu uma pontuação de 0, pequena inflamação com hiperplasia do revestimento sinovial de 1, infiltração de células inflamatórias e a destruição de cartilagens / ossos receberam uma pontuação de 2 a 4 (CHEN *et al.*, 2013).

4.8.5 Coloração em Picrossirius

O método se baseia na utilização do Sirius Red em associação com o ácido pícrico. O Sirius Red é um corante fortemente ácido que se liga aos aminoácidos básicos presentes na molécula de colágeno. A molécula longa do Sirius Red exibe uma orientação paralela ao longo eixo da molécula de colágeno, aumentando sua birrefringência natural, quando observada sob luz polarizada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Os componentes fibrilares, contendo moléculas orientadas de colágeno, aparecem como estruturas brilhantes e com cores de interferência, que variam do verde ao vermelho, contra um fundo escuro, quando analisadas em microscópio de luz polarizada. As regiões contendo feixes de fibras colágenas espessas (compactadas) e organizadas exibem coloração predominantemente avermelhadas e maiores absorbâncias, ao passo que, as regiões que possuem colágeno menos compactado e organizado, apresentam coloração verde e menores absorbâncias (VIDAL; MELLO; PIMENTEL, 1982).

Neste método, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, desidratadas em uma bateria de alcoóis, coradas por aproximadamente 15 minutos em Picrossirius e lavadas em água corrente. Em seguida, receberam coloração de fundo em Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

4.8.6 Coloração em Azul de Toluidina

O azul de toluidina (AT) é um corante básico que tem forte afinidade pelo grupamento sulfato dos Glicosaminoglicanos sulfatados presentes nos proteoglicanos (PGs). As regiões com elevadas concentrações de PGs exibem intensa metacromasia, ou seja, são coradas em violeta, diferentemente da cor normal do corante. A coloração foi realizada com AT 0,5% em 5% de

Borax (0,125 g/25 mL de água deionizada). As lâminas foram deixadas na solução corante por 10 minutos, em seguida, desidratadas em sequência alcoólica (70, 80, 95, 100%), mergulhadas em xilol e montadas com lamínulas em Bálsamo do Canadá. As análises foram realizadas por um único examinador treinado e, três cortes por articulação foram avaliados, para calcular a espessura utilizou a maior área da região articular, fazendo a média, o programa image J para o processamento da imagem

4.8.7 Análises Estatísticas

Os resultados quantitativos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e, para os dados qualitativos como os escores histológicos foram expressos pela mediana \pm mínimo e máximo.

Foi realizado teste de normalidade Shapiro Wilk, os resultados que obedecerem a uma distribuição paramétrica foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e pelo teste de Student Newman-Keuls como post hoc teste através do programa GraphPad Prism versão 6.0. Os dados obtidos a partir da análise histológica foram analisados por estatística não-paramétrica utilizando teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's (comparações múltiplas). Para todas as análises será considerado significativo quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito sobre o edema articular induzido por Zymosan

A administração de zymosan aumentou o volume da articulação por um período de aproximadamente 4 horas. A formação do edema se deu rapidamente depois da injeção de zymosan e o volume da articulação aumentou significativamente em todos os quatro grupos dentro da primeira hora em relação ao grupo salina. No grupo zymosan o edema apresentou um aumento exponencial na primeira hora e muito significativo na terceira hora e logo após diminuiu. Na primeira hora, ambos grupos Laser 1J e 5J mostraram medidas similares de volume do edema. No pico do edema que se dá na terceira hora, o grupo controle negativo apresentou variação de volume de edema em $0,045 \pm 0,022$ ml; nos grupos L1 foi de $0,028 \pm 0,010$ ml e L5 de $0,038 \pm 0,022$ ml, equivalentes, respectivamente a uma redução de 48% e 16% em comparação ao grupo zymosan. Observa-se que na terceira hora o Laser de 1J não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo dexametasona.

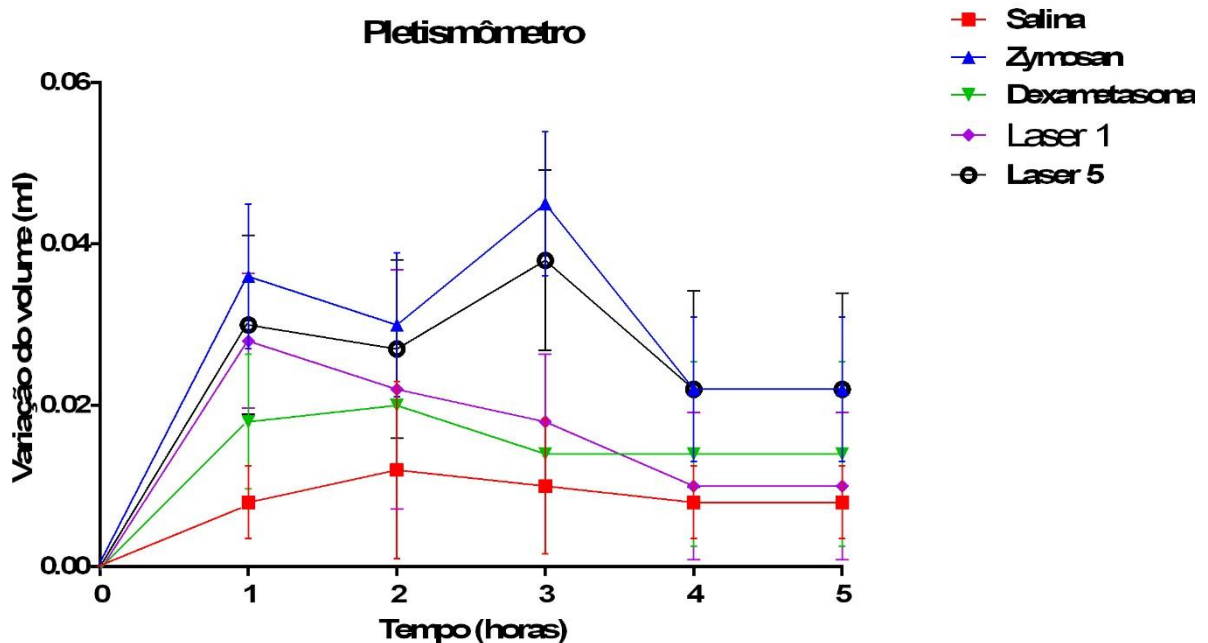


Figura 7. Avaliação do Edema articular induzido por zymosan.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5 J/cm² após a administração do zymosan na articulação. O volume da articulação foi medido no tempo 0 e após 1, 2, 3, 4 e 5 horas seguintes no pletismômetro. O tratamento com laser na dose de 1J/cm² foi mais eficiente na redução do edema quando comparado ao grupo zymosan no pico da terceira hora. Os resultados são expressos com média +/- S.E.M. *P<0,05 comparado com controle negativo.

5.2 Avaliação do efeito do laser sobre o efeito antinociceptivo

A avaliação foi realizada entre a quarta e quinta hora após a indução da artrite pelo zymosan, seguindo o protocolo descrito, o grupo zymosan se mostrou com o limiar de dor alterado, mostrando a efetividade da indução da artrite, os grupos laser 1J cm² e laser 5J cm² se mostraram eficazes no aumento do limiar da dor, sendo capazes de diminuir o comportamento nociceptivo causado pela artrite, apresentando uma redução de 30 % e 42 %, laser 5J cm² e laser 1J cm² respectivamente na sua resposta grama/força, na última avaliação os grupos Laser 1 e 5 não apresentaram diferença estatística (Figura 5) .

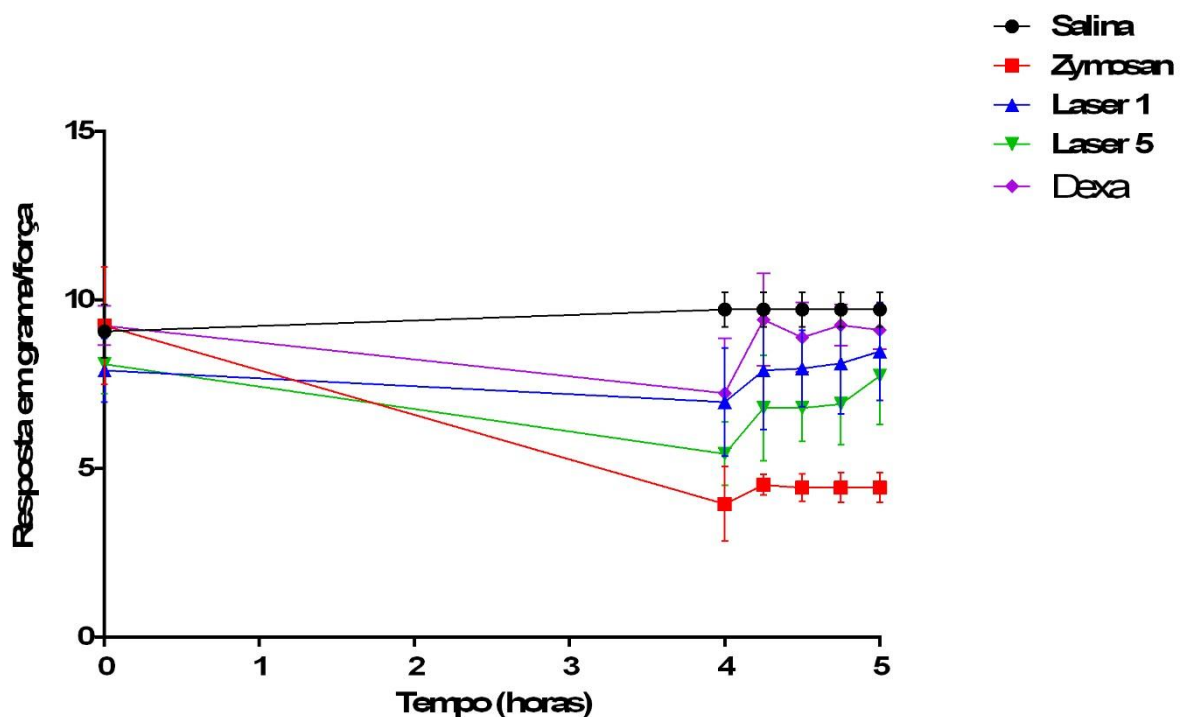


Figura 8. Avaliação nociceptiva induzida por zymosan.

Legenda: Os animais foram tratados com laser na dose de 1 e 5 J/cm² após a administração do zymosan na articulação. A avaliação foi realizada entre a quarta e quinta hora, em intervalo de 15 minutos. Os resultados foram comparados com o grupo controle negativo.

5.3 Avaliação do efeito do laser na cartilagem articular

Os resultados mostram que os animais do grupo salina apresentaram menores pontuações de escores microscópicos para parâmetros avaliados (Figura 9), o grupo que recebeu a injeção de zymosan apresentou uma pontuação de escores de $1,2 \pm 0,2$. O laser mostrou diminuição dos parâmetros em comparação ao grupo carragenina quando tratados nas duas doses de 1 e 5J/cm² e os escores tiveram médias $2,2 \pm 0,2$ e $2,8 \pm 0,2$ respectivamente, apresentando diferença estatística somente o grupo da dose de 5 joules (figura 9) caracterizando

um efeito protetor da cartilagem, quando comparado ao grupo 5 J/cm² ao grupo Dexa (2,8±0,2) vs (2,8±0,2), o grupo laser 5 J/cm² não apresentou diferença estatística (Figura 9 e 10).

Tabela 2. Efeito da Fotobiomodulação nas doses de 1 e 5(J/cm²) sobre a cartilagem articular no modelo de artrite experimental.

Grupos Experimentais	Sal	Dexa	Zym	Laserterapia (J/cm ²)	
				1	5
Degeneração Articular	1,0 (2,0±0)	2,0 (3,0±1,0)	4,0 (4,0 ± 3,0)	3,0 (3,0±2,0)	2,0 (2,0±1,0)

Os dados foram representados média±EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # p<0,05 vs grupo salina e *** p<0,05 vs grupo Zym.

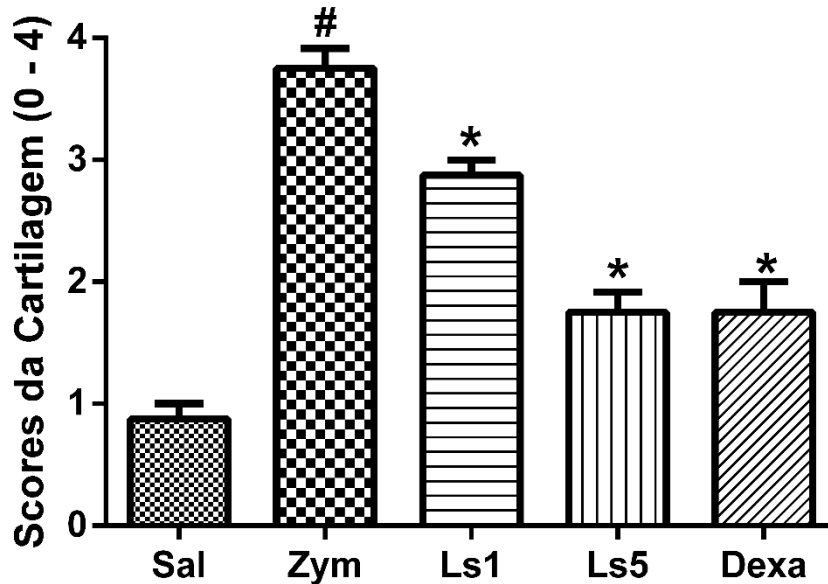


Figura 9. Efeito do Laser na dose 1 e 5J/cm² nos escores de degeneração articular.

Legenda: Os escores foram mensurados após a indução da artrite. A avaliação de escores microscópicos foi realizada conforme proposto por Chen et al., 2013. Os grupos laser 1 e 5J/cm² mostraram uma reversão do quadro degenerativo em comparação ao grupo zymosan. *Indica P <0,05 comparado com o grupo salina. #P <0,05 comparado com o grupo zymosan.

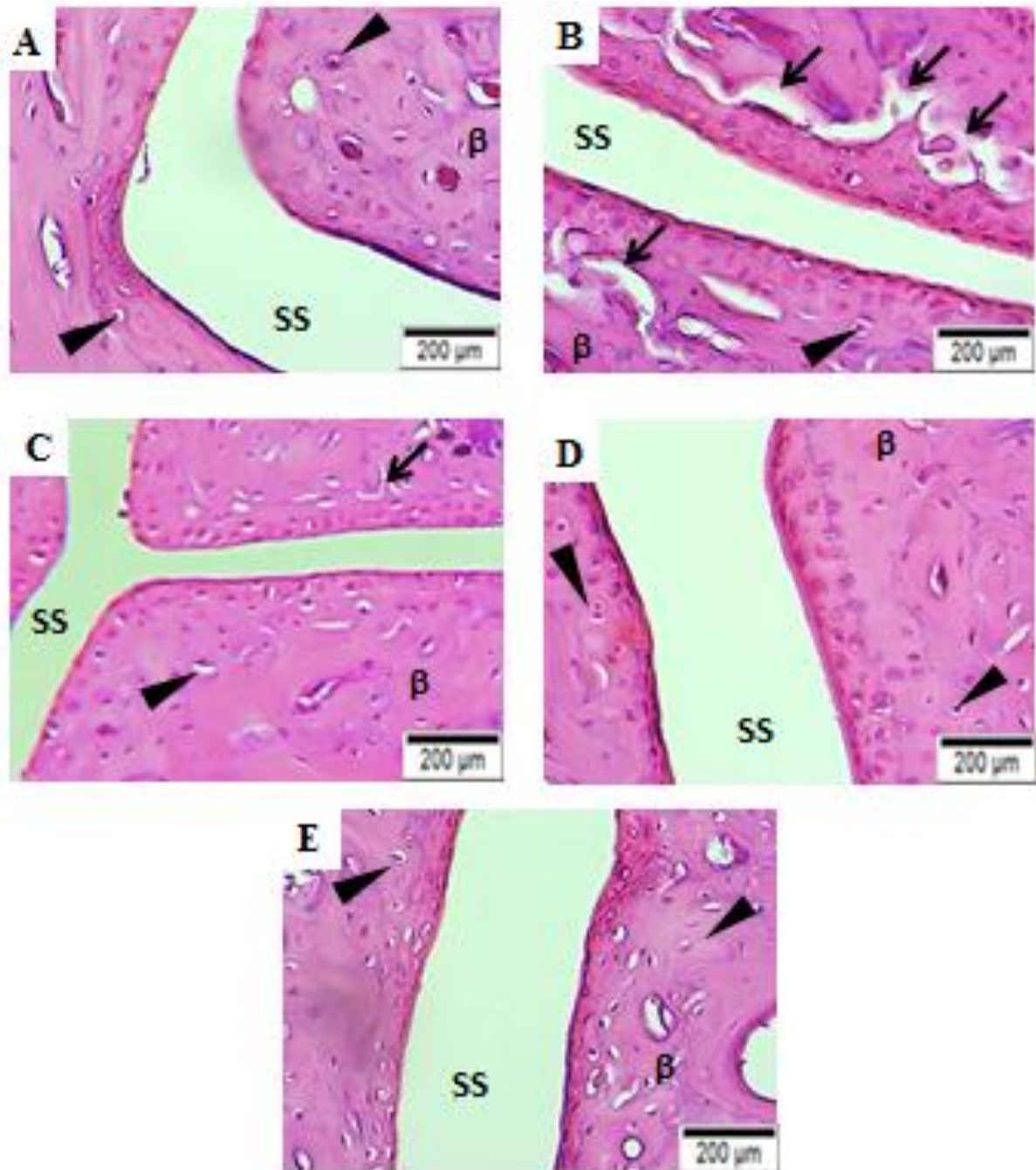


Figura 10. Região da articulação dos diferentes grupos: A) Grupo salina, demonstrando tecido cartilaginoso normal com condroblasto apontado pela ponta da seta e espaço sinovial (SS); B) Grupo Zym ilustrando descontinuidade da superfície cartilaginosa com perda de continuidade (seta) com osso adjacente (β); O tratamento com Laser 1 em C) e Laser 5 em D) reduziu as alterações histológicas causadas pelo zym, com preservação da superfície cartilaginosa e continuidade com osso adjacente (β); O tratamento com Laser melhorou, para dose de 5 ($p < 0,05$) e para dose de 1 ($p < 0,05$), o escore de cartilagem em comparação ao grupo Zym. Todas as fotomicrografias estão com 600x de aumento original e coradas com hematoxilina e eosina. SS, espaço sinovial; β , osso.

5.4 Avaliação do efeito do laser na quantificação do colágeno

A coloração por meio do *Picrosirius Red* é uma das técnicas comumente utilizada para análise quantitativa da porcentagem de colágeno, principalmente, durante o processo inflamatório. Baseado nisto, nesta pesquisa, pode-se observar a presença de colágeno na articulação em todos os grupos, com uma diminuição estatisticamente significativa, para o grupo Zym quando comparado ao grupo salina ($31,76 \pm 5,78$); ($95,91 \pm 10,64$) respectivamente, salina $p < 0,05$).

Além disso, pode-se notar que houve a reversão deste quadro, observando o aumento estatisticamente significativo, na porcentagem de colágeno nos grupos tratados com a Fotobiomodulação nas doses de 1 e 5 (J/cm^2) quando comparado ao grupo Zym ($62,86 \pm 5,37$), ($31,76 \pm 5,78$); ($85,21 \pm 6,15$); ($31,76 \pm 5,78$) respectivamente. E como esperado, pode -se observar, que houve um aumento estatisticamente significativo no grupo Dexa quando comparado ao grupo Zym ($28,6 \pm 30,0$) vs ($78,0 \pm 38,8$), salina $p < 0,05$ (Figura 11 e 12).

Tabela 3. Efeito da Fotobiomodulação sobre a porcentagem de fibras de colágeno.

Grupos Experimentais	Sal	Dexa	Zym	Laserterapia (J/cm^2)	
				1	5
Porcentagem de colágeno total	100,00 ($95,91 \pm 10,64$)	86,82 ($79,15 \pm 6,17$)	28,64 ($31,76 \pm 5,78$)	62,58 ($62,86 \pm 5,3$)	92,22 ($85,21 \pm 6,15$)

Os dados foram representados média \pm EPM e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e *** $p < 0,05$ vs grupo Zym.

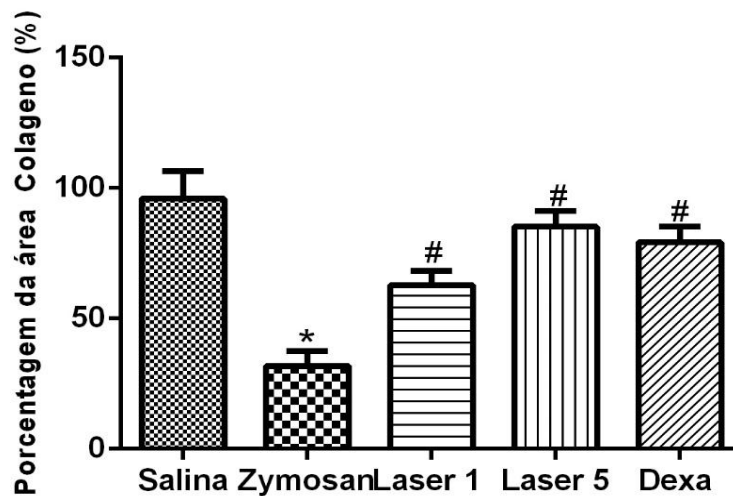


Figura 11. Efeito das doses de 1 e 5 (J/cm^2) sobre a porcentagem de fibras de colágeno no modelo de artrite experimental. Onde * $p < 0,05$ vs grupo salina e # $p < 0,05$ vs grupo Zym

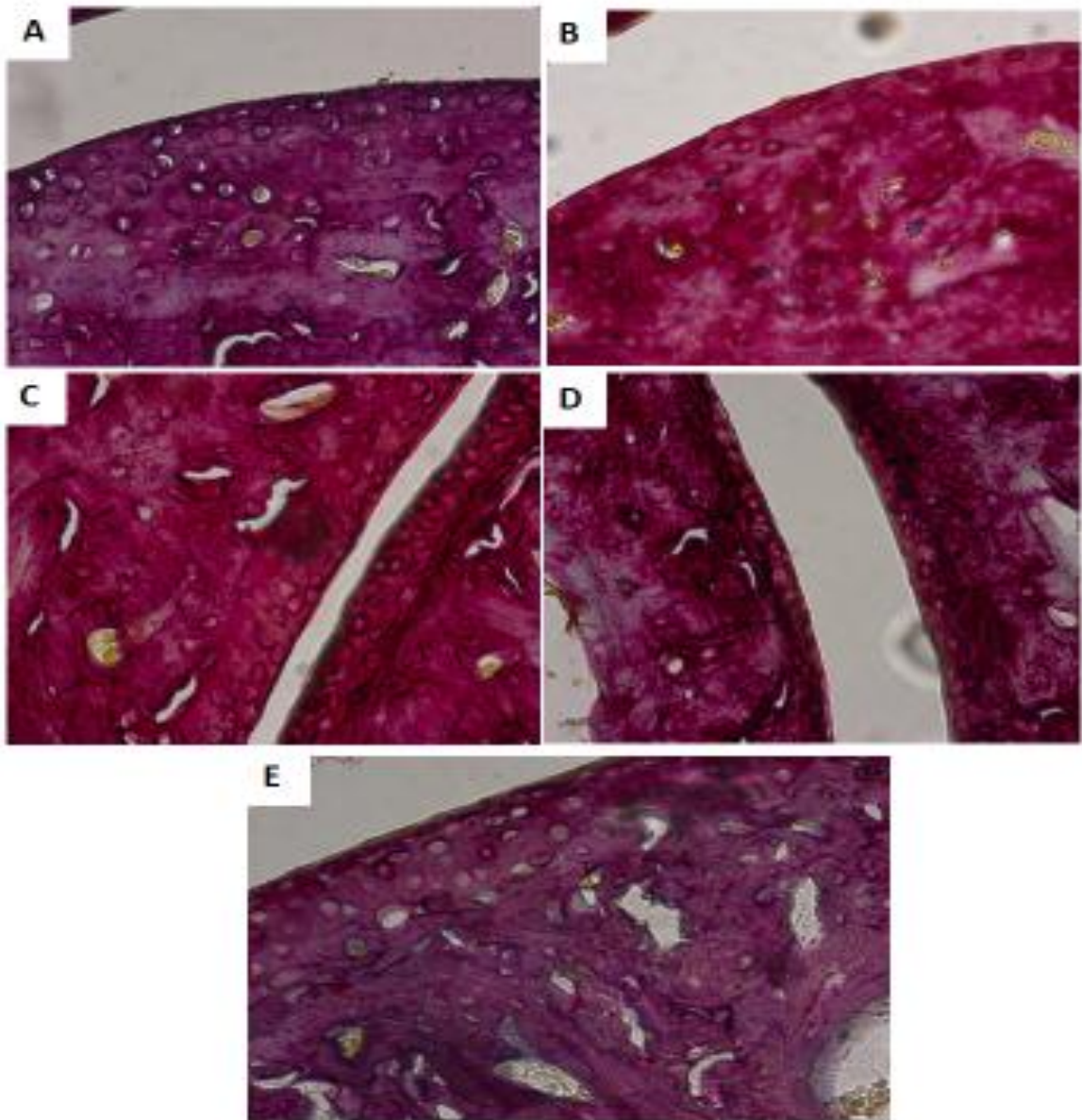


Figura 12. Região da articulação dos diferentes grupos mostrando a expressão de colágeno: A) Grupo salina, demonstrando a quantidade de colágeno normal ; B) Grupo Zym ilustrando aumento da quantidade de expressão de colágeno; O tratamento com Laser 1 em C) e Laser 5 em D) reduziu a expressão de colágeno; E) Tratamento com a dexametasona. O tratamento com Laser melhorou, para dose de 5 ($p < 0,05$) e para dose de 1 ($p < 0,05$)

5.5 Avaliação do efeito do laser na espessura da cartilagem articular

Os resultados apresentam a medição linear da espessura da cartilagem articular que durante o processo inflamatório se mostra aumentado (figura 14), assim pode-se observar o espessamento da região articular (figura 13) para o grupo Zym quando comparado ao grupo salina ($519,2 \pm 79,6$); ($142,7 \pm 20,5$) respectivamente, salina $p < 0,05$). Também foi observado uma redução na espessura da região articular nos grupos tratados com a Fotobiomodulação nas doses de 1 e 5 (J/cm^2) quando comparado ao grupo Zym ($519,2 \pm 79,6$), ($323,3 \pm 58,6$); ($519,2 \pm 79,6$); ($199,2 \pm 38,15$) respectivamente.

Tabela 4. Efeito da Fotobiomodulação nas doses de 1 e 5 (J/cm^2) na avaliação da medida linear quantificando a espessura da cartilagem no modelo de artrite experimental.

Grupos Experimentais	Sal	Dexa	Zym	Laserterapia (J/cm^2)	
				1	5
Espessura da Cartilagem	148,2 (142,7 \pm 20,5)	156,9 (179,0 \pm 21,5)	452,8 (519,2 \pm 79,6)	281,5 (323,3 \pm 58,6)	166,2 (199,2 \pm 38,15)

Os dados foram representados $media \pm EPM$ e foram analisados por meio do One way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não paramétricos) e pós teste de Dunn's. Onde # $p < 0,05$ vs grupo salina e *** $p < 0,05$ vs grupo Zym.

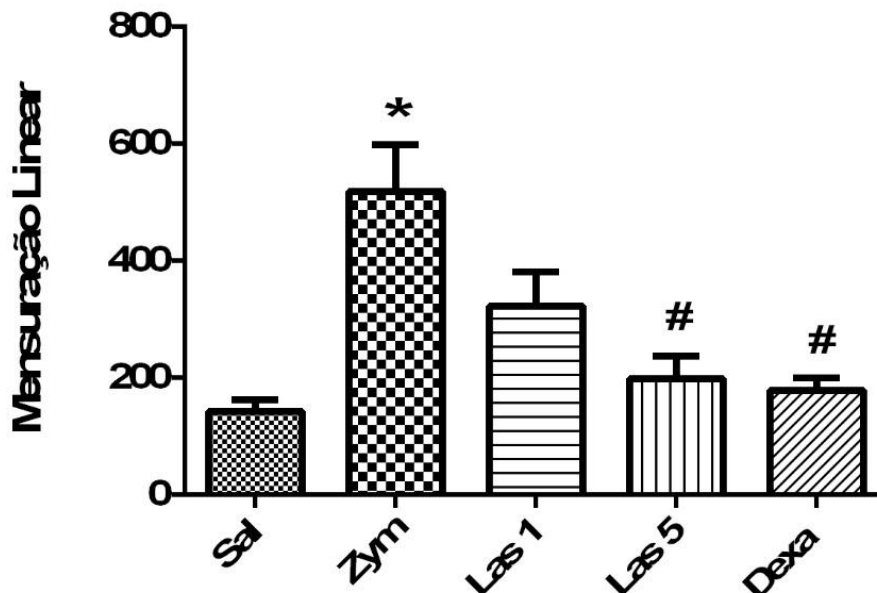


Figura 13. Efeito da Fotobiomodulação de baixa potência nas doses de 1 e 5 (J/cm^2) sobre espessura da cartilagem articular no modelo de artrite experimental. Onde * $p < 0,05$ vs grupo salina e # $p < 0,05$ vs grupo Zym.

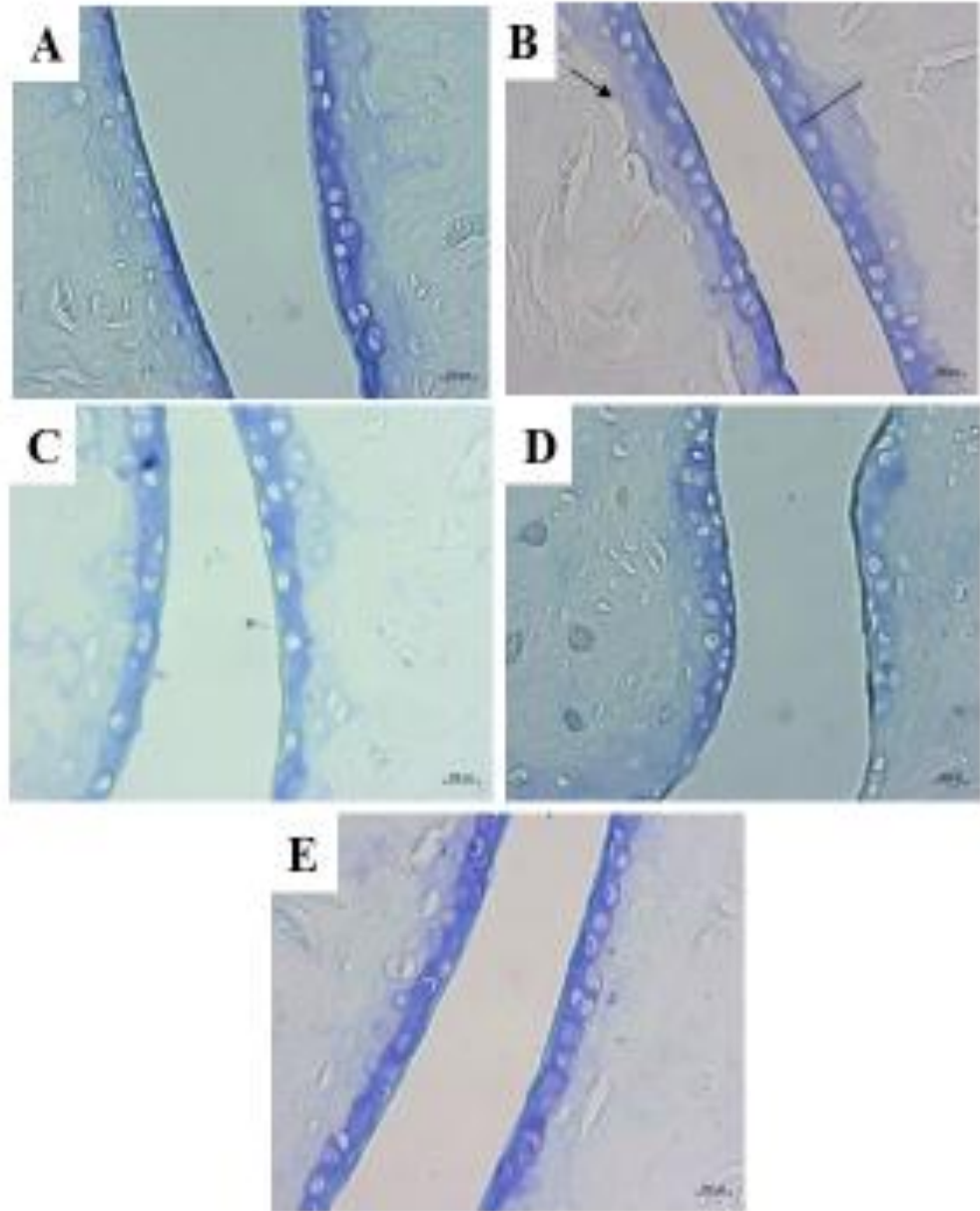


Figura 14. Região da articulação dos diferentes grupos mostrando a espessura da superfície: A) Grupo salina, demonstrando tecido cartilaginoso normal ; B) Grupo Zym ilustrando aumento do espessamento da região articular indicado pela linha, além da presença da destruição óssea indicada pela seta (β); O tratamento com Laser 1 em C) e Laser 5 em D) reduziu as alterações histológicas causadas pelo zym, com preservação da superfície cartilaginosa e continuidade com osso adjacente (β); E) Tratamento com a dexametasona. O tratamento com Laser melhorou, para dose de 5 ($p < 0,05$) e para dose de 1 ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o LASER apresentou resultados positivos na modulação do edema e a hipernocicepção, também revertendo a destruição articular e estimulando a produção de fibras de colágeno, dados obtidos quando comparados os grupos tratados (LAS 1 e LAS 5) com o grupo que recebeu a indução da artrite (Zym), enquanto que apresenta o efeito semelhante ao grupo previamente tratado com o fármaco anti-inflamatório (Dexa). Além disso após 101 horas, se observa uma reversão do quadro na dose de 5 joules/cm², diferente quando é analisado no tempo de 5 hora, onde a dose de 1 joule/cm² demonstrou ser mais efetiva, fenômeno esse que pode ser justificado pela lei de Arndt Schultz.

Na modulação do edema, os grupos de animais tratados com o laser obtiveram resultados semelhantes ao grupo onde foi administrado a dexametasona após a 1^a hora depois da indução inflamatória. Esse processo de modulação do edema inflamatório é explicado por Albertini (2007), por Bjordal (2010) e Andrade (2014), como um complexo conjunto de fatores envolvendo a inibição da exsudação e de proteínas totais como IL-6 e o TNF-alfa, aumento na microcirculação local, controle dos níveis de trifosfato de adenosina (ATP), promoção da angiogênese, da vasodilatação, inibição dos mediadores inflamatórios (prostaglandina E2 (PGE2), efeitos antioxidantes e a diminuição do influxo de células inflamatórias.

A aplicação da radiação é capaz de reduzir a inflamação aguda e periférica, pois, segundo Prianti *et al.*(2014), o uso do LASER de baixa intensidade é capaz de diminuir a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), tanto a nível periférico quanto centralmente, diminuindo a liberação de prostaglandina E2 (PGE2), o que confirma os resultados do presente estudo, sugerindo que o LASER de baixa intensidade atua na modulação do processo inflamatório, que por sua vez levou a uma redução do edema. Entre os mecanismos associados à diminuição do processo inflamatório, os geralmente atribuídos ao LBI são a ativação da microcirculação, aumento da permeabilidade vascular e drenagem linfática (MESTER, 2013).

Em estudo desenvolvido por Erthal *et al.*(2016), um edema da pata teve a indução promovida pela histamina, o tratamento com LASER reduziu a formação do edema de pata em 11% aos 30 minutos após a indução da inflamação, evidenciando a eficácia do LASER no controle e redução do edema produzido pela indução da inflamação. Outro estudo mostrou que o tratamento com laser de baixa intensidade (LBI) foi eficaz para reduzir a migração de neutrófilos para os pulmões, bem como para inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias,

mostrando o efeito benéfico do laser no tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica (MORAES *et al.*, 2018).

Borato *et al.* (2008) em seu estudo, utilizando um LASER de comprimento de onda de 808 nm, com potência de 100 mW e doses de 20 J/cm², 50 J/cm² e 100 J/cm² sobre a região dos gastrocnêmios, avaliou os efeitos de três doses de LASER na dor e nos edemas imediatos; demonstraram que os efeitos do LASER de baixa intensidade não foram significativos para a redução da dor e houve aumento do edema.

Corroborando com os dados obtidos neste trabalho, vários outros grupos já abordaram a capacidade de LBI na modulação de artrite reumatoide por alguns mecanismos anti-inflamatórios. Em um trabalho realizado por DOS ANJOS *et al.* (2017) foi mostrado que o LBI promove a apoptose em células polimorfonucleares na articulação, o que poderia incluir em um desses mecanismos. Além disso, o LBI pode reduzir os níveis de citocinas no local da inflamação e modificar quantitativamente populações de linfonodos de células T, devido à fotobioestimulação promovida por essa terapia, que acelera as atividades celulares levando a uma resolução mais rápida da inflamação (DOS ANJOS *et al.*, 2018; PERRETTI, *et al.*, 2017).

Neste estudo também foi mensurado a hipernocicepção da articulação inflamada, utilizando uma versão eletrônica do teste de filamentos de von Frey, em que a força necessária para gerar uma retirada comportamental é automaticamente gravada por um medidor eletrônico de pressão. Observou-se que o grupo Laser 1J e laser 5 J mostrou uma redução gradual da hipernocicepção na fase inicial.

A hipótese para explicar este efeito é bloquear a inibição/condução neural, um indicador do potencial do laser de baixa potência, para efeitos de alívio da dor (COTLER, 2015). Inibição neural seria prevenir a transmissão sináptica a partir da pele para o cérebro, que em última análise conduz à supressão de sensibilização central e está associada com a redução da dor em longo prazo (PEREIRA *et al.*, 2017). Além de que, após induzir a artrite no joelho de ratos adultos jovens, Felizatti *et al.* (2019) concluíram que a utilização de fototerapia foi capaz de reverter as lesões teciduais produzidas em seu modelo. Sendo apresentado um grande potencial na recuperação de condições agudas. O que corrobora com os achados.

Merigo *et al.* (2015), usando LASER de baixa intensidade (650 nm, 31 J/cm²) para o tratamento de pós-operatório, observou que houve uma redução do processo inflamatório e da dor, de modo que acelerou o tempo de cura. Ilieva (2016) em seu trabalho procurou avaliar o efeito laser na melhora da função em pacientes com oostoeartrose de joelho, os resultados

demonstraram forte efeito imediato, cumulativo e duradouro (por três meses) da terapia a laser na dor na osteoartrite do joelho, que indica que a Fotobiomodulação poderia ser uma nova e promissora possibilidade no tratamento da osteoartrose do joelho.

No trabalho de Desidera *et al.* (2015) foi induzido a artrite na ATM do rato, os resultados demonstraram a ação do laser de baixa intensidade, que reduziu a alodinia mecânica, avaliada pelo teste de von frey, reduzindo a atividade de MMP-2 e MMP-9 no gânglio trigeminal. Karvat *et al.* (2015) descreveu que os comprimentos de onda de 670 nm e 830 nm produziram alteração na hipernocicepção em joelhos de ratos, quando avaliados com pressão local, sendo que 670 nm mostrou redução precocemente. Quando a pressão foi realizada distal (região plantar), apenas 830 nm diminuiu a hipernocicepção.

Masoumpoor *et al.* (2014) observaram em animais submetidos a modelo de compressão de nervo isquiático, que 4 J/cm², tanto no comprimento de onda de 660 quanto no de 980 nm foram efetivos em reduzir os limiares algícos em ratos, contudo, o comprimento de onda compreendido na faixa do vermelho apresentou melhores resultados. Panhoca *et al.* (2013) relatam que em pacientes com disfunção temporomandibular, LEDs na faixa do vermelho (630±10 nm) e infravermelho (850±10 nm) foram igualmente eficazes em reduzir o quadro algíco e aumentar a abertura oral.

De acordo com Memis *et al.* (2018) os efeitos da artrite na cartilagem, assim como a espessura da região e a produção de colágeno, só podem ser avaliadas em um fase crônica da condição patológica, assim foi necessário realizar uma fase crônica da artrite, afim de descrever os resultados histomorfologicos, sendo esses positivos nas doses de 5 joule/cm², de forma mais significativa, 1 joule/cm², causando um efeito positivo na região articular, na espessura da cartilagem articular e fibras de colágeno.

Nos cortes corados com HE observou-se que os grupos tratados com o laser de 1 e 5 joules/cm², exibiram menores alterações morfológicas em comparação ao grupo zymosan, sendo mais significativo na dose de 5 joule/cm². Esse resultado corrobora com o encontrado por Lemos *et al.* (2016) utilizou em seu estudo a dose de 20j/cm², descrevendo um efeito positivo dos grupos, apresentando aspectos menos severos da destruição articular, como hiperplasia da membrana sinovial e infiltrado inflamatório crônico.

Estudos experimentais utilizaram diferentes agentes para indução da artrite, e observaram efeitos positivos do LPB, aplicado nas dosagens entre 3 e 225 J/cm². Dentre os efeitos, foram destacados a redução do número de células inflamatórias, menor hiperplasia sinovial, maior organização e distribuição das fibras colágenas e angiogênese (BARRETTO *et*

al., 2013; CASTRO *et al.*, 2015; LEMOS *et al.*, 2016). Nestes estudos citados, os tratamentos com LBP foram iniciados imediatamente ou após 24h da indução de injúria articular e prosseguiram até 7 dias.

Estudos experimentais realizados na articulação do joelho, também corroboraram com nossos resultados ao demonstrarem efeitos significativos do LPB sobre a artrite induzida, promovendo redução das alterações morfológicas articulares na fase crônica (ALVES *et al.*, 2014; ISSA *et al.*, 2017). Nesses experimentos as doses variaram entre 2,5 e 142 J/cm².

Em cortes corados com picrossirius, contagem de colágeno total, demonstramos que os grupos tratados com o laser de baixa intensidade nas doses de 1 e 5 joules/cm² apresentaram maior agregação de fibras de colágeno, quando comparados ao grupo zymosan, sendo mais significativo na dose de 5 joule/cm².

Gupta *et al.* (2014), investigaram o efeito terapêutico do laser de baixa intensidade (904 nm, 0,7 mW, 100 Hz, J 0,4) como um tratamento não-invasivo de feridas em ratos. Eles encontraram cicatrização mais rápida, redução da inflamação (histologia), diminuição da expressão de TNF- α e NF-kB e expressão regulada para cima de metaloproteinases de matriz-2 e 9 em comparação com o grupo controle. Sendo, que o estudo também mostrou aumento nos processos de liberação e da biossíntese de colágeno pró celulares após tratamento com laser 904 nm.

Nos cortes histológicos corados com azul de toluidina, observou-se uma redução no espessamento da região articular nos grupos tratados com o laser de baixa intensidade, mostrando significância estatística quando comparado ao grupo zymosan, sendo mais significativo na dose de 5 joule/cm².

Em outros estudos o tratamento com o LBP levou a uma tendência de redução da espessura na região articular, contudo, diferença estatística foi observada apenas para a dose de 20J/cm² (TEIXEIRA; REHER; REHER, 2008; KALPAKCI *et al.*, 2011). A região articular submetido a um processo inflamatório, responde aumentando de forma desordenada a sua espessura, como forma de adaptação as condições biomecânicas, conforme destacaram outros estudos (WANG *et al.*, 2012; LEMOS *et al.*, 2015; LEMOS *et al.*, 2016).

Santos (2012) observou um aumento na espessura da cartilagem articular do rato submetido a OA tratados com o laser de 685 nm e dose de 50 joules/cm², o autor descreveu que no período experimental de 5 semanas o laser retardou o espessamento do tecido, uma vez que a superfície articular dos animais tratados foi semelhante ao grupo que não sofreu a inflamação. Discordando dos nossos resultados Bayat *et al.* (2007), encontraram o aumento da espessura da

cartilagem após a irradiação do laser 632 nm na dose de 13 joules/cm² em um modelo experimental de OA.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados expostos podemos sugerir que a terapia Laser de Baixa Intensidade na dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$ tem ação mais significativa na fase inicial, no que se refere a sinais clássicos do processo inflamatório, edema e dor. Enquanto a dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$, apesar de ser eficaz na fase inicial, demonstra que na avaliação de 101 horas este apresenta uma resposta significativa, quando avaliado sua ação na cartilagem articular e seus componentes. Podemos assim, sugerir que o efeito da Fotobiomodulação é dose-dependente e que menores doses, dentro de uma janela terapêutica de energia, podem ter melhores efeitos na inflamação aguda, ou, que doses maiores podem ter efeitos melhores em fases tardias. Além de tudo, o Laser atua como recurso anti-inflamatório eficiente, uma vez que é de fácil aplicação, não invasivo e relativamente barato.

8 REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R.; *et al.* Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LBI) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **J Photochem Photobiol B Biol**, v.89(1), p. 50–5, 2007.
- ALBERTINI, R.; *et al.* Análise do efeito do laser de baixa potência (AsGaAl) no modelo de inflamação de edema de pata em ratos. **Fisioterapia Brasil**, V. 1, p.5-15, 2004.
- ALVES, A.C.A.; *et al.* Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. **Lasers Med Sci**, 28(2):529–536 ; 2013.
- ALMEIDA P.; *et al.* What is the best treatment to decrease pro-inflammatory cytokine release in acute skeletal muscle injury induced by trauma in rats: Low-level laser therapy, diclofenac, or cryotherapy?. **Lasers Med Sci**, v.29(2), p.653–8, 2014.
- ANDRADE, F.S.S.D.; CLARCK, R.M.O.; FERREIRA, M.L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Revisa Bras. Fisio**,41(2): 129-133, 2014.
- ANDRADE, N.N.; *et al.* Analgesic Effect of Photobiomodulation on Bothrops Moojeni Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. **PLOS**. October 17, 2016.
- AHN, K.B. *et al.* Irradiation by gallium–aluminum–arsenate diode laser enhances the induction of nitric oxide by porphyromonas gingivalis in raw 264.7 cells. **Journal of Periodontology**, 85(9): 1259-1265,2014.
- BAO, Y.K. *et al.* High prevalence of comorbid autoimmune diseases in adults with type 1 diabetes from the HealthFacts database. **J Diabetes**, 11(4): 273-279, 2018.
- BAYAT, M.; ANSARI, E.; GHOLAMI, N.; BAYAT, A. Effect of low-level helium-neon laser therapy on histological and ultrastructural features of immobilized rabbit articular cartilage. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.87,n. 2, p.81-7, 2007.
- BORATO, E.; OLIVEIRA, J.J.J; CIENA, A.P.; BERTOLINI, G.R.F. Avaliação imediata da dor e edema em lesão muscular induzida por formalina e tratada com laser 808 nm. **Rev Bras Med Esporte**,14(5): 446-449, 2008.
- BOSCHI, E. S. Efeito Antiinflamatório da Terapia Laser de Baixa Potência (660 nm) na Pleurisia em Ratos. 2008. 108f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)**.PUC- Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BROSSEAU, L. *et al.* Randomized controlled trial on low level laser therapy (LBI) in the treatment of osteoarthritis (OA) of the hand. **Lasers in Surgery and Medicine**.2005, v. 36, n. 3, p. 210–219.
- CASTRO, I. C.; ROSA, C. B.; CARVALHO, C. M.; ARAGÃO, J. S.; CANGUSSU, M. C.; DOS SANTOS, J. N.; DOS SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. Assessment of different energy delivery settings in laser and LED phototherapies in the inflammatory process of rat's TMJ induced by carrageenan. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 8, p. 2105-13, 2015.

CHEN, M.; SU, W.; LIN, X.; GUO, Z.; WANG, J.; ZHANG, Q.; BRAND, D.; RYFFE, L.B.; HUANG, J.; LIU, Z.; HE, ZHENG, S.G. Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of regulatory T cell differentiation. **Arthritis & Rheumatology**, 65(5):1181–1193, 2013.

CHOUDHARY, M.; KUMAR, V.; MALHOTRA, H.; SINGH, S. Medicinal plants with potential anti-arthritic activity. **J Intercult Ethnopharmacol**,4(2): 147 -179, 2015.

COTLER, H.B.; CHOW, R.T.; HAMBLIN, M.R.; CARROLL, J.: The use of low level laser therapy (LBI) for musculoskeletal pain. **MOJ Orthop Rheumatol**, 2:00068, 2015.

CROSS, M.; SMITH, E.; HOY, D.; CARMONA, L.; WOLFE, F.; VOS, T. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease study. **Ann Rheum Dis**, 73(7): 1316-1322, 2014.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**. 2000, v. 343, n. 1, p.37-49.

DEODHAR, A. *et al.* The effect of etanercept on traditional metabolic risk factors for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, 2016. v. 35, n. 12, p. 3045–3052.

ENWEMEKA, C.S.; PARKER, J.C.; DOWDY, D.S.; HARKNESS, E.E.; SANFORD, L.E.; WOODRUFF, L.D. The Efficacy Of Low-Power Lasers In Tissue Repair And Pain Control: A Meta-Analysis Study. **Photomed Laser Surg**, 22(4): 323-329, 2004.

ERTHAL, V.; FERREIRA, M. D.; WERNNER, M.F.; BAGGIO, C.H.; NOHAMA, P. Anti-inflammatory effect of laser acupuncture in ST36 (Zusanli) acupoint in mouse paw edema. **Lasers in medical science**, 31(2): 315-322,2016.

FELIZATTI, A.L. et al. Effects of low-level laser therapy on the organization of articular cartilage in an experimental microcrystalline arthritis model, **Lasers Med Sci**. 2019.

FONSECA, A.S.; CAMPOS, V.M.; MAGALHÃES, L.A.; PAOLI, F. Nucleotide excision repair pathway assessment in DNA exposed to low-intensity red and infrared lasers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 48(10):929-38, 2015.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 1, p. 9-17, 2007.

GOTTILIEB, T.; JORGENSEN, B.; MULLER, E.R.G.; SCHELLER, E.E. The influence of irradiation with low-level diode laser on the proteoglycan content in arthrotically changed cartilage in rabbits. **Inflammation**, Volume 21, Issue 1, Pages 53-59, 2006.

GUIRRO, R.R.J.; WEIS, L.C. Radiant power determination of low level laser therapy equipment and characterization of its clinical use procedures. **Photomed Laser Surg**. 27(4):633-39, 2009.

GUM, S.L.; REDDY, G.K.; BITTEL, L.S; ENWEMEKA, C.S. Combied ultrasound, electrical stimulation, and laser promote collagen syntesis with

moderate changes in tendon biomechanics. *Am J Phys Med Rehabil.* 76(4):288-96, 1997.

GUPTA, A.; KESHRI, G.K.; YADAV, A.; et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *Biophotonics*, 8: 489–501, 2014.

HAAPALA, J.; AROKOSKI, J.P.A.; RONKKO, S.; AGREN, U.; KOSMA, V.M.; LOHMANDER, L.S. Decline after immobilisation and recovery after remobilisation of synovial fluid IL1, TIMP, and chondroitin sulphate levels in young beagle dogs. *Ann Rheum Dis*, 60:55-60. 21, 2001.

HELLIWELL, P.; REAY, N.; GILWORTH, G.; REDMOND, A.; SLADE, A.; TENNANT, A.; WOODBURN, J. Development of a foot impact scale for rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research*, 53(3):418–422, 2011.

HUANG YY, SHARMA SK, CARROLL J, HAMBLIN MR .Biphasic dose response in low level light therapy update. *Dose.Response*, v. 9, p.602–618, 2011.

ISSA, J.P.M.; TRAWITZKI, B.F.; ERVOLINO, E.; MACEDO, A.P.; LILGE, L.: Low-intensity laser therapy efficacy evaluation in FVB mice subjected to acute and chronic arthritis. *Lasers Med Sci*. 2017.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Analyt. Biochem*, 1979.

KALPAKCI, K. N.; WILLARD, V. P.; WONG, M. E.; ATHANASIOU, K. A. An Interspecies Comparison of the Temporomandibular Joint Disc. *J Dent Res*, v. 90, n. 2, p.193-8, 2011.

KARU, T.I., Low power laser therapy. In: **Biomedical Photonics Handbook**, Tuan Vo-Dinh, ed., CRC Press, Boca Raton: 2003, Ch. 48.

KITCHEN, S. S. Eletroterapia: Prática baseada em evidências. São Paulo: Ed. Manole Ltda, 2003, P. 267-283.

KAZEM, S.S.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKSAMANI, Y.; OSKUIE, M.R. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci*, 25(1):73-77, 2010.

KARVAT, J.; *et al.* Redução da nocicepção articular induzida pela formalina em ratos tratados com laser de baixa potência 670 ou 830 nm. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v. 48, n. 6, p. 533-538, 20 dez. 2015.

LEMOS, G. A; *et al.* Low-level laser therapy stimulates tissue repair and reduces the extracellular matrix degradation in rats with induced arthritis in the temporomandibular joint. *Lasers Med Sci*, v. 31, n. 6, p. 1051-9, 2016.

LIN, Y.S.; HUANG, M.H.; CHAI, C.Y. Effects of helium- neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. *American Journal of physical medicine e rehabilitation*. 2004; 10(83): 758-765.

LOPES, L.; BRUGNERA, A.J.; PINHEIRO, A.L.B. Aplicações clínicas do laser não cirúrgico. **Laseres na odontologia moderna**, V.100, p. 20, 2008.

MARTINS, L.R.A.B., MARCOS, R.L., LEONARDO, O.S., PRIANTI, A.C., MUSCARA, M.N., AIMBIRE, F., FRIGO, L., IVERSEN, V.V., BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **Journal of Applied Physiology**, 101:283-8, 2006.

MARTIUS F. D. arndt-schulz grundgesetz. **Munch Med Wschr**, p.1005–1006, 1923.

MATERA, J.M.; TATARUNAS, A.C.; OLIVEIRA, S.M. Uso do laser arseneto de gálio (904nm) após excisão artroplástica da cabeça do fêmur em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.2, p.102-106, 2003.

MCINNES, I.B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, 7:429-442, 2007.

MEIRELES, S.M.; JONES, A.N.; JENNINGS, F.; SUDA, A.L.; PARIZOTTO, N.A.; NATOUR, J. Assessment of the effectiveness of low-level laser therapy on the hands of patients with rheumatoid arthritis: a randomized double-blind controlled trial. **Clinical Rheumatology**, 29:501–509, 2010.

MERIGO, E.; VESCOVI, P.; MARGALITI, M. et al. Efficacy of LBI in swelling and pain control after the extraction of lower impacted third molars. **Laser Therapy**, 24(1): 39-46, 2015.

MESTER, A. Laser Biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, 31(6): 237-239, 2013.

MEMIS, S.; CANDIRLI, C.; KERIMOGLU, G. Temporomandibular Joint Dysfunction. Short term histopathological effects of GaAlAs laser on experimentally induced TMJ osteoarthritis in rabbits. **Braz. Oral Res**, 32: e90, 2018.

MICHELSON, J.; EASLEY, M.; WIGLEY, F.M.; HELLMANN, D. Foot and ankle problems in rheumatoid arthritis. **Foot and Ankle International**, 15(11):608-613, 1994.

PALLOTTA R.C.; BJORDAL J.M.; FRIGO L.; LEAL JUNIOR E.C.P.; TEIXEIRA S.; MARCOS R.L.; et al. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med Sci**, v.27(1),p.71–8, 2012.

PENIDO, C.; CONTE, F.P.; CHAGAS, M.S.; RODRIGUES, C.A.; PEREIRA, J.F.; HENRIQUES, M.G. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, 55:457–464, 2006.

PERRETI, M.; COOPER, D.; DALLI, J.; NORLING, L.V. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, 13(2): 87-99, 2017.

PINTO, L.G.; CUNHA, T.M.; VIEIRA, S.M.; LEMOS, H.P.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, 148:247-256, 2010.

PRIANTI, A.C.G.; SILVA, J.A.; SANTOS, R.F.; ROSSETI, I.B.; COSTA, M.S. Low-level laser therapy (LBI) reduces the cox-2 mrna expression in both subplantar and total brain tissues in the model of peripheral inflammation induced by administration of carrageenan. **Lasers med sci**, 29(4): 1397-1403, 2014.

REDDY, G.K.; STEHNO- BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetics rats. **Wound Repair and Regeneration**. Saint Louis, v. 9, n. 3, p. 448-255, 2001.

RIBEIRO, B.G.; *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** , v.11(4), 2016.

RUSCITTI, P.; *et al.* Increased Cardiovascular Events and Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis Patients: 1 Year Prospective Single Centre Study. **PLOS ONE**, 12(1): 1-17, 2017.

SANTOS, S.A.; *et al.* Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. **Lasers Med Sci**.2017.

SERGIO, L.P.S.; *et al.* Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red Laser. **Journal of Clinical and Experimental Dermatology Reserach**, 3(166), 2012.

SMOLEN, J.S.; *et al.* Recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs update. **Ann. Rheum. Dis**, 76(6): 960-977, 2017.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; REDLICH, K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 4, p. 235–243, 2012.

TRAWITZKI, B.F. *et al.* Low-intensity laser therapy efficacy evaluation in FVB mice subjected to acute and chronic arthritis. **Lasers in Medical Science**. 2017, v. 174, n. September 2016, p. 1–9.

TIM, C.R.; *et al.* Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. **J Photochem Photobiol**, 154: 8-15, 2016.

VAZ, A.E.; JÚNIOR, W.A.F.; LAZARSKI, C.F.S.; CARMO, H.F.; SOBRINHO, R.H.M. Perfil epidemiológico e clínico de pacientes portadores de artrite reumatoide em um hospital escola de medicina em Goiânia, Goiás, Brasil. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, 46(2): 141-153, 2013.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L., PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochemical Journal**, v.14, p.000- 000, 1982.

WANG, Y.; *et al.* Low-Level Laser Therapy Attenuates LPS-Induced Rats Mastitis by Inhibiting Polymorphonuclear Neutrophil Adhesion. **J Vet Med Sci**, v.76(11), p.1443–50, 2014.

ANEXOS



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



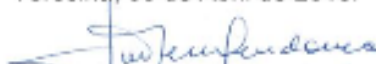
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: cesapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "***Efeitos de duas doses de laser de baixa intensidade em modelo experimental de artrite***", registrada nº 406/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **MARCELO DE CARVALHO FILGUEIRAS** do Departamento Pós-Graduação em **Biociências - Campus Ministro Reis Veloso /UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **06/04/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Abril /2018 à Julho/ 2019
Espécie/Linhagem/raça	1. Camundongos heterogênicos/ Swiss 2. Rato heterogênico/ wistar
Nº de Animais	1. 100 2. 133
Peso/ Idade	1. 25-35 g/ 30 dias 2. 180-220g/ 30 dias
Sexo	1. Fêmeas 2. Machos
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 06 de Abril de 2018.


Prof.ª Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal UFPI
 Coordenadora