

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
POS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IMUNOLOGIA E
DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA
ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN**

Lúcia Mara Januário dos Anjos

Juiz de Fora, 2016

LÚCIA MARA JANUÁRIO DOS ANJOS

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA
ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós
Graduação em Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e Doenças Infectoparasitárias,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas, Área: Imunologia.

Orientadora: Jacy Gameiro
Co-orientadora: Flávia de Paoli

Juiz de Fora, 2016

LÚCIA MARA JANUÁRIO DOS ANJOS

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA
ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOZAN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Juiz de Fora, como parte das exigências do Programa
de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia
e Doenças Infectoparasitárias, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas, Área: Imunologia.

Aprovado em ____ de _____ de _____

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira – UFJF

Prof. Dr. Adenilson de Sousa da Fonseca – UERJ

Profa. Dra. Jacy Gameiro
Orientadora

Juiz de Fora, 2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à Deus, pelo presente da vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho;

Dedico também à minha família e amigos, fonte constante de força e alegria;

Às minha amigas Gi e Flávia, por tornarem os dias de trabalho sempre mais agradáveis;

Àos meus pais pelo amor e empenho para que pudesse me tornar uma pessoa melhor;

Ào meu marido João Paulo, por me aguentar nos momentos de ansiedade e estresse, sendo sempre companheiro, carinhoso e paciente; À você João, minha gratidão e todo o meu Amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Jacy Gameiro, pela orientação, pela acolhida em seu grupo de pesquisa e por confiar e acreditar no meu potencial.

À Profa. Flávia de Paoli, pela orientação e por todo o conhecimento tão generosamente passado a mim, sempre disponível para me auxiliar no que fosse necessário, além de oferecer importante suporte financeiro ao projeto. Grande incentivadora do meu crescimento acadêmico, seja através do incentivo a participação de congressos, seja pelos ensinamentos sobre confecção de artigos, é uma profissional brilhante ao qual sempre irei me espelhar.

Àos amigos do Laboratório de Imunologia e Doenças Infectoparasitárias, Obesidade e Câncer (LIDIPO): Aninha, Gabi, Polly, Sara e todos os alunos de graduação, que participaram ativamente dos experimentos, muitas vezes ficando até altas horas da noite sem perder o bom humor e a disposição.

À todos os alunos, professores, técnicos e terceirizados do Laboratório de Imunologia do ICB, por disponibilizar o laboratório e equipamentos tão importantes para a realização deste trabalho, em especial à Profa. Ana Paula, por também aceitar participar da banca examinadora.

Ào Prof. Adenilson (UERJ) pela generosidade em nos emprestar equipamentos, por nos auxiliar na padronização das técnicas de PCR e por aceitar o convite para participar da banca examinadora.

RESUMO

A artrite é uma desordem músculo esquelética, caracterizada por inflamação das articulações e que apresenta importante impacto socioeconômico, uma vez que é observada em diversas patologias reumáticas, como na artrite reumatóide (AR), doença autoimune crônica, associada à incapacidade motora e laboral dos pacientes. As estratégias atuais para o tratamento da AR objetivam o alívio dos sintomas e modificação do curso degenerativo da doença, mas podem apresentar sérios efeitos colaterais e nem sempre resultam em melhora clínica. Neste contexto, a utilização de laser de baixa potência surge como alternativa não invasiva para o tratamento da artrite, devido as suas propriedades anti-inflamatórias e de regeneração tecidual. Entretanto, os mecanismos anti-inflamatórios do laser nos tecidos biológicos ainda não estão completamente conhecidos. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos anti-inflamatórios de lasers terapêuticos de baixa potência num processo inflamatório induzido, o qual se assemelha a AR. Para isso, um processo inflamatório foi induzido nas articulações talocrural e subtalar dos dois membros posteriores de camundongos C57BL/6, utilizando uma injeção de zymosan na região periarticular. Os animais foram divididos em 8 grupos (n=6): (I) controle, (II) zymosan, (III) eutanasiado 5h após indução com zymosan, (IV) zymosan+dexametasona, (V) laser 3J/cm², (VI) laser 30J/cm², (VII) zymosan+laser 3J/cm², (VIII) zymosan+laser 30J/cm². As condições do laser de baixa potência foram: $\lambda=830\text{nm}$ (infravermelho), potência 10mW e fluências de 3J/cm² e 30J/cm², no modo contínuo de emissão da luz. A irradiação foi realizada durante 4 dias consecutivos, iniciando 5 horas após a indução a inflamação pelo zymosan. Vinte quatro horas após a última aplicação do laser, os animais foram eutanasiados e suas articulações encaminhadas para as seguintes análises: (a) análise morfológica, (b) análise de fragmentação de DNA por TUNEL e (c) análise da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas às vias apoptóticas por PCR em tempo real. As análises morfológicas revelaram a presença de infiltrado celular inflamatório no tecido conjuntivo adjacente a região periarticular, em todos os grupos que receberam zymosan. Esse infiltrado diminuiu consideravelmente após a irradiação do laser na fluência de 30J/cm². Para os dois grupos irradiados com laser, observou-se a elevação na taxa de apoptose somente nas células do infiltrado inflamatório, resultado este corroborado pelo aumento da expressão de genes que codificam

proteínas associadas tanto pela via extrínseca como pela via intrínseca da apoptose. A resolução do processo inflamatório para o grupo Zy+3J/cm² foi mais lenta do que a observada no grupo Zy+30J/cm², uma vez que, após o término do tratamento, foram observadas elevada densidade celular e taxa de fragmentação de DNA nas células inflamatórias. Com isso, o laser de baixa potência, em especial na fluência de 30J/cm², foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório na região periarticular, acelerando o processo apoptótico dessas células. A utilização do laser infravermelho de baixa potência pode ser uma boa alternativa para o tratamento de desordens inflamatórias articulares, uma vez que é um método não invasivo. Adicionalmente, esse tipo de tratamento não demonstrou efeitos colaterais nos demais tecidos adjacentes saudáveis, atuando especialmente nas células inflamatórias.

Palavras chave: Laser de baixa potência; apoptose; artrite; zymosan.

ABSTRACT

Arthritis is a muscle skeletal disorder characterized by inflammation of the joints, which has a significant socioeconomic impact, as observed in various rheumatic disorders such as rheumatoid arthritis (RA), chronic autoimmune disease associated with patients motor incapacity. Current strategies for the treatment of RA aim to relieve symptoms and modifying the degenerative course of the disease, but may have serious side effects and not always result in clinical improvement. In this context, the use of low-power laser therapy appears as non-invasive alternative for the arthritis treatment due to their anti-inflammatory and tissue regeneration properties. However, the anti-inflammatory mechanisms of the laser in biological tissues are not completely understood. Thus, this study aims to evaluate the anti-inflammatory effects of therapeutic low-power lasers in an induced inflammatory process, which resembles RA. An inflammatory process was induced in the talocrural and subtalar joints of the two rear paws of C57BL/6 using a zymosan injection in the periarticular region. The animals were divided into 8 groups (n = 6): (I) control, (II) zymosan, (III) euthanized 5 hours after induction with zymosan (IV) zymosan + dexametasona, (V) laser 3J/cm² (VI) laser 30J/cm² (VII) + zymosan laser 3J/cm² (VIII) laser zymosan + 30J/cm². The low power laser conditions were: λ = 830 nm (infrared), 10mW power and fluences of 3 J/cm² and 30J/cm² at continuous mode of light emission. Irradiation was carried out for 4 consecutive days, starting 5 hours after inflammation-induced by zymosan. Twenty four hours after the last application of the laser, the animals were euthanized, their joints dissected and distributed: (a) morphological analysis, (b) DNA fragmentation analysis by TUNEL and (c) expression analysis of genes encoding proteins related to apoptotic pathways by real time PCR. Morphological analysis revealed the presence of inflammatory cell infiltrate in the adjacent connective tissue of periarticular region for all groups that received zymosan. This infiltration decreased significantly after laser irradiation using 30J/cm² fluence. Both groups irradiated demonstrated DNA fragmentation rate increased and only observed in inflammatory cells. DNA fragmentation is usually observed to cell death by apoptosis. This result is corroborated by expression increase of genes that encode proteins associated with both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis. The inflammatory process resolution for Zy+3J/cm² group was slower than

Zy+30J/cm², since it was observed high cell density and DNA fragmentation rate in inflammatory cells. Thus, the low-power laser, particularly in 30J/cm² fluence, could reduce the inflammatory infiltration in periarticular area, accelerating the inflammatory cells apoptosis. The use of low power infrared laser can be a good alternative for inflammatory joint disorders treatment, since it is a noninvasive method. Additionally, this type of treatment did not show side effects on other healthy surrounding tissues, acting especially in inflammatory cells.

Keywords: Low power laser; apoptosis; arthritis; zymosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia óssea e articular do pé e tornozelo humano	21
Figura 2 - Desenho esquemático representando as citocinas e células imunes envolvidas na AR.....	23
Figura 3 – Desenho esquemático do controle mitocondrial da apoptose.....	25
Figura 4 – Desenho esquemático representando a sinalização intracelular após permeabilização mitocondrial em resposta a aborção de radiação visível ou infravermelho (IV) pelo fotoceptor citocromo c oxidase	30
Figura 5 - Administração de Zymosan na região da articulação talocrural e subtalar.....	35
Figura 6 - Cronograma experimental.....	36
Figura 7 - Planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia.....	37
Figura 8 – Foto representativa demonstrando a região da articulação talocrural.....	43
Figura 9 – Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal controle.....	44
Figura 10 - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal eutanasiado 5h após administração com zymosan	44
Figura 11 - Fotomicrografia demonstrando as células do infiltrado inflamatório do animal eutanaziado 5h após administração com zymosan	45
Figura 12 - Fotomicrografia demonstrando as células do infiltrado inflamatório do animal sem tratamento (Zy)	45

Figura 13 – Fotomicrografia representando a articulação talocrural e subtalar, bem como seus tecidos adjacentes..... 46

Figura 14 - Fotomicrografia demonstrando a marcação de TUNEL em células do infiltrado inflamatório, indicando fragmentação de DNA, em marrom..... 48

Figura 15 - Apresenta o esquema dos resultados ponderados da expressão gênica dos grupos tratados..... 52

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Área (μm^2) do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo do espaço sinovial..... 45
- Gráfico 2** - Densidade celular do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo do espaço sinovial 45
- Gráfico 3** - Número de células inflamatórias com marcação positiva de TUNEL, indicando fragmentação de DNA 48
- Gráfico 4** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Fas..... 49
- Gráfico 5** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína FasL 49
- Gráfico 6** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Apaf1..... 50
- Gráfico 7** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína caspase 9..... 50
- Gráfico 8** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína caspase 3..... 50
- Gráfico 9** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína caspase 6..... 50
- Gráfico 10** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Bax..... 50
- Gráfico 11** - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína p53 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais 34

Tabela 2 - *Primers* utilizados para qPCR 40

Tabela 3 - Densidade celular absoluta do infiltrado inflamatório (expresso pela média) e coeficientes gerados pela comparação com Zy..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite Reumatóide
OA	Osteoartrite
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
DMCD	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
LLLT	" <i>Low Level Laser Therapy</i> " Terapia com Laser de Baixa Potência
Zy	Zymosan A
TLR2	Receptor <i>toll-like</i> tipo 2
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear κB
IL	Interleucina
NK	" <i>Natural killer</i> " Matadora Natural
NKT	" <i>NK like T cell</i> " NK tipo célula T
APRIL	Ligante Indutor de Proliferação
BAFF	Fator Ativador de Células B
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico
CCL21	CC-quimiocina ligante 21
CXCL13	CXC- quimiocina ligante 13
FcγR	Receptor Fc para IgG
IFN	Interferon
LTβ	Linfotoxina-β
M-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Macrófago
PAR2	Receptor 2 Protease Ativada

RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear -κB
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear -κB
TGFβ	Fator de Transformação do Crescimento-β
Th	"T <i>helper</i> " T auxiliar
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Bcl-2	"B-cell lymphoma 2" Célula B de linfoma tipo 2
DR	" <i>Death Receptor</i> " Receptor de morte
ROS	" <i>Reactive Oxygen Species</i> " Espécies reativas de oxigênio
DNA	" <i>Deoxyribonucleic Acid</i> " Ácido Desoxirribonucléico
Flip	Enzima Conversora da IL-1β Ligada ao FADD
FADD	Domínio de Morte Associado a Fas
Fas	CD95 (cluster of differentiation 95)
FasL	Ligante de Fas
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Quinase
AKT	Proteína Quinase B
MTX	Metotrexato
pHi	Potencial hidrogeniônico intracelular
Ca ²⁺	Cálcio Iônico
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato

RNA	" <i>Ribonucleic Acid</i> " Ácido Ribonucléico
$\Delta\Psi_m$	Potencial Elétrico da Membrana Mitocondrial
Eh	Potencial Redox Intracelular
ΔE_m	Potencial de Membrana
GSK3 β	Proteína Glicogênio Sintase Quinase 3 β
PGE2	Prostaglandinas E2
iNOS	" <i>Inducible nitric oxide synthase</i> " Óxido Nítrico Sintase Induzível
PMN	Polimorfonucleares
λ	Comprimento de Onda
TUNEL	" <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling</i> " Quebra e ligação da desoxinucleotídeo tranferase terminal biotina-dUTP
DAB	Diaminobenzidina
cDNA	DNA complementar
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool" Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico
NCBI	"National Center for Biotechnology Information" Centro Nacional de Informação em Biotecnologia - EUA
H&E	Hematoxilina e Eosina
RIPK1	Receptor Serina Treonina Quinase 1
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE ARTRITE	19
1.2 ARTRITE REUMATÓIDE (AR)	20
1.2.1 Processo inflamatório articular na AR	22
1.2.2 Processo inflamatório e apoptose	23
1.2.3 Tratamento da AR	26
1.3 LASER	28
1.3.1 Lasers e processo inflamatório	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	34
3.2 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PELO ZYMOSAN	35
3.3 EXPOSIÇÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA	35
3.4 TRATAMENTO COM DEXAMETASONA	36
3.5 EUTANASIA E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	36
3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA	38
3.7 FRAGMENTAÇÃO DE DNA E APOPTOSE	38
3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E <i>real time</i> PCR (qPCR)	39
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4 RESULTADOS	43
4.1 INFLAMAÇÃO NA REGIÃO ARTICULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN	43
4.2 EFEITO DO LASER SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO	45
4.3 EFEITO DO LASER SOBRE A TAXA DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA NAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	47
4.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS VIAS APOPTÓTICAS	49
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Artrite é uma desordem crônica degenerativa de etiologia multifatorial caracterizada pela perda progressiva da cartilagem articular, hipertrofia e deformação do osso subcondral e por inflamação secundária da membrana sinovial (SALTER, 2001; MAHAJAN *et al.*, 2005). Os sintomas clínicos são dor e edema, e com a evolução da doença, limitação da amplitude de movimentos e crepitação articular (LIANZA, 2001). De grande importância epidemiológica devido à alta prevalência na população mundial (cerca de 1%), a artrite é observada em diversas desordens musculoesqueléticas importantes, como na artrite reumatóide (AR) e na osteoartrite (OA), embora também possa ser iniciada por impacto ou outros agentes mecânicos sobre a articulação (SILMAN & PEARSON, 2002; FIRESTEIN 2003). Segundo dados mais recentes sobre o impacto global de patologias, realizado pela Organização Mundial da Saúde, as desordens músculoesqueléticas são responsáveis por mais de um quinto (21,4%) de todos os anos vividos com incapacidade, perdendo mundialmente, apenas para problemas de saúde mental (23,2%) (VOS *et al.*, 2012).

A AR é uma doença autoimune inflamatória, de natureza e etiologia desconhecida, que acomete preferencialmente a membrana sinovial das articulações, podendo levar à destruição óssea e cartilaginosa (IDE *et al.*, 2011). Caracterizada pelo acometimento em geral simétrico das pequenas e grandes articulações e pelo caráter crônico e destrutivo, a doença pode levar a importante limitação funcional, com perda da capacidade laboral e da qualidade de vida, exceto se o diagnóstico for realizado na fase inicial da doença e que o tratamento determine melhora clínica (VERSTAPPEN *et al.*, 2005).

Historicamente, a AR tem sido tratada usando a estratégia de pirâmide, em que se inicia o tratamento visando somente o alívio dos sintomas, com a administração de anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), drogas amplamente utilizadas em todo o mundo que possuem propriedades analgésicas, antipiréticas e, em fluências mais elevadas, anti-inflamatórias, e/ou corticosteróides, eficazes na supressão da inflamação e na diminuição da destruição articular. Com a cronicidade do quadro e a progressão das lesões, são introduzidos fármacos mais potentes

como drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas e/ou biológicas e drogas imunossupressoras (FLOOD, 2010; DA MOTA *et al.*, 2013). Entretanto, estes tratamentos podem apresentar importantes efeitos colaterais, se utilizados a longo prazo, nem sempre alcançando a melhora clínica (KIELY *et al.*, 2009; SMOLEN *et al.*, 2010; DA MOTA *et al.*, 2013).

Neste contexto, as terapias baseadas em lasers de baixa potência, do inglês *Low Level Laser Therapy* (LLLT), surgem como alternativa não invasiva para o tratamento da artrite, devido às suas propriedades anti-inflamatórias (ANTUNES *et al.*, 2007), de regeneração tecidual (POSTEN *et al.*, 2005) e de redução da dor e edema (GUR *et al.*, 2004). LLLT, forma de fototerapia que envolve a aplicação de radiações visíveis e pertencentes à região que abrange a luz vermelha a infravermelha do espectro eletromagnético, induz reações biológicas não destrutivas e não térmicas com finalidade terapêutica (WU & XING, 2014).

O presente estudo investigou os efeitos anti-inflamatórios do laser de baixa potência em um modelo de inflamação articular induzida por zymosan em camundongos, com foco nos mecanismos envolvidos na resolução do processo inflamatório.

1.1 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE ARTRITE

Modelos animais têm sido extensivamente utilizados para o estudo da artrite. Apesar de certas limitações, muitos destes estudos em roedores apresentaram significativo progresso no entendimento dos mecanismos patológicos fundamentais e possibilitaram avanços no tratamento da doença. Dentre estes, a aplicação de zymosan (Zy) na cavidade articular de roedores produz uma sinovite grave e erosiva (KEYSTONE *et al.*, 1989), que induz uma resposta imune *in vivo* por ativação de macrófagos e outras células mononucleares. A sintomatologia apresentada é semelhante àquela observada na AR, como edema, infiltrado celular sinovial, destruição cartilaginosa e óssea e perda motora (DERBOCIO *et al.*, 2005).

O zymosan, um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, é composto primariamente de resíduos de glicose e

manose (DI CARLO & FIORE, 1958). *In vitro*, o zymosan é utilizado como um modelo de indução de resposta imune inata, pois é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias e pode ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas (UNDERHILL *et al.*, 1999). O zymosan é reconhecido e fagocitado principalmente por monócitos e macrófagos, levando a ativação das células de defesa (UNDERHILL, 2003). A injeção intra-articular de zymosan promove, em até três dias após a indução, um aumento de permeabilidade vascular e migração celular, levando a sinovite erosiva grave. A seguir, desenvolve-se uma sinovite com infiltrado mononuclear e resposta dos fibroblastos, lembrando a sinovite crônica que caracteriza o *pannus* reumatóide (ASQUITH *et al.*, 2009).

A resposta inflamatória desencadeada pelo zymosan está relacionada com sua fagocitose, realizada por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos por intermédio da ligação do zymosan ao receptor *toll-like* tipo 2 (TLR2) (SCHORLEMMER *et al.*, 1977; TAYLOR *et al.*, 2002). Uma vez ligado ao seu receptor, o zymosan induz a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias, IL-1, IL-6, IL-8, e IL-18, bem como a expressão de moléculas coestimuladoras. Adicionalmente, o zymosan é capaz de induzir a maturação de células dendríticas *in vitro* e estimular a produção de IL-2 por essas células, indicando ligação entre respostas imunológicas inata e adaptativa (GRANUCCI *et al.*, 2003).

1.2 ARTRITE REUMATÓIDE (AR)

A AR é uma doença autoimune inflamatória crônica que afeta primariamente as articulações causando dor, enrijecimento e sinovite. Componentes genéticos e ambientais participam da etiologia da doença e o processo patológico envolve a perturbação dos mecanismos de imunidade inata e adaptativa, com produção de autoanticorpos, assim como a migração de células T e B para o compartimento sinovial e subsequente inflamação crônica (ASQUITH *et al.*, 2009, BURMESTER *et al.*, 2012).

De incidência mundial, cerca de 1% da população adulta, e com predomínio sobre o gênero feminino (cerca de três vezes em relação ao gênero masculino), a AR ocorre em qualquer idade, sobretudo, em pacientes entre a quarta e sexta década de vida, não existindo associação entre a prevalência da doença e a condição socioeconômica da população (FIRESTEIN 2003; SILMAN & PEARSON, 2002).

As manifestações clínicas da doença podem ser divididas em articulares e extra-articulares. As manifestações articulares podem ser reversíveis em sua fase inicial, porém a sinovite persistente e não controlada determina destruição óssea e cartilaginosa, lesões tendinosas e ligamentares irreversíveis (DEODHAR *et al.*, 2003).

O pé contém várias articulações sinoviais que podem ser afetadas pela AR. Conseqüentemente, o acometimento destas articulações está presente em 80-90% das pessoas que apresentam AR, sendo o envolvimento das articulações do tornozelo (como a talocrural e a subtalar) observada em 10-20% (VAINIO, 1991; KERRY *et al.*, 1994; MICHELSON *et al.*, 1994). O desenho esquemático abaixo (figura 1) representa a anatomia óssea e articular do pé e tornozelo comparada de humano e camundongo.

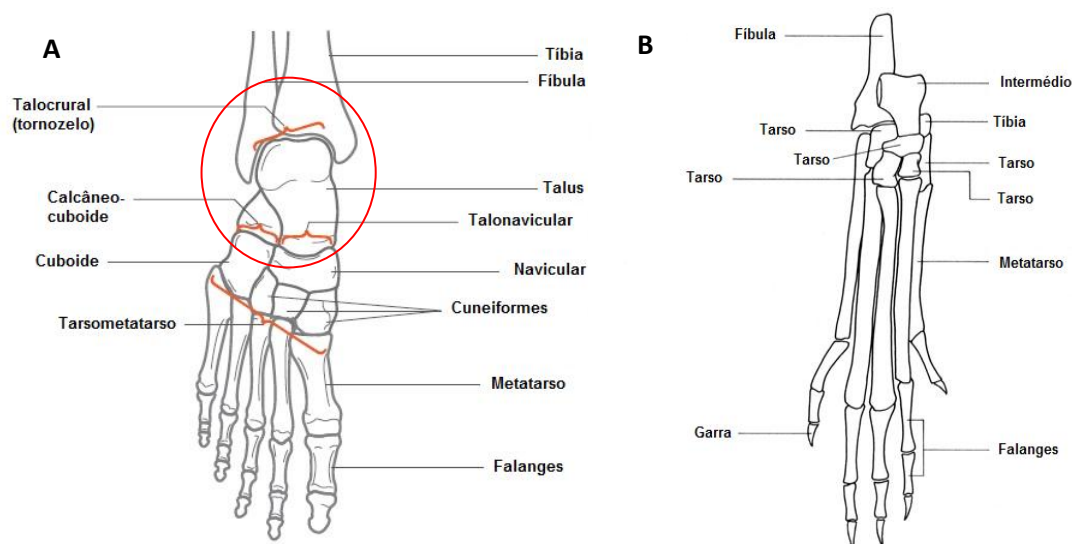


Figura 1 - Anatomia óssea e articular do pé e tornozelo humano (A) e da pata de rato (B). A - Adaptado de HELLIWELL *et al.*, 2011; B- Adaptado de <http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>.

A inflamação sinovial nas articulações do pé e tornozelo causa o alongamento e o enfraquecimento da cápsula sinovial, a perda da integridade das estruturas

estabilizadoras das articulações (ligamentos colaterais) e destruição da cartilagem articular (KEENAN *et al.*, 1991; KIRVESKARI *et al.*, 1998; JAAKKOLA & MANN, 2004). A perda da estabilidade das articulações torna-as mais suscetíveis às deformidades impostas pelas forças musculares e mecânicas geradas pela caminhada e pelo uso de sapato (KIRVESKARI *et al.*, 1998).

Patologias dos tecidos moles também são comuns e até 25% dos pacientes se queixam de dor nos tecidos em torno do pé, como as observadas na fascite plantar (inflamação da fácia plantar), tendinite peroneal (inflamação no tendão do tornozelo) ou bursite (inflamação da bursa - cápsula sinovial) (VIDIGAL *et al.*, 1975; BOUYSSSET *et al.*, 1987; KERRY *et al.*, 1994; MICHELSON *et al.*, 1994).

1.2.1 Processo inflamatório articular na AR

O processo inflamatório articular ou sinovite inicia-se com o influxo de leucócitos em reflexo à quimiotaxia destas células em migrar para o compartimento sinovial e proliferar, o que resulta na hiperplasia da membrana sinovial, normalmente hipocelular (MCINNES & SCHETT, 2007). Essa migração é induzida pela ativação de células dos microvasos sinoviais, as quais aumentam a expressão de moléculas de adesão (incluindo integrinas, selectinas, e membros da superfamília das imunoglobulinas) e citocinas. A neoangiogênese, induzida pela exacerbação das condições de hipóxia local e a ação de citocinas, assim como a linfoangiogênese, são fenômenos típicos observados no início da sinovite da AR (SZEKANECZ *et al.*, 2009). Dentre as células hiperplásicas no compartimento sinovial estão fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células TCD4⁺, células TCD8⁺, células *natural killer* (NK), células *natural killer* tipo linfócitos T (*NK like T cell-NKT*), células B e plasmócitos (BURMESTER *et al.*, 2014).

Diversos mediadores estão envolvidos no processo inflamatório, como os eicosanóides (ciclooxigenases, prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos) e as citocinas (SMITH, 1992; APPLETON, *et al.*, 1996). As citocinas são uma família de mediadores protéicos importantes em interações intercelulares e na indução e

modulação de um grande número de processos inflamatórios e metabólicos. Participam ativamente da resposta imune, principalmente na ativação e proliferação dos linfócitos; estão envolvidas também na resposta pirogênica e de fase aguda da AR (HOFSLI *et al.*, 1989; MCINNES & SCHETT, 2011). Diversas subpopulações celulares produzem citocinas durante a inflamação sinovial e o padrão desta produção pode variar de acordo com o estágio da doença (figura 2).

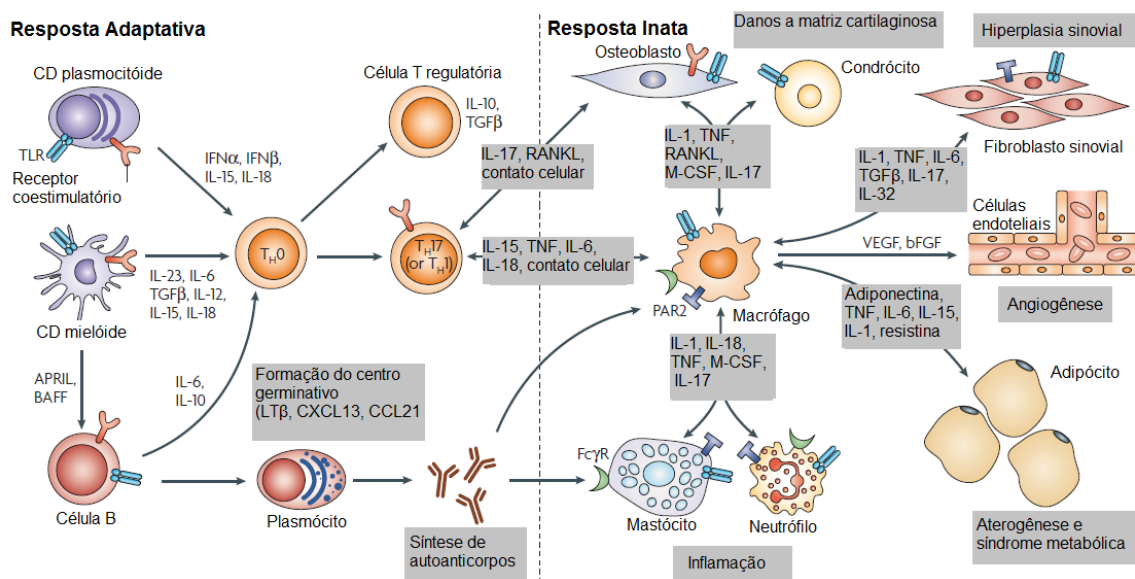


Figura 2- Desenho esquemático representando as citocinas e células imunes envolvidas na AR. As citocinas atuam em diversos processos relacionados à patogênese da AR. Nas articulações reumáticas, o desequilíbrio entre a atividade das citocinas pro e anti-inflamatórias favorece a indução da autoimunidade, a inflamação crônica e o conseqüente dano à estrutura articular. APRIL, ligante indutor de proliferação; BAFF, fator ativador de células B; bFGF, fator de crescimento de fibroblasto básico; CCL21, CC-quimiocina ligante 21; CXCL13, CXC- quimiocina ligante 13; FcγR, receptor Fc para IgG; IFN, interferon; IL, interleucina; LTβ, linfotóxina-β; M-CSF, fator estimulador de colônia de macrófago; PAR2, receptor 2 protease ativada; RANKL, ligante do receptor ativador do fator nuclear-κB (RANK); TGFβ, fator de transformação do crescimento-β; TH, T helper; TLR, receptor Toll-like; TNF, fator de necrose tumoral; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. (Adaptado de McInnes e Schett, 2007).

As mudanças no microambiente, combinadas com a reorganização na arquitetura sinovial, são condições favoráveis ao desenvolvimento da inflamação articular e podem desencadear a destruição da cartilagem adjacente devido à ativação de osteoclastos, condrócitos e fibroblastos (MCINNES & SCHETT, 2011).

1.2.2 Processo inflamatório e apoptose

A morte por apoptose de sinoviócitos residentes e células inflamatórias, assim como a observada em condrócitos, tem sido associada com a patogênese da AR (BAIER *et al.* 2003).

Apoptose é um complexo processo, dependente de energia e caracterizado por específicas modificações morfológicas e bioquímicas, incluindo a ativação de caspases, que desempenham um papel central. As caspases são amplamente expressas em forma de pró-enzimas, inativas na maioria das células e, uma vez ativadas são capazes de ativar outras pró-caspases, permitindo a iniciação de uma cascata de proteases. Algumas pró-caspases também podem se agregar e se autoativar. As caspases têm atividade proteolítica e são capazes de clivar proteínas em resíduos de ácido aspártico, embora apresentem diferentes especificidades, que envolvem o reconhecimento de aminoácidos vizinhos. Atualmente, 10 caspases principais foram identificadas e classificadas em iniciadores (caspase-2, -8, -9, -10), efetores ou executores (caspase-3, -6, -7) e caspases inflamatórias (caspase-1, -4, -5) (RAI *et al.*, 2005).

Já o controle e a regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorre através de membros da família de proteínas Bcl-2 (CORY & ADAMS, 2002). Atualmente, 25 genes foram identificados na família Bcl-2. A proteína p53, supressora de tumor, possui um papel importante na regulação do Bcl-2; no entanto os mecanismos exatos ainda não foram completamente elucidados (SCHULER & GREEN, 2001). A família Bcl-2 de proteínas regula a permeabilidade da membrana mitocondrial e pode ser tanto pró-apoptótica ou antiapoptótica. Algumas das proteínas antiapoptóticas incluem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, Mcl-1, enquanto as proteínas pró-apoptóticas incluem, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, e Blk (Figura 3). Estas proteínas têm um significado especial, uma vez que é possível determinar se a célula irá entrar no processo apoptótico ou irá impedir o processo. Acredita-se que o principal mecanismo de ação da família de proteínas Bcl-2 seja a regulação da liberação do citocromo c da mitocôndria, através de alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (CORY & ADAMS, 2002).

Duas vias distintas, mas convergentes, são responsáveis em desencadear a apoptose: a via do receptor de morte, do inglês *death receptor* (DR), e a via mitocondrial. Membros da super família do TNF se ligam à superfície celular e ativam a via DR, com subsequente aumento da atividade da caspase 8, importante

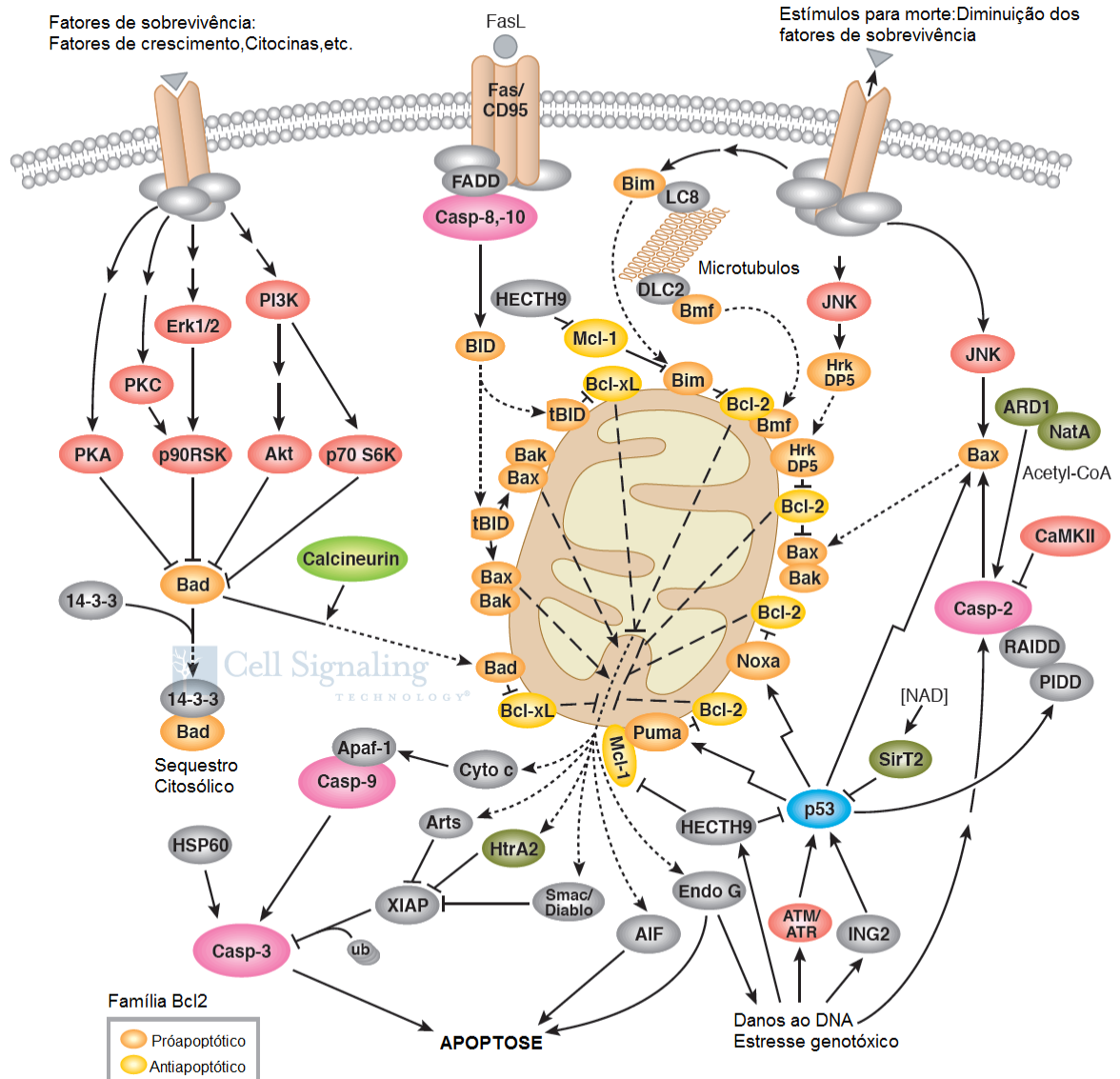


Figura 3 – Desenho esquemático do controle mitocondrial da apoptose. As proteínas antiapoptóticas Bcl2 e Bcl-xL residem na membrana externa da mitocôndria e impedem a liberação do citocromo c. Já as proteínas próapoptóticas, Bad, Bid, Bax e Bim residem no citosol mas podem translocar para a mitocôndria após sinalização para morte celular, induzindo a liberação do citocromo c. Após início da sinalização para morte celular via receptor Fas, a Bid citosólica é clivada pela caspase 8 no fragmento ativo tBid e transloca para a mitocôndria, assim como Bax e Bim, em resposta ao estímulo para morte pela ausência de fatores para sobrevivência celular. Ativado pelo dano ao DNA, p53 induz a transcrição de Bax, Noxa e Puma. Após liberado pela mitocôndria, o citocromo c se liga a Apaf-1 e forma o complexo de ativação da caspase 9, que por sua vez ativa a caspase 3 o que culmina com apoptose celular (Adaptado de <http://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-apoptosis/mitochondrial-control-of-apoptosis-signaling-pathway/pathways%20apoptosiscontrol?Ntk=Content&N=4294956305&Ntt=apoptosis&fromPage=plp>.)

mediador para essa via. Já o balanço entre os membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família da Bcl2 controlam a via mitocondrial e possuem como mediador principal a caspase 9. A ativação da via mitocondrial ocorre pelos seguintes fatores: aumento das espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species* -

ROS), danos ao DNA, mudanças conformacionais de proteínas e privação de fatores de crescimento; e prossegue com o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de proteínas pró-apotóticas, como o citocromo c, do espaço intermembranas para o citosol, ativação de caspase 8 e caspase 9, e consequente ativação das caspases 3, -6 e -7, que por sua vez levam à morte da célula pela clivagem de diversas proteínas e pela ativação de endonucleases (WU & XING, 2014).

Na AR, a hiperplasia celular com aumento da população de neutrófilos, macrófagos, fibroblastos sinoviais e linfócitos indicam que o aumento da proliferação destas células e/ou a insuficiente apoptose contribuem para a persistência da inflamação crônica (POPE, 2002). Embora a proliferação local de fibroblastos possa ocorrer (SUGIYAMA *et al.*, 1996), os macrófagos, assim como os linfócitos aumentados no local da inflamação são provenientes da migração a partir da circulação periférica e apresentam resistência a apoptose (FIRESTEIN *et al.*, 1996; TAK *et al.*, 2000; POPE, 2002).

Ao menos três mecanismos têm sido caracterizados como essenciais para a viabilidade de macrófagos e fibroblastos sinoviais durante a AR: 1) expressão de Flip (enzima conversora da IL-1 β ligada ao FADD), responsável por se ligar ao FADD (domínio de morte associado a Fas) e inibir a ativação da caspase 8 em resposta a sinalização de morte gerada pela ligação de Fas (CD95) e Fas ligante (FasL) na membrana da célula (PERLMAN *et al.*, 1999); 2) manutenção da ativação constitutiva do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), que quando inibida, esta via culmina com a rápida redução do membro A1 da família da Bcl2, perda da integridade mitocondrial e ativação da caspase 9 (PAGLIARI *et al.*, 2000) e 3) manutenção da ativação constitutiva do fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K-AKT1), pois quando inibida, esta via resulta em supressão de Mcl-1, perda da integridade mitocondrial, ativação da caspase 9 e apoptose celular. Todas as vias acima já foram descritas em macrófagos presentes no infiltrado inflamatório na AR (POPE, 2002).

1.2.3 Tratamento da AR

O tratamento da AR, que tem como objetivo a remissão da doença, definida como a ausência dos sinais e sintomas, envolve educação do paciente e de sua família, terapia medicamentosa, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas. As terapias medicamentosas incluem uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINE), corticosteróides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas e biológicas e drogas imunossupressoras (DA MOTA *et al.*, 2013).

Analgésicos e AINE's são largamente utilizados no tratamento de AR para diminuição da dor e da rigidez. Entretanto, os AINE's tem perdido seu papel histórico como primeira opção farmacológica do tratamento devido ao seu efeito limitado, incapacidade de modificar o curso da doença em longo prazo e pelos seus efeitos colaterais tóxicos, em especial os cardíacos e gastrointestinais (MONK *et al.*, 2006; SCOTT *et al.*, 2010). Já a utilização dos corticosteróides demonstrou-se eficaz na supressão da inflamação e na diminuição da destruição articular, quando utilizado no período inicial da doença. Entretanto, o uso na fase tardia deve ser moderado devido aos seus significativos efeitos colaterais (SMOLEN *et al.*, 2012).

Entre as DMCD sintéticas, o metotrexato (MTX) é atualmente considerado o fármaco padrão, sendo eficaz no tratamento da AR ativa e recente ao reduzir sinais e sintomas, a progressão das lesões radiográficas e melhorar o estado funcional do paciente. Entre as DMCD biológicas os mais utilizados são os bloqueadores do TNF (potente citocina inflamatória que promove a liberação de outras citocinas inflamatórias, particularmente as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 e estimula a produção de proteases), que em associação a MTX ou a outra DMCD sintética, possui benefício clínico, radiológico, de remissão e funcional. Contudo, o aumento do risco de eventos adversos sérios e de reação local a aplicação já foi descrito (KIELY *et al.*, 2009; DA MOTA *et al.*, 2013).

O tratamento para os quadros com acometimento das articulações do pé e tornozelo consistem em tratamento farmacológico, utilização de órtese e, em quadros mais avançados, cirurgias como a artrodese (fusão dos dois ossos que formam a articulação) (KIRVESKARI *et al.*, 1998).

Tendo em vista que a hiperplasia sinovial é tanto o marcador da AR quanto o principal fator que contribui para a progressão das lesões (BURMESTER *et al.*,

2012) os tratamentos direcionados a eliminação da inflamação, com alvo nas citocinas, quimiocinas e na coestimulação das células B e células T, têm obtido resultados promissores na AR (HARINGMAN *et al.*, 2003; SMOLEN *et al.*, 2012).

Apesar do progresso no desenvolvimento destas terapias, somente uma pequena parte dos pacientes atingem remissão clínica sustentada (BURMESTER *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, a fototerapia utilizando o laser de baixa potência tem sido introduzida como alternativa não invasiva para o tratamento da AR, por propiciar reações fotoquímicas favoráveis a resolução dos processos inflamatórios e de regeneração tecidual (BROSSEAU *et al.*, 2005). Porém, há controvérsias quanto a sua efetividade e seus mecanismos efetores ainda não são completamente conhecidos.

1.3 LASER

Laser é um acrônimo para “(L)ight (A)mplification by (S)timulated (E)mission of (R)adiation”, ou seja, amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação (SVELTO & HANNA, 1998). Trata-se de um dispositivo constituído de um material capaz de emitir luz quando estimulado numa cavidade óptica composta por dois espelhos (um de frente para o outro) (YOUNG, 1998). Um feixe de luz emitido por um laser se caracteriza por ser colimado, monocromático, coerente e de alta densidade de energia, enquanto um feixe de luz branca, emitida pelas lâmpadas comuns, é divergente, apresenta diferentes comprimentos de onda, fases e, em geral, baixas densidades de energia (O’SHEA *et al.*, 1978). Os lasers podem ser diferenciados pelo comprimento de onda (ou frequência) emitido, pelo modo de emissão (contínuo ou pulsado) ou ainda pela sua potência (baixa, média ou alta) (NIEMZ, 2007).

Terapias baseadas em lasers de baixa potência têm sido utilizadas com sucesso para aplicações clínicas (REDDY, 2004). Radiações visíveis e pertencentes às regiões do vermelho e infravermelho do espectro eletromagnético parecem ser efetivas em tais terapias. Na literatura são encontrados estudos sobre os efeitos

biológicos dos lasers de baixa potência em culturas de células eucarióticas e procarióticas (FONSECA *et al.*, 2010; 2012; HUANG *et al.*, 2011; BARBOZA *et al.*, 2015; CANUTO *et al.*, 2015), em animais (MANTINEO *et al.*, 2014; ANJOS *et al.*, 2015; PAOLI *et al.*, 2015) e em humanos (ESLAMIAN *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2014).

Atribuem-se os resultados clínicos positivos em terapias baseadas em lasers de baixa potência a uma sequência de eventos em nível molecular e celular, nos quais os fatores determinantes na resposta fotoquímica, fotofísica e/ou fotobiológica são o comprimento de onda e a intensidade utilizadas, a fluência aplicada e a concentração de cromóforos ativos e as propriedades ópticas (reflexão, transmissão, absorção, espalhamento e anisotropia) do tecido tratado, bem como o seu estado fisiológico (KARU, 1998; 2003).

A ação dos LLLTs está baseada na absorção da luz pelas células, nas quais modulam reações bioquímicas e estimulam a atividade mitocondrial (KARU *et al.*, 1998; WILDEN *et al.*, 1998). Esses efeitos tanto podem acelerar a síntese de DNA, RNA e de proteínas regulatórias do ciclo celular, promovendo assim uma proliferação (GAO & XING, 2009), 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.*, 2010; 2012; 2015; SERGIO *et al.*, 2012).

Os eventos observados entre as reações primárias da irradiação com laser e os efeitos biológicos observados na célula compreendem as cascatas de sinalização intracelulares secundárias. Primariamente os fótons são absorvidos pelo fotoceptor, como o citocromo c oxidase (enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial), provocando mudanças nas propriedades óxidorredutoras de componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Como consequência ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, de íons cálcio e alteração no potencial elétrico da membrana mitocondrial (como representado na figura 4). Estas modificações mitocondriais levam a alterações nos parâmetros homeostáticos celulares (pHi, [Ca²⁺], [cAMP], Eh, [ATP]), culminando com o aumento na síntese de DNA e RNA, dentre outras implicações (KARU, 2008).

Dentre os mecanismos geralmente associados aos benefícios clínicos do LLLT estão a proliferação e a diferenciação celular (WU & XING, 2014). O aumento da proliferação, em resposta a irradiação com laser de baixa potência, tem sido atribuída

ao aumento na expressão de fatores sensíveis ao estado redox da célula, como NFκB ou as proteínas da família das Src quinases (ALEXANDRATOU *et al.*, 2002; KARU, 1999; 2008; LUBART & BREITBARTM 2000). As Src quinases possuem importante papel em processos celulares como proliferação, migração, ancoragem e sobrevivência e são ativadas pelo ROS produzido em resposta à irradiação pelo laser (PARSONS & PARSONS, 2004).

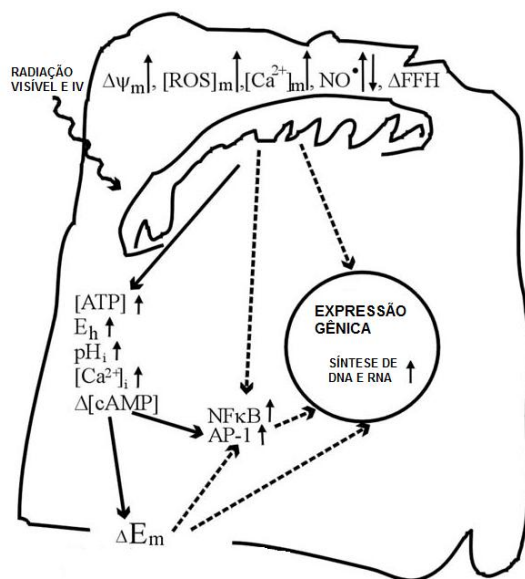


Figura 4 – Desenho esquemático representando a sinalização intracelular após permeabilização mitocondrial em resposta a absorção de radiação visível ou infravermelha (IV) pelo fotoceptor citocromo c oxidase. As setas ↑ indicam elevação e ↓ indicam diminuição nos valores, e os colchetes [] concentração. ΔE_m =potencial de membrana; $\Delta\Psi_m$ =potencial elétrico da membrana mitocondrial; ROS=espécies reativas de oxigênio; ΔFFH = alterações na homeostasia fusão-fissão mitocondrial; E_h =potencial redox intracelular; pH_i =pH intracelular; cAMP=adenosina monofosfato cíclico; ATP=adenosina trifosfato; AP-1=proteína ativadora 1; NFκB=fator de transcrição nuclear κB. Adaptado de KARU, 2008.

O LLLT pode conferir também efeito protetor à célula ao suprimir a expressão de p53, inibidor da proteína antiapoptótica Bcl2 ou atuar diretamente na indução da expressão de Bcl2 a nível pós-transcricional (SHEFER *et al.*, 2002).

Perquisas recentes têm demonstrado que os efeitos do LLLT em células animais podem ser representados por uma parábola. Com o aumento da energia os efeitos estimulatórios sobre a célula são diminuídos gradualmente e, quando o limiar é atingido, os efeitos inibitórios sobre as células emergem (WU & XING, 2014). A inibição celular causada pelo LLLT em fluências elevadas tem sido relatada em diversos trabalhos como descrito por Wu e colaboradores (2007). 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 consequente permeabilização da membrana da mitocôndria, também podem estar envolvidos no processo apoptótico induzido por LLLT em fluências elevadas, como ativação de Bax e inibição de Akt pela proteína glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) (HUANG *et al.*, 2011).

1.3.1 Lasers e processo inflamatório

Terapias utilizando LLLT têm demonstrado excelentes resultados no controle do processo inflamatório, através da redução da dor, do edema e promovendo o reparo dos tecidos lesionados (FERREIRA *et al.*, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2007). Outra vantagem que vem sendo descrita é a ausência 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 (BASFOR, 1993). 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* (SHIMIZU *et al.*, 1995; SAKURAI *et al.*, 2000) quanto *in vivo* (CAMPANA *et al.*, 1998; ALBERTINI *et al.*, 2004).

Em estudos utilizando células do sistema imune *in vivo* e *in vitro* como, células dendríticas e neutrófilos, o LLLT teve seu efeito anti-inflamatório atribuído ao bloqueio ou inibição da via de NF-kB (AIMBIRE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011). NF-kB é um fator de regulação da transcrição que regula a expressão de muitos genes, dentre estes os relacionados à inflamação, estresse e sobrevivência celular (CHEN *et al.*, 2011). Em neutrófilos, LLLT também promove aumento da atividade respiratória mitocondrial e da expressão de iNOS (MORGAN & RASHID, 2009). Já no estudo de Hemvani e colaboradores (2005) o aumento na taxa de apoptose de PMN foi o mecanismo anti-inflamatório efetor do LLLT.

A utilização de LLLT é sugerida como alternativa em curto prazo para redução da dor e da rigidez matinal na AR (BROSSEAU *et al.*, 2000); entretanto estudos recentes têm reportado resultados diversos sobre a terapia. Meireles e colaboradores (2010) aplicaram LLLT ($\lambda = 785$ nm, fluência de 3 J/cm^2 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 e colaboradores (2007) aplicaram LLLT ($\lambda = 810$ nm, fluência de $3\text{-}5 \text{ J/cm}^2$ e potência de $5\text{-}50$ mW) em joelho de ratos com AR induzida e observaram diminuição do edema articular, relacionando com a diminuição do nível de prostaglandina (PGE_2). Já Alves e colaboradores (2013), também utilizando articulação do joelho de ratos com AR induzida, aplicaram LLLT ($\lambda = 780$ nm, fluência de $7,7 \text{ J/cm}^2$ 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 exudato proteico, a hemorragia medular, a hiperemia e a necrose.

Apesar de lasers de baixa potência serem utilizados em terapias alternativas para aceleração de cicatrização de feridas em tecidos moles (HAWKINS & ABRAHAMSE, 2006; AMARILLAS-ESCOBAR *et al.*, 2010) ou de fraturas ósseas (SHAKOURI *et al.*, 2010), no tratamento de lesões na cavidade oral (ANTUNES *et al.*, 2007) e para reduzir a sensação álgica (CRAWFORD & THOMSON, 2010; ORHAN *et al.*, 2011), seus efeitos biológicos necessitam ainda de estudos para que sejam melhores compreendidos e que suas aplicações clínicas possam ser mais eficazes e seguras (BROSSEAU *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na resolução do processo inflamatório articular induzido por zymosan após a utilização de terapia com laser de baixa potência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever os efeitos do laser infravermelho ($\lambda = 830\text{nm}$, 10mW), no modo contínuo de luz e utilizando fluências de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $30\text{J}/\text{cm}^2$ na:

- Resolução do processo inflamatório através de análise morfológica da articulação e infiltrado inflamatório (Hematoxilina & Eosina);
- Detecção e quantificação da taxa de apoptose através da análise da fragmentação de DNA pela técnica de TUNEL;
- Avaliação dos mecanismos apoptóticos induzidos pela irradiação, através da análise da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas nas vias extrínseca e intrínseca (Fas, Fas ligante, Apaf1, caspase 9, caspase 3, caspase 6, Bax e p53) por PCR em tempo real (qPCR);

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica C57BL/6, com 8-10 semanas de vida, peso médio variando entre 24-28 g, oriundos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF), Juiz de Fora, MG, Brasil.

Os camundongos foram mantidos no biotério experimental do laboratório de Imunologia (ICB/UFJF) com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro constante (período claro de 7 às 19 horas) e livre acesso a água e ração para roedores.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas éticas internacionais, sendo o projeto devidamente aprovado no Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo número 039/2014).

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos com número amostral (n) igual a 6, conforme descrito abaixo (tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos grupos experimentais.

Grupos
1. Controle (C)
2. Induzido por zymosan (Zy)
3. Eutanasiado 5h após indução com zymosan (5h)
4. Zymosan + dexametasona (Zy+dexa)
5. Laser infravermelho 3 J/cm ² (3J/cm ²)
6. Laser infravermelho 30 J/cm ² (30J/cm ²)
7. Zymosan + laser infravermelho 3 J/cm ² (Zy+3J/cm ²)
8. Zymosan + laser infravermelho 30 J/cm ² (Zy+30J/cm ²)

3.2 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PELO ZYMOZAN

A artrite experimental foi induzida através da injeção de 200 μ g de zymosan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvido em 10 μ L de solução salina estéril, na região da articulação talocrural e subtalar (direita e esquerda) dos membros posteriores (figura 5). Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de salina estéril. Cinco horas após a indução com zymosan, um grupo de animais (n=6) foi eutanasiado com a finalidade de confirmar a presença do processo inflamatório e os tipos celulares presentes na região articular. Além do controle, os grupos laser nas fluências de 3J/cm² e laser 30J/cm² também não foram submetidos à indução inflamatória por zymosan.

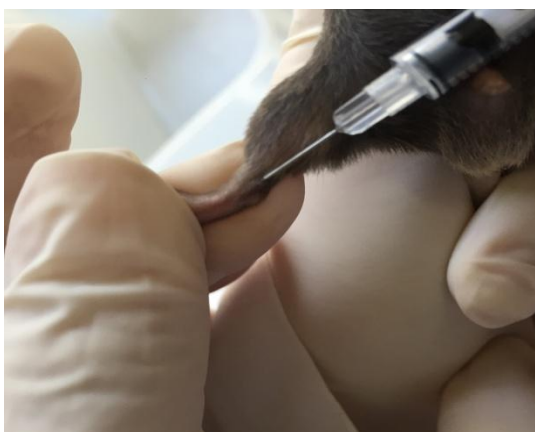


Figura 5 - Administração de Zymosan na região da articulação talocrural e subtalar.

3.3 EXPOSIÇÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O laser infravermelho de baixa potência (AlGaAs - Aluminum Gallium Arsenide, HTM Laser Compact, HTM Indústria de Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda/Brasil) foi utilizado nos procedimentos experimentais com potência fixa de 10mW, no modo contínuo de emissão da luz, $\lambda = 830\text{nm}$, nas fluências de 3J/cm² e 30J/cm². A irradiação seguiu a seguinte ordem cronológica representada na figura 6.

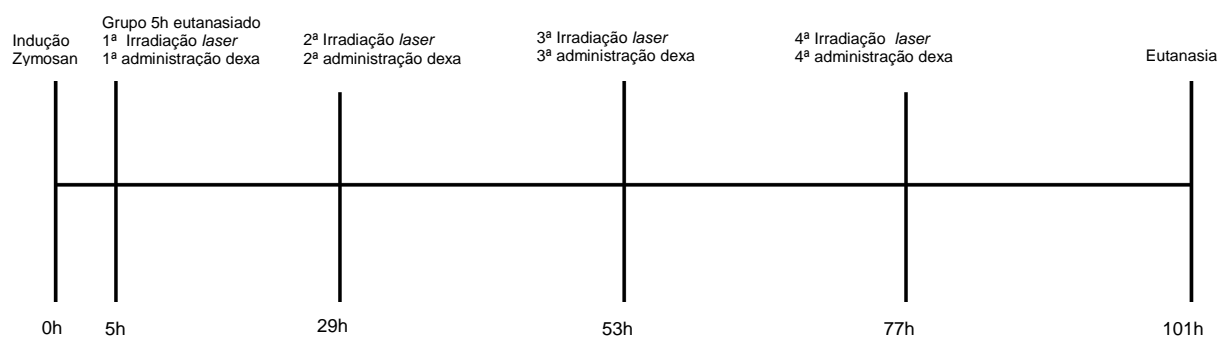


Figura 6 - Cronograma experimental.

Após 5 horas da indução pelo zymosan, os animais pertencentes aos grupos 7 e 8 (tratados com laser - Zy+3J/cm² e Zy+30J/cm²) foram imobilizados e expostos aos lasers, nas fluências de 3J/cm² e 30J/cm², respectivamente, assim como os grupos sem inflamação induzida por zymosan, 5 e 6 (somente tratados com o laser - 3J/cm² e 30J/cm²). No mesmo horário da irradiação, os animais do grupo 4 (Zy+dexta) receberam uma injeção contendo dexametasona intraperitonealmente. Esses procedimentos prosseguiram por 4 dias consecutivos, sempre no mesmo horário definido na primeira irradiação.

3.4 TRATAMENTO COM DEXAMETASONA

Com o intuito de comparar os efeitos do laser com os efeitos do tratamento medicamentoso baseado em uso de corticosteróides, comumente utilizado na artrite, foi criado um grupo tratado com solução de dexametasona (Aché Laboratório Farmacêutico, Brasil), intraperitonealmente, na dose de 4mg/kg, 5h, 29h, 53h, e 77h após a indução da inflamação articular pelo zymosan.

3.5 EUTANASIA E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Vinte quatro horas após a última irradiação e tratamento com dexametasona (101 horas após a indução com zymosan), os animais foram eutanasiados, por indução anestésica, utilizando uma solução de cloridrato de quetamina e cloridrato de xylazina, conforme aprovado previamente pelo Comitê de Experimentação Animal.

Imediatamente após, 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 figura 7 apresenta os planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia). Logo em seguida os tecidos foram encaminhados para preparação das técnicas histológicas de rotina e imunocitoquímicas (articulação direita) e para técnicas de extração de RNA (articulação esquerda).

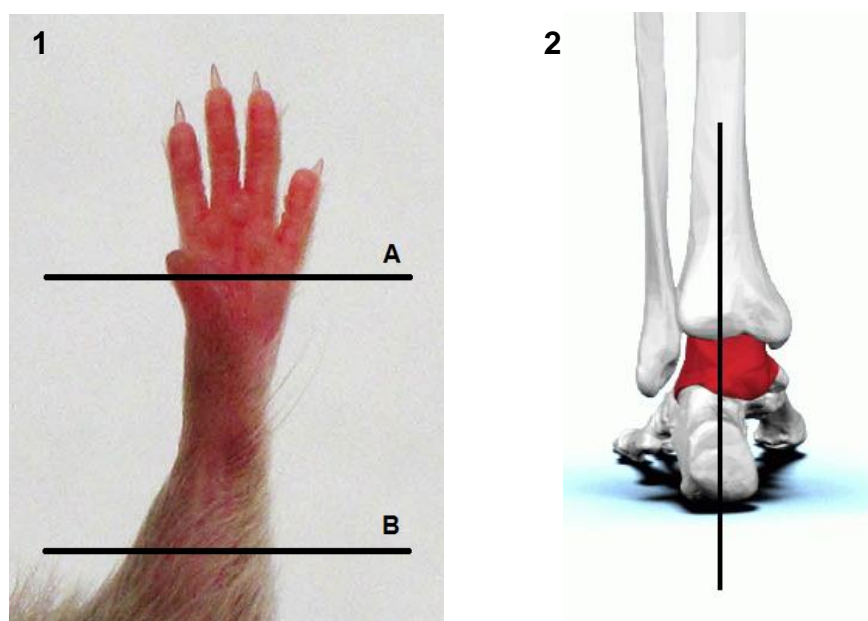


Figura 7 - Planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia. Figura 1: A - plano de corte para retirada das falanges; corte na porção média do metatarso. B - plano de corte na porção media da tíbia e fíbula. Adaptado de <http://hookelabs.com/services/cro/cia.html>. Figura 2: plano de corte utilizado na microtomia para obtenção das lâminas histológicas. Adaptado de <http://newsblog.drexel.edu/2014/09/16/drexel-engineers-discovery-turns-artificial-ankle-research-in-a-new-direction/>.

Para as análises morfológica e de imunocitoquímica, a região da articulação talocrural foi fixada em paraformaldeído tamponado 4%, pH 7,4, durante 24 horas, descalcificado em solução de ácido nítrico 5% por 48 horas e em seguida lavados

em água corrente por 24h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas, diafanizados e incluídas em parafina (Histosec-Merck). Foram obtidos cortes longitudinais com 3 µm de espessura, os quais foram desparafinizados e hidratados. Os cortes em lâminas foram encaminhados para análise de fragmentação nuclear através de TUNEL e corados pela hematoxilina e eosina (HE) para análises morfológicas.

3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As análises morfológicas foram realizadas utilizando microscópio Olympus (BX53F) equipado com as objetivas U-PlanFL N 4/0.13, 10/0.30, 40/0.75 e 100/0.85. As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus DP73 e através de software Cell Sens Imaging (5.1 version, Olympus, EUA). Para quantificação da área do infiltrado inflamatório foi utilizado o software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc.), onde a densidade celular do infiltrado inflamatório foi obtida utilizando 5 campos focalizados (objetiva de 100X). Para obtenção da densidade absoluta de células no infiltrado inflamatório foi feito o seguinte cálculo usando regra de três:

$$\begin{array}{l} \text{n}^\circ \text{ de células no campo} \text{ ----- } \text{área do campo} \\ \text{X (densidade absoluta)} \text{ ----- } \text{área total do infiltrado} \end{array}$$

3.7 FRAGMENTAÇÃO DE DNA E APOPTOSE

Entre os métodos para detectar apoptose em tecidos histológicos, a técnica de TUNEL (do inglês *Terminal deoxynucleotidyl transferase biontin-dUTP nick end labeling*) está entre os mais utilizados. Uma característica importante da apoptose é a degradação do DNA após a ativação de endonucleases dependentes de Ca/Mg. O método de TUNEL identifica a fragmentação de DNA *in situ* pela ligação de biotina-

dUTP às terminações clivadas do DNA, pela ação da deoxinucleotídeo transferase (TdT). Os pontos de clivagem ligados à biotina são detectados pela reação com HRP (do inglês *horse radish peroxidase*) conjugada com estreptavidina e visualizada por DAB (diaminobenzidina), que confere coloração marrom (NIEHS, 2007).

Neste estudo foi utilizado kit TUNEL POD (Roche, Germany) seguindo as instruções do fabricante. Após desparafinização e hidratação, as lâminas foram incubadas com solução de 20 µg/mL de proteinase K (Roche Diagnostics, EUA) por 30 minutos a 37°C e em seguida em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% diluído em metanol por 30 minutos a temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram incubados com a solução de reação contendo a enzima e os nucleotídeos TdT e dUTP por 60 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS, reveladas com solução de DAB (Sigma Aldrich, Brasil) 0,5mg/ml e contra coradas em solução de verde de metila. Como controle positivo, cortes foram incubados com DNase 1 (Roche Diagnostics, EUA) antes da utilização da solução contendo a enzima; já para controle negativo, cortes não foram incubados com a solução de enzima.

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA E *real time* PCR (qPCR)

Os fragmentos de tecidos foram macerados após imersão em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen, EUA) seguido pela separação de fases por clorofórmio e isopropanol. A concentração de RNA extraído foi obtida utilizando o NanoDrop™ 1000 Espectrofotômetro (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, 2µg de RNA total foi transcrito a DNA complementar (cDNA) utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

Para a reação de qPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real) foram utilizados *primers* dos genes que codificam proteínas envolvidas nas cascatas de sinalização para apoptose: Fas, Fas ligante, Bax, Apaf1, caspase 9, caspase 3, p53 e caspase 6 (Invitrogen, Brasil), e como controle interno o *primer* do gene β-actina (Invitrogen, Brasil) (Tabela 2). Todos os primers foram desenhados em

diferentes éxons, para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico utilizando o programa Primer BLAST (NCBI, 2012).

Tabela 2 - *Primers* utilizados para qPCR.

Genes alvo	Sequência Foward (5' --> 3')	Sequência Reverse (3' --> 5')	Nº referência NCBI
Fas	AACCTCCAGTCGTGAAACCA	TGTCTTCAGCAATTCTCGGG	NM_007987.2
Fas ligante	CTGGTGGCTCTGGTTGGAAT	TCACGGAGTTCTGCCAGTTC	NM_010177.4
Bax	CAAACCTGGTGCTCAAGGCC	GGCTCACGGAGGAAGTCC	NM_007527.3
Apaf1	TTACCTGCCTGAAGCCCAAG	CAGCTTTCTTGTGCCCAACC	NM_001042558.1
caspase 9	GTAGGGCAATGTGGAGCAGT	GGGCACAATCCCTAACCACA	NM_015733.5
caspase 3	GGGAGCAAGTCAGTGGACTC	CCGTACCAGAGCGAGATGAC	NM_001284409.1
p53	GTGCTCACCCCTGGCTAAAGT	AGGAGGATGAGGGCCTGAAT	NM_011640.3
caspase 6	GACGTGGTGGAAGGGCTAAA	AGTGTACAAAAAGGGGAGGC	NM_009811.4
β -actina	CATCCGTAAAGACCTCTATGCC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC	NM_007393.4

Através dos resultados das curvas padrão para determinação da eficiência dos *primers* (eficiência aceitável superior a 90%), padronizou-se a utilização da diluição de 1:5 de cDNA para todas as amostras. As reações foram feitas no volume final de 10 μ L, contendo 2,6 μ L de água ultrapura, 1,4 μ L da mistura de um dos pares de *primers Foward* e *Reverse* de cada gene, 1 μ L de cDNA diluído e 5 μ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

O ensaio de qPCR foi realizado no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 40 ciclos; em cada ciclo, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em duplicata, e como controle negativo para a reação de qPCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers, na ausência do template (cDNA). A análise das curvas de melting e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Para análise da expressão gênica através de qPCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔCt de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (β -actina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do ΔCt da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA dos animais controle. Para o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ utilizou-se a fórmula seguinte: [ΔCt (amostra) – ΔCt (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta Ct$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Para que os resultados absolutos (sem ponderamento matemático) da expressão gênica dos grupos com diminuição do infiltrado inflamatório em função do tratamento, seja ele o laser ou a dexametasona, não fossem subestimados, os resultados absolutos foram então ponderados em relação à densidade celular absoluta do grupo sem tratamento (Z_y). Para tanto foi gerado um coeficiente A (n^o de vezes menor que Z_y) resultado do cálculo:

$$\text{Coeficiente A} = \frac{\text{Densidade celular absoluta grupo não tratado (grupo } Z_y)}{\text{Densidade celular absoluta grupo tratado (grupos 4 ou 7 ou 8)}}$$

O coeficiente A, gerado para cada grupo experimental, foi então multiplicado pelo resultado da expressão gênica relativa de cada gene alvo testado, obtendo-se assim os resultados ponderados do qPCR.

Com esse ponderamento objetiva-se analisar a expressão gênica de cada grupo uniformemente, minimizando assim resultados que poderiam subestimar grupos com menor quantidade de células inflamatórias, mas que poderiam apresentar maior expressão de certos genes por célula.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e desvio padrão relativo. A comparação entre os grupos foi realizada aplicando o teste de variância One-Way Anova seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni e para análise de normalidade D'Agostino e Pearson, utilizando o programa GraphPad InStat software (versão 5 para Windows 8, GraphPad Software, EUA). A significância estatística foi considerada como $P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ e $P^{***} < 0.001$.

4 RESULTADOS

4.1 INFLAMAÇÃO NA REGIÃO ARTICULAR INDUZIDA POR ZYMOZAN

Sinais clínicos de um processo inflamatório, como edema, rubor e calor foram observados na região da articulação talocrural e subtalar nos grupos de animais que receberam a administração de zymosan intra-articular. A figura 8 ilustra o edema na região articular após 5 horas da administração do zymosan.



Figura 8 – Foto representativa demonstrando a região da articulação talocrural. Em destaque o edema observado e indicando o processo inflamatório 5h após administração de Zymosan.

A análise morfológica revelou que 5h após a administração de zymosan foi possível evidenciar influxo de células inflamatórias nas estruturas sinoviais das articulações talocrural e subtalar, assim como no tecido conjuntivo adjacente (figura 9 e 10). Esse infiltrado foi caracterizado pelo predomínio de neutrófilos (figura 11). Já nos grupos eutanaziados 101h após a indução com zymosan, observou-se infiltrado inflamatório fortemente marcado pela presença de PMN, em especial neutrófilos (figura 12A), macrófagos (figura 12B), e linfócitos (figura 12C), além da intensa presença de tecido fibroso. Não foram observadas alterações morfológicas nas estruturas adjacentes á articulação, tanto nos grupos com inflamação induzida por zymosan quanto nos grupos somente tratados com laser.



Figura 9 – Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal controle. **A** indica a articulação talocrural; **B** indica a articulação subtalar; **C** indica a membrana sinovial. Coloração H&E. Barra=200µm.

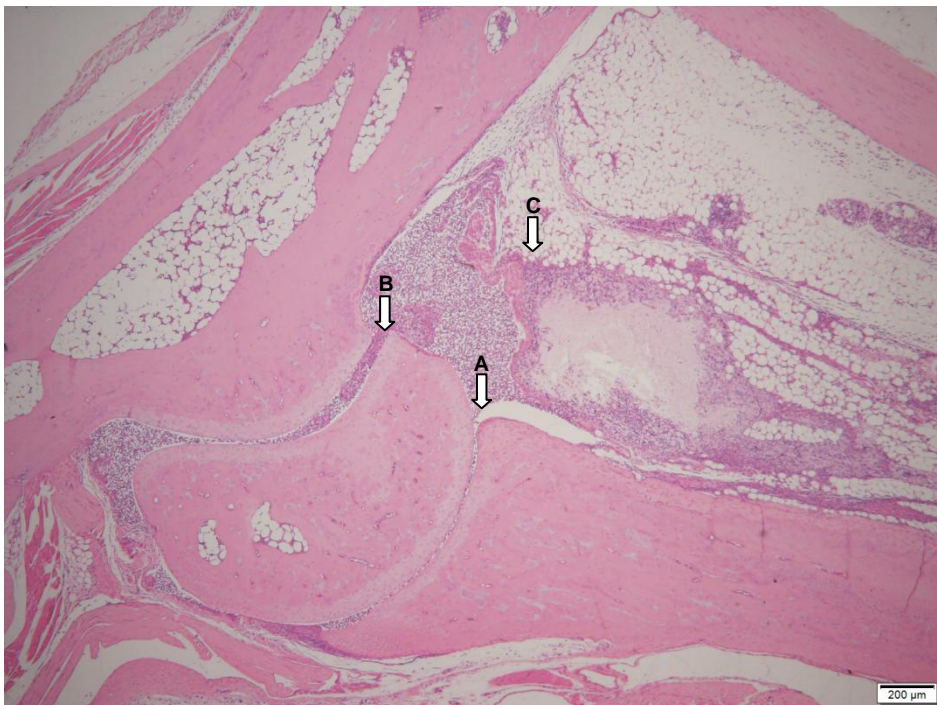


Figura 10 - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal eutanasiado 5h após administração com zymosan. **A** indica a articulação talocrural; **B** indica a articulação subtalar; **C** indica o infiltrado inflamatório. Coloração H&E. Barra=200µm

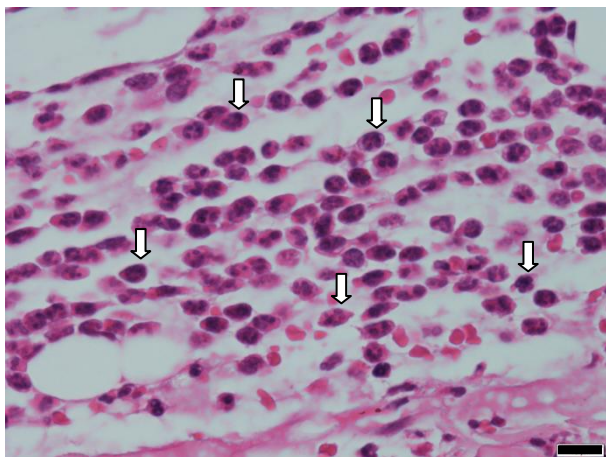


Figura 11 - Fotomicrografia demonstrando as células do infiltrado inflamatório do animal eutanaziado 5h após administração com zymosan. As setas indicam neutrófilos. Coloração H&E. Barra= 10µm.

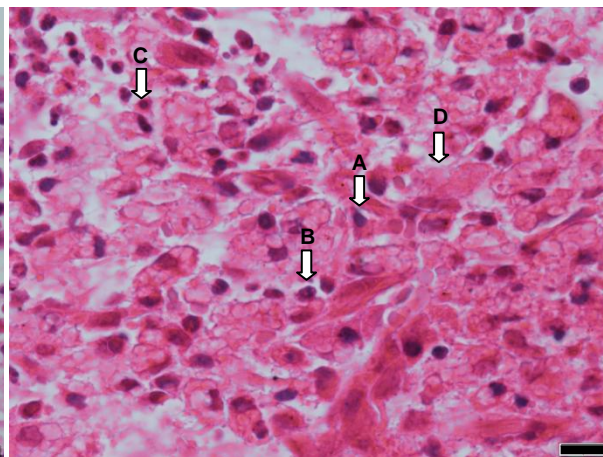


Figura 12 - Fotomicrografia demonstrando as células do infiltrado inflamatório do animal sem tratamento (Zy). A seta A indica um neutrófilo; a seta B indica um macrófago; a seta C indica um linfócito; a seta D indica tecido fibroso. Coloração H&E. Barra= 10µm.

4.2 EFEITO DO LASER SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Nos grupos com inflamação induzida e tratados, tanto com laser em ambas as fluências utilizadas quanto com a dexametasona, foi observado diminuição do infiltrado inflamatório (figura 13) no que tange a área (figura 14) e a densidade celular (figura 15). Entretanto, somente no grupo tratado com laser na fluência de 30J/cm² os resultados apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para ambos os parâmetros avaliados, se comparado ao grupo não tratado (grupo Zy).

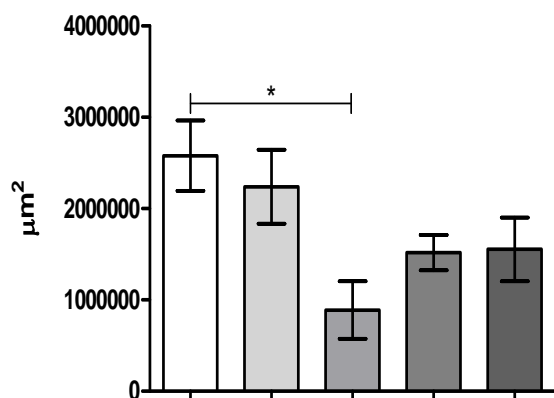


Gráfico 1 - Área (em µm²) do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo do espaço sinovial. * $p < 0,05$.

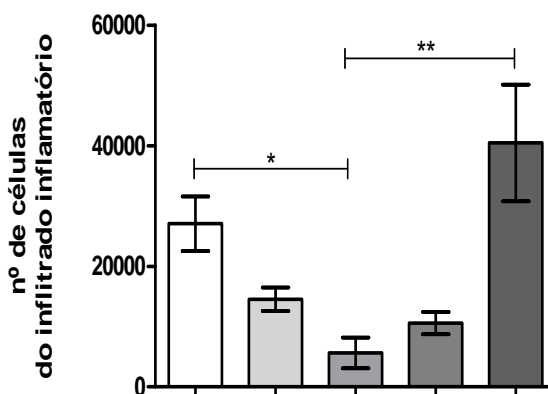


Gráfico 2 - Densidade celular do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo do espaço sinovial. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

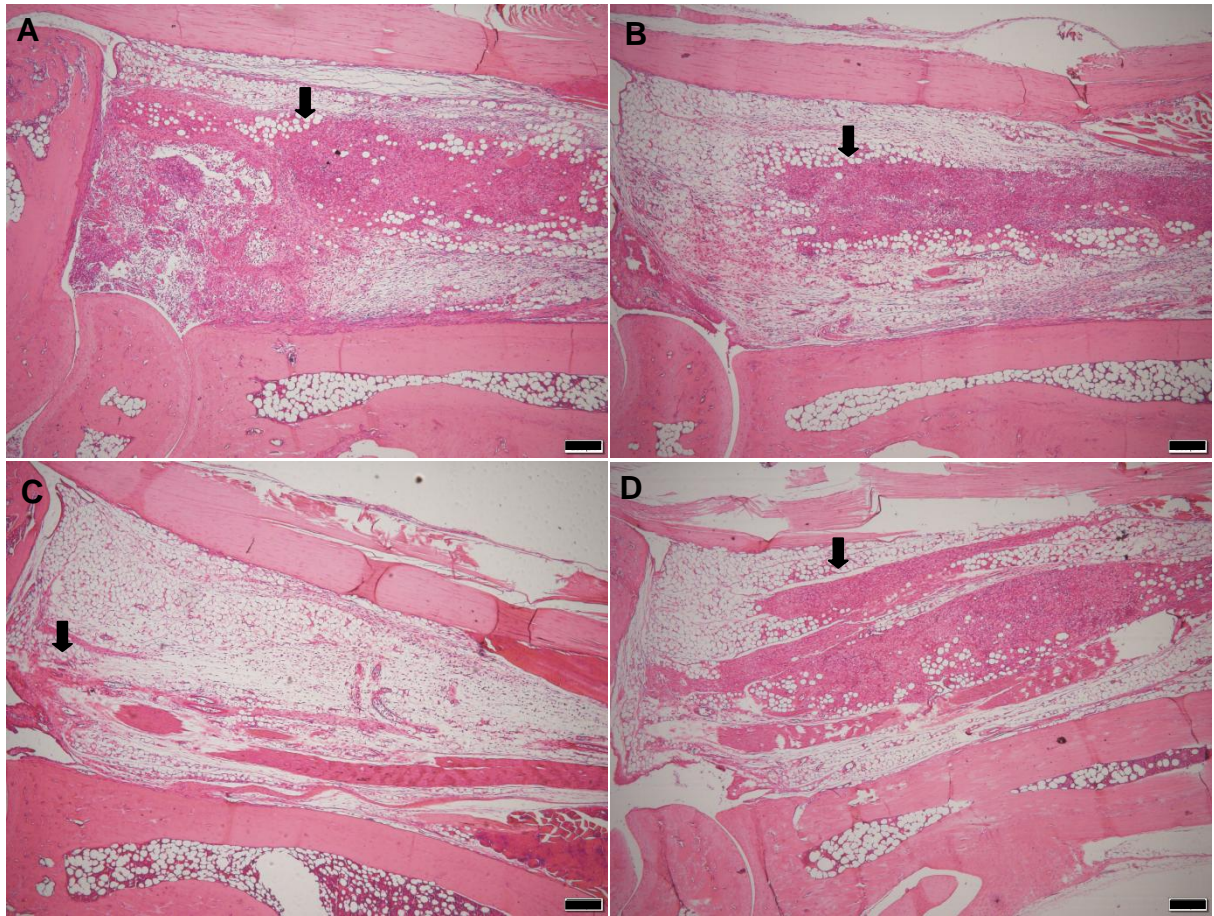


Figura 13 – Fotomicrografia representando a articulação talocrural e subtalar, bem como seus tecidos adjacentes. **A** Zymosan; **B** Zymosan + $3\text{J}/\text{cm}^2$; **C** Zymosan + $30\text{J}/\text{cm}^2$; **D** Zymosan + Dexametasona. **B**, **C** e **D** demonstram a diminuição do infiltrado inflamatório presente no tecido conjuntivo após tratamentos com diferentes fluências de laser e dexametasona. Observe que no grupo tratado com a fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$ (**C**) essa diminuição foi ainda mais significativa. Seta indica o infiltrado inflamatório. Coloração H&E. Barra= $200\mu\text{m}$.

A proporção entre as densidades celulares do infiltrado inflamatório para cada grupo está representada na tabela 3, assim como o coeficiente A, utilizado para o ponderamento dos resultados do qPCR.

Tabela 3 - Densidade celular absoluta do infiltrado inflamatório (expresso pela média) e coeficientes gerados pela comparação com Zy.

Grupos	Média (nº células do infiltrado)	Proporção em relação a Zy	Coeficiente A (nº de vezes menor que Zy)
Zy	27053	1	1
Zy+3J/cm ²	14530	0,54	1,85
Zy+30J/cm ²	5602	0,21	4,76
Dexa	10569	0,39	2,56
5h	40463	1,49	0,67

4.3 EFEITO DO LASER SOBRE A TAXA DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA NAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

A fragmentação de DNA, analisada por TUNEL, foi observada predominante nas células do infiltrado inflamatório, sendo o maior número de marcações positivas por campo observadas para o grupo tratado com o laser na fluência de 30J/cm² seguido pelo grupo tratado com a fluência de 3J/cm² (gráfico 3 e figura 17).

Foi observado menor número de fragmentação de DNA nas células do infiltrado inflamatório por TUNEL, nos grupos sem tratamento (Zy) e tratado com dexametasona.

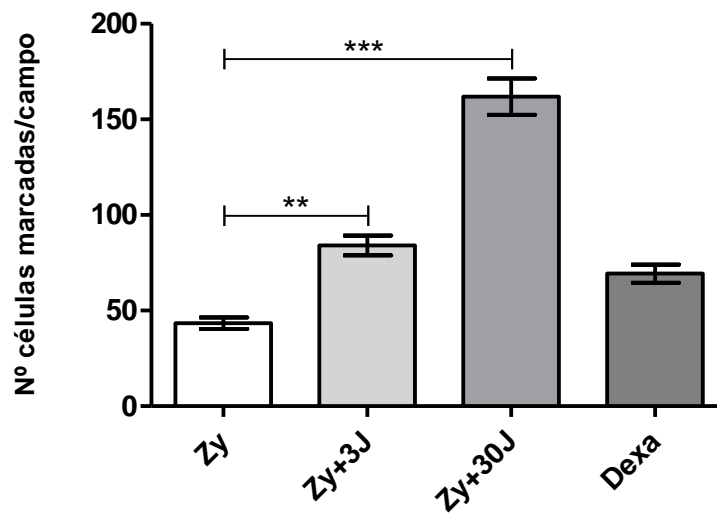


Gráfico 3 – Células inflamatórias com marcação positiva de TUNEL, indicando fragmentação de DNA. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan.

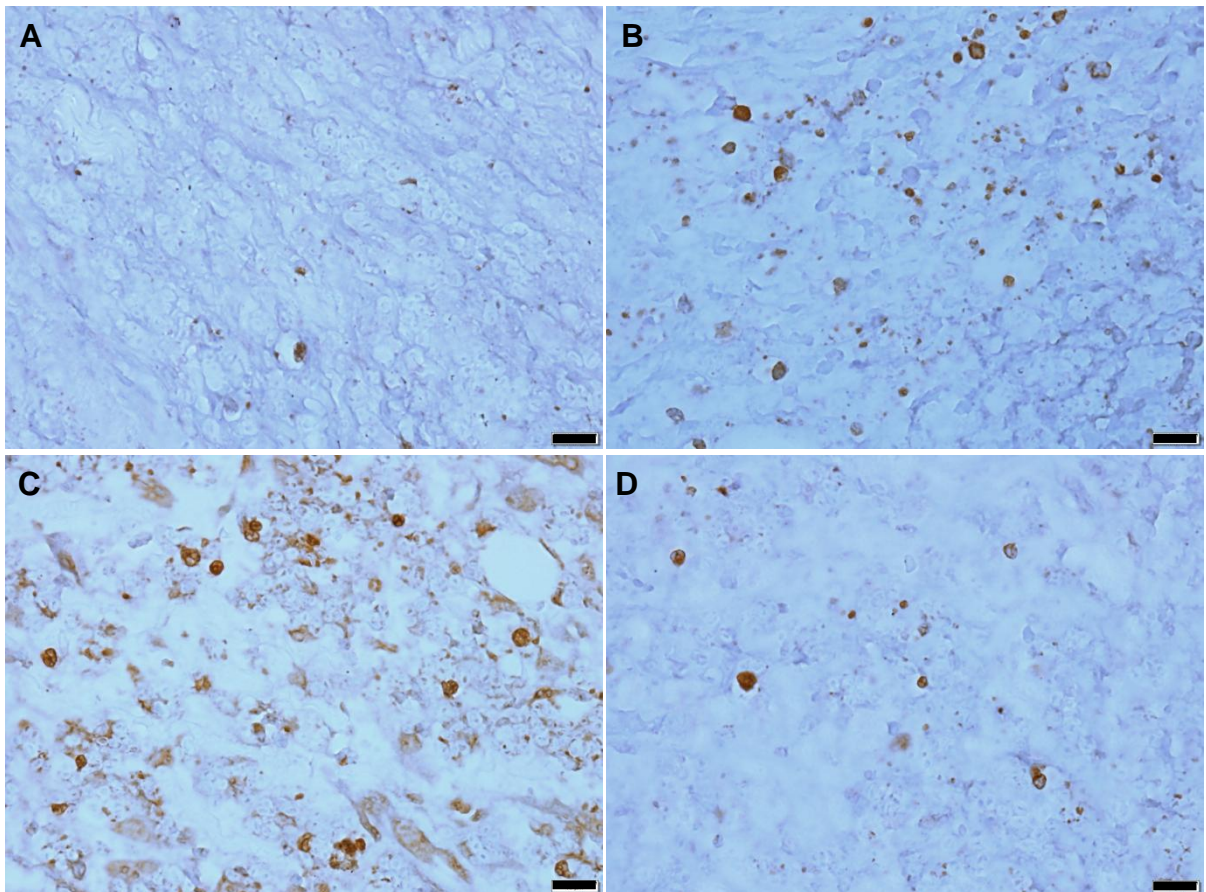




Figura 14 - Fotomicrografia demonstrando a marcação de TUNEL em células do infiltrado inflamatório, indicando fragmentação de DNA, em marrom. Barra=10 μ m.

4.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS VIAS APOPTÓTICAS

Com o intuito de avaliar quais os mecanismos envolvidos na morte celular observada nos grupos irradiados com laser de baixa potência, a expressão de genes que codificam o receptor de morte associado a via extrínseca de apoptose Fas e seu ligante Fas ligante, os transdutores de sinal Bax, Apaf1 e caspase 9, as caspases efetoras caspase 3 e caspase 6, além da proteína reguladora de proliferação celular p53, foram avaliadas.

Uma vez que as marcações de TUNEL se concentraram no infiltrado inflamatório, atribuiu-se os resultados da expressão gênica de alvos relacionados com o processo apoptótico às células que compõem esse infiltrado. Devido a este fato, os resultados absolutos da expressão gênica relativa foram ponderados através da multiplicação pelo coeficiente A, apresentado na tabela 3. Os resultados absolutos e ponderados do qPCR, para expressão dos 8 genes codificadores testados, estão representados nos gráficos 4 a 11.

Legenda:  resultados absolutos  resultados ponderados

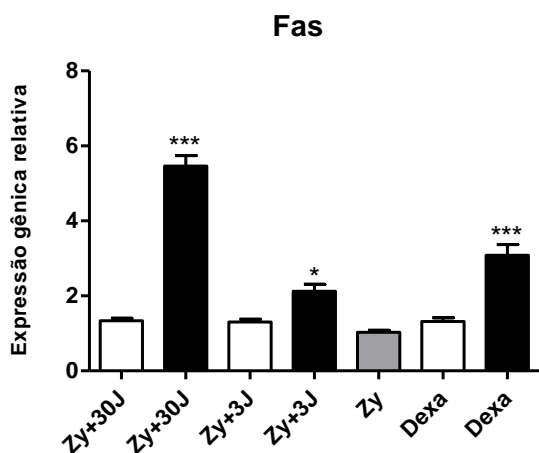


Gráfico 4 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Fas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

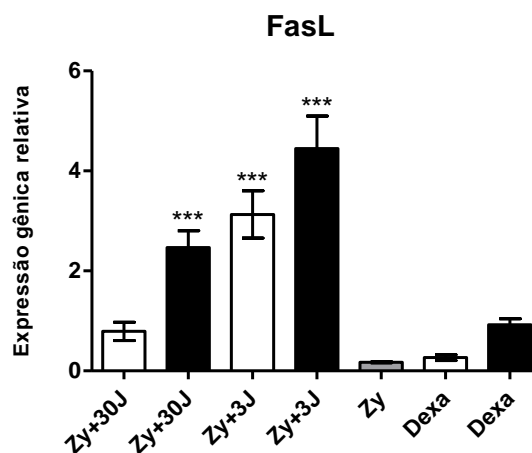


Gráfico 5 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína FasL. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

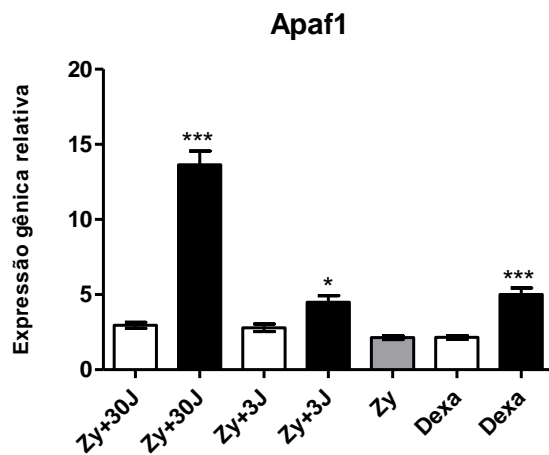


Gráfico 6 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Apaf1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

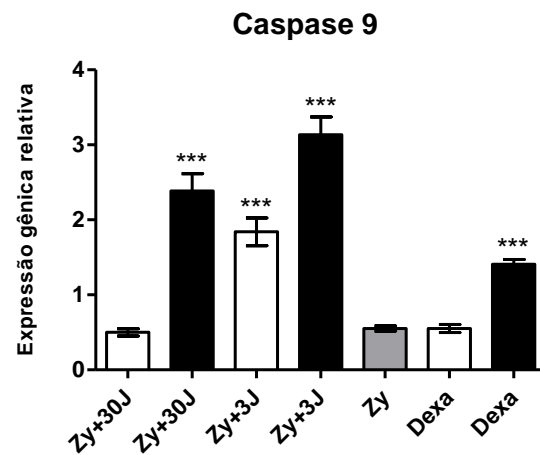


Gráfico 7 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Caspase 9. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

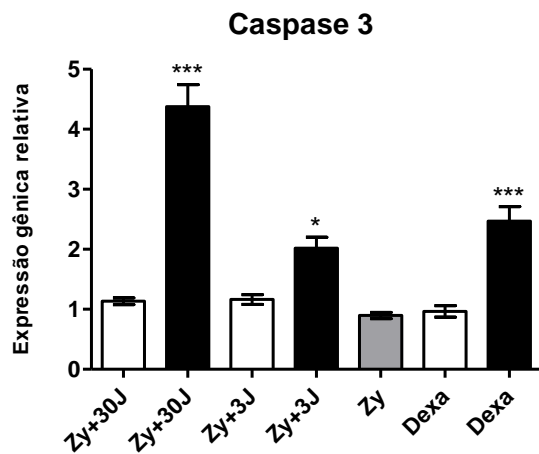


Gráfico 8 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Caspase 3. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

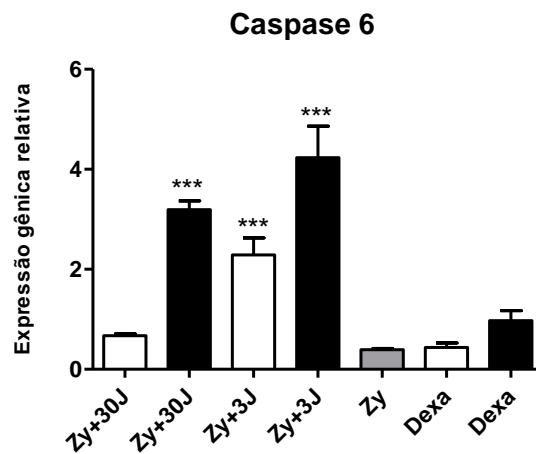


Gráfico 9 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Caspase 6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

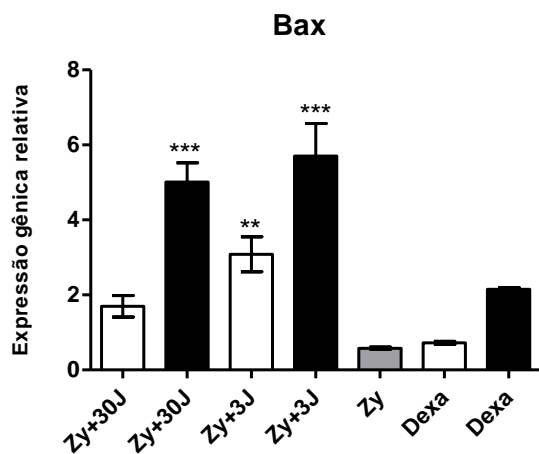


Gráfico 10 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína Bax. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

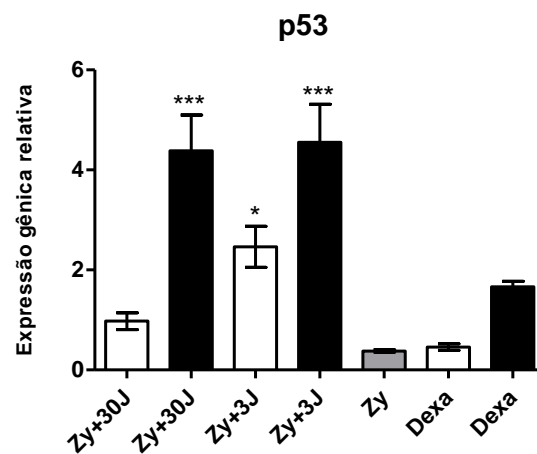


Gráfico 11 - Expressões relativa e ponderada do gene para proteína p53. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo Zymosan (barra em cinza).

Os resultados absolutos do grupo tratado com laser na fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$ revelaram que a expressão dos genes, aqui avaliados, não apresentou diferença estatística relevante, quando comparados ao grupo sem tratamento (Zy), grupo este que apresentou densidade celular 4,76 vezes maior que o grupo Zy+ $30\text{J}/\text{cm}^2$. Entretanto, quando ponderados, os resultados demonstraram significativa expressão de todos do 8 genes avaliados.

Já o grupo tratado com laser na fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou diferença estatística, se comparado ao grupo sem tratamento, tanto nos resultados absolutos quanto nos ponderados, exceto para a expressão do gene para a proteína Fas, Apaf1 e caspase 3, em que se observa diferença estatística somente nos resultados ponderados. Para todos os grupos tratados, inclusive o grupo tratado com dexametasona, observou-se a manutenção da tendência dos resultados absolutos nos resultados ponderados, elevando-se somente o nível de significância.

O grupo não tratado Zy, apresentou a segunda maior densidade celular no infiltrado inflamatório. Entretanto, não foi observado aumento de marcações de fragmentação de DNA assim como elevação na expressão de genes relacionados a apoptose. Já no grupo Dexa, os resultados ponderados revelaram elevação da expressão gênica de Fas, Apaf1, caspase 9 e caspase 3. A figura 15 apresenta um esquema para os resultados ponderados da expressão gênica.

Os grupos sem inflamação induzida por zymosan e irradiados com o laser não apresentaram alterações na expressão dos genes avaliados, quando comparados ao grupo controle.

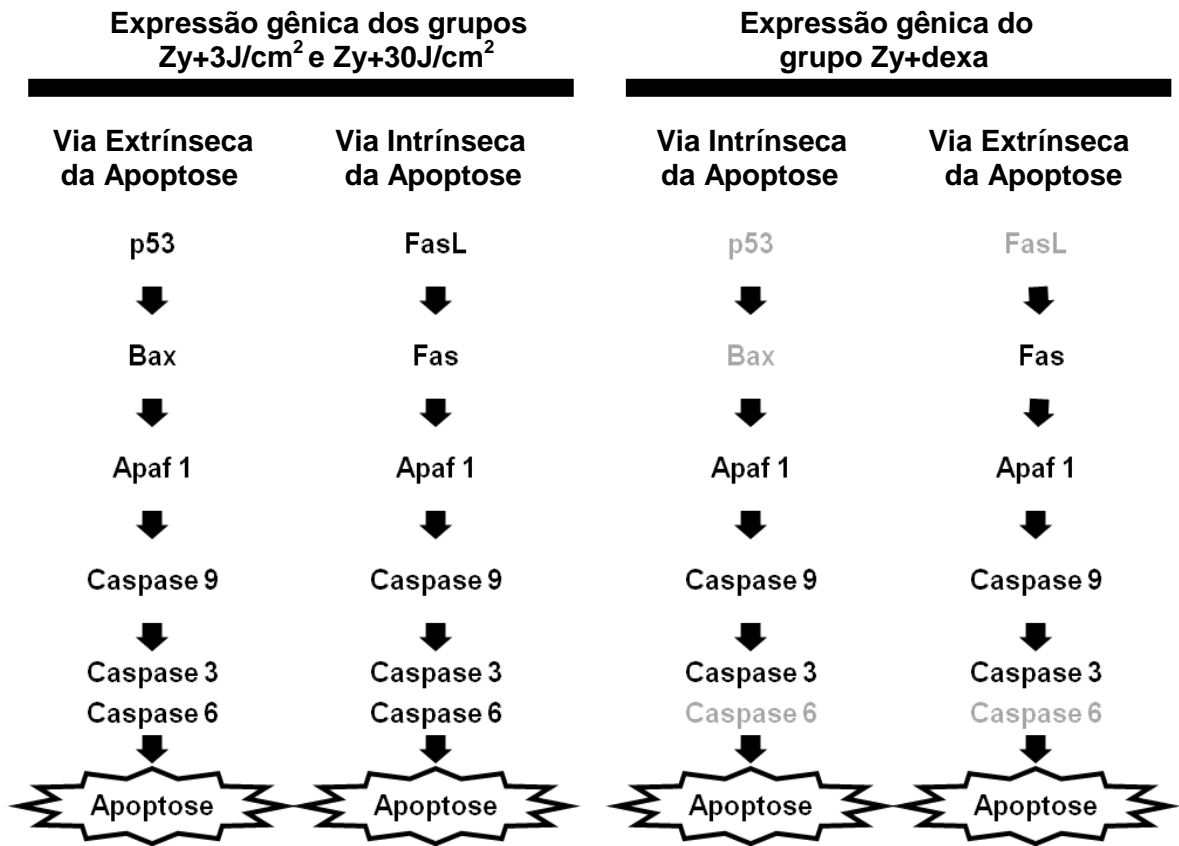


Figura 15 – Desenho esquemático da expressão gênica das proteínas envolvidas nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose nos grupos tratados. Em destaque (preto e negrito) estão as proteínas cujas expressões de seus genes foram elevadas, enquanto as proteínas não destacadas (cinza) demonstram as quais não apresentaram diferenças estatísticas nas expressões de seus genes, quando comparado ao grupo sem tratamento (Zy).

5 DISCUSSÃO

A artrite é uma desordem músculo esquelética que afeta as articulações diartrodiais, considerada importante causa de incapacidade motora em todo o mundo (PAP & KORB-PAP, 2015). Patologias reumáticas crônicas apresentam quadro de artrite inflamatória degenerativa, que progride para destruição completa das estruturas articulares e consequente perda da capacidade motora, quando o tratamento não é efetivo em alterar o curso progressivo da doença (YOSHIDA *et al.*, 2014).

Tendo em vista que o principal marcador da AR, também associado à progressão das lesões, é a presença de células inflamatórias, principalmente PMNs nos tecidos sinoviais (MCINNES & SCHETT, 2011), foi escolhida a administração de zymosan como modelo para estudo da inflamação articular, uma vez que este é capaz de induzir reação inflamatória associada ao aumento da permeabilidade vascular e migração dessas células. Como consequência, uma sinovite erosiva grave assemelhando-se ao quadro degenerativo observado em pacientes com AR, é produzida (GEGOUT *et al.*, 1994; PENIDO *et al.*, 2006). No presente estudo, a administração de zymosan na região das articulações talocrural e subtalar induziu a inflamação nos tecidos sinoviais, com formação de extenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente, composto inicialmente e quase que exclusivamente de neutrófilos (5 horas após indução). Após 101 horas de inflamação, observou-se então a presença de PMNs, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, além de intensa produção de tecido fibroso.

O efeito anti-inflamatório de LLLT em lesões inflamatórias músculo esqueléticas tem sido amplamente descrito na literatura (GAM *et al.*, 1993; ; HALL *et al.*, 1994; BROSSEAU *et al.*, 2000; 2004; BJORDAL *et al.*, 2006; 2007). O tratamento da inflamação, utilizando laser na fluência de 30J/cm², resultou numa importante diminuição da área inflamatória, assim como o número de células nesse infiltrado. Já nos grupos tratados com fluência de 3J/cm² e com dexametasona, os resultados demonstraram uma tendência a diminuição da inflamação, mas ainda foi visualizado uma extensa área desse infiltrado.

Tais efeitos benéficos dos lasers de baixa potência para a resolução do processo inflamatório podem estar relacionados com a rápida diminuição desse infiltrado de PMNs e, conseqüentemente, rápida redução de citocinas e enzimas inflamatórias. Estas células são encontradas no exudato sinovial de uma variedade de patologias articulares, incluindo a artrite (HARRIS, 1991). Entre os mecanismos associado à diminuição do processo inflamatório, os geralmente atribuídos ao LLLT são a ativação da microcirculação, aumento da permeabilidade vascular e drenagem linfática (MESTER, 2013).

Adicionalmente a esses mecanismos, Hemvani e colaboradores (2005) associaram o efeito anti-inflamatório do LLLT à indução de apoptose nos PMNs. A análise da fragmentação de DNA revelou uma intensa marcação positiva nas células inflamatórias após a irradiação com laser, para ambas as fluências testadas. Uma vez que estas células apresentam fragmentação de DNA, o processo de morte por apoptose é irreversível e comumente envolve uma cascata de sinalização intracelular e a ação de caspases efetoras, como as caspases 3 e 6 (COHEN, 1997; RAI *et al.*, 2005). Assim como observado por Hemvani e colaboradores (2005), a diminuição das células do infiltrado inflamatório nos grupos irradiados pode ser em consequência da aceleração da resposta imune, com aumento nas atividades fagocitárias por macrófagos, rápida liberação de citocinas e com posterior indução à morte celular através de apoptose devido à irradiação.

A determinação do perfil de expressão de genes envolvidos nas vias apoptóticas como, receptores, ligantes, moduladores intracelulares e fatores de transcrição pode ser considerada uma importante ferramenta de estudo para o entendimento dessas vias (NIEHS, 2007). Neste estudo, a elevação na expressão de genes codificadores de proteínas associadas às vias apoptóticas extrínseca e intrínseca, nos grupos irradiados com laser, foi observada, indicando que as células do infiltrado inflamatório destes grupos estavam sofrendo estímulos pró-apotóticos.

Dentre as vias de sinalização para apoptose pela via extrínseca, a iniciada pela ligação Fas/Fas ligante é bem caracterizada (NIEHS 2007). Fas, membro da superfamília do TNF, é um receptor transmembrana que uma vez ligado ao Fas ligante, recruta a proteína adaptadora citoplasmática FADD que então se associa com pró-caspases 8. Neste ponto é formado o complexo de sinalização indutor de morte, resultando na ativação autocatalítica das pró-caspases 8. Caspase 8 ativada estimula a apoptose através de duas cascatas paralelas: ela pode clivar e ativar

diretamente a caspase 3 e 6, ou, em alternativa, pode clivar Bid (tBid), que então se transloca para mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c, que sequencialmente ativa Apaf1/caspase-9 e estes por sua vez, caspase 3 e 6. Quando ativadas, caspases 3 e 6 desencadeiam uma reorganização de citoesqueleto e ativação de endonucleases que degradam o DNA cromossomal, resultando na desintegração celular e formação dos corpos apoptóticos. Já na via intrínseca da apoptose, a ativação das caspases efetoras é precedida pela permeabilização da membrana externa mitocondrial por proteínas pró-apotóticas da família da Bcl2, como a Bax, e consequente liberação de citocromo c. O aumento na transcrição de Bax pode ser induzido por p53, que é ativado em resposta a danos ao DNA. (POP & SALVESEN, 2009; MARTINOU & YOLE, 2011; PORTT *et al.*, 2011).

Em estudo detalhado sobre a relação entre o laser de baixa potência e a expressão de diversos genes utilizando cultura de fibroblastos humanos, Zhang e colaboradores (2003) descreveram o aumento na expressão de 111 genes, pertencentes a 10 diferentes categorias. Dentre os genes que foram ativados pela irradiação figuram alguns relacionados a apoptose e estresse celular como, a caspase 6 e o receptor Serina treonina quinase 1 (RIPK1), integrante da super família do TNF de receptores associado a morte.

Tendo em vista a elevada taxa de apoptose observada no grupo Zy+30J/cm², os resultados ponderados do qPCR indicam que ambas as vias apoptóticas foram ativadas nas células do infiltrado inflamatório, uma vez que foi observada a elevação na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas a via extrínseca (Fas e Fas ligante), relacionadas a via intrínseca (p53 e Bax), assim como os comuns as duas vias (Apaf1 e caspases 3, 6 e 9). Já no grupo Zy+3J/cm², a densidade celular e taxa de fragmentação de DNA elevadas nas células do infiltrado inflamatório, bem como a expressão dos genes que codificam proteínas relacionadas às vias apoptóticas, podem indicar que a apoptose está ocorrendo nestas células, mas este processo foi mais lento se comparado ao grupo Zy+30J/cm², onde foi observado, ao final do tratamento, resolução completa da inflamação.

Apesar das contradições ou até mesmo o pouco conhecimento sobre os efeitos moleculares do laser nas células, há um consenso na literatura que os efeitos dos lasers, sejam bioestimulação ou morte celular, são iniciados através das mitocôndrias, já que os fotorreceptores (local onde os fótons liberados pelo laser serão absorvidos) estão presentes em sua cadeia respiratória (KARU, 2008; GAO &

XING, 2009; CHUNG *et al.*, 2012). A mitocôndria está diretamente envolvida na via intrínseca da apoptose, já que as diversas proteínas reguladoras desse processo estão presentes em sua membrana (NIEHS 2007). Essa seria então a primeira via ativada na indução das células inflamatórias a apoptose, seguindo posteriormente para a ativação da via extrínseca, sendo que no final do processo ambas as vias estariam em funcionamento. A diferença observada nas densidades celulares do infiltrado entre as fluências aqui testadas seria apenas temporal: a maior fluência estimula mais rapidamente as vias apoptóticas do que a menor fluência, apresentando assim uma rápida resposta para a resolução processo inflamatório.

Além disso, a absorção dos fótons pelos fotorreceptores é capaz de gerar uma alteração no potencial elétrico da membrana mitocondrial, com consequências na produção de ROS, na síntese de ATP e de fatores de transcrição (KARU, 2010). Um exemplo é a ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, por ROS mitocondrial produzidos após irradiação com laser de baixa potência, o que eleva e acelera a transcrição de genes relacionados à resposta imune, como para citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (CHEN *et al.*, 2011; CHUNG *et al.*, 2012). Mais ainda, um maior efeito da irradiação com laser em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas pode ser associado à presença de mecanismo adicional para produção de ROS, devido à ativação da NADPH-oxidase presente na membrana plasmática destas células (KARU, 2003). A presença dessa proteína na membrana das células inflamatórias pode ser um dos responsáveis pela seletividade da ação pró-apoptótica do laser de baixa potência observada neste trabalho.

As células de origem mielóide, granulócitos, monócitos e células dendríticas, possuem tempo de vida em média menor que outras células do organismo, mas que pode ser prolongado em períodos de infecção ou inflamação, o que requer um controle mais sensível da apoptose (MARSDEN & STRASSER, 2003). Em condições inflamatórias, os estímulos para sobrevivência celular incluem redução da sinalização pelos receptores de morte e elevação da expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 (MARSDEN & STRASSER, 2003). Os macrófagos apresentam ainda, elevação na expressão de Flip, proteína inibidora da sinalização apoptótica via receptor de morte Fas (PERLMAN *et al.*, 1999). Uma hipótese a ser levantada seria que o laser também estaria alterando a expressão das proteínas acima descritas, impedindo assim a persistência dessas células nos processos inflamatórios.

Contraditoriamente ao esperado, o grupo tratado com dexametasona apresentou um aumento na expressão de alguns genes envolvidos na via intrínseca e extrínseca da apoptose, mas com uma resposta mais lenta do que o observado com o tratamento com laser, uma vez que ao final do tratamento foi possível observar elevada densidade celular no infiltrado e baixa taxa de fragmentação de DNA nas células inflamatórias. Apesar do conhecido efeito da dexametasona, o qual controla a velocidade de síntese de proteínas (como citocinas), alterando assim a resposta imune (RANG *et al.*, 2001), esse tratamento, nas condições aqui testadas, não foi o mais eficaz para a resolução do processo inflamatório induzido por zymosan.

6 CONCLUSÃO

O laser infravermelho de baixa potência nas condições aqui testadas e, em especial, quando utilizado na maior fluência, foi capaz de:

- Induzir a fragmentação de DNA especificamente nas células inflamatórias;
- Regular a expressão dos genes relacionados com as vias intrínscica e extrínscica de apoptose nas células inflamatórias;
- Reduzir a população de células presentes no infiltrado inflamatório através da indução da apoptose nessas células;

Os resultados deste trabalho demonstram que a utilização do laser infravermelho de baixa potência pode ser uma boa alternativa para o tratamento de desordens inflamatórias articulares, uma vez que é um método não invasivo, o qual foi seletivo para as células inflamatórias e sem efeitos adversos, como é amplamente conhecido em tratamentos medicamentosos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMBIRE, F.; SANTOS, F.V.; ALBERTINI, R.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; MITTMANN, J.; PACHECO-SOARES, C. 2008. Low-level laser therapy decreases levels of lung neutrophils anti-apoptotic factors by a NF- κ B dependent mechanism. **International Immunopharmacology**, **8**:603–605.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.C.; CORREA, F.I.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S.A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; ZÂNGARO, R.A.; LOPES-MARTINS, R.A.B. 2004. Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **74**:101–107.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.C.; BJORDAL, J. M.; ALVES, L.P.; MUNIN, E.; COSTA, M.S. 2007. Antiinflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660nm and 684 nm) in carrageenan- induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, **12**:50–55.

ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; HANDRIS, P.; KLETSAS, D.; LOUKAS, S. 2002. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. **Photochemistry & Photobiology Science**, **1**:547-552.

ALVES, A.C.A.; VIEIRA, R.P.; LEAL-JUNIOR, E.C.P.; SANTOS, S.A.; LIGEIRO, A.P.; ALBERTINI, R.; SILVA JUNIOR, J.A.; CARVALHO, P.T.C. 2013. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, **15**:R116.

AMARILLAS-ESCOBAR, E.D.; FERNANDEZ, J.M.T.; RIDER, R.M.; FRIAS, M.A.N.F.; HURTADO, J.A.H.; SERNA, V.M.F.; MOSCOSO, A.G.; GUILLEN, A.J.P. 2010. Use of Therapeutic Laser After Surgical Removal of Impacted Lower Third Molars. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, **68**: 319-324.

ANJOS, L.M.J.; FONSECA, A.S.; GAMEIRO, J.; PAOLI, F. 2015. Low-intensity infrared laser effects on zymosan-induced articular inflammatory response. **Proceedings SPIE 9321-Optical Interactions with Tissue and Cells XXVI**, **9321**: 932114.

ANTUNES, H.S.; AZEVEDO, A.M.; BOUZAS, L.F.S; ADÃO, C.A.E.; PINHEIRO, C.T.; AZEVEDO, R., MATOS, V.D.; RODRIGUES, P.C.; SMALL, I.A.; FERREIRA, C.G. 2007. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. **Blood**, **109**:2250-2255.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. 1996. Induction of ciclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Advances in Pharmacology**, **35**:27-79.

ASQUITH, D.L.; ASHLEY, M.; MILLER, I. B.; MCINNES, I.B.; FOO, Y.L. 2009. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, **39**: 1991–2058.

BAIER, A.; MEINECKEL, I.; GAY, S.; PAP, T. 2003. Apoptosis in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, **15(3)**:274–279.

BARBOZA, L.L.; CAMPOS, V.M., MAGALHÃES, L.A., PAOLI, F., FONSECA, A.S. 2015. Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on Escherichia coli cultures. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **48(10)**:945-952.

BARFORD, J.R. 1993. Laser therapy: scientific basis and clinical role. **Orthopaedics**, **16(5)**: 541-547.

BJORDAL, J.M.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; IVERSEN, V.V. 2006. A randomized placebo controlled trial of low level laser therapy for activated Achilles tendinitis with microdialysis measurement of peritendinous prostaglandin E2. **Brazilian Journal of Sports Medicine**, **40**:76–80.

BJORDAL, J.M.; JOHNSON, M.I.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BOGEN, B.; CHOW, R.; LJUNGGREN, A.E. 2007. Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomized placebocontrolled trials. **BMC Musculoskeletal Disorders**, **8(51)**.

BOUYSSSET, M.; BONVOISIN, B.; LEJEUNE, E.; BOUVIER, M. 1987. Flattening of the rheumatoid foot in tarsal arthritis on X-ray. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, **16(2)**:127-33.

BROSSEAU, L.; WELCH, V.; WELLS, G.; TUGWELL, P. 2000. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Journal of Rheumatology**, **27**:1961–1969.

BROSSEAU, L.; ROBINSON, V.; WELLS, G.; DEBIE, R.; GAM, A.; HARMAN, K.; MORIN, M.; SHEA, B.; TUGWELL, P. 2004. Low level laser therapy (classes I, II and III) for treating rheumatoid arthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, **3**: CD002046.

BROSSEAU, L.; WELCH, V.; WELLS, G.A.; BIE, R.; GAM, A.; HARMAN, K.; MORIN, M.; SHEA, B.; TUGWELL, P. 2005. Low level laser therapy (Classes I, II and III) for treating rheumatoid arthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, **4**: CD002049.

BURMESTER, G. R.; PRATT, A. G.; SCHERER, H. U.; VAN LAAR, J. M. 2012. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and clinical features. **EULAR textbook on Rheumatic Diseases**, 1st edn., BMJ Publications, London, 206-231.

BURMESTER, G.R.; FEIST, E.; DÖRNER, T. 2014. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, **10**:77–88.

CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; JURI, H.; PALMA, J. 1998. Effects of diclofenac sodium and He: Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory processes. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, **(6)**:317-320.

CANUTO, K.S.; SERGIO, L.P.; GUIMARÃES, O.R.; GELLER, M.; PAOLI, F.; FONSECA, A.S. 2015. Low-level red laser therapy alters effects of ultraviolet C radiation on Escherichia coli cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **48(10)**:939-944.

CASTANO, A.P.; DAI, T.; YAROSLAVSKY, I.; COHEN, R.; APRUZZESE, W.A.; SMOTRICH, M.H.; HAMBLIN, M.R. 2007. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. **Lasers in Surgery and Medicine**, **39(6)**:543–550.

CELL SIGNALLING TECHNOLOGY, **Mitochondrial Control of Apoptosis Signaling Pathway**. Disponível em < <http://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-apoptosis/mitochondrial-control-of-apoptosis-signaling-pathway/pathways-apoptosis-control?Ntk=Content&N=4294956305&Ntt=apoptosis&fromPage=plp>>

CHEN, A.C.H.; ARANY, P.R.; HUANG, Y.Y.; TOMKINSON, E.M.; SHARMA, S.K.; KHARKWAL, G.B.; SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, E.F.; BLACKWELL, T.S.; HAMBLIN, M.R. 2011 Low-Level Laser Therapy Activates NF- κ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. **PLoS ONE**, **6(7)**: e22453.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S.K.; HUANG, Y.Y.; CARROLL, J.D.; HAMBLIN, M.R. 2012. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, **40(2)**:516-533.

COHEN, G.M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, **15(326 - Pt 1)**:1-16.

COOK, M.J. **The Anatomy of the Laboratory Mouse**, disponível em <http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>

CORY, S.; ADAMS, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, **2(9)**:647-656.

CRAWFORD, F.; THOMSON, C.E. 2010. Interventions for treating plantar heel pain. **Cochrane Database Systematic Reviews**, **(3)**:CD000416.

DA MOTA, L.M.H.; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; PEREIRA, I.A.; FRONZ, L.S.R.; BERTOL, M.B.; FREITAS, M.V.C.; SILVA, N.A.; LOUZADA-JUNIOR, P.; GIORGI, R.D.N.; LIMA, R.A.C.; KAIRALLAB, R.A.; KAWASSAKIB, A.M.; BERANRDO, W.M.; PINHEIRO, G.R.C. 2013. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, **53**:141-157.

DERBOCIO, A.M.; KELMER-BRACHT, A.M.; BRACHT, L.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. 2005. The hemodynamic effects of zymosan in the perfused rat liver. **Vascular Pharmacology**, **43(1)**:75-85.

DEODHAR, A.A.; BRABYN, J.; PANDE, I.; SCOTT, D.L.; WOOLF, A.D. 2003. Hand bone densitometry in rheumatoid arthritis, a five year longitudinal study: an outcome measure and a prognostic marker. **Annals of Rheumatology Diseases**, **62**:767-770.

DI CARLO, F.J.; FIORE, J.V. 1958. On the composition of zymosan. **Science**, **127(3301)**:756-757.

ESLAMIAN, F.; SHAKOURI, S.K.; GHOJAZADEH, M.; NOBARI, O.E.; EFTEKHARSADAT, B. 2012. Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. **Lasers in Medical Science**, **27(5)**:951-958.

FAULSTICK, B. **Drexel Engineer's Discovery Turns Artificial Ankle Research in a New Direction**. Disponível em: < <http://newsblog.drexel.edu/2014/09/16/drexel-engineers-discovery-turns-artificial-ankle-research-in-a-new-direction/>>.

FERREIRA, D.M.; ZÂNGARO, R.A.; VILLAVERDE, A.B.; CURY, Y.; FRIGO, L.; PICOLO, G.; LONGO, I.; BARBOSA, D.G. 2005. Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. **Photomedicine and Laser Surgery**, **23(2)**:177-181.

FIRESTEIN, G.S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, **423**:356-361.

FIRESTEIN, G.S.; NGUYEN, K.; AUPPERLE, K.R.; YEO, M.; BOYLE, D.L.; ZVAIFLER, N.J. 1996. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. **The American Journal of Pathology**, **149(6)**:2143-2151.

FLOOD J. 2010. The role of acetaminophen in the treatment of osteoarthritis. **American Journal of Managed Care**, **16(Suppl Management)**:S48–54.

FONSECA, A.S.; MOREIRA, T.O.; PAIXÃO, D.L.; FARIAS, F.M.; GUIMARÃES, O.R.; PAOLI, S.; GELLER, M.; DE PAOLI, F. 2010. Effect of laser therapy on DNA damage. **Lasers in Surgery and Medicine**, **42**:481-488.

FONSECA, A.S.; PRESTA, G.A.; GELLER, M.; DE PAOLI, F.; VALENÇA, S.S. 2012. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. **Lasers in Medical Science**, **27(1)**:211-217.

FONSECA, A.S.; CAMPOS, V.M.; MAGALHÃES, L.A.; PAOLI, F. 2015. 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.

GAM, A.N.; THORSEN, H.; LONNBERG, F. 1993. The effect of low level laser therapy on musculoskeletal pain: a meta-analysis. **Pain**, **52**:63–66.

GAO, X. & XING, D. 2009. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low Lower laser irradiation. **Journal of Biomedical Science**, **16(4)**.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. 1994. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Science**, **55(17)**:PL321-326.

GRANUCCI, F.; FEAU, S.; ANGELI, V.; TROTTEIN, F.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2003. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. **The Journal of Immunology**, **170(10)**:5075-5081.

GUR, A.; SARAC, A.J.; CEVIK, R.; ALTINDAG, O.; SARAC, S. 2004. Efficacy of 904 nm Gallium Arsenide Low Level Laser Therapy in the Management of Chronic Myofascial Pain in the Neck: A Double-Blind and Randomize-Controlled Trial. **Lasers in Surgery and Medicine**, **35**:229–235.

HALL, J.; CLARKE, A.K.; ELVINS, D.M.; RING, F.J. 1994. Low level laser therapy is ineffective in the management of rheumatoid arthritic finger joints. **Brazilian Journal of Rheumatology**, **33**:142–147.

HARINGMAN, J.J.; KRAAN, M.C.; SMEETS, T.J.; ZWINDERMAN, K.H.; TAK, P.P. 2003. Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatic Diseases**, **62**:715–721.

HARRIS-JUNIOR, E.D. 1991. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: its relevance to therapy in the '90s. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, **102**: 260–270.

HAWKINS, D.H.; ABRAHAMSE, H. 2006. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, **38(1)**:74-83.

HEMVANI, N.; CHITNIS, D.S.; GEORGE, M.; CHAMMANIA, S. 2005. *In Vitro* Effect of Nitrogen and He-Ne Laser on the Apoptosis of Human Polymorphonuclear Cells from Burn Cases and Healthy Volunteers. **Photomedicine and Laser Surgery**, **23(5)**: 476-9.

HOFSLI, E.; BAKKE, O.; NONSTAD, U.; ESPEVIK, T. 1989. A flow cytometric and immunofluorescence microscopic study of tumor necrosis factor production and localization in human monocytes. **Cellular Immunology**, **122**:405-415.

HOOKE LABORATORIES. **Collagen-Induced Arthritis (CIA) in DBA/1 Mice.**
Disponível em: <<http://hookelabs.com/services/cro/cia.html>>.

HUANG, L.; WU, S.; XING, D. 2011. High Fluence Low-Power Laser Irradiation Induces Apoptosis via Inactivation of Akt/GSK3b Signaling Pathway. **Journal of Cellular Physiology**, **226**:588–601.

HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M.R. 2011. Biphasic dose response in low level light therapy-an update. **Dose-Response**, **9(4)**:602-618.

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

IDE, M.R.; GONZALEZ-GAY, M.A.; YANO, K.C.; IMAI, M.J.; ANDRADE JR, M.C.; LLORCA, J. 2011. Functional capacity in rheumatoid arthritis patients: comparison between Spanish and Brazilian sample. **Rheumatology International**, **31(2)**: 221-226.

JAAKKOLA, J.I.; MANN, R.A. 2004. A review of rheumatoid arthritis affecting the foot and ankle. **Foot and Ankle International**, **25(12)**:866-874.

KARU, T.I. 1998. Molecular mechanism of low-power lasertherapy. **Lasers in the Life Science**, **2**:53-74.

KARU, T.I. 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry Photobiology B**, **49**:1-17.

KARU, T. I. 2003. Low-power laser therapy. **Biomedical Photonics Handbook**, **48**:1-25.

KARU T.I. 2008. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, **84**:1091-1099.

KARU, T.I. 2010. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, **28**:159-160.

KARU, T.I. 2010. Multiple Roles of Cytochrome c Oxidase in Mammalian Cells Under Action of Red and IR-A Radiation. **Life**, **62**:607–610.

KEENAN, M.A.; PEABODY, T.D.; GRONLEY, J.K.; PERRY, J. 1991. Valgus deformities of the feet and characteristics of gait in patients who have rheumatoid arthritis. **Journal of Bone and Joint Surgery**, **73(2)**:237-247.

KERRY, R.M.; HOLT, G.M.; STOCKLEY, I. 1994. The foot in chronic rheumatoid arthritis: a continuing problem. **The Foot**, **4(4)**: 201-203.

KEYSTONE, E.C. 1989. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis and Rheumatism**, **20**:1396-1401.

KIELY, P.D.; BROWN, A.K.; EDWARDS, C.J.; O'REILLY, D.T.; ÖSTÖR, A.J.; QUINN, M.; TAGGART, A.; TAYLOR, P.C.; WAKEFIELD, R.J.; CONAGHAN, P.G. 2009. Contemporary treatment principles for early rheumatoid arthritis: a consensus statement. **Rheumatology**, **48(7)**:765-772.

KIRVESKARI, J.; JALKANEN, S.; GRANFORS, O.M.A. 1998. Increased synovial endothelium binding and transendothelial migration of mononuclear cells during *Salmonella* infection. **Arthritis & Rheumatism**, **41(6)**:1054–1063.

LIANZA, S.A. 2001. **Medicina de Reabilitação**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 197–198.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, **25(4)**:402-408.

LOTZ, M.; HASHIMOTO, S.; KUHN, K. 1999. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. **Osteoarthritis and Cartilage**, **7**:389–391.

LUBART, R.; BREITBART, H. 2000. Biostimulative effects of low energy lasers and their implications for medicine. **Drug Development Research**, **50**:471-475.

MAHAJAN, A.; VERMA, S.; TANDON, V. 2005. Osteoarthritis. **Journal of the Association of Physicians of India**, **53**:634-641.

MANTINEO, M.; PINHEIRO, J.P.; MORGADO, A.M. 2014. Evaluation of low level laser therapy irradiation parameters on rat muscle inflammation through systemic blood cytokines. **Proceedings SPIE 8932**, Mechanisms for Low-Light Therapy IX, 89320M.

MARSDEN, V. S.; STRASSER, A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-Only Proteins and More. **Annual Review of Immunology**, **21**:71–105.

MONK, J.P.; PHILLIPS, G.; WAITE, R.; KUHN, J.; SCHAAF, L.J.; OTTERSON, G.A.; GUTTRIDGE, D.; RHOADES, C.; SHAH, M.; CRISWELL, T.; CALIGIURI, M.A.; MARTINO, J.C.; YOULE, R.J. 2011. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. **Developmental Cell**, **21(1)**:92–101.

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

MCINNES, I.B.; SCHETT, G. 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, **365**:2205-2219.

MEIRELES, S.M.; JONES, A.N.; JENNINGS, F.; SUDA, A.L.; PARIZOTTO, N.A.; NATOUR, J. 2010. 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.

MESTER, A. 2013. Laser Biostimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, **31(6)**.

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

MORGAN, M.C.; RASHID, R.M. 2009. The effect of phototherapy on neutrophils. **International Immunopharmacology**, **9(4)**:383-388.

MURPHY, G.; HEMBRY, R. M. 1992. Proteinases in rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, **(Suppl-32)**:61-64.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Primer-BLAST, primer designing tool**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>.

NIEHS, LABORATORY OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, RESEARCH TRIANGLE PARK, NORTH CAROLINA. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, **35(4)**: 495–516.

NIEMZ, M.H. 2007. **Laser-tissue interactions: fundamentals and applications**. 2^a ed, Springer Science & Business Media, 303p.

ORHAN, K.; AKSOY, U.; CAN-KARABULUT, D.C.; KALENDER, A. 2011. Low-level laser therapy of dentin hypersensitivity: a short-term clinical trial. **Lasers in Medical Science**, **26(5)**:591-598.

O'SHEA, D.C.; CALLEN, W.R.; RHODES, W.T.; THOMPSON, B.J.; 1978. An Introduction to Lasers and Their Applications. **American Journal of Physics**, **46(5)**:592-592.

PAGLIARI, L.J.; PERLMAN, H.; LIU, H.; POPE, R.M. 2000. Macrophages require constitutive NF- κ B activation to maintain A1 expression and mitochondrial homeostasis. **Molecular and Cellular Biology**, **20**:8855–8865.

PAP, T.; KORB-PAP, A. 2015. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis-two unequal siblings. **Nature Reviews Rheumatology**, **11**:606–615.

PARSONS, S.J.; PARSONS, J.T. 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. **Oncogene**, **23(48)**:7906-7909.

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

PERLMAN, H.; PAGLIARI, L.J.; GEORGANAS, C.; MANO, T.; WALSH, K.; POPE, R.M. 1999. FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, **190(11)**:1679-1688.

POP, C.; SALVESEN, G.S. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, **284(33)**:21777–21781.

POPE, R.M. 2002. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, **2**:1-9.

PORTT, L.; NORMAN, G.; CLAPP, C.; GREENWOOD, M.; GREENWOOD, M.T. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. **Biochimica et Biophysica Acta** **1813(1)**:238–259.

POSTEN, W.; WRONE, D.A.; DOVER, J.S.; ARNDT, K.A.; SILAPUNT, S.; ALAM, M. 2005. Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy. **Dermatologic Surgery**, **31**:334–340.

RAI, N.K.; TRIPATHI, K.; SHARMA, D.; SHUKLA, V.K. 2005. Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, **4(3)**:138-144.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. 2001. **Farmacologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 703p.

REDDY, G,K. 2004. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, **22**:141-150.

REIS, M.C. 2014. **Sistema indutor de neoformação tecidual para pé diabético com circuito emissor de luz de LEDs e utilização do látex natural**. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Universidade de Brasília, Brasília, xiv, 163f.

SAKURAI, Y.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. 2000. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Science**, **108(1)**:29-34.

SALTER, R.B. 2001. **Distúrbios e Lesões do Sistema Músculoesquelético**. 3ªed. São Paulo: Medsi, 259–264.

SCHORLEMMER, H.U.; BITTER-SUERMAN, D.; ALLISON, A.C. 1977. Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. **Immunology**, **32(6)**:929-940.

SCHULER, M.; GREEN, D.R. 2001. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. **Biochemical Society Transactions**, **29(6)**:684-687.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W.J. 2010. Rheumatoid Arthritis, **Lancet** **376**: 1094–1108.

SERGIO, L.P.S.; MARCIANO, R.S.; POLIGNANO, G.A.C.; GUIMARÃES, O.R.; GELLER, M.; PAOLI, F.; FONSECA, A.S. 2012. Evaluation of DNA Damage Induced by Therapeutic Low-Level Red Laser. **Journal of Clinical and Experimental Dermatology Reserach**, **3(166)**.

SHAKOURI, S.K.; SOLEIMANPOUR, J.; SALEKZAMANI, Y.; OSKUIE, M.R. 2010. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. **Lasers in Medical Science**, **25(1)**:73-77.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T.A.; HESLOP, L.; GROSS, J.G.; ORON, U.; HALEVY, O. 2002. Low energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**, **115(Pt 7)**:1461-1469.

SHIMIZU, N.; YAMAGUCHI, M.; GOSEKI, T.; SHIBATA, Y.; TAKIGUCHI, H.; IWASAWA, T.; ABIKO, Y. 1995. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. **Journal of Dental Research**, **74(7)**:1382-8.

SMITH, W.L. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiology**, **263**:181-191.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; REDLICH, K. 2012. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?. **Nature Reviews Rheumatology**, **8**:235–243.

SILMAN, A.J.; PEARSON, J.E. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research**, **4 (Suppl 3)**:S265-272.

SUGIYAMA, M.; TSUKAZAKI, T.; YONEKURA, A.; MATSUZAKI, S.; YAMASHITA, S.; IWASAKI, K. 1996. Localisation of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **55(7)**:442-449.

SVELTO, O.; HANNA, D.C. 1998. Principles of Lasers. Plenum Press, New York, USA.

SZEKANECZ, Z.; PAKOZDI, A.; SZENTPETERY, A.; BESENYEI, T.; KOCH, A.E. 2009. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Front Bioscience**, **1**:44-51.

TAK, P. P.; ZVAIFLER, N. J.; GREEN, D. R.; FIRESTEIN, G. S. 2000. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. **Immunology Today**, **21**:78–82.

TAYLOR, P.R.; BROWN, G.D.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S.Y. 2002. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **The Journal of Immunology**, **169(7)**:3876-3882.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; HAJJAR, A.M.; STEVENS, A.; WILSON, C.B.; BASSETTI, M.; ADEREM, A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, **401(6755)**: 811–815.

UNDERHILL, D. M. 2003. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of Endotoxin Research**, **9(3)**:176-180.

VAINIO, K. 1991. The rheumatoid foot: a clinical study with pathological and roentgenological comments. **Clin Orthop Relat Res (265)**:4-8.

VERSTAPPEN, S.M.M.; BOONEN, A.; VERKLEIJ, H.; BIJLSMA, J.W.J.; BUSKENS, E.; JACOBS, J.W.G. 2005. Productivity costs among patients with rheumatoid arthritis: the influence of methods and sources to value loss of productivity. **Annals of Rheumatic Diseases**, **64(12)**: 1754-1760.

VIDIGAL, E.; JACOBY, R.K; DIXON, A.S.; RATLIFF, A.H.; KIRKUP, J. 1975. The foot in chronic rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatism Disease**, **34(4)**: 292-297.

VOS, T.; FLAXMAN, A.D.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; MICHAUD, C.; EZZATI, M.; *et al.* 2012. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, **380**:2163–2196.

YOSHIDA, K.; SUNG, Y.K.; KAVANAUGH, A.; BAE, S.C.; WEINBLATT, M.E.; KISHIMOTO, M.; MATSUI, K.; TOHMA, S.; SOLOMON, D.H. 2014. Biologic discontinuation studies: a systematic review of methods. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **73**:595-599.

YOUNG, M. 1998. **Óptica e Lasers**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

WILDEN, L.;KARTHEIN, R. 1998. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, **16(3)**:159-165.

WU, S. & XING, D. 2014. Intracellular signaling cascades following light irradiation. **Laser and Photonics Reviews**, **8(1)**:115–130.

WU, S.; XING, D.; WANG, F.; CHEN, T. 2007. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. **Journal of Biomedical Optics**, **12(6)**:064015.

ZHANG, Y.; SONG, S.; FONG, C.C.; TSANG, C.H.; YANG, Z.; YANG, M. 2003. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. **Journal of Investigative Dermatology**, **120**: 849–857.