

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO PARASITÁRIAS

Deuzedina Cristini Ribeiro de Alcântara

**LASER DE BAIXA POTÊNCIA COMO TRATAMENTO DA
INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2021

Deuzedina Cristini Ribeiro de Alcântara

**Laser de baixa potência como tratamento da inflamação articular
induzida por zymosan.**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas Área de concentração: Imunologia e doenças infecto parasitárias para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR (A): PROF^a. DR^a. FLÁVIA DE PAOLI

Juiz de Fora

2021

DEUZEDINA CRISTINI RIBEIRO DE ALCÂNTARA

Laser de baixa potência como tratamento da inflamação articular induzida por zymosan.

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 21 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Flávia de Paoli

Prof^a. Dr^a. Flávia de Paoli - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Jacy Gameiro

Prof^a. Dr^a Jacy Gameiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Adenilson de Souza da Fonseca

Prof. Dr. Adenilson, de Souza da Fonseca
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cleonice Ribeiro e José Gonçalves, e ao meu irmão Júnior, os maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos e que sempre sorriem comigo todos os meus risos e choram comigo todas as minhas tristezas; a vocês, minha gratidão e todo meu amor.

Dedico também ao meu querido tio João Gonçalves (*in memoriam*) que partiu de forma repentina, e a todos familiares e amigos de pessoas que se foram em decorrência da pandemia de Covid-19.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

Agradeço a Prof.^aDr.^a Flávia de Paoli, do Departamento de Histologia da UFJF não só pela orientação durante todo o desenvolvimento do trabalho, mas principalmente pelo apoio, compreensão e incentivo fundamental nos momentos em que me senti insegura, respeitando sempre meu tempo e minhas limitações.

Agradeço a Dr.^a Lúcia Mara Januário dos Anjos do Departamento de Histologia da UFJF por toda ajuda e ensinamentos dispensados durante a realização desta pesquisa.

Agradeço ao Álvaro, Luiza, Flávia, Luan e Nathália, alunos de Iniciação Científica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF (ICB/UFJF) pelo empenho em me auxiliar na parte prática do experimento.

Agradeço, de forma muito especial, a Carol, técnica do Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP) e ao Carlos, técnico do Departamento de Histologia, ambos do ICB/UFJF, pela generosidade, profissionalismo e grande boa vontade em me auxiliar em todos os momentos.

Agradeço também com muito carinho, aos membros da banca Prof.^a Dr.^a Jacy Gameiro, membro interno; Prof. Dr. Adenilson de Souza Fonseca, membro externo vinculado a UERJ; Prof. Dr. Maycon Moura Reboredo, suplente interno; e Carolina dos Santos Fernandes, suplente externo vinculada a UNIPAC, pela pronta disponibilidade em avaliar este trabalho.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.
(Aristóteles)

RESUMO

A artrose e a artrite reumatóide (AR) são doenças articulares caracterizadas por mecanismos fisiopatológicos diferentes, porém com sintomas clínicos bem parecidos, o que inclui dor articular, comprometimento da função da articulação afetada além de danos estruturais que são caracterizados por osteófitos na artrose e erosões ósseas na AR. Os principais tratamentos da AR incluem medicamentos conhecidos por provocarem efeitos colaterais diversos como osteoporose, susceptibilidade à infecções, efeitos metabólicos, alto índice de toxicidade, além do alto custo geral do tratamento. Com isso, o laser de baixa potência (LBP) surge como uma opção terapêutica que pode auxiliar na redução e resolução do processo inflamatório, diminuindo o tempo de utilização de medicamentos, custos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do LBP na resolução do processo inflamatório induzido por zymosan em modelo experimental animal. Foram avaliados os efeitos do LBP infravermelho (830nm, 10mW, modo contínuo de emissão da luz), comparando duas fluências ($3\text{J}/\text{cm}^2$ e $30\text{J}/\text{cm}^2$) e tempos de tratamento (24h, 48h e 72h) na resolução do processo inflamatório. Camundongos C57BL/6 foram distribuídos nos seguintes grupos: **ZY-** Artrite induzida; **ZY + Dexa**– artrite induzida e tratada com dexametasona; **ZY + 3 J/cm²** artrite induzida e tratada com laser $3\text{ J}/\text{cm}^2$; e **ZY + 30 J/cm²** artrite induzida e tratada com laser $30\text{ J}/\text{cm}^2$. Para cada grupo descrito, 3 tempos de tratamentos foram utilizados: 24h, 48h e 72h, ou seja, 1, 2 ou 3 sessões de LBP ou dexametasona, respectivamente. O número de animais por subgrupo foi de 5, totalizando 60 animais. O zymosan foi aplicado próximo a região talo crural e subtalar de ambos membros posteriores dos camundongos. Os resultados revelaram grande influxo de células inflamatórias, predominantemente de polimorfonucleares no tecido conjuntivo adjacente a articulação após 24h do primeiro tratamento, fato esse que persistiu ainda nos grupos com duas sessões de tratamento (48h). Uma redução no infiltrado inflamatório foi observada nos grupos que foram tratados por 3 dias consecutivos (72h), em especial aqueles tratados com fluência $30\text{ J}/\text{cm}^2$ e dexametasona. Observou-se que os grupos tratados com dexametasona e LBP na fluência de $30\text{J}/\text{cm}^2$ apresentaram uma tendência de redução da inflamação em todos os tempos testados (24h, 48h e 72h) quando comparado aos seus respectivos grupos ZY, apesar de nenhuma diferença estatística ser encontrada ($p>0,05$). Já o grupo $3\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou uma leve redução na sua área inflamatória, somente a partir do tempo 48h e não apresentou também diferenças estatísticas quando comparados ao grupo não tratado (ZY) ($p>0,05$). Adicionalmente, após 48h, o grupo ZY aumentou sua área de inflamação, podendo indicar que nesse tempo ocorra o ápice do processo inflamatório nesse modelo experimental. Nossos resultados demonstram que a terapia com LBP tende a reduzir o processo inflamatório a partir de 48h de tratamento na maior fluência ($30\text{ J}/\text{cm}^2$), enquanto na menor fluência ($3\text{ J}/\text{cm}^2$) o efeito anti-inflamatória é mais lento. A fluência de $30\text{ J}/\text{cm}^2$ apresenta comportamento anti-inflamatório semelhante a medicamentos utilizados em patologias inflamatórias, como por exemplo a dexametasona.

Palavras-chave: Artropatias. Laser de baixa potência. Zymosan. Inflamação.

ABSTRACT

Arthrosis and rheumatoid arthritis (RA) are joint diseases characterized by different pathophysiological mechanisms. However, they may present remarkably similar clinical symptoms, including pain and function loss of joint and structural damage, characterized by osteophytes in arthrosis and bone erosion in RA. The main treatments for RA include drugs which cause several side effects such as osteoporosis, susceptibility to infections, metabolic effects, and high toxicity. In general terms, such treatments can represent high cost to governments. Therewith, the low-level laser therapy (LLLT) appears as therapeutic option which may be helpful in inflammatory process resolution, reducing medication use time, costs and quality of life improving. Therefore, the aim was to evaluate LLLT inflammatory process resolution zymosan induced. Infrared laser parameters were: 830nm, 10mW, continuous light emission mode, purchased two energy densities (3J/cm² and 30J/cm²) and treatment times (24h, 48h and 72h). C57BL/6 mice were distributed into groups: **ZY**- arthritis induced; **ZY + Dexa** – arthritis induced and treated with dexamethasone; **ZY + 3 J/cm²** – arthritis induced and treated with LLLT at 3 J/cm²; and **ZY + 30 J/cm²** - arthritis induced and treated with LLLT at 30 J/cm². For each group described, 3 treatment times were used: 24h, 48h and 72h (1, 2 or 3 LLLT sessions or dexamethasone, respectively). The number of animals per subgroup was 5, totalling 60 animals. The zymosan was injected in crural and subtalar regions, both mice hind limbs. The results demonstrated inflammatory cells influx, predominantly polymorphonuclear in connective tissue adjacent after 24 hours, persisting after two treatment sessions both LLLT and dexamethasone groups (48 hours). Decrease of inflammatory infiltrate was observed in groups treated for 3 consecutive days (72h), especially with LLLT at 30 J/cm² and dexamethasone. It was observed that dexamethasone and LLLT at 30J/cm² treatments showed tendency to reduce inflammation at all times tested (24h, 48h and 72h) when compared with untreated group (ZY), although no statistical differences were observed (p>0.05). On the other hand, LLLT at 3J/cm² showed slight reduction in inflammatory area, only from 48h and it did also not present statistical differences when compared with untreated group (ZY) (p>0.05). Additionally, after 48 hours, ZY group increased its inflammation area. This finding may indicate the inflammatory process peak for this experimental model. Our results demonstrate that LLLT tends to reduce the inflammatory process after 48 hours at the highest energy density (30 J/cm²), while at the lowest energy density (3 J/cm²) the anti-inflammatory effect was slower. LLLT at 30J/cm² presents anti-inflammatory behaviour similar to drugs used in inflammatory pathologies, such as dexamethasone.

Keywords: Arthropathies. Low-level laser therapy. Zymosan. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática dos receptores de membrana TLR2 e dectina-1.....	17
FIGURA 2 – Gráfico da cinética bifásica da inflamação articular induzida por zymosan (quantificação isotópica da inflamação das articulações <i>in vivo</i>)	21
FIGURA 3 – Representação ilustrativa dos principais tipos de lasers e seus comprimentos de onda.	24
FIGURA 4 – Representação ilustrativa das características específicas do laser	25
FIGURA 5 – Estrutura interna do laser	25
FIGURA 6 – Esquemática da lei de Arndt-Schultz.	27
FIGURA 7 – Administração de Zymosan próximo a região da articulação talo crural e subtalar.	33
FIGURA 8 – Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular 24 horas após indução por zymosan.	36
FIGURA 9 – Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular tratados 24 horas após indução por zymosan; e quantificação da área do infiltrado inflamatório (cm ²).	37
FIGURA 10 – Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular tratados 48 horas após indução por zymosan; e quantificação da área do infiltrado inflamatório.	38
FIGURA 11 – Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular tratados 48 horas após indução por zymosan; e quantificação da área do infiltrado inflamatório.	39
FIGURA 12 – Gráfico das médias das áreas dos infiltrados inflamatórios (cm ²) agrupados por tempo de tratamento (24 horas;48 horas; e 72 horas).	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Distribuição dos animais em 12 grupos experimentais (n=5)	32
TABELA 2 – Parâmetros físicos do laser de baixa potência.	34
TABELA 3 – Área média do infiltrado inflamatório por grupo.	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AINES	Anti Inflamatórios Não Esteroidais
ATP	Adenosina Trifosfato
AR	Artrite Reumatoide
Ca ²⁺	Cálcio Iônico
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CEAF	Componente Especializado da Assistência Farmacêutica
CONITEC	Comissão Nacional De Incorporação De Tecnologias
COX – 2	Ciclooxigenase 2
DCs	“ <i>Dendritic cells</i> ” - Células dendríticas
DMARDs	Drogas Modificadoras Do Curso Da Doença
Ga-As	Arseneto de gálio
GaAl-As	Arseneto de gálio e alumínio
GC	Glicocorticoide
He-Ne	Hélio-Neônio
IFN- γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ITAM	“ <i>Immunoreceptor Tyrosinase-Based Activation Motif</i> ” - Motivo de Ativação à Base de Tirosina Imunorreceptora”
LBP	Laser de Baixa Potência
NFKB	“ <i>Nuclear Factor Kappa B</i> ” - Fator Nuclear Kappa B
PBS	“ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ” - Salina Tamponada com Fosfato
pHi	Potencial hidrogeniônico intracelular

ROS	<i>"Reactive Oxygen Species"</i> - Espécies Reativas de Oxigênio
SUS	Sistema Único de saúde
TLR	<i>"Toll-Like Receptor"</i> - Receptor do Tipo Toll
TNF- α	<i>"Tumor Necrosis Factor Alpha"</i> - Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR	<i>"Tumor Necrosis Factor Receptor"</i> - Receptor de Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
	1.1 PATOLOGIAS ARTICULARES INFLAMATÓRIAS.....	15
	1.2 MODELO DE INDUÇÃO POR ZYMOZAN	18
	1.3 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DA ARTRITE	22
	1.4 LASER DE BAIXA POTÊNCIA	23
	1.4.1 INTERAÇÃO COM TECIDO BIOLÓGICO	26
2	OBJETIVO... ..	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
	3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
	3.2 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	33
	3.3 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO	33
	3.4 EXPOSIÇÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA	34
	3.5 EUTANÁSIA	34
	3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA	35
	3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4	RESULTADOS	36
	4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA	36
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

As artropatias inflamatórias são caracterizadas por levarem o indivíduo a sintomas comuns como dor e rigidez na articulação afetada, bem como perda de função e conseqüente diminuição na qualidade de vida (HOCHBERG *et al.*, 2004).

Dentre os tipos mais comuns dessas artropatias inflamatórias está a Artrite Reumatoide (AR). O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza recursos medicamentosos para o tratamento da AR e estes tratamentos são regulamentados pelo Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF) juntamente a Comissão Nacional De Incorporação de Tecnologias (CONITEC), no SUS que também é responsável por elaborar e manter atualizado o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide (CONITEC, 2020).

Os protocolos para tratamento da AR, no geral, incluem medicamentos conhecidos por provocarem efeitos colaterais diversos como osteoporose, eventos cardiovasculares, susceptibilidade à infecções, efeitos metabólicos entre outros,(PEREIRA; DE CARVALHO; CANALIS, 2010; ROGLER, 2010), além de muitos apresentarem alto índice de toxicidade (RUDOLF *et al.*, 2009; HEIBERG, 2002). Outro fator que merece destaque é o longo tempo de duração do tratamento e o alto custo do seu gerenciamento e monitoramento o que eleva ainda mais os gastos fazendo com que seja um importante componente dos provedores de saúde (NURMOHAMED, DIJKMANS, 2005; ZANINI, WADT, 2006), incluindo o SUS.

Os custos diretos englobam gastos com medicamentos, hospitalização, cirurgias, exames além de outros procedimentos médicos relacionados (GULÁCSI *et al.*, 2015). Com a progressão da doença os pacientes desenvolvem dificuldade para realização de atividades rotineiras e profissionais (FELLET, SCOTTON, 2013).

Portanto, fazem-se necessários estudos mais aprofundados para a compreensão do curso inflamatório de doenças articulares, com objetivo de evitar e/ou reduzir os efeitos colaterais dos medicamentos atualmente utilizados em paralelo, apontar um caminho para a redução de gastos, principalmente do SUS. Com isso, o laser de baixa potência (LBP) surge como uma opção terapêutica que pode auxiliar na redução e resolução do processo inflamatório, diminuindo o tempo de utilização de medicamentos e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

1.1 PATOLOGIAS ARTICULARES INFLAMATÓRIAS

A articulação sinovial é o conjunto formado por, no mínimo, duas extremidades ósseas (DÂNGELO, 2005). São as mais comuns e também podem ser chamadas de diartroses. Faz parte de sua estrutura uma cavidade articular envolvida pela capsula articular que tem como principal função, manter os ossos unidos além de possibilitar o movimento entre esses ossos que aí se articulam. Contam ainda com uma membrana sinovial produtora de um líquido que funciona como lubrificante para articulação: o líquido sinovial (MOORE *et al.*, 2014; SEELEY *et al.*, 2011).

As patologias que acometem as articulações são classificadas em agudas ou crônicas e podem levar a graves efeitos físicos, psicológicos e socioeconômicos, sendo a artrite a patologia mais comum, destacando-se a artrose (ou osteoartrite) e AR (BROUWERS *et al.*, 2015).

A artrose e a AR são doenças articulares caracterizadas por mecanismos fisiopatológicos diferentes, porém com sintomas clínicos bem parecidos, o que inclui dor articular, comprometimento da função da articulação afetada além de danos estruturais que são caracterizados por osteófitos na artrose e erosões ósseas na AR. Além disso, ambas as doenças exibem estreitamento do espaço articular, refletindo a perda de cartilagem (YUSUF *et al.*, 2011; BERENBAUM, 2013).

Embora em alguns indivíduos seja difícil distinguir a artrose da AR, devido ao processo inflamatório do tecido sinovial, os componentes inflamatórios da artrose são apontados através da identificação, por exemplo, de citocinas e quimiocinas que compõem a resposta imune inata em associação ao quadro clínico e histórico do paciente (LOESER *et al.*, 2012). Ao contrário do que acontece em indivíduos saudáveis, em que os condrócitos são células quiescentes, na artrose os condrócitos encontram-se em estado ativado, o que promove a proliferação celular, bem como a formação de agregados, aumento da produção de proteínas de matriz e enzimas proteolíticas, com destaque para as metaloproteases. O estado ativado dos condrócitos ocorre possivelmente em resposta a uma lesão inicial e leva a remodelagem da matriz, maturação hipertrófica inadequada e calcificação da cartilagem afetada (LOESER *et al.*, 2012)

Já a AR é uma doença inflamatória crônica, sistêmica, progressiva e autoimune, com predominantes alterações de estruturas articulares e periarticulares.

A membrana sinovial, chamada de sítio inflamatório primário da AR, passa a apresentar sinais de hiperplasia celular e de processo inflamatório configurando a sinovite, além da produção de auto anticorpo e destruição de cartilagem e osso. Durante o desenvolvimento da AR, a hipertrofia do tecido inflamatório originado da membrana sinovial acontece devido ao influxo exacerbado de células inflamatórias incluindo monócitos, células T e B provenientes da circulação sanguínea e células sinoviais residentes (FIRESTEIN, 2003; CROSS *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2016). A sinovite então ocorre devido à infiltração por macrófagos, linfócitos T e B e são produzidas citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ) responsáveis pela ativação de células sinoviais residentes que são estimuladas a produzirem proteases e collagenases que medeiam a destruição da cartilagem, ligamentos e tendões das articulações (DAVID *et al.*, 2013). A cronicidade da inflamação forma um tecido proliferativo que adentra na articulação invadindo a cavidade articular e o tecido ósseo, formando o chamado *pannus* (SHEKHANI *et al.*, 2016). O processo inflamatório se difunde para os tecidos adjacentes, provocando erosão da cartilagem articular e do osso subcondral, onde as quimiocinas liberadas localmente atraem neutrófilos que vão se acumulando no líquido sinovial aumentando o derrame articular (BUGATTI *et al.*, 2016). Embora a AR se desenvolva predominantemente na membrana sinovial, outras estruturas articulares podem ser acometidas, tais como cápsulas fibrosas, osso subcondral, cartilagem articular, bursas, bainhas tendinosas e tendões (CROSS *et al.*, 2014; FIRESTEIN, 2017). Como consequência desses eventos inflamatórios, a AR leva a sérias limitações na qualidade de vida funcional de seus portadores, incluindo perda da capacidade laboral, de forma que os custos indiretos relacionados a essa circunstância devam ser adicionados as análises fármaco-econômicas que envolva essa patologia (SCHOELS *et al.*, 2010).

Com isso, modelos animais para pesquisas envolvendo processos inflamatórios articulares têm sido demonstrado como importante instrumento para o entendimento desses mecanismos celulares e moleculares, bem como para avaliação de novos tratamentos. Atualmente, vários modelos de inflamação articular em camundongos foram estabelecidos (BRAND, 2005), onde os mais utilizados são: (1) induzidos por colágeno; (2) induzidos por anticorpo contra colágeno; (3) induzidos por antígeno; e (4) induzidos por zymosan (ASQUITH *et al.*, 2009).

No primeiro modelo, a inflamação articular é induzida por colágeno após imunização com o colágeno do tipo II. As alterações patológicas incluem sinovite

com infiltração de células polimorfonucleares e mononucleares, formação de *pannus*, erosão de osso e cartilagem além de fibrose. Em ratos, a imunização com colágeno heterólogo tipo II geralmente leva a um forma de artrite. Em contraste, a imunização com colágeno autólogo resulta em um curso de doença mais prolongado (MALFAIT *et al.* 2001; BOISSIER *et al.* 1987; HOLMDAHL *et al.* 1986). Os sinais clínicos da doença costumam se desenvolver entre 21 e 25 dias após a inoculação inicial, se apresentando como poliartrite caracterizada por infiltrado inflamatório no líquido sinovial e cartilagem resultando em erosão óssea e hiperplasia sinovial. Esse modelo se torna semelhante a AR humana (MALFAIT *et al.* 2001; HOLMDAHL *et al.* 1986).

Já no segundo modelo, a inflamação é induzida por um anticorpo contra colágeno e ocorre através da transferência de soro de um animal imunizado para um receptor não imunizado. Assim como na artrite induzida por colágeno, os anticorpos IgG anti-colágeno tipo II são detectáveis (HOLMDAHL, 1986; ROWLEY, 2008).

O terceiro modelo desenvolve um processo inflamatório através de uma injeção intra-articular utilizando antígenos (BRACKERTZ *et al.*, 1977). O acometimento compreende uma inflamação imunomediada complexa seguida por respostas articulares mediadas por células T. No entanto, o modelo não reproduz a quebra endógena de tolerância que é típica da patogênese da AR, sendo essa, umas das limitações desse modelo nas pesquisas relacionadas com a AR (MAFFIA *et al.*, 2004).

Por último, há o modelo de indução da inflamação articular utilizando zymosan. O zymosan é um polissacarídeo que se liga a macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DC, do inglês "*dendritic cell*") e leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação do complemento através de via alternativa, resultando em uma artrite inflamatória proliferativa com infiltração de células mononucleares, sinovial hipertrofia e formação de *pannus* (KEYSTONE *et al.*, 1977).

É importante ressaltar que nenhum modelo experimental reproduz a patologia clínica em sua totalidade. Porém, esses modelos experimentais que permitem o estudo dos mecanismos subjacentes a essas condições inflamatórias e dolorosas têm grande relevância para que os processos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença sejam avaliados. Tais modelos têm promovido de forma significativa o entendimento dos mecanismos patológicos da artrite, contribuindo para avanços em diferentes modalidades de tratamentos (ASQUITH *et al.*, 2009). No

presente trabalho, o modelo de inflamação articular utilizado para verificar as respostas do tratamento com LBP foi o induzido por zymosan.

1.2 MODELO DE INDUÇÃO POR ZYMOZAN

Como descrito anteriormente, dentre os principais modelos experimentais de inflamação articular, o induzido por zymosan é capaz de produzir grave sinovite erosiva associada à hiperalgesia em modelos animais semelhantes às descritas na AR (KEYSTONE *et al.*, 1977; GEGOU *et al.* 1994; ROCHA *et al.*, 1999).

O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (organismo eucarioto pertencente ao reino dos Fungos), composto por manano e tendo o β -glucano como principal componente estrutural (DI CARLO, FIOERE, 1958; BROWN *et al.*, 2003). Devido a sua ação *in vitro*, o zymosan serve de modelo para avaliação de resposta imune inata, justamente por ser capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias além de ativar o complemento na ausência de imunoglobulinas (UNDERHILL *et al.* 1999, FEARON, AUSTEN, 1977).

O modelo de inflamação articular induzida por zymosan foi descrito pela primeira vez por Keystone e colaboradores em 1977 utilizando uma solução de zymosan intra-articular no joelho de camundongos, o que resultou em uma artrite inflamatória proliferativa com infiltrado de células mononucleares, hipertrofia sinovial além de formação de *pannus* articular. Adicionalmente, Keystone e col (1977) destacaram que o reconhecimento inicial do zymosan é mediado por receptores celular presentes na membrana celular de macrófagos conhecidos como receptores de reconhecimento padrão. Dentre esses receptores estão os semelhantes à *toll* (TLR do inglês, *toll-like receptor*) e uma família de lectinas do tipo-C (incluído aqui os receptores de manose, dectina-1 e dectina-2). Os receptores descritos como envolvidos com a resposta ao zymosan incluem o TLR2 e a dectina-1.

Os TLRs são uma família de proteína transmembrana, compostas de um domínio extracelular e um domínio citoplasmático homólogo ao domínio citoplasmático do receptor da interleucina 1 (IL-1). A ligação com esses receptores, induz a ativação de NF- κ B, além da produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-18, assim como a expressão da molécula co-estimuladora B7

(MEDZHITOV *et al*, 1997). Os ligantes de TLR2 incluem lipopeptídeos e peptidoglicanos, sendo um receptor para o zymosan, que atua em colaboração com CD14 e TLR6 (UNDERHILL *et al*, 1999; OZINSKY *et al*, 2000).

Frasneli e colaboradores (2005) examinaram o papel do TLR2 na resposta celular ao zymosan utilizando camundongos TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-}, observando que em ambos os grupos a artrite estava histologicamente presente, porém em camundongos TLR2^{-/-} houve redução significativa das fases inflamatórias precoce e tardia, indicando que um ligante que ativa a resposta imune inata através do TLR2 pode levar a uma reação inflamatória crônica local. Como a inflamação não foi totalmente bloqueada na ausência de TLR2, os autores sugeriram que, *in vivo*, a resposta inflamatória ao zymosan depende de outros receptores além do TLR2. Neste mesmo estudo, foi avaliada a expressão de TLR2 em sinoviócitos artríticos de camundongos no modelo de indução por zymosan, e a modulação da inflamação em animais TLR2^{-/-} sugerem que o TLR2 tem um papel geral na amplificação da inflamação local. Em 2003, Brown *et al*. demonstraram pela primeira vez que a resposta inflamatória ao zymosan e aos patógenos requer o reconhecimento também pela Dectina-1, um receptor específico, além dos TLRs.

A dectina-1 é um receptor de reconhecimento padrão que desempenha um papel importante na imunidade inata e se encontra em macrófagos, neutrófilos e DCs (BAUER *et al.*, 2008). É uma proteína transmembrana tipo II com um domínio de reconhecimento de carboidratos tipo C conectado à região transmembrana, seguido por uma cauda citoplasmática contendo um motivo de ativação à base de tirosina imunorreceptora. Quando β -glucanos se ligam a dectina-1, há uma indução de sinalização intracelular, com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de NF- κ B, e subsequente secreção de citocinas pró-inflamatórias (BROWN *et al.*, 2003) (GROSS *et al.*, 2006; DENNEHY, BROWN, 2007).

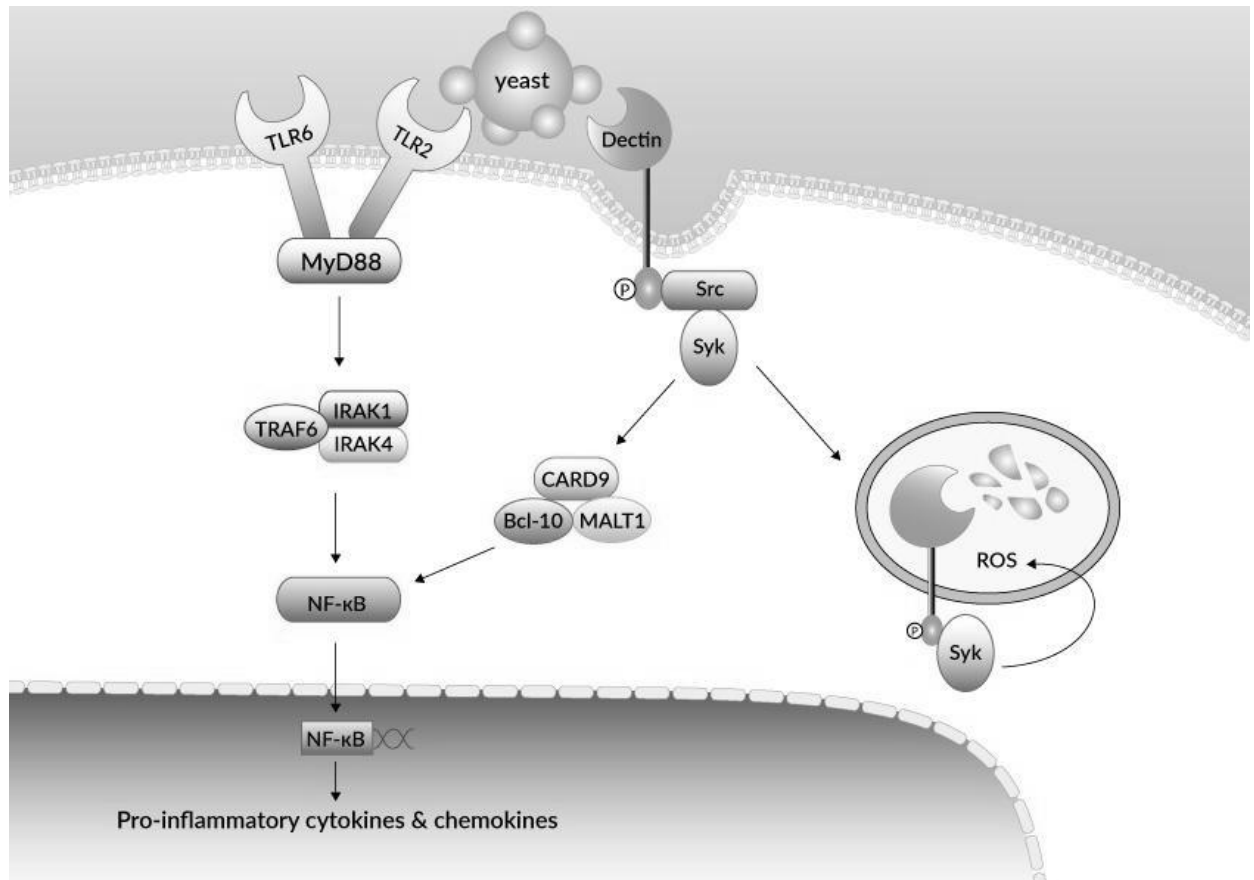


Figura 1. Representação esquemática dos receptores de membrana TLR2 e dectina-1. Ao se ligarem ao zimosan, desencadeiam vias de sinalizações intracelulares que culminam na ativação do NF-κB. NF-κB participa ativamente da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. *Fonte: Invivogen, 2008.*

Um estudo feito por Frasnelli e colaboradores (2005) demonstrou que o modelo de inflamação articular induzido por zimosan descrito por Keystone e colaboradores (1977) é bifásico, compreendendo duas fases: uma fase inicial por volta do 3º dia, perdurando até o 7º dia com conseqüente diminuição da inflamação e outra tardia com pico em torno do 14º dia, persistindo até o 25º dia. A fase tardia descrita pode indicar uma natureza crônica desse modelo de inflamação (figura 2).

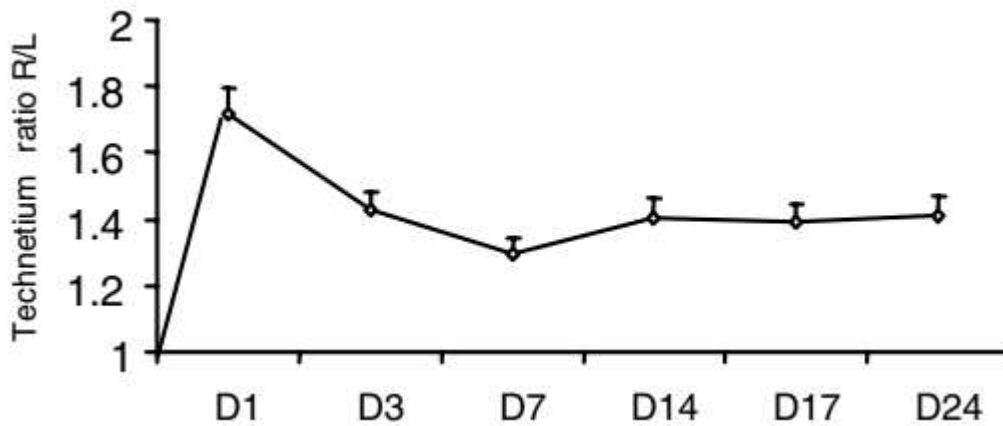


Figura 2. Gráfico demonstrando cinética bifásica da inflamação articular induzida por zymosan (quantificação isotópica da inflamação das articulações *in vivo*). Solução contendo zymosan foi injetada em joelho direito de camundongos, enquanto no joelho esquerdo foi injetada solução contendo PBS, utilizado como controle contralateral. Os valores obtidos correspondem à razão entre os joelhos direitos e esquerdos (n = 15). A severidade dos sinais histológicos de artrite foi avaliada pela pontuação da espessura sinovial e destruição da cartilagem em uma escala de 0 a 6. Fonte: FRASNELLI, M. E. *et al.* 2005.

O aumento da permeabilidade vascular, presença de edema e influxo celular inflamatório para a cavidade articular caracteriza a fase aguda da inflamação induzida por zymosan. Em seguida, ocorre progressiva sinovite, com infiltrado de células polimorfonucleares e ativação dos fibroblastos, assemelhando-se à sinovite reumatóide crônica (*pannus* reumatóide) (GEGOUT *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 2003). A interação entre componentes do sistema imune, como linfócitos e monócitos, e os sinoviócitos que também interagem entre si, desencadeiam a produção de mediadores inflamatórios e uma alta produção de metaloproteinases, culminando na degeneração de estruturas como cartilagem, osso e tecidos adjacentes (TRAWITZKI *et al.*, 2016).

Estudos recentes com o modelo de artrite induzida por zymosan trouxeram novas informações à cerca da resposta imunológica que envolve esse composto, mostrando que além da resposta desencadeada pelo zymosan estar ligada a fagocitose mediada por receptores de superfície que resulta na ativação de NF- κ B e consequente produção de citocinas inflamatórias, o zymosan também seria capaz de desenvolver respostas imunes adaptativas pela maturação de DCs e estimulação de interleucina-2 (IL-2), uma proteína que regula a atividade de células leucócitos, culminando na migração de DCs maduras para os linfonodos mais próximos a área sensibilizadas, induzindo a ativação de linfócitos T, auxiliando na resolução do

processo inflamatório articular (KARUMUTHIL-MELETHIL *et al*, 2015; GRANUCCI *et al*, 2003).

A principal limitação desse modelo é a natureza monoartrítica da doença, por isso, o modelo impede a avaliação de componentes sistêmicos dessa patologia. Apesar das limitações, os modelos experimentais animais podem fornecer informações valiosas acerca da patogênese da artrite. Esse modelo utilizado para representar a artrite reumatoide não autoimunes permitem descrever o processo inflamatório articular, bem como a formação de edema na articulação, limitação articular, migração de leucócitos e suas consequências (PENIDO *et al*. 2006).

1.3 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DA ARTRITE

Os tratamentos disponibilizados para a artrite atualmente têm como principal objetivo prevenir e/ou controlar a lesão articular, a dor, bem como a perda de função, melhorando a qualidade de vida do paciente (BÉRTOLO *et al*, 2007). Os principais tratamentos das artrites são baseados na utilização de glicocorticoides (GCs), medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) e drogas imunossupressoras que são administradas sozinhas ou em combinação (SMOLEN *et al.*, 2017). Considerando a AR, a grande maioria dos doentes acometidos (entre 25 e 75%) é tratada com GCs de forma contínua ou não. Estudos mais recentes levam a acreditar num importante potencial de modificação da doença com baixas doses de GCs, o que leva a comunidade médico-científica a um debate sobre a relação entre o risco e o benefício deste tratamento e o cuidado sobre a gestão da terapia de GCs em doenças reumáticas (RUDOLF *et al.*, 2009; BIJLSMA *et al.*, 2003; KIRWAN *et al.* 2007).

Os AINES são largamente utilizados em doenças reumáticas sejam elas inflamatórias ou não; porém esses fármacos não modificam o processo da doença e muitas recomendações têm sido feitas no intuito de diminuir o uso desses fármacos devido sua toxicidade (RUDOLF *et al.*, 2009; HEIBERG, 2002). Já os DMARDs são amplamente utilizados como base do tratamento da AR, e sua utilização sofreu muitas alterações ao longo dos últimos anos a fim de oferecer uma terapêutica mais eficaz desta doença. São fármacos que tem a capacidade de interferir diretamente nas células do sistema imune e/ou reduzirem a inflamação, além de aliviarem os

sintomas e são largamente capazes de postergar ou parar a progressão da AR (WOOD, 2004; KEMPER, 2012). Dentre os principais efeitos adversos associados ao uso terapêutico desses fármacos estão aqueles associados fortemente com a sua dose diária e cumulativa, repercutindo em outras patologias como a osteoporose, eventos cardiovasculares, susceptibilidade a infecções, efeitos metabólicos entre outros (PEREIRA; DE CARVALHO; CANALIS, 2010; ROGLER, 2010).

Se tratando de drogas imunossupressoras há o risco do surgimento e/ou do agravamento de infecções agudas ou crônicas ou ainda, de reativar infecções latentes, com efeitos prejudiciais para o paciente (WALSH & GRAVALLESE, 2004; HAROON & INMAN, 2009). Na prática clínica a sua utilização tem sido associada à ocorrência de alguns efeitos adversos graves além dos custos consideráveis (KUKAR, et al, 2009).

Com o intuito de evitar ou pelo menos reduzir os efeitos colaterais, novas terapias têm sido amplamente investigadas. Um método de tratamento promissor é o uso do LBP, que surge como tratamento alternativo, não invasivo e com propriedades anti-inflamatórias já descritas (ANTUNES *et al.*, 2007; TIM *et al.*, 2016). Nosso grupo de pesquisa tem investigado, em diferentes modelos experimentais de inflamação, os mecanismos moleculares e celulares em resposta a utilização desse tipo de terapia. Em estudos prévios foram observados redução do infiltrado inflamatório devido a morte celular das células inflamatórias, aumentando a velocidade de resolução da inflamação (DOS ANJOS *et al.*, 2017; 2018; 2019). Adicionalmente, outros estudos corroboram com nossos achados, descrevendo a diminuição de células mononucleares inflamatórias, exsudato proteico, hemorragiamedular, hiperemia e a necrose (ALVES *et al.*, 2013) e a eficácia na diminuição do nível de prostaglandina-2 (CASTANO *et al.*, 2007).

1.4 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O termo LASER é uma sigla para *Light Amplification by Emission of Radiation* (Amplificação da Luz pela Emissão Estimulada da Radiação) onde a onda eletromagnética é gerada a partir da excitação dos elementos constituintes do meio ativo (sólido, líquido ou gasoso) por uma fonte externa de energia, como por

exemplo, corrente elétrica. Os fótons gerados são capazes de estimular a emissão de outros fótons, gerando assim o princípio da emissão estimulada (KITCHEN, 2003).

Os lasers de baixa potência mais utilizados são os que compreendem uma faixa de espectro que varia entre o visível e o infravermelho, com ênfase para os com meio ativo gasoso de Hélio-Neônio (He-Ne) na faixa visível (vermelho) e os com diodos ou semicondutores de Arseneto de gálio (Ga-As) e Arseneto de gálio e alumínio (GaAl-As), com emissão na faixa do vermelho e infravermelho. A chamada “janela terapêutica” para tecidos biológicos geralmente compreende o intervalo espectral de 630 e 940nm (KITCHEN, 2003).

As ondas eletromagnéticas são organizadas de acordo com a frequência e o comprimento de onda. Essa organização é conhecida como espectro eletromagnético (figura 3) (BAXTER *et al*, 1994).

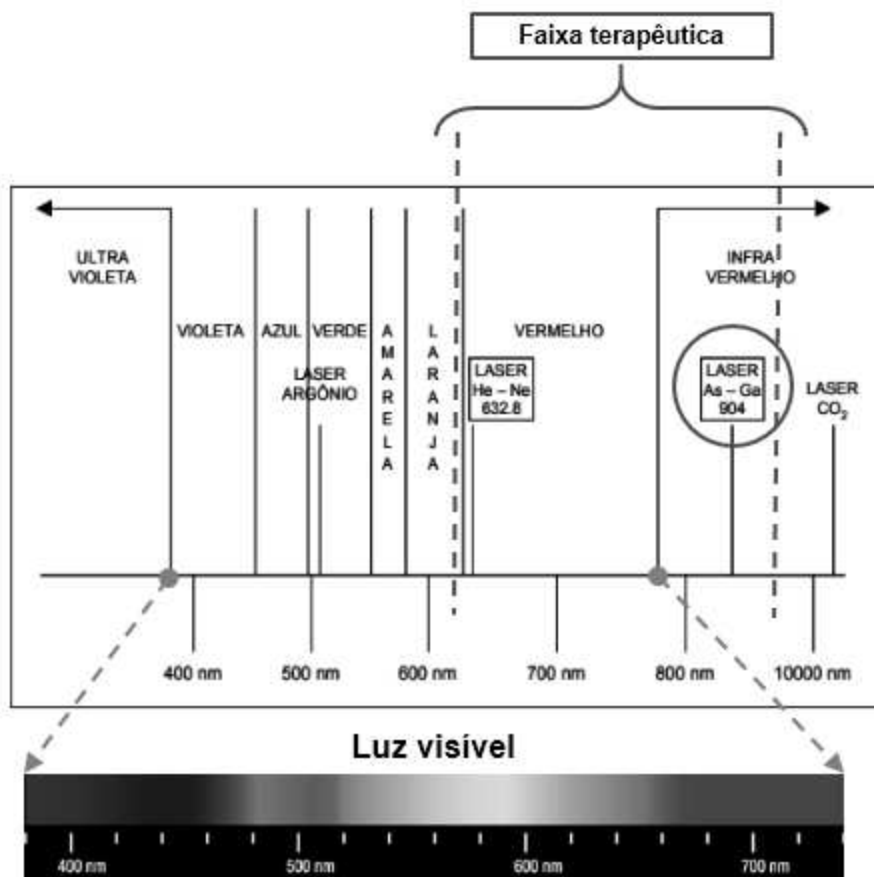


Figura 3. Representação ilustrativa dos principais tipos de lasers e seus comprimentos de onda.

Fonte: VEÇOSO, 1993, adaptado.

As radiações emitidas pelos lasers possuem algumas características específicas (figura 4) que as caracterizam e as diferenciam das radiações emitidas por fontes ordinárias de radiações como (GUIRRO E GUIRRO 2004; ALBERTINE, 2002):

- Monocromaticidade - cor única resultante de um único comprimento de onda ou única frequência;
- Colimação/Direcionalidade - é a direção dos fótons em um único sentido;
- Coerência da emissão - ocorre devido ao alinhamento das ondas eletromagnéticas no tempo e no espaço.



Figura 4. Representação ilustrativa das características específicas do laser. *Fonte: Próprio autor*

Estruturalmente, o laser conta com uma cavidade óptica, também conhecida como cavidade de ressonância, que é formada por dois espelhos paralelos acomodados nas extremidades da cavidade óptica, entre os quais fica localizado o meio emissor (ou meio ativo). Tais espelhos têm como função, refletir os fótons emitidos pelo meio emissor, o que permite múltiplas passagens de ida e volta ao longo do meio ativo, o que amplifica o campo eletromagnético na cavidade, e conseqüentemente, a radiação emitida. Um dos espelhos apresenta característica semirreflexiva, semitransparente ou apresenta um orifício permitindo a saída da radiação do sistema através de um feixe de radiação único (figura 5) (YUNG, 1998; GENEVESE, 2000).

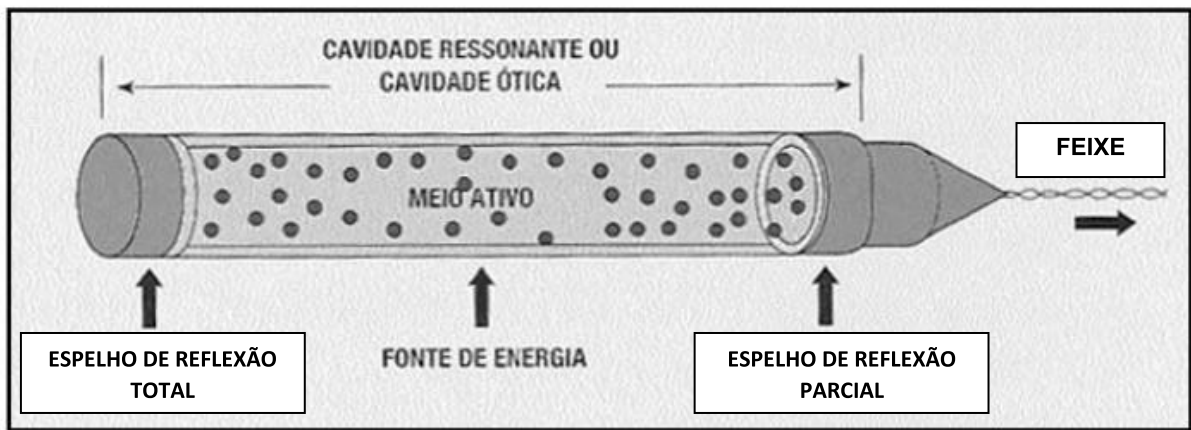


Figura 5. Estrutura interna do laser. *Fonte:* Genovese, 2000, adaptado.

A irradiância ou densidade de potência é uma medida da potência da radiação eletromagnética por unidade de área e é dada em W/m^2 ou W/cm^2 . Na prática, corresponde à intensidade da luz. Já a fluência (ou densidade de energia ou dose) é a energia total transmitida por um feixe do laser por unidade de área e é dada em $J.m^{-2}$ ou $J.cm^{-2}$ no caso específico das aplicações biomédicas (TUNER; HODE, 1999; FISCHER, 1991).

É importante ressaltar que tanto o comprimento de onda da luz laser como a fluência dependem do meio ativo do laser. Variações na densidade de potência e no tempo de exposição condicionam diferentes efeitos nos tecidos (GUIRRO E WEISS, 2009).

1.4.1 INTERAÇÃO COM TECIDO BIOLÓGICO

A ação do laser de baixa potência ocorre através da absorção da luz pelas células, que por sua vez induz a reações bioquímicas e ao aumento da atividade mitocondrial, o que pode acarretar em aceleração da síntese de DNA, RNA e proteínas regulatórias do ciclo celular. Esses eventos culminam em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, conhecidos como “ROS” (do inglês *Reactive Oxygen Species*). Acredita-se que as ROS possam causar danos subletais e/ou irreversíveis no DNA (FONSECA *et al.*, 2015. SÉRGIO *et al.*, 2012).

A citocromo c oxidase (polipeptídeo do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial) é um cromóforo, principal fotoceptor e por tanto, com capacidade de absorver luz irradiada em determinado comprimento de onda (KARU *et al.* 2008;

SANTANA-BLANK *et al.*,2010), tendo sua atividade enzimática aumentada após a absorção da radiação emitida por um laser de baixa potência, assim como a síntese de ATP (YU *et al.*,1997; SANTANA-BLANK *et al.*,2010, CHEN *et al.*, 2011).

Após absorção dos fótons provenientes da irradiação com laser de baixa potência pelo citocromo c oxidase, pode ocorrer alteração nas propriedades oxidativas de alguns componentes da cadeia respiratória mitocondrial. São essas alterações as responsáveis pelo aumento da produção de ROS, íons de cálcio além de mudanças do potencial elétrico da membrana mitocondrial, culminando em alterações dos parâmetros homeostáticos celulares (pHi, [Ca²⁺], [cAMP], Eh, [ATP]) (KARU *et al.*, 2008).

A bioestimulação ocorre quando a radiação do laser é absorvida pelo o citocromo c oxidase, e parece competir com inibidores deste fotoceptor na sua ativação enzimática (WONG-RILEY *et al.*, 2005), resultando em aumento da sua atividade, aumento da produção de ATP, e maior atividade metabólica, o que está intimamente ligado a proliferação e diferenciação celular, em virtude do aumento na expressão de fatores sensíveis ao estado redox celular, como NFKB (do inglês “*nuclear factor kappa B*”, um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição) ou as proteínas da família da SRC quinases (KARU, 1999), que são importantes para a proliferação, migração, ancoragem e sobrevivência celular (PARSONS & PARSONS, 2004).

O tipo de resposta celular e tecidual ao laser está diretamente relacionado com o comprimento de onda, a dose e a intensidade da luz utilizada (GUIRRO E WEISS, 2009). Uma parábola pode representar os efeitos do laser de baixa potência em células animais devido a percepção de uma resposta bifásica (WANG *et al.* 2014), que pode ser explicada pela “Lei de Arndt-Schulz”, onde um fraco estímulo acelera ligeiramente uma atividade, enquanto estímulos mais fortes aumentam ainda mais essa atividade até que um pico seja alcançado e um estímulo acima desse limiar pode suprimir a atividade, conforme mostra a figura 6 (MARTIUS, 1923). Ainda de acordo com essas respostas celulares bifásicas, Wang e colaboradores (2014) afirmam que os efeitos estimulantes do laser sobre a célula são gradativamente diminuídos diante do aumento da energia utilizada e, quando o limiar é atingido, surgem os efeitos inibitórios sobre a célula. Sendo assim, uma irradiância insuficiente ou um tempo muito curto de irradiação, pode não interferir na resposta

celular; e por outro lado, irradiância muito alta ou longo tempo de irradiação podem gerar respostas inibitórias.

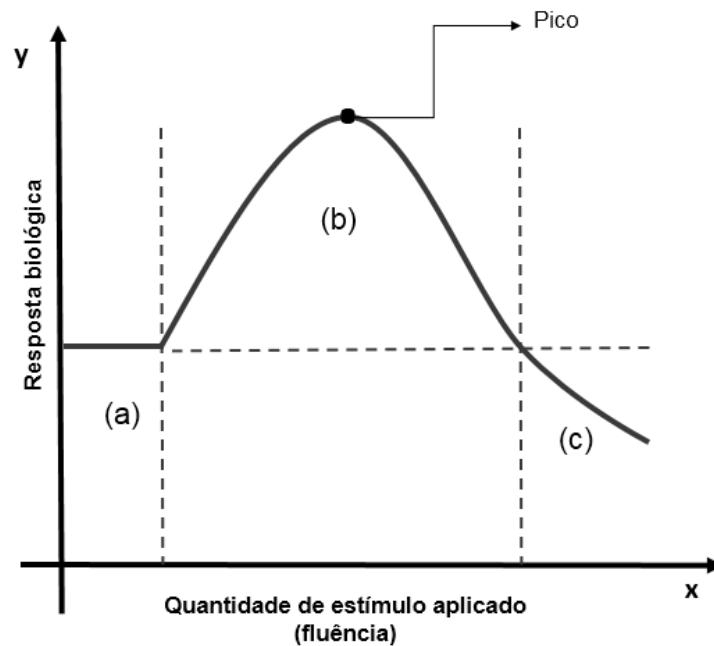


Figura 6. Esquemática da lei de Arndt-Schultz, onde (a) representa o repouso, (b) a bioestimulação e (c) a bioinibição. *Fonte: Próprio autor*

No que se refere aos resultados bioestimulantes e anti-inflamatórios do LBP, diversas respostas celulares e teciduais já foram descritas, dentre elas:

- Diminuição na expressão do gene que codifica a ciclooxygenase - 2 (COX - 2), a qual participa da síntese de eicosanoides, incluindo as prostaglandinas mediadoras da dor (ALBERTINI *et al.*, 2008; DE LIMA *et al.*, 2011).
- Inibição do aparecimento de fatores quimiotáticos nas fases iniciais dos processos inflamatórios, interferindo diretamente nos efeitos dos mediadores químicos induzidos pela inflamação, além de dificultar a síntese das prostaglandinas (LOPES, 2008).
- Alteração da expressão de gene e proteínas relacionadas à morte celular por apoptose, incluindo caspases-3 e -6, Bcl-2 e BAX, seletivamente nas células polimorfonucleadas; consequentemente, o LBP é capaz de acelerar a resolução

do processo inflamatório (HUANG *et al.*, 2011; DOS ANJOS *et al.*, 2017; SERGIO *et al.*, 2018a, 2018b).

- Diminuição da ativação do fator de transcrição de NFκB e citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 Beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interferon gama (IFN-γ) (DOS ANJOS *et al.*, 2018; KARU, 1999; PARSONS & PARSONS, 2004).
- Aumento na liberação de interleucina 10 (IL-10), a qual possui propriedade anti-inflamatória (PIRES *et al.*, 2011; BASSO *et al.*, 2013, DOS ANJOS *et al.*, 2018).
- Aumento da microcirculação através da alteração de pressão hidrostática, e os efeitos anti-inflamatórios podem ocorrer devido a reabsorção do edema e posterior eliminação do acúmulo de metabólitos intermediários da inflamação (SILVA *et al.*, 2010).
- Alteração das populações de células que apresentam antígenos, linfócitos e células Treg expressando CD25 (receptor de IL-2) em níveis elevados no linfonodo proximal à inflamação (DOS ANJOS *et al.*, 2018).
- Aumentada produção de mucopolissacarídeos, substância responsável por manter a integridade da cartilagem; também aumenta a produção de proteínas de choque preservadoras dos condrócitos da cartilagem sinovial, de forma a melhorar as características histopatológicas da cartilagem (HAAPALA *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2006).
- Indução da apoptose de polimorfonucleados possivelmente pela alteração do equilíbrio entre a expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX e p53) e anti-apoptóticas (Bcl-2) nessas células (DOS ANJOS *et al.*, 2017).
- Aumento da atividade quimiotática e fagocitária de leucócitos humanos *in vitro* (TADAKUMA, 1999).

Deste modo, é possível perceber que o LBP, não possui efeito curativo, mas pode atuar como adjuvante na resposta à inflamação e importante agente antiálgico, desencadeando em redução do edema e diminuição da dor, além de auxiliar de maneira importante o processo de reparo tecidual da região lesionada mediante a bioestimulação celular (MALUF *et al.*, 2006).

Um estudo recente feito pelo nosso grupo de pesquisa descreveu, pela primeira vez, a presença de células T-regno glânglio linfático após irradiação com LBP na articulação inflamada, além de ter demonstrado taxas mais altas de células

T-reg CD8+ com maior expressão de CD25 (receptor de IL-2) um marcador de destaque para sua característica reguladora (DOS ANJOS *et al.*, 2018).

Os últimos estudos do nosso grupo de pesquisa, através da utilização de diferentes modelos experimentais de inflamação induzida, têm demonstrando a importância de se avaliar os parâmetros físicos do LBP (comprimento de onda, potencia, fluências, modo de emissão da luz, etc.), já que diferentes condições de irradiação geram diferentes tipos de respostas celulares. Adicionalmente, em outros trabalhos, foram observados que as células que compõem a região ao redor do infiltrado inflamatório são capazes de responder a irradiação de forma diferente das células polimorfonucleares (DOS ANJOS *et al.*, 2017; SERGIO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*; 2019) e esses achados podem ser de grande importância no papel anti-inflamatório do LBP. Com isso, faz-se necessário avaliar em mais detalhes a ação do LBP na inflamação articular induzida e seu papel modulador e seletivo nas células inflamatórias.

2 OBJETIVO

Comparar o efeito de diferentes fluências ($3\text{J}/\text{cm}^2$ e $30\text{J}/\text{cm}^2$) e diferentes tempos de tratamento (24, 48h e 72h) com laser infravermelho de baixa potência na resolução do processo inflamatório em modelo experimental induzido por zymosan.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram usados sessenta camundongos C57BL/6, machos entre 8 e 10 semanas de idade, pesando entre 24 e 28g cada um, sendo seguidas as diretrizes éticas do Comitê de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo 002/2019). Os animais puderam deslocar-se livremente nas gaiolas com água e dieta livre, em temperatura de 25°C com ciclos controlados de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.

Os animais experimentais foram distribuídos aleatoriamente em 12 grupos (n=5) conforme demonstrado na tabela 1. Todos os tratamentos tiveram início 5h após a indução da artrite induzida por zymosan, tempo necessário para a presença do processo inflamatório, como demonstrado em estudo anterior (DOS ANJOS *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Distribuição dos animais em 12 grupos experimentais (n=5).

Tratamentos	Grupos eutanasiados após 24h	Grupos eutanasiados após 48h	Grupos eutanasiados após 72h
Artrite induzida (controle)	ZY/24h	ZY/48h	ZY/72h
Artrite induzida e tratada com dexametasona	D/24h	D/48h	D/72h
Artrite induzida e tratados com laser 3J/cm ²	ZY/3/24h	ZY/3/48h	ZY/3/72h
Artrite induzida e tratados com laser 30J/cm ²	Zy/30/24h	Zy/30/48h	Zy/30/72h

3.2 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Neste estudo foi utilizado o modelo de artrite induzido por zymosan que se caracteriza por uma monoartrite, ou seja, a reação inflamatória articular restrita a articulação onde este fármaco é aplicado. A solução foi preparada segundo a técnica utilizada por Dimitrova e colaboradores (2010), a partir de 180µg de zymosan (*Sigma Chemical Company*, St. Louis, MO, USA) diluído em 10µL de solução tampão de fosfato estéril (PBS), injetada próximo a região talo crural e subtalar (direita e esquerda) dos membros posteriores dos camundongos conforme demonstra a figura 5. Todos os tratamentos (com laser de baixa potência ou dexametasona) foram iniciados 5 horas após a administração da solução contendo zymosan, conforme padronizado anteriormente (DOS ANJOS *et al.*, 2019).



Figura 7 - Administração de Zymosan próximo a região da articulação talo crural e subtalar. Fonte: DOS ANJOS, L. M. J. Efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência na artrite induzida por zymosan. 2019. 72f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

3.3 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

O tratamento à base de corticosteroide, comumente aplicado no controle de artrite reumatoide (SMOLEN *et al.*, 2017), foi realizado com solução de Dexametasona (Aché Laboratório Farmacêutico, Brasil), intraperitonealmente, na dose de 4mg/kg, a fim de se obter um quadro comparativo entre este e os tratamentos realizados com o laser de baixa potência.

3.4 EXPOSIÇÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (LBP)

Para o tratamento com LBP, foi utilizado o laser infravermelho de baixa potência (AlGaAs – *Aluminum Gallium Arsenide*, *HTM Laser Compact*, HTM Indústria de Equipamentos Eletroeletrônicos Ltda. /Brasil) e seus parâmetros físicos e métodos de aplicação estão descritos na tabela 2. Os animais foram imobilizados utilizando um tubo falcon adaptado, para que a irradiação fosse aplicada perpendicularmente a articulação do tornozelo.

Tabela 2-Parâmetros físicos do laser de baixa potência.

Comprimento de onda	830 nm
Laser diodo	AlGaAs
Potência	10mW
Área irradiada	0,05 cm ²
Energia por ponto	150 e 1500mJ
Fluências	3 e 30 Jcm ²
Tempo de irradiação	15 e 150s
Número de pontos irradiados	1
Técnica de aplicação	Pontual
Modo de emissão da luz	Contínua

3.5 EUTANÁSIA

Vinte quatro horas após o tratamento, os animais de cada grupo camundongos foram eutanasiados utilizando uma solução cloridrato de quetamina e cloridrato de xylazina aplicada intraperitonealmente, conforme aprovado previamente pelo Comitê de Experimentação Animal e conforme disposto pela Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal(MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, 2018).

Após a eutanásia dos animais, as articulações talocrural de ambos os membros posteriores foram dissecadas e lavadas em solução tampão de fosfato estéril (PBS) para retirada do excesso de sangue. Durante a dissecação, a pele e as falanges foram retiradas preservando o tendão calcâneo. Em seguida, os membros posteriores direitos foram fixados em solução de paraformaldeído tamponado 4%, pH 7,4 durante 24h e encaminhados para procedimento de técnicas histológicas de rotineiras, enquanto os membros posteriores esquerdos foram macerados utilizando nitrogênio líquido e acondicionada em recipientes individuais identificados contendo trizol para técnica de extração de RNA para análises futuras.

3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para a análise morfológica, as patas direitas, foram previamente fixadas em paraformaldeído tamponado 4%, com pH de 7,3 durante 24h e posteriormente lavadas e acondicionadas em solução de ácido nítrico 5% por 72h afim de que o material ósseo das patas fosse descalcificado possibilitando um melhor processamento histológico e conseqüentemente, melhor análise do tecido. Posteriormente as amostras foram lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes longitudinais com 4 μ m de espessura, os quais foram desparafinados e hidratados e corados com hematoxilina e eosina (H&E).

A análise morfológica e quantitativa foi realizada no microscópio Olympus (BX53F), equipado com as objetivas U-PlanFLN 4/0.13, 10/0.30, 40/0.75 e 100/0.85. As imagens foram capturadas pela câmera OlympusDP73, usando o *software* CellSens Imaging (versão 5.1, Olympus, EUA). Para análise quantitativa da área do infiltrado foi utilizada a captura de imagens na objetiva 4/0.13 e o software citado anteriormente.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada aplicando o teste de variância One-Way Anova seguido do teste de Tukey de múltiplas comparações, utilizando o software GraphPad Prism (versão 5

para Windows 8, GraphPad Software, EUA). A significância estatística foi considerada como $p < 0,05$.

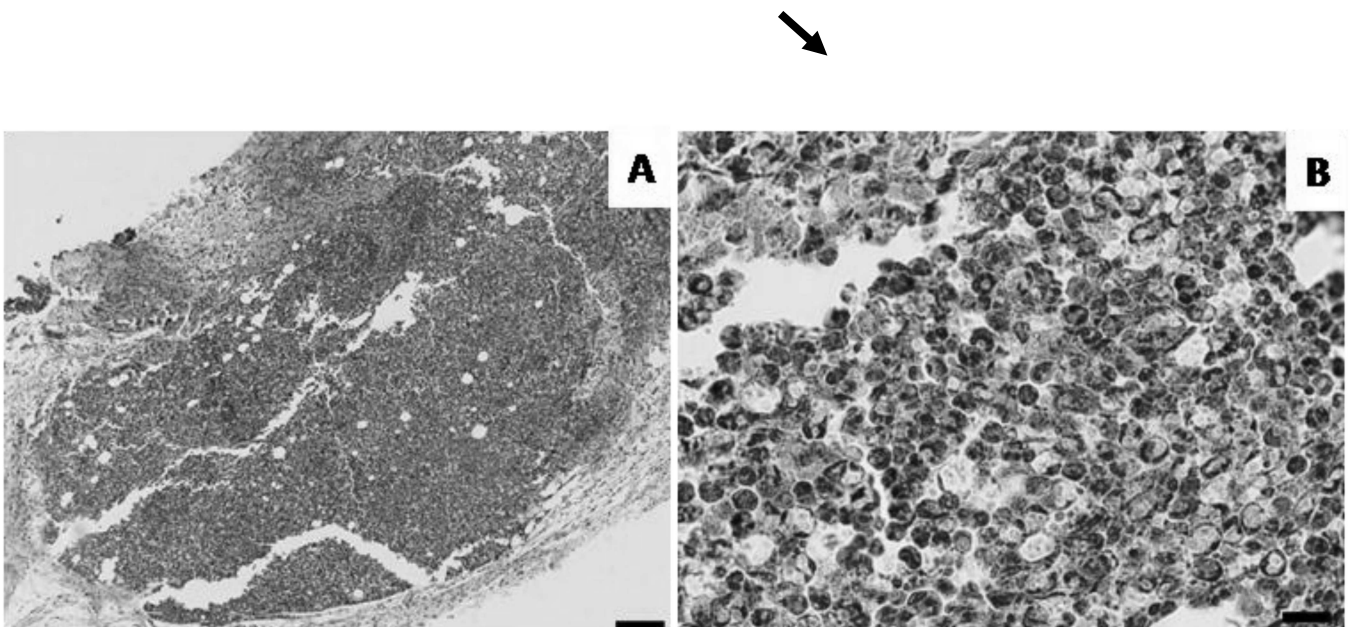
4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Cinco horas após a administração do zymosan foram constatados leves sinais clínicos de inflamação na região talocrural e subtalar, como edema e rubor em todos os animais. A partir disso, foram iniciados os tratamentos com as duas fluências de LBP e com a dexametasona.

A análise morfológica da região articular demonstrou um grande influxo de células inflamatórias, predominantemente de neutrófilos no tecido conjuntivo periarticular, conforme demonstrado na figura 8.

Figura 8. Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular 24 horas após indução por zymosan (**A**) e presença de células polimorfonucleares, em especial neutrófilos (**B**). Seta aponta neutrófilos. Barras: **A** = 100 μm ; **B** = 10 μm .



Após 24h do primeiro tratamento, todos os grupos demonstraram um intenso infiltrado inflamatório na região de tecido conjuntivo adjacente, conforme ilustrado na figura 9. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre os

grupos tratados quando comparados com o grupo ZY/24h ($p>0,05$), foi observado uma tendência para diminuição da área do infiltrado no grupo D/24h.

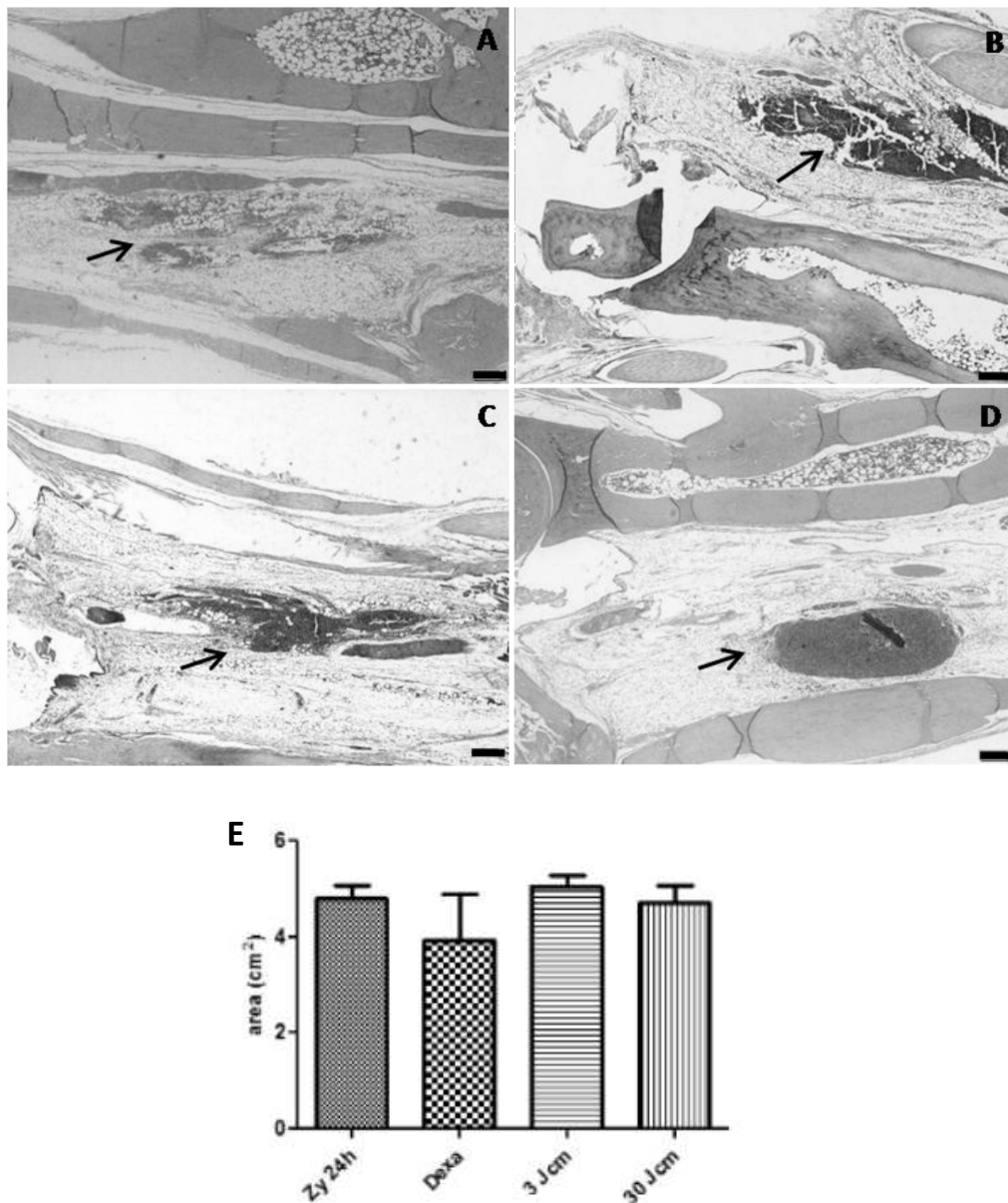


Figura 9 - Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular induzido por zymosan. Um intenso infiltrado inflamatório na região de tecido conjuntivo adjacente (setas) pode ser observado após **24h** de tratamento. **A** –ZY/24h(Artrite induzida); **B**–D/24h (artrite induzida e tratada com dexametasona); **C** –ZY/3/24h(artrite induzida e tratada com laser 3 J/cm²); **D**–ZY/30/24h(artrite induzida e tratada com laser 30 J/cm²); **E** – quantificação da área do infiltrado inflamatório (cm²). Barra = 200 µm.

Após 48 horas do início do tratamento, o infiltrado inflamatório também foi observado em todos os grupos (Figura 10), em destaque para o grupo ZY/48h, onde foi observado um leve aumento da área do infiltrado inflamatório quando comparado

ao grupo ZY/24h. A análise quantitativa da área do infiltrado demonstrou que os grupos D/48h e ZY/30/48h começaram a esboçar redução na área inflamatória, apesar de não demonstrar diferenças estatísticas ($p>0,05$).

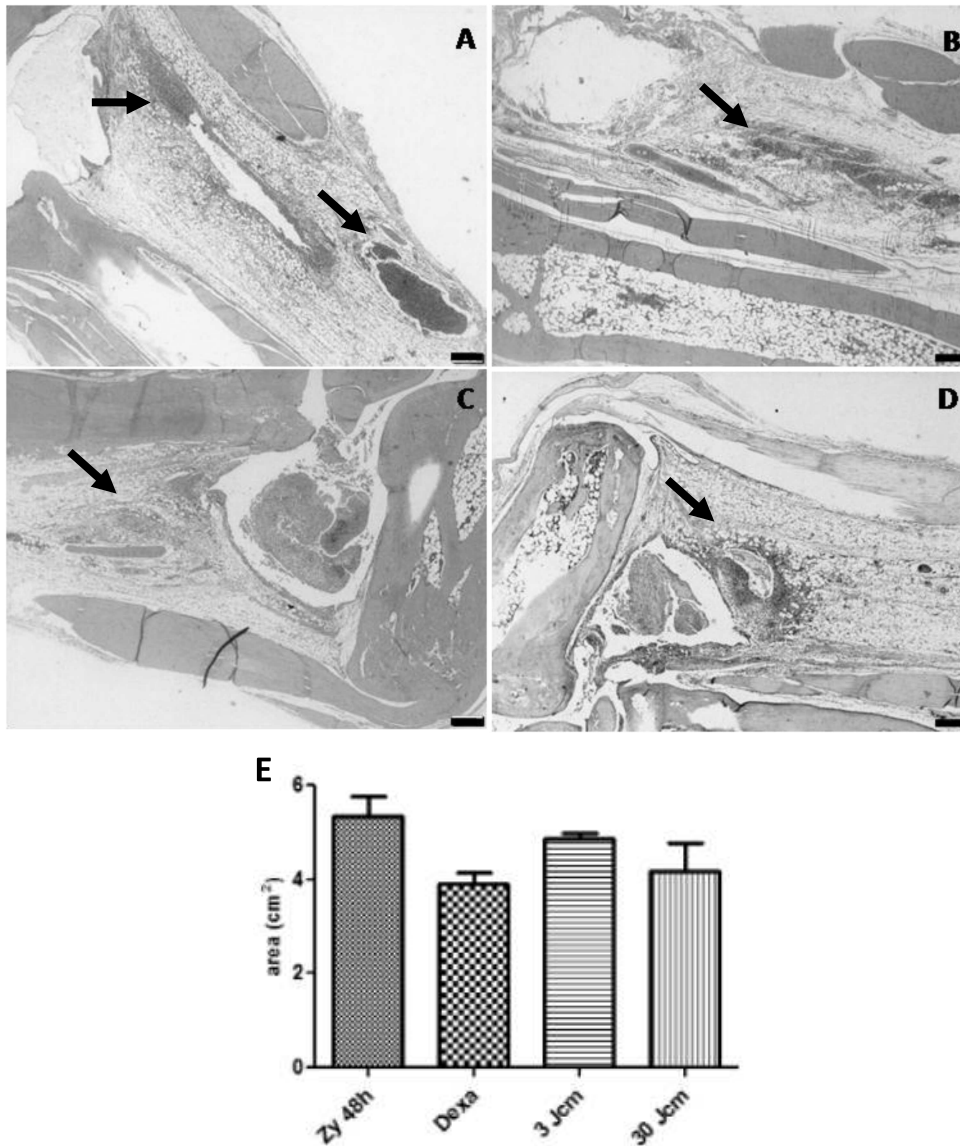


Figura 10 - Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular induzido por zymosan. A presença do infiltrado inflamatório na região de tecido conjuntivo adjacente (setas) ainda pode ser observada após **48h** de tratamento. **A** –ZY/48h(Artrite induzida); **B** – D/48h (artrite induzida e tratada com dexametasona); **C** –ZY/3/48h(artrite induzida e tratada com laser 3 J/cm²); **D** – ZY/30/48h(artrite induzida e tratada com laser 30 J/cm²); **E** – quantificação da área do infiltrado inflamatório (cm²). **Barra** = 200 µm.

Na figura 11 pode-se observar uma menor área do infiltrado inflamatório para os grupos D/72h (Figura 11B) e para o grupo ZY/30/72h (Figura 11D), que foi confirmada após a sua quantificação (Figura 11E). Entretanto, esse fato somente indica uma tendência para diminuição já que não foram observadas diferenças estatísticas quando comparados com o grupo ZY/72h. Já o grupo ZY/3/72h, a área do infiltrado permanece semelhante a área do grupo não tratado.

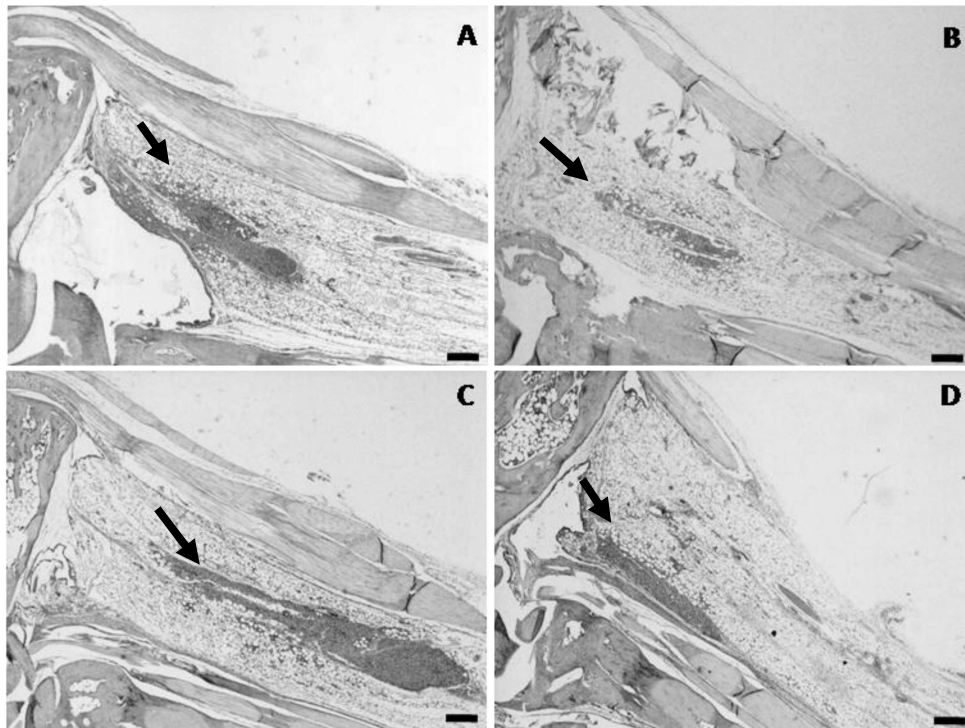


Figura 11 - Imagens histológicas representativas do processo inflamatório articular induzido por zymosan. A presença do infiltrado inflamatório na região de tecido conjuntivo adjacente (setas) possui tendência a diminuição após **72h** de tratamentos, especialmente nos grupos tratados dexametasona e laser de baixa potência na dose de 30 J/cm^2 **A** –ZY/72h(Artrite induzida); **B** – D/72h (artrite induzida e tratada com dexametasona); **C** –ZY/3/72h(artrite induzida e tratada com laser 3 J/cm^2); **D** – ZY/30/72h(artrite induzida e tratada com laser 30 J/cm^2); **E** – quantificação da área do infiltrado inflamatório. Barra = $200 \mu\text{m}$.

Ao analisar os grupos nos tres tempos de tratamentos em conjunto, foi observado que após 48h, o grupo ZY teve um leve aumento na sua área inflamatória, o que pode indicar o ápice do processo inflamatório nesse modelo experimental. Apesar de nenhuma diferença estatística significativa tenha sido observada, pode-se notar que os dois tratamentos mencionado anteriormente possuem comportamentos semelhantes na resolução do processo inflamatório.

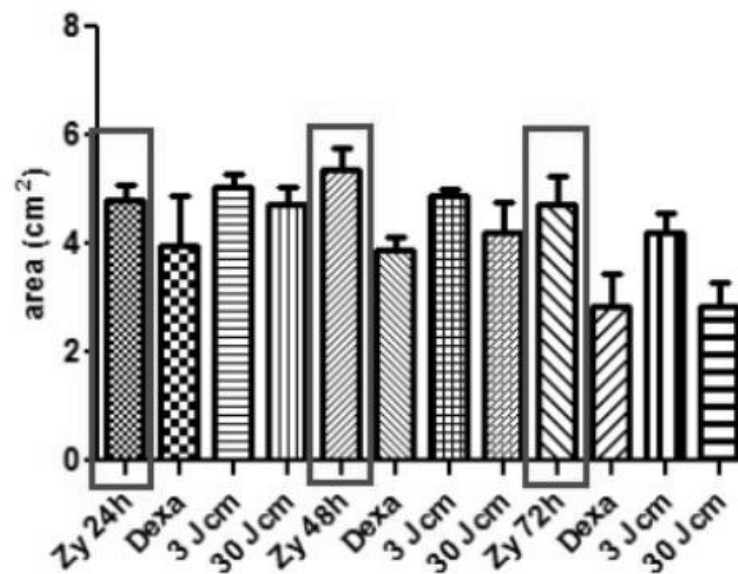


Figura 12– Gráfico das médias das áreas dos infiltrados inflamatórios (cm²) agrupados por tempo de tratamento a) 24 horas; b) 48 horas c) 72 horas. **ZY**- Artrite induzida (controle); **Dexa** - grupos tratados com dexametasona; **3 J/cm²** – grupos tratados com laser de baixa potência na dose de 3Jcm²; **30 J/cm²** – grupos tratados com laser de baixa potência na dose de 30 Jcm².

4 DISCUSSÃO

A existência de inflamação crônica e degenerativa das articulações é características da artrite (PINHEIRO, 2015). Nesse contexto, é verificado o acometimento de pequenas e grandes articulações periféricas com comprometimento da membrana sinovial, diminuindo a capacidade funcional do indivíduo (NAGAYOSHI *et al.*, 2018). Dentre os principais modelos experimentais, o induzido por zymosan é capaz de produzir sintomatologia parecida com a descrita na artrite reumatóide (KEYSTONE *et al.*, 1977; GEGOU *et al.* 1994; ROCHA *et al.*, 1999).

A análise morfológica demonstrou que o modelo experimental de indução de inflamação articular por zymosan funcionou, com intensa presença de células inflamatórias polimorfonucleares no tecido conjuntivo adjacente das articulações talocrural e subtalar corroborando com estudos encontrados na literatura (DOS ANJOS, 2018; DIMITROVA, 2010; KEYSTONE *et al.*, 1977).

O resultado anti-inflamatório do LBP tem sido muito discutido na literatura ao longo dos últimos anos (BROSSEAU *et al.*, 2004; 2005; BJORDAL *et al.*, 2006; 2007). Em estudos prévios, utilizando o mesmo modelo experimental e parâmetros do LBP, nosso grupo de pesquisa demonstrou resultados que indicam essa ação anti-inflamatória na dose de 30 J/cm² após 96 horas de tratamento; adicionalmente, o grupo tratado com dexametasona também demonstrou tais efeitos nesse estudo (dos Anjos *et al.*, 2017).

A partir desses resultados, o grupo levantou a hipótese de que o tratamento com LBP na dose de 30 J/cm² aumentaria a velocidade de resolução da inflamação articular, enquanto a menor dose (3 J/cm²) essa resolução aconteceria, mas de forma mais lenta. Por isso, fez-se necessário o entendimento dos diferentes tempos de tratamento da inflamação desenvolvido nesse trabalho.

O tratamento da inflamação articular induzida por zymosan, com a utilização do LBP na dose de 30 J/cm², demonstrou uma tendência na diminuição da inflamação a partir de 48h, enquanto nos grupos tratados na dose de 3J/cm², esse achado não foi observado, apesar de não serem diferentes estatisticamente. Após 72 horas de tratamento, o grupo 30 J/cm² apresenta redução semelhante ao grupo tratado com dexametasona, resultado esse semelhante ao encontrado em trabalho prévio após 96 horas de tratamento (dos Anjos *et al.*, 2017).

Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados, e os demais experimentos não terem sido realizados devido à paralisação das atividades laboratoriais devido à pandemia de COVID-19, nossa hipótese de que a dose de 30 J/cm² é mais rápida para diminuir a inflamação ganha força. Em trabalhos anteriores foi observado que essa resolução é mais rápida devido a diminuição de citocinas inflamatórias (dos Anjos *et al.*, 2018), além da indução da fragmentação de DNA de células polimorfonucleadas (dos Anjos *et al.*, 2017), sendo essa fragmentação, um indicativo de processo de morte por apoptose (COHEN, 1997; RAI *et al.*, 2005).

Tais experimentos relacionados a apoptose e citocinas pró- e anti-inflamatórias não puderam ser desenvolvidos durante esse período.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a terapia com laser de baixa potência tem a tendência de reduzir o processo inflamatório a partir de 48 horas de tratamento na fluência de 30 J/cm², enquanto a menor fluência (3 J/cm²) possui uma ação anti-inflamatória mais lenta. A dose de 30 J/cm² apresenta comportamento anti-inflamatório semelhante à medicamentos utilizados em patologias inflamatórias, como por exemplo a dexametasona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI R.; VILLAVERDE A.B.; AIMBIRE F.; BJORDAL J.; BRUGNERA A.; MITTMANN J.; SILVA J.A.; COSTA M. Cytokine mRNA expression is decreased in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg.** v. 26, n. 1, p. 19-24, 2008.
- ALVES, A.C.A.; DE CARVALHO, P. T.; PARENTE, M.; XAVIER, M.; FRIGO, L.; AIMBIRE, F.; LEAL JUNIOR, E. C.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. **Lasers Medical Science.** v. 28, n. 2, p.529–536, 2013.
- ANDRADE, N.N.; DALE, C. S.; OLIVEIRA, V. R.; TONIOLO, E. F.; FELICIANO, R. D.; DA SILVA, J. A.; JR.; ZAMUNER, S. R. Analgesic Effect of Photobiomodulation Bothrops Moojeni Venom Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. **PLOS**, v. 10, p. 10, 2016.
- ANTUNES, H. S.; DE AZEVEDO, A. M.; DA SILVA BOUZAS, L. F.; ADÃO, C. A.; PINHEIRO, C. T.; MAYHE, R.; PINHEIRO, L. H.; AZEVEDO, R.; D'AIUTO DE MATOS, V.; RODRIGUES, P. C.; SMALL, I. A.; ZANGARO, R. A.; FERREIRA, C. G. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: A randomized trial. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2250-2255, 2007.
- ASQUITH, D. L.; MILLER, A. M.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2040–2044, 2009.
- BASSO F. G.; OLIVEIRA C. F.; KURACHI C.; HEBLING J.; COSTA C. A. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers Med Science.** v. 28, n.2, p.367-374, 2013.
- BAXTER, G D. **Therapeutic Lasers:Theory and Practice.** New York: Churchill Livingstone. p. 259, 1994.
- BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and Cartilage**, v.1, n. 1, p.16-21, 2013.
- BÉRTOLO, M.B. et al. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatoide. **Rev Bras Med.** Campinas. v. 3, n. 47, p, 151-159, 2007.
- BOISSIER, M. C.; FENG, X. Z.; CARLIOZ, A.; ROUDIER, R.; FOURNIER, C.Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. **Ann. Rheum. Dis.** v. 46, p.691– 700, 1987.
- BRACKERTZ, D.; MITCHELL, G.F.; MACKAY, I.R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. **Arthritis Rheum.** v. 20, n. 3, p. 841-50, 1977.

BRAND, D. D. Rodent models of rheumatoid arthritis *Comparative Medicine, American Association for Laboratory Animal Science*. v. 55, n. 2, p. 114-122, 2005.

BROUWERS., H.; VON HEGEDUS, J.; TOES, R.; KLOPPENBURG, M.; IOAN-FACSINAY, A. Lipid mediators of inflammation in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*, v. 29, n.6, p. 741–755, 2015.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D. L.; WILLMENT, J. A.; MARSHALL, A. S.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta glucans. *Journal Exp Med*. v. 197, n. 9, p. 1119-24, 2003.

BUGATTI, S.; BOGLIOLO, L.; VITOLO, B.; MANZO, A.; MONTECUCCO, C.; CAPORALI, R. Anti-citrullinated protein antibodies and high levels of rheumatoid factor are associated with systemic bone loss in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2016.

CASTANO, A. P.; DAI, T.; YAROSLAVSKY, I.; COHEN, R.; APRUZZESE, W. A.; SMOTRICH, M. H.; HAMBLIN, M. R. Low-Level Laser Therapy for Zymosan-Induced Arthritis in Rats: Importance of Illumination Time. *Lasers in Medical Science*, v. 39, n. 6, p. 543– 550, 2007

CHEN, A.C.; ARANY, P.R.; HUANG, Y.Y.; TOMKINSON, E.M.; SHARMA, S.K.; KHARKWAL, G.B.; SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, F.E.; BLACKWELL, T.S.; HAMBLIN, M.R. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *Plos one*. v. 6, n. 7, p. 22453, 2011.

CONITEC. Ministério da Saúde. Coordenação de gestão de protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas. **Relatório de recomendações**. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas da artrite reumatóide. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/20200908_Relatorio_Artrite_Reumatoide_551.pdf. Acesso em: 15 fev 2021.

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

DÂNGELO, J. G. Anatomia Básica dos Sistemas Orgânicos. São Paulo. Editora Atheneu. São Paulo. p. 31-39, 2005.

DAVID, J.M.; MATTEI, R.A.; MAUAD, J.L.; ALMEIDA, L.G.; NOGUEIRA, M.A.; MENOLLI PVS, MENOLLI RA. Estudo clínico e laboratorial de pacientes com artrite reumatóide diagnosticados em serviços de reumatologia em Cascavel, PR, Brasil. *Rev Bras Reumatol* 2013.

DE LIMA F.M.; VILLAVERDE A.B.; ALBERTINI R.; CORRÊA J.C.; CARVALHO R.L.; MUNIN E.; ARAÚJO T.; SILVA J.A.; AIMBIRE F. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines. *Lasers Surg Med*. v. 43, n. 5, p. 410-20, 2011.

DENNEHY, K.M.; BROWN, G.D. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 82, n. 2, p.253-8, 2007

DI CARLO, F.J.; FIORE, J.V. On the composition of Zymosan. **Science**. v. 127, p.756-757, 1958.

DOS ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers in Medical Science**. v. 32, n. 5, p. 975–983, 2017.

DOS ANJOS, L. M. J. et al. Modulation of immune response to induced arthritis by low-level laser therapy. **Journal of Biophotonics**, v. 12, n. 2, p. 1–12, 2018.

DA SILVA, P.A.V.; DOS ANJOS, L.M.J.; ABDUCH, T.F. *et al.* Photobiomodulation can alter mRNA levels cell death-related. **Lasers Medical Science**. n. 34. p. 1373–1380, 2019.

DOS ANJOS, L. M. J. **Efeito anti-inflamatório do laser de baixa potência na artrite induzida por zymosan**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

FEARON, D.T.; AUSTEN, K.F. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. **PNAS USA**. v. 74, p. 1683-1687, 1977.

FELLET, A.J.; SCOTTON, A.S. Como diagnosticar e tratar artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Medicina**. São Paulo. p. 39-48, 2013.

FISCHER, J.C. A short glossary of laser terminology for physicians and surgeons. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. p. 345-348, 1991.

FIRESTEIN, G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature** v.423, p. 356–361, 2003.

FIRESTEIN, G. S. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. In: **Kelley's Textbook of Rheumatology**, 2017

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

FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis research & therapy**, v. 7, n. 2, p. R370-9, 2005.

GENOVESE, W. J. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Lovise, 2000.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUNGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism, **Life Sciences**, v. 55, n. 17, p. 321–326, 1994.

GRANUCCI, F.; FEAU, S.; ANGELI, V.; TROTTEIN, F.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. **The Journal of Immunology**. v. 70. n. 10. p. 5075-5081, 2003.

GROSS, O., GEWIES, A., FINGER, K. *et al.* Card 9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**. v. 442, n. 7103, p.651-656, 2006.

GULÁCSI, L., BRODSZKY, V., BAJI, P., KIM, H., KIM, S. Y., CHO, Y., PÉNTEK, M. Biosimilars for the management of rheumatoid arthritis: economic considerations. **Expert review of clinical immunology**, v. 11, n. 1, p. 43-52, 2015.

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

HAROON, N.; INMAN, R.D. Infectious complications of biological therapy. **Curr Opin Rheumatology**. v. 21, n. 4, p. 397–403, 2009.

HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.; SMOLEN, J.S.; WEINBLATT, M.E.; WEISMAN, M.H. **Rheumatology**. USA: Mosby Elsevier. v. 1, p. 763-765, 2004.

HOLMDAHL, R.; JANSSON, L.; LARSSON, E.; RUBIN, K.; KLARESKOG, L. Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. **Arthr. Rheum.**v. 29, p. 106–113, 1986.

HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy an update. **Dose Response**, v. 9, p.602–618, 2011.

WANG, Y., HE, X., HAO, D., YU, D., LIANG, J., QU, Y., SUN, D., YANG, B., YANG, K., WU, R., & WANG, J. Low-Level Laser Therapy Attenuates LPS-Induced Rats Mastitis by Inhibiting Polymorphonuclear Neutrophil Adhesion. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.76, n. 11, p.1443–50, 2014.

INVIVOGEN. Innovation within reach. **Dectin-1**. 2008. Disponível em <https://www.invivogen.com/review-dectin1> Acesso em 20 mar 2021.

KARU T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomed Laser Surg**.v. 28, n. 2, p. 159-60, 2010

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KOLYAKOV, S.F.; AFANASYEVA. N.I. Absorption measurements of cell monolayers relevant to mechanisms of laser phototherapy: reduction or oxidation of cytochrome c oxidase under laser radiation at 632.8 nm. **Photomed Laser Surg**. v. 26, n. 6, p. 593-599, 2008.

KARUMUTHIL-MELETHIL, S.; SOFI, M.H.; GUDI, R.; JOHNSON, B.M.; PEREZ, N.; VASU, C. TLR2- and Dectin 1-associated innate immune response modulates T-cell

response to pancreatic β -cell antigen and prevents type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 64. n. 4, p. 1341-1357, 2015.

KEYSTONE, E.C.; SCHORLEMMER, H.U.; POPE, C.; ALLISON, A.C. Zymosan Induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum**. v. 20, p.1396-1401, 1977.

LIN, Y.S.; HUANG, M.H.; CHAI, C.Y. Effects of helium-neon laser on themucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**. v.14, p. 377-83, 2006.

LOESER, R. F.; GOLDRING, S. R.; SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, M. B. Osteoarthritis: a disease of a joint as an organ. **Arthritis & Rheumatology**, Atlanta, v. 64, n. 6, p. 1697-1707, 2012.

MAFFIA, P.; BREWER, J.M.; GRACIE, J.A.; IANARO, A.; LEUNG, B.P.; MITCHELL, P.J.; SMITH, K.M.; MCINNES, I.B.; GARSIDE P. Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells. **Journal of Immunology**. v.173, n. 1, p.151-6, 2004.

MALFAIT, A. M.; WILLIAMS, R. O.; MALIK, A. S.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Chronic relapsing homologous collagen-induced arthritis in DBA/1 mice as a model for testing disease-modifying and remission-inducing therapies. **Arthritis & Rheumatology**. v. 44, p. 1215–1224, 2001.

MARTIUS F. D. Arndt-schulz Grundgesetz. Munch **Medical Wschr**, p.1005–1006, 1923.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. n. 388, p. 394-397, 1997.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E. C. B. Resoluções Normativas. **Resolução Normativa nº 37**: Diretriz da Prática de Eutanásia. Conceia, 2018.

MOORE, K. L.; DALEY II, A. F. Anatomia orientada para a clínica. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 7. ed., 2014.

NURMOHAMED, M.T.; DIJKMANS, B.A.C. Efficacy, tolerability and cost effectiveness of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in rheumatoid arthritis. **Drugs**, v.65, n.5, p.661-694, 2005.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; FONTENOT, J.D.; HAJJAR, A.M.; SMITH, K.D.; WILSON, C.B.; SCHROEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **PNAS**. v. 97, n. 25, p. 13766-13771, 2000.

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

PEREIRA, R. M. R.; DE CARVALHO, J. F.; CANALIS, E. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases. **Clinic**, v. 65, n. 11, p. 1197-205, 2010.

PIRES, D.; XAVIER, M.; ARAÚJO, T.; SILVA JÁ, J.R.; AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Medical Science**. v. 26, n. 1, p. 85-94, 2011.

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

ROCHA, F. A. C.; ARAGAO, A. G. M. Jr.; OLIVEIRA, R. C.; POMPEU, M. M. L.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. "Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats," **Inflammation Research**, v. 48, n. 9, p. 485–490, 1999.

ROCHA, F.A.C. Efeitos de inibidores da síntese de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.43, p.206-217, 2003.

ROWLEY, M.J.; NANDAKUMAR, K.S.; HOLMDAHL, R. The role of collagen antibodies in mediating arthritis. **Modern Rheumatology**. v. 18, n. 5, p. 429-4, 2008.

SANTANA-BLANK, L.; RODRÍGUEZ-SANTANA, E.; RODRÍGUEZ, S. K. Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. **Photomed Laser Surg**. v. 28, n.1, p.,41-52, 2010.

SCHOELS, M.; WONG, J.; SCOTT, D.L.; ZINK, A.; RICHARDS, P.; LANDEWÉ, R.; SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D. Economic aspects of treatment options in rheumatoid arthritis: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v. 69, n. 6, p. 995-1003, 2010.

SEELEY, R.; STEPHENS, D.; TATE, P. **Anatomia e fisiologia**, Lusodidata, 8. ed. 2011.

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

SERGIO, L.P.S.; THOMÉ, A. M. C.; TRAJANO, L. A. D. S. N.; MENCALHA, A. L.; DA FONSECA, A. S.; DE PAOLI, F. Photobiomodulation prevents DNA fragmentation of alveolarepithelial cells and alters the mRNA levels of caspase 3 and Bcl-2 genes in acute lunginjury, Photochem. **Photobiology Science**. v.17, p.975-983, 2018a.

SERGIO, L.P.S.; THOMÉ, A. M. C.; TRAJANO, L. A. D. S. N.; MENCALHA, A. L.; DA FONSECA, A. S.; DE PAOLI, F. Low power infrared laser modifies the morphology of lung affected with acute injury induced by sepsis. **Laser Physics**. v.28, p.065601, 2018b.

SHEKHANI, M.T.; FORDE, T.S.; ADILBAYEVA, A.; RAMEZ, M.; MYNGBAY, A.; BEXEITOV, Y.; LINDNER, V.; ADARICHEV, V.A. Collagen triple helix repeat containing 1 is a new promigratory marker of arthritic pannus. **Arthritis Res Ther.** N. 18, p. 171, 2016.

SMOLEN, J. S.; LANDEWÉ, R.; BIJLSMA, J.; BURMESTER, G.; CHATZIDIONYSIOU, K.; DOUGADOS, M.; et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying ant rheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76. n. 6. p. 960-977, 2017.

STITES, D. P.; TERR, A.; PARLOW, T. G. **Medical Immunology**. Stamford: Ed. Appleton & Lange. 9 ed., p. 900, 1997.

TADAKUMA, T. Possible applications of the laser in immunobiology. **Keio J Med.**v. 42. p. 180-182, 1993.

TIM, C. R.; BOSSINI, P. S.; KIDO, H. W.; MALAVAZI, I.; VON ZESKA KRESS, M. R.; CARAZZOLLE, M. F.; PARIZOTTO, N. A.; RENNO, A. C. Effects of low level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 154, p. 8-15, 2016.

TUNER, J.; HODE, L. Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books; 1999.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; HAJJAR, A.M.; STEVES, A.; WILSON, C.B.; BASSETTI, M.; ADEREM. A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**. n. 401, p. 811-815, 1999.

VEÇOSO, M. C. **Lesar em Fisioterapia**. Editora Lovise Cientifica. 1 ed. p. 143. São Paulo, 1993.

WALSH, N.C.; GRAVALLESE, E.M. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies, **Curr Opin Rheumatology**, 2004.

WANG, Y.; HE, X.; HAO, D.; YU, D.; LIANG, J.; QU, Y.; SUN, D.; YANG, B.; YANG, K.; WU, R.; WANG, J. Low-level laser therapy attenuates LPS-induced rats mastitis by inhibiting polymorphonuclear neutrophil adhesion. **The Journal of veterinary medical science**. v. 76, n. 11, p. 1443–1450, 2014.

WOOD, A. J. J.; O'DELL, J. R. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**. n. 350, p. 2591-2602, 2004.

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

ZANINI, A.C.; WADT, M. Farmacoeconomia. In: LOPES, A.C.; AMATO NETO, V. (Eds.) **Tratado de clínica médica**. São Paulo: Roca. v.1, p.370-378, 2006.

YU, W.; NAIM J.O.; MCGOWAN, M.; IPPOLITO, K.; LANZAFAME, R.J. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem Photobiol.** v. 66, p. 866-871, 1977.