



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PPG - BIOTEC – Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia
Rod. Washington Luís, Km. 235 – Cx. Postal. 676
TEL: (016) 3351-8030 E mail: ppgbiotec@ufscar.br
CEP: 13565-905 – São Carlos – SP



**OS EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO
($\lambda=830\text{NM}$) EM MODELO EXPERIMENTAL
DE OSTEOARTRITE EM RATOS**

POLIANI DE OLIVEIRA

SÃO CARLOS – SP

2013

POLIANI DE OLIVEIRA

**OS EFEITOS DO LASER TERAPÊUTICO
($\lambda=830\text{NM}$) EM MODELO EXPERIMENTAL
DE OSTEOARTRITE EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Muniz Rennó

Prof^a. Dr^a. Fernanda de Freitas Anibal

São Carlos – SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48eL Oliveira, Poliani de.
Os efeitos do laser terapêutico ($\lambda=830\text{NM}$) em modelo experimental de osteoartrite em ratos / Poliani de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
88 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Lasers. 2. Cartilagem articular. 3. Condrócitos. 4. Osteoartrite. 5. Laser de baixa intensidade. 6. Citocinas. I. Título.


CDD: 615.83 (20^a)

Poliani de Oliveira

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 28/02/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Muniz Renno (Orientadora)
(Universidade Federal de São Carlos)



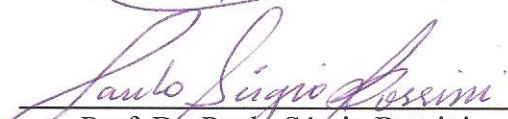
Prof.^a Dr.^a Débora Gusmão Melo
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof.^a Dr.^a Karina Gramani Say
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof.^a Dr.^a Walcy Rosólia Teodoro
(Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Bossini
(Universidade Federal de São Paulo)

Dedico este trabalho a minha querida mãe Terezinha e a minha irmã Priscila, pelo amor e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, minha fonte de sabedoria. Agradeço por ter me guiado, me protegido e me concedido forças para enfrentar todas as dificuldades encontradas nessa caminhada.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Rennó, que abriu as portas da pesquisa para mim, mostrando-se sempre disposta a me ajudar. Agradeço pela confiança a mim depositada, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela paciência, compreensão e amizade construída ao longo deste período. A você minha eterna gratidão e carinho!

A minha orientadora Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Muito obrigada pelas sugestões, contribuições e também pela amizade construída!

AGRADECIMENTOS

A minha mãe por todo apoio e amor incondicional depositado a mim. Minha eterna gratidão e amor!

A minha irmã Priscila, pelo amor e incentivo constante para que eu pudesse vencer mais essa etapa da minha vida. Você é muito especial para mim! Te amo!

Ao meu lindo sobrinho Paulo Renato, minha alegria de viver!

Ao meu cunhado Sandro, pelo apoio e incentivo constante!

Ao Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto, pessoa de extrema sabedoria. Obrigada por me acolher de forma tão carinhosa e sábia e por ter confiado no meu trabalho.

A Profa. Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi pela co-orientação e ajuda constante no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Stela Marcia Mattiello, pela co-orientação que foi de extrema importância para finalização deste trabalho.

Agradeço aos membros que se dispuseram a participar da banca examinadora, por suas contribuições e sugestões científicas.

Ao amigo Anderson, pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela amizade construída!

Às alunas de iniciação científica do curso de Fisioterapia da UFSCar, Lara e Tamara, pela amizade e dedicação com trabalho.

Aos amigos de laboratório: Carla, pela amizade e ajuda constante; meu amigo-irmão Kido, pelos momentos de

descontração, incentivo e conselhos tão valiosos para a minha vida; Paulo Bossini, pelo incentivo, amizade e carinho sempre me auxiliando nos momentos que precisei; Fernando (Zé) pelas valiosas discussões e ajuda; Paulo Armelin e Cleber, pelos momentos compartilhados; Natália, Lívia, Vivian e Davilene, pela amizade construída. Queridos, obrigada pelas conversas e risadas tão importantes nos momentos de lazer!

Aos amigos do laboratório da UNIFESP de Santos, em especial a Kelly, por toda ajuda e paciência nos momentos que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Patologia, em especial à querida amiga Cynthia, pelo auxílio durante a realização dos ensaios imunológicos.

Aos queridos amigos Yara, Erick, Rubens, Rodrigo, Barão, Daniel, Rafael e Lucas pelos momentos felizes de descontração que vocês me proporcionaram. Sei que nossa amizade durará por toda vida!

A Cláudia, secretária do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFSCar, pelos auxílios prestados.

Aos funcionários do biotério central da UFSCar, Roberto e Rivair, pela ajuda e atenção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
não seremos capazes de resolver os problemas causados pela
forma como nos acostumamos a ver o mundo".

(Albert Einstein)

RESUMO

A osteoartrite (OA) é caracterizada como uma doença crônica que afeta as articulações sinoviais causando degeneração e inflamação. O tratamento da OA consiste em drogas analgésicas e anti-inflamatórias, exercícios físicos e, em casos mais graves, intervenção cirúrgica. Mais recentemente, pode ser destacado o uso de tecnologias não invasivas como a terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT). Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da LLLT no metabolismo da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos a um modelo experimental de OA. Um total de 80 ratos machos (*Wistar*) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: grupo intacto (GI); grupo controle lesão (GC); grupo lesão tratado com *laser* na fluência de $10\text{J}/\text{cm}^2$ (L10) e grupo lesão tratado com *laser* na fluência de $50\text{J}/\text{cm}^2$ (L50). Os animais foram distribuídos em 2 subgrupos, com diferentes períodos de sacrifício (5 e 8 semanas pós-cirurgia). A transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) foi utilizada para induzir a OA no joelho dos ratos. O tratamento com *laser* de baixa intensidade ($\lambda= 830\text{nm}$, 10 e $50\text{J}/\text{cm}^2$) teve início 2 semanas após a cirurgia e foi realizado em 15 ou 30 sessões. Para avaliar os efeitos do *laser* no processo osteoartrítico, foram realizadas análises histológicas qualitativas e semi-quantitativas, morfometria, imunohistoquímica e ensaio imunoenzimático. Os resultados histológicos revelaram que a terapia *laser* parece modular a progressão do processo de degeneração da cartilagem articular. Porém, o *laser* não foi capaz de diminuir o processo degenerativo observado através do aumento na graduação de Mankin e da espessura da cartilagem e ainda não apresentou efeito sobre a biomodulação da expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α e MMP-13. No entanto, a terapia *laser* na fluência de $50\text{J}/\text{cm}^2$ foi capaz de aumentar a expressão das citocinas regulatórias (IL-4 e IL-10). Deste modo, os resultados do presente estudo indicam que a terapia *laser* 830nm modula a proliferação de condrócitos em modelo experimental de OA em ratos, mas não apresenta efeito na expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α . A terapia *laser* $50\text{J}/\text{cm}^2$ foi capaz de aumentar a expressão sérica das citocinas IL-4 e IL-10, favorecendo um efeito regulatório do processo inflamatório.

Palavras-chave: cartilagem articular, condrócitos, osteoartrite, terapia *laser*, citocinas.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is characterized as a chronic disease that affects synovial joints, causing degeneration and inflammation. Treatments for OA include painkillers and anti-inflammatory drugs, physical exercises and, in the most serious cases, surgical interventions. Recently, can be emphasized the use of non-invasive technologies such as low level *laser* therapy (LLLT). In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of LLLT on the metabolism of articular cartilage on the knees of rats in an experimental model of OA. Eighty-male rats (Wistar) were distributed into four groups: intact group (GI); injured control group (GC); injured *laser* treated group at 10J/cm² (L10) and injured *laser* treated group at 50J/cm² (L50). Animals were distributed into 2 subgroups, with different periods of sacrifice (5 and 8 weeks post-surgery). The anterior cruciate ligament transection (ACLT) was used to induce OA in the knee of rats. The LLLT ($\lambda=830\text{nm}$, 10 and 50J/cm²) started 2 weeks after the surgery and it was performed for 15 and 30 sessions. Qualitative and semi-quantitative histology, morphometry, immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) analysis were performed. The histological findings revealed that laser therapy modulated the progression of the degenerative process. However, laser therapy was not able of decreasing the degenerative process observed by the increased of Mankin score and cartilage thickness and it did not have any effect in the biomodulation of the expression of markers IL1 β , TNF- α and MMP-13. Moreover, LLLT, at 50J/cm² was able to increase the expression of cytokines IL-4 and IL-10. The results found in present study indicate that laser therapy 830 nm, modulate proliferation of chondrocytes in the experimental model of OA in rats but had no effect on the expression of cytokines IL-1 β and TNF- α . The laser therapy 50J/cm² LLLT was able in increasing serum expression of cytokines IL-4 and IL-10, favoring a regulatory effect of the inflammatory process.

Key words: articular cartilage; chondrocytes; osteoarthritis; laser therapy; cytokines

LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	= Análise de Variância
ATP	= Adenosina Trifosfato
cm	= Centímetro
cm²	= Centímetro quadrado
DNA	= Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	= Ácido Etilenodiaminotetracético
g	= Gramma
GA-Al-As	= Arseneto de Gálio e Alumínio
GAG	= Glicosaminoglicana
GI	= Grupo Intacto
GC	= Grupo Controle
HE	= Hematoxilina e Eosina
He-Ne	= Hélio e Neônio
IL-1β	= Interleucina-1β
IL-4	= Interleucina-4
IL-6	= Interleucina-6
IL-8	= Interleucina-8
IL-10	= Interleucina-10
J/cm²	= Joules por Centímetro Quadrado
Laser	= Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LLLT	= Low level laser therapy (Laser terapêutico de baixa intensidade)

L10	= Grupo lesão + tratamento com o <i>laser</i> na fluência de 10 J/cm ²
L50	= Grupo lesão + tratamento com o <i>laser</i> na fluência de 50 J/cm ²
MEC	= Matriz extracelular
mg/Kg	= Miligrama por Kilograma de Massa Corporal
MMP-13	= Metaloproteinase-13
mm	= Milímetro
mW	= MiliWatts
mW/cm²	= MiliWatts por Centímetro Quadrado
nm	= Nanômetro
OA	= Osteoartrite
PBS	= Solução Tampão Fosfato
TLCA	= Transecção do ligamento cruzado anterior
TNF-α	= Fator de necrose tumoral- α
RNA	= Ácido Ribonucléico
W	= Watts
W/cm²	= Watts por Centímetro quadrado
UFSCar	= Universidade Federal de São Carlos
≤	= Menor ou Igual
λ	= Comprimento de onda
μm	= Micrômetro
μm^2	= Micrômetro Quadrado
%	= Porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do complexo agregado de proteoglicanas (FELICE, 2002).....	24
Figura 2: Procedimento cirúrgico para TLCA. (A) Tricotomia da região do joelho esquerdo; (B) Incisão longitudinal na região parapatelar; (C) Acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior; (D) Transecção do ligamento cruzado anterior através de uma tesoura cirúrgica; (E) Teste de gaveta anterior; (F) Tendão patelar reposicionado e sutura da incisão.....	42
Figura 3 - Aparelho portátil de <i>laser</i> DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, Ga-Al-As diodo.....	44
Figura 4: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado entre os cornos anterior e posterior do menisco medial - Lâmina corada com H&E pertencente a um dos animais do grupo controle intacto 8 semanas - Representa como foi realizado a análise morfométrica de celularidade nos campos selecionados. (X amarelos) Condrócitos presentes na área delimitada; (*) Corno anterior do menisco medial; (#) Corno posterior do menisco medial. (Barra 100 µm).....	48

Figura 5: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado entre os cornos anterior e posterior do menisco medial - Lâmina corada com H&E pertencente a um dos animais do grupo lesão 8 semanas - Representa como foi realizado a análise morfométrica de espessura em um dos campos selecionados. (*) Corno anterior do menisco medial; (#) Corno posterior do menisco medial. (Barra 100 μm)..... 49

Figura 6: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado próximo ao corno anterior do menisco medial - Lâmina corada com *Picro Sirius Red* para análise de birrefringência do colágeno pertencente o a um dos animais do grupo tratado com *laser* 10 J/cm^2 no período experimental de 5 semanas – (→) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração avermelhada; (▶) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração esverdeada (*) Corno anterior do menisco medial. (Barra 100 μm)..... 51

Figura 7 – Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. Organização dos condrócitos (→), fibrilação e irregularidades na superfície (➡) cartilagem articular (#), osso subcondral (*) **A** - GI 5 semanas; **B** – GI 8 semanas; **C** – GC 5 semanas; **D** – GC 8 semanas; **E** – L10 5 semanas; **F** – L10 8 semanas; **G** – L50 5 semanas; **H** – L50 8 semanas. Barra 100 μm 56

Figura 8- Médias e desvios-padrão da graduação de Mankin. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm^2 ; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm^2 . * $p \leq 0,05$ 57

Figura 9- Médias e desvios-padrão da celularidade. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm^2 ; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm^2 . * $p \leq 0,05$ 58

Figura 10- Médias e desvios-padrão da espessura da cartilagem. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ² . * p≤ 0,05.....	59
Figura 11- Médias e desvios-padrão das fibras totais de colágeno. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ²	60
Figura 12- Médias e desvios-padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para IL-1β. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ² . * p≤ 0,05.....	61
Figura 13- Médias e desvios-padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para TNF-α. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ² . * p≤ 0,05.....	62
Figura 14- Médias e desvios-padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para MMP-13. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ² . * p≤ 0,05.....	63
Figura 15: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina IL-4. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ² . * p≤ 0,05.....	64
Figura 16: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina IL-6. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ²	65
Figura 17: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina IL-6. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ² . * p≤ 0,05.....	66
Figura 18: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina TNF-α. GI: grupo intacto; GC: grupo controle lesão; L10: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 10 J/cm ² ; L50: grupo lesão e tratado com <i>laser</i> 50 J/cm ²	67

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1: Sistema de graduação de Mankin (MANKIN <i>et al.</i> , 1971).....	46
---	----

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVEATURA E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELA

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Cartilagem articular.....	22
1.2 Osteoartrite.....	25
1.2.1 Fisiopatologia da AO.....	26
1.2.2 O papel das citocinas na OA	28
1.3 <i>Laser</i> Terapêutico de Baixa Intensidade (LLLT).....	31
1.3.1 Interação <i>laser</i> tecido.....	32
2. OBJETIVO	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Animais para experimentação.....	40
3.2 Delineamento experimental.....	40
3.3 Modelo Experimental de Osteoartrite.....	41
3.4 Protocolo de Tratamento.....	43
3.5 Eutanasia dos animais.....	44
3.6 Coleta das amostras.....	45

3.7	Análises.....	45
3.7.1	Análise histológica.....	45
3.7.1.1	Análise histológica descritiva.....	45
3.7.1.2	Análise histológica através da graduação de Mankin.....	46
3.7.1.3	Análise Morfométrica de Celularidade.....	47
3.7.1.4	Análise Morfométrica de Espessura.....	48
3.7.2	Análise de Quantificação das Fibras Totais de Colágeno.....	50
3.7.3	Análises Semi-quantitativas - Imunohistoquímica.....	51
3.7.4	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	52
3.7.5	Análise Estatística.....	53
4.	RESULTADOS.....	54
4.1	Análise histológica.....	54
4.1.1	Análise histológica descritiva.....	54
4.1.2	Análise histológica através da graduação de Mankin.....	57
4.1.3	Análise morfométrica.....	58
4.1.3.1	Celularidade.....	58
4.1.3.2	Espessura.....	59
4.2	Análise das Fibras Totais de Colágeno.....	60
4.3	Análise Semi-quantitativa através da Imunohistoquímica - Detecção da citocina IL-1 β	61
4.4	Análise Semi-quantitativa através da Imunohistoquímica - Detecção da citocina TNF- α	62
4.5	Análise Semi-quantitativa através da Imunohistoquímica – Detecção da citocina MMP-13.....	63
4.6	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina IL-4.....	64

4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina IL-6.....	65
4.8 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina IL-10....	65
4.9 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina TNF- α ...	66
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO A.....	86
ANEXO B.....	87
ANEXO C.....	88

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença progressiva degenerativa caracterizada pela perda de cartilagem articular, remodelamento do osso subcondral, redução do espaço articular e formação de osteófitos (GOLDRING, 2000; DA ROSA, 2012). Apresentando alta prevalência, a OA é considerada a doença articular mais comum, constituindo uma das principais causas de incapacidade e morbidade na população idosa e gerando um elevado custo social (BROOKS, 2002).

A etiologia da OA pode ser de origem primária ou secundária. A OA primária ocorre sem causa definida enquanto que, a OA secundária pode ser desencadeada por defeitos congênitos ou adquiridos das estruturas articulares, distúrbios metabólicos, doenças inflamatórias ou traumatismo (PORTH; MATFIN, 2010). Embora a OA não seja classificada como uma artropatia inflamatória, ela apresenta alguns sinais e sintomas relacionados à inflamação, como dor, edema e rigidez, acarretando uma redução significativa na qualidade de vida dos pacientes que sofrem dessa doença (BENDELE, 2001; GOLDRING e OTERO, 2011).

Atualmente, as opções de tratamento para a OA incluem a fisioterapia, mudanças no estilo de vida e também o uso de recursos farmacológicos (analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais) (NAITO, 2012). Mais recentemente, pode ser destacado o uso de técnicas não invasivas de tratamentos como a terapia *laser* de baixa intensidade (*Low level laser therapy – LLLT*) (TIMOFEYEV *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2004). Este vem se destacando como um recurso capaz de estimular o metabolismo tecidual e acelerar o processo de reparo após uma lesão (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Em estudos com modelos animais de OA, a LLLT parece promover uma série de modificações metabólicas e estruturais na cartilagem articular, com melhora do aspecto do tecido articular, diminuição do processo inflamatório além de efeitos analgésicos (HONMURA *et al.*, 1993; ORTIZ, 2001; KAMALLI *et al.*, 2007). Baseado nesses efeitos, o *laser* vem ganhando espaço no tratamento da OA e este recurso parece atuar de forma positiva no tecido cartilaginoso (ORTIZ, 2001).

Apesar de alguns trabalhos evidenciarem os efeitos positivos da LLLT na cartilagem, existe grande lacuna na literatura investigando os mecanismos pelos quais essa terapia atua no processo de regeneração articular frente ao processo degenerativo. Ainda, a utilização de uma ampla gama de doses por diferentes autores, somado à falta de padronização das condições experimentais, tornam difícil a comparação dos resultados publicados. Portanto, este estudo foi desenvolvido com o intuito de entender melhor o mecanismo de ação da LLLT na cartilagem articular acometida pela OA.

1.1 Cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo desprovido de vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos (GOLDRING, 2000; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2011). Em condições normais há um balanço entre anabolismo e catabolismo, sendo os condrócitos responsáveis pela manutenção da homeostase tecidual (AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006). A nutrição e a retirada de catabólitos da cartilagem articular ocorrem por meio da interação entre a vascularização presente na sinóvia e os condrócitos, por meio do líquido sinovial (FELICE *et al.*, 2002).

As principais funções do tecido cartilaginoso são: absorver choques, distribuir a carga ao longo da superfície articular durante a descarga de peso e permitir o livre e suave deslizamento dos movimentos. A matriz extracelular (MEC) é composta principalmente por uma alta concentração de proteoglicanas estruturadas em uma densa rede de fibras colágenas e uma grande quantidade de água (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2005).

Os condrócitos, único tipo celular existente na cartilagem articular, estão distribuídos esparsamente na matriz, apresentando-se de forma alongada e paralela à superfície na camada superficial, enquanto que, mais profundamente, os condrócitos apresentam-se arredondados (AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2011). Localizados em lacunas são responsáveis em manter a homeostase tecidual, através de um balanço altamente regulado entre a síntese e degradação de vários componentes da MEC (GOLDRING, 2000; AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006).

A rede de fibrilas presente na cartilagem articular é formada principalmente por colágeno tipo II, juntamente com outros colágenos predominantemente dos tipos IX, XI e XVI (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2005; AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006). As fibrilas de colágeno formam uma rede que proporciona a forma ao tecido. O colágeno tipo II é o mais abundante na cartilagem articular, representando cerca de 90-98% do colágeno total (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2005).

Outro componente importante da MEC são os proteoglicanos. Estes, por sua vez, são formados por uma parte proteica central, de onde se irradiam numerosas moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados (sulfato 4 de condroitina, sulfato 6 de condroitina e queratam sulfatado), os quais através de uma proteína de ligação, se ligam às extensas

moléculas de ácido hialurônico (glicosaminoglicano não sulfatado) (Figura 1) (GOLDRING, 2000; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2011).

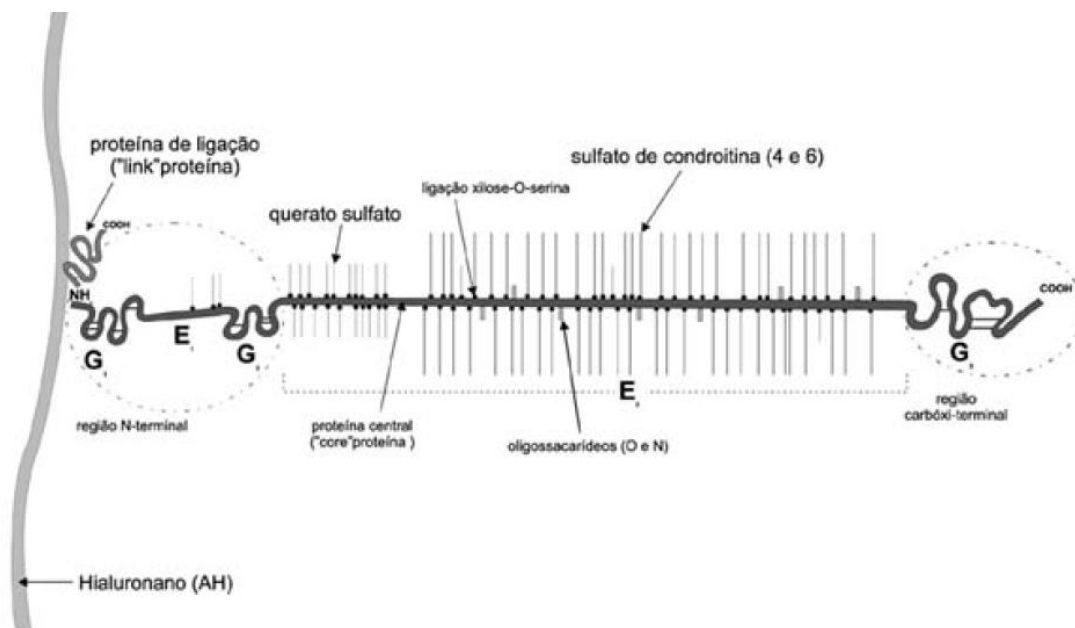


Figura 1: Esquema do complexo agregado de proteoglicanas (FELICE, 2002).

Como descrito acima, o tecido cartilaginoso é composto por colágeno, proteoglicanas e outras proteínas e glicoproteínas. Porém, estes representam apenas 20% do peso úmido da cartilagem, sendo o restante constituído de água e sais inorgânicos. A água apresenta um papel muito importante ao tecido cartilaginoso, pois contribui para a nutrição e lubrificação do tecido (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2005). Quando a cartilagem é lentamente comprimida por uma carga mecânica imposta a ela,

as moléculas de água e soluto são liberadas na matriz. Quando a carga é cessada, as proteoglicanas se reidratam e o fluido retorna à cartilagem, restaurando seu formato original. Esse processo é extremamente importante para a sobrevivência da cartilagem, pois o fluxo de fluido para o exterior e para o interior permite que ocorra a troca de nutrientes e solutos entre a matriz e o condrócito (GOLDRING, 2000; NORKIN e LEVANGIE, 2001).

1.2 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é uma doença progressiva degenerativa caracterizada pela perda de cartilagem articular, remodelamento do osso subcondral, redução do espaço articular e formação de osteófitos (GOLDRING, 2000; DA ROSA, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization- WHO*) *Scientific Group on Rheumatic Diseases*, 10% da população mundial acima de 60 anos tem significativo problema clínico que pode estar associado a OA (CORNELIS *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011; NAITO *et al.*, 2012). De acordo com Brooks (2002), 80% dos indivíduos acometidos pela OA apresentam limitações de movimento e destes, 25% não conseguem realizar as atividades de vida diária. Em fases avançadas da doença, a incapacidade física está relacionada à presença de dor, inflamação das articulações e enrijecimento articular (BREDEVELD, 2004).

A OA resulta tanto de eventos mecânicos quanto biológicos que desequilibram o acoplamento normal entre a degradação e a síntese das células na MEC da cartilagem e no osso subcondral. A OA pode ser iniciada por múltiplos fatores, incluindo fatores genéticos, metabólicos e traumáticos, levando a alterações morfológicas, bioquímicas,

moleculares e biomecânicas tanto das células quanto da MEC, as quais resultam em fibrilação, ulceração e perda da cartilagem articular, e remodelação e esclerose do osso subcondral, com formação de osteófitos (SHARMA *et al.*, 2006).

Segundo Ishiguro *et al.* (2002), a classificação clínica da OA é uma combinação de condições patológicas que envolvem: degeneração progressiva da matriz extracelular (MEC) da cartilagem articular, remodelamento do osso subcondral e presença de citocinas inflamatórias no líquido sinovial. A OA é considerada um resultado cumulativo de eventos mecânicos e biológicos que induzem ao desequilíbrio entre a degradação e a síntese dos tecidos articulares. De acordo com Pritzker *et al.* (2006), a OA é uma lesão mecânica que tem a presença de mediadores inflamatórios, cuja extensão pode atingir diferentes níveis e, portanto, é consenso a dificuldade de se classificar a atividade biológica da doença e sua progressão, pois os métodos utilizados na qualificação possuem diferentes parâmetros.

1.2.1 Fisiopatologia da OA

Uma vez iniciado o processo osteoartrítico, os condrócitos começam a proliferar-se e a sintetizar componentes da matriz, enzimas degradantes e citocinas catabólicas, ocasionando a degradação local de proteoglicanas e também a fragmentação do colágeno tipo II (GOLDRING, 2000). A lesão da cartilagem articular que ocorre na OA parece estar relacionada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α , que estimulam a produção e liberação de proteases destrutivas para as estruturas articulares. Com a consequente lesão, ocorre uma alteração no metabolismo do condrócito e este perde sua capacidade de reparar a lesão através da síntese de colágeno e proteoglicanos. Além disso, o desequilíbrio entre

as proteases e seus inibidores contribuem ainda mais para a progressão dessa doença (PORTH; MATFIN, 2010); KAPOOR, *et al.*, 2011).

Com isso ocorrem alterações estruturais da cartilagem osteoartrítica, como a reorganização e aumento da quantidade dos condrócitos, edema da matriz cartilaginosa, perda de seu aspecto liso e presença de fibrilação (PORTH; MATFIN, 2010). A partir disso, se inicia o processo de descamação da cartilagem, seguido pela formação de fissuras e rachaduras superficiais. Em uma tentativa de regeneração, os condrócitos aglomeram-se ao redor das fendas, principalmente nas áreas mais profundas (FELICE, 2002). Com a evolução do processo degenerativo, vão formando-se fendas verticais que se estendem ao longo do tecido, até atingir o osso subcondral a ponto da cartilagem articular sofrer erosão completa (GOLDRING; GOLDRING, 2004; PORTH; MATFIN, 2010).

Alguns fragmentos da cartilagem destruída podem penetrar na cavidade articular e cair no líquido sinovial, indo alcançar a sinóvia. Estes fragmentos estimulam sinoviócitos que passam a sintetizar citocinas catabólicas (IL-1 β e TNF- α), as quais irão interagir com os condrócitos, estimulando ainda mais a produção de proteases. Assim, ocorre o aumento da degradação e conseqüentemente o aumento da quantidade de fragmentos. Estes por sua vez, voltam a estimular as células sinoviais, gerando um ciclo que contribuirá para o crescimento da lesão (FELICE, 2002; GOLDRING; GOLDRING, 2004).

Com a evolução da doença, o osso trabecular subjacente torna-se esclerótico, e com isso, menos efetivo como absorvente de choque (PORTH; MATFIN, 2010). Diante disso, a resposta óssea mais característica é a formação de osteófitos nas bordas articulares, tendo início com uma proliferação fibroblástica, aumento da atividade

osteoblástica e neoformação vascular. Esses fatores somados a estímulos mecânicos e a presença de citocinas anabólicas irão desencadear um processo de ossificação (FELICE, 2002; PORTH; MATFIN, 2010; GOLDRING; OTERO, 2011).

1.2.2 O papel das citocinas na OA

As citocinas são hormônios proteicos que podem ser produzidas por vários tipos celulares, como linfócitos, macrófagos e, no caso da cartilagem, também pelo condrócito. Sabe-se que estas estão envolvidas nas respostas imunológicas celulares, onde possuem um importante papel na inflamação (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Bondeson *et al.* (2006) apontaram especialmente a IL-1 e TNF- α como sendo as peças chaves na fisiopatogênese da OA, inflamação da sinóvia e na ativação dos condrócitos. A IL-1 β está relacionada com a destruição da cartilagem, enquanto que o TNF- α atua na ativação iniciando a cascata inflamatória (GOLDRING, 2000). Ambas as citocinas são consideradas pró-inflamatórias, podendo ser produzidas pelos condrócitos, células mononucleares, osteoblastos e pelo tecido sinovial, sendo capazes de induzir a produção de vários fatores inflamatórios e catabólicos (KAPOOR, 2011). O TNF- α age em sinergismo com a IL-1 β e regulam a síntese dos componentes da MEC, pois inibem a atividade anabólica dos condrócitos (GOLDRING; GOLDRING, 2007; KAPOOR, 2011).

Atuando de forma conjunta, a IL-1 e o TNF- α são capazes de estimular os condrócitos a produzirem vários fatores inflamatórios, como óxido nítrico sintase (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX₂) (GOLDRING, 2000). Além disso, são capazes de suprimir a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II nos condrócitos, além de

estimular os condrócitos a liberar várias enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (GOLDRING; OTERO, 2011).

A IL-1 e o TNF- α induzem os condrócitos a sintetizarem prostaglandina E2 (PGE₂) e óxido nítrico (NO), além de vários outros produtos que agem na atividade anabólica e catabólica dos condrócitos (GOLDRING; GOLDRING, 2004). Em contrapartida, há o envolvimento de mediadores que favorecem o anabolismo tecidual, como o TGF- β e o IGF-1. Estes antagonizam esses catabólicos por induzirem aumento na síntese de proteoglicanas. A administração de IL-1 promove a degradação da cartilagem articular, efeito esse que é potencializado na presença de TNF- α . Com isso observa-se que a ação conjunta das citocinas é mais importante do que o seu efeito isolado (PELLETIER *et al.*, 2001; CARON *et al.*, 1996).

Outras citocinas anabólicas estão presentes na cartilagem articular. Estas compreendem o grupo das citocinas anti-inflamatórias, destacando-se a IL-4, IL-10, IL-13 e o TGF- β . Estas, por sua vez, são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , podendo ser consideradas, portanto, como citocinas inibitórias. A IL-10 pode ser produzida por vários tipos celulares, como linfócitos Th₂, monócitos e macrófagos e a IL-4 e IL-13 são produzidas principalmente pelos linfócitos Th₂ (VALE *et al.*, 2003).

A IL-4 e a IL-10 tem-se destacado pelo seu efeito condroprotetor. Segundo Goldring (2000), essas citocinas podem ter uma ação positiva diminuindo a patogênese da OA, pois poderiam inibir a degradação da cartilagem articular. Ainda, Vale *et al.* (2003) demonstraram que a IL-4, IL-10 e IL-13 exibem um efeito analgésico, possivelmente pela inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e o TNF- α .

Outras citocinas participam da patogênese da OA, como a IL-6 e a IL-8. Estas são classificadas como citocinas regulatórias e são consideradas mediadoras de respostas catabólicas da cartilagem. Além disso, a síntese de IL-6 e IL-8 podem ser estimuladas pela IL-1 e TNF- α . No entanto, a IL-6 e a IL-8 sozinhas não são capazes de estimular a degradação da cartilagem. Atualmente, a ação da IL-6 é controversa, pois ela parece desempenhar um papel duplo na patogênese da OA, modulando atividades tanto anabólicas quanto catabólicas, dependendo do contexto em que se encontra (GOLDRING, 2000)

A síntese de citocinas próinflamatórias pelos condrócitos, incluindo a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), estimulam a produção de uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs) (YASUDA, 2006; KAPOOR, 2011). A cascata proteolítica que ocorre na OA, degradando colágenos e agrecano, envolve colagenases, como a MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase neutrofila) e MMP-13 (colagenase-3), sendo considerados reguladores chave na destruição da cartilagem (GOLDRING, 2000; AIGNER; SOEDER; HAAG, 2006; KAPOOR, 2011). As MMPs tem sido encontradas em regiões de degradação da cartilagem e também em níveis elevados no líquido sinovial em pacientes com OA. Estudos sugerem um papel importante para MMP-13 na degradação da cartilagem, devido a sua capacidade para degradar mais facilmente o colágeno do tipo II (GOLDRING, 2000). No entanto, para que ocorra a homeostase tecidual, inibindo os efeitos anabólicos das MMPs, os condrócitos produzem inibidores de metaloproteinases, denominados TIMPs (AIGNER; SOEDER; HAAG, 2006).

Atualmente, as opções de tratamento para a OA incluem a fisioterapia, mudanças no estilo de vida e também o uso de recursos farmacológicos (analgésicos e

anti-inflamatórios não-esteroidais) (NAITO *et al.*, 2012). Porém, as altas incidências de efeitos colaterais gastrointestinais podem limitar a utilização dos fármacos (ZHANG *et al.*, 2004). Diante do exposto e do alto índice de pessoas acometidas com esta patologia, torna-se necessário a investigação de novos recursos não farmacológicos que atuem de forma não invasiva proporcionando uma melhor qualidade de vida ao paciente. Assim, um método de tratamento promissor é o uso da terapia *laser* de baixa intensidade (*Low level laser therapy* – LLLT) (TIMOFEYEV *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2004).

1.3 Laser Terapêutico de Baixa Intensidade (LLLT)

O termo *laser* é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa “*amplificação de luz por emissão estimulada de radiação*”. (LOW; RED, 2001; KITCHEN; BAZIN, 2003).

Em 1916, Albert Einstein postulou os princípios básicos da emissão estimulada de fótons. No entanto, somente em 1960, Theodore Maiman, propôs o desenvolvimento do primeiro *laser* com um material sólido, utilizando o cristal de rubi. Este equipamento emitia luz na região do vermelho do espectro eletromagnético (KITCHEN; BAZIN, 2003; SUN; TUNER, 2004).

Desde sua descoberta, os *lasers* têm sido utilizados em diversas áreas da medicina. Os primeiros a utilizarem esta tecnologia foram os cirurgiões oftálmicos, contando com as interações fototérmicas e fotoablativas para cortar e até mesmo destruir tecidos (KITCHEN; BAZIN, 2003).

No entanto, as aplicações clínicas das interações não térmicas da luz *laser* com os tecidos, tiveram início no final da década de 1960, com os trabalhos do professor Endre Mester, em Budapeste. Nesses estudos, foram observados os efeitos da radiação

laser na modulação de processos biológicos, o que reportou o efeito fotobioestimulante do *laser* sobre o processo de cicatrização e reparo tecidual. Desde então, muitos estudos envolvendo a LLLT foram iniciados nos países da Europa Oriental, União Soviética e China (KITCHEN; BAZIN, 2003; SUN; TUNER, 2004). Em 1980, a LLLT começou a ganhar popularidade nos países da Europa, Ásia, America do Sul e Austrália (SUN; TUNER, 2004).

Atualmente, a terapia *laser* vem sendo utilizada como forma de tratamento em muitas condições patológicas, com relatos de múltiplos efeitos clínicos (KARU, 1998; ENWEMEKA *et al.*, 2004). No entanto, muitos de seus efeitos ainda não foram explicados e há grande controvérsia em relação aos mecanismos de ação e os melhores parâmetros a serem utilizados em diferentes tipos celulares (COOMBE, 2001).

1.3.1 Interação *laser* tecido

A LLLT vem se destacando como um recurso capaz de estimular o metabolismo tecidual e acelerar o processo de reparo após uma lesão (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). Vários autores evidenciaram que a LLLT promove a regeneração tecidual, proliferação celular, aumento da síntese proteica, além da modulação do processo inflamatório e promoção do controle da dor. (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; VLADIMIROV *et al.*, 2004; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Uma vez que a energia *laser* é absorvida pelos tecidos, esta pode fazer com que as biomoléculas específicas alcancem um estado de excitação eletrônica, onde são capazes de sofrer reações químicas como oxidação, redução, isomerização, ruptura de ligações covalentes ou interações com outras moléculas (ORTIZ *et al.*, 2001).

De acordo com BAXTER (1997), a absorção da luz ocorre predominantemente no nível de interação molecular. A energia *laser* ao ser absorvida pelas biomoléculas fotorreceptoras pode desencadear três possíveis respostas:

- ✓ Excitação das cadeias de elétrons nas mitocôndrias, gerada pelo espectro visível e infravermelho próximo, visto que tais moléculas excitadas apresentam um maior potencial para gerar reações químicas;
- ✓ Vibrações moleculares, que consistem na ocorrência de estiramento e batimento das ligações, causando um deslocamento dos núcleos atômicos, porém sem afetar suas posições de equilíbrio. Essas vibrações são geradas pela absorção da irradiação infravermelha;
- ✓ Rotação total da biomolécula, ou parte dela ao redor de um eixo gerado pelo campo eletromagnético da luz incidente. Isso poderia levar a um aumento discreto da temperatura.

A magnitude do efeito biomodulatório ou fotobiorregulador atribuído a LLLT ao interagir com os tecidos, o qual pode influenciar as funções celulares estimulando ou inibindo atividades bioquímicas e biofísicas, é referido como sendo dependente do comprimento de onda, dose e densidade de potência selecionada, assim como da frequência de tratamento, do tipo de lesão e do espectro específico de absorção dos cromóforos moleculares (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; KARU, 2000).

Várias teorias tentam explicar os efeitos bioestimulantes do LLLT. No entanto, segundo Ortiz *et al.* (2001), a teoria fotoquímica é atualmente, a mais estudada e fundamentada e oferece uma explicação sobre a sensibilidade das células à luz *laser*, considerando que a energia eletromagnética estimula fotoreceptores ou cromóforos os

quais vão responder a uma faixa específica de luz, realizando assim, a conversão em energia fotoquímica. Esses cromóforos são um grupo de moléculas inter-relacionadas que podem ser enzimas, membranas moleculares, ou qualquer outra substância extracelular, que estão capacitadas para absorver a luz e apresentam algumas etapas comuns na realização de efeitos causados pelas diferentes faixas de luz (KARU, 1998; BECKERMAN *et al.*, 1992).

De acordo com citações feitas por Karu (2000), vários trabalhos evidenciaram fotosensibilidade a irradiação com luz visível monocromática, tendo significância fisiológica somente sob certas condições, em mitocôndria de animais superiores, fungos, assim como na cadeia respiratória de células procariontes (*Escherichia coli*). No entanto, a questão sobre qual (is) molécula (s) é/são fotorreceptora (es) na cadeia respiratória permanece em aberto.

Visto que, os efeitos biomodulatórios promovidos pela radiação *laser* acontecem em um amplo intervalo espectral, considera-se, portanto, que existam diferentes cromóforos como alvos fotoreceptores. Além disso, é proposto que a intensidade dos efeitos seja determinada pelo estado fisiológico prévio da célula a irradiação, o qual é condicionado no caso de cultura celular, por exemplo, pela quantidade de nutrientes disponíveis e a idade da cultura. No caso de uma baixa concentração de oxigênio e pH, o que provoca a alteração do estado redox, ocorrerá influência na resposta biológica a irradiação. Assim, a resposta celular será fraca ou ausente quando o potencial redox estiver ótimo, e forte quando o mesmo estiver alterado (estado intermediário) (KARU, 1998; 1995; 2000). Citações sobre evidências experimentais comprovam que a alteração deste estado redox no sentido da oxidação está correlacionado com o efeito estimulatório da radiação *laser*, enquanto a alteração no sentido da redução

correlaciona-se com o efeito inibitório. Isto explica porque o efeito bioestimulante nem sempre é obtido, havendo uma grande diversidade de resultados reportados na literatura (KARU, 2000; ORTIZ *et al.*, 2001).

São reportados na literatura vários efeitos da terapia *laser* em tecidos biológicos, sendo os três principais, os efeitos analgésico, cicatrizante e modulador inflamatório. A ação moduladora do *laser* sobre o processo inflamatório pode ser embasada na promoção de diversas ações tais como (a) inibir a emergência de fatores quimiotáticos nas primeiras etapas da lesão; (b) interferir com os efeitos dos mediadores químicos ou superóxidos induzidos pela inflamação; (c) diminuir o volume de exsudado alterando a permeabilidade vascular (ORTIZ *et al.*, 2001; KARU, 1998).

Ortiz *et al.* (2001) concluiu que o *laser* apresenta uma ação modulatória sobre o processo inflamatório, induzido no modelo experimental de inflamação em joelhos de coelhos submetidos ao tratamento com *laser* de Ga-Al-As (830 nm, CW, 77 mW), densidade de energia de 27,5 W/cm², com melhores resultados na dose de 3,4 J/cm². Com relação aos mecanismos envolvidos na ação analgésica do *laser*, estes estão relacionados a múltiplos fatores. Segundo Borges *et al.* (1996), os mecanismos que se destacam são provavelmente o relaxamento muscular e os mecanismos opióides endógenos. De acordo com Colls (1985), o *laser* atuaria na redução da inflamação e da dor através da promoção da reabsorção de exsudatos, favorecendo assim a eliminação de substâncias alogênicas. Além disso, haveria uma elevação do limiar de dor nos nervos periféricos, interferindo assim na transmissão do estímulo nervoso, fato este evidenciado por demais autores (SNYDER-MACKLER; BORK, 1988; TAGUCHI, 1991).

O *laser* parece atuar também nos mecanismos envolvidos na cicatrização de tecidos. Diversos trabalhos evidenciam que a irradiação *laser* de baixa intensidade tem um efeito significativo no metabolismo tecidual e na proliferação celular, justificando os resultados positivos da sua aplicação nos processos de reparação após uma lesão (PINHEIRO *et al.*, 2001, VLADIMIROV *et al.*, 2004; NINOMIYA *et al.*, 2007).

Resultados encontrados em uma série de estudos, sugerem que o LLLT promove um aumento da síntese de colágeno, aumento da proliferação e diferenciação de osteoblastos e fibroblastos, aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP (VLADIMIROV *et al.*, 2004; NINOMIYA *et al.*, 2007), maior recrutamento de macrófagos, aumento da angiogênese, aumento da atividade fagocitária o que resultará na aceleração do reparo de tecidos (ORTIZ *et al.*, 2001; LIRANI *et al.*, 2006; BOSSINI *et al.*, 2009).

Baseado nesses efeitos, o *laser* vem ganhando espaço no tratamento da OA e este recurso parece atuar de forma positiva no tecido cartilaginoso. Em um estudo *in vitro*, Torriceli *et al.* (2001), avaliaram o efeito do *laser* Ga-Al-As (830nm; 300 J; 1W; 100 ou 30 hertz; pulsado, por 10 minutos) em culturas de condrócitos e relataram efeitos bioestimulatórios positivos na proliferação celular comparado ao grupo controle.

Além disso, em estudos com modelos animais de OA, a LLLT parece promover uma série de modificações metabólicas e estruturais na cartilagem articular, com melhora do aspecto do tecido articular, diminuição do processo inflamatório além de efeitos analgésicos (HONMURA *et al.*, 1993; ORTIZ, 2001; KAMALLI *et al.*, 2007).

Em modelo experimental de OA induzida por injeção intra-articular de solução de papaína em joelho de coelhos, Lin *et al.* (2004), observaram que a LLLT no comprimento de onda de 632 nm e densidade de potência 3,1 mW/cm² aplicada 3 vezes

por semana durante 8 semanas, promoveu o aumento da presença de proteínas que previnem a morte celular de condrócitos na cartilagem articular.

Em outro estudo, Lin *et al.* (2005), analisaram os efeitos do *laser* terapêutico de He-Ne (632nm; 3.1 mW/cm²; 15 min) em joelhos de ratos com OA induzida por injeção de papaína. Os autores observaram que o *laser* apresentou alterações significativas benéficas na histologia do tecido cartilaginoso.

Em estudo utilizando modelo de transecção do ligamento cruzado anterior, Gottlieb *et al.* (2006) aplicaram o *laser* com comprimento de onda 692,6 nm nas fluências de 1 J/cm² e 4 J/cm² na cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a TLCA e observaram aumento da síntese de proteoglicanas nos animais irradiados com a maior densidade de energia.

No estudo de Bayat *et al.* (2007) foi verificado o efeito do *laser* He-Ne (632 nm) na fluência de 13 J/cm² na cartilagem articular de joelhos de coelhos pós imobilização. Os autores relataram após análise em microscopia eletrônica, a presença de uma superfície articular com aspecto mais regular nos animais tratados em relação aos animais somente imobilizados. Cressoni *et al.* (2010) observaram o efeito do *laser* Ga-Al-As na cartilagem epifisária de ratos e notaram aumento no número de condrócitos e mudanças na espessura da cartilagem.

Zhang *et al.* (2011) avaliaram os efeitos do *laser* Ga-Al-As (830nm, 500mW, 6.4mW/cm², 7.64J/cm², por 20 min.) em modelo experimental de artrite reumatoide induzida em joelho de ratos. Os resultados apontam para um efeito positivo do *laser* sobre o processo inflamatório, pois os animais irradiados apresentaram uma diminuição da síntese de CCL2 na membrana sinovial.

No estudo de Da Rosa *et al.* (2012) os autores compararam os efeitos do *laser* 660 e 808nm em modelo experimental de OA induzido por injeção de papaína em joelho de ratos. Foi avaliado os efeitos do *laser* 660nm (100mW, 3.57W/cm², 40s) e 808nm (100mW, 3.57W/cm², 40s), ambos com energia igual a 4J. Os resultados mostraram que o *laser* 808nm foi mais efetivo no reparo da cartilagem articular, pois estimulou a angiogênese, reduziu o exudato inflamatório e a formação de fibrose.

Em humanos, o *laser* parece atuar de maneira positiva em pacientes com OA de mão, com diminuição do processo inflamatório, diminuição da dor e ganho de ADM. Os pacientes foram tratados com *laser* 860nm na fluência 3 J/cm² (BROSSEAU *et al.*, 2005).

Apesar dos efeitos positivos do *laser* evidenciados pelos estudos supracitados, existe uma grande lacuna na literatura em estudos que avaliem a eficácia do *laser* no tecido cartilaginoso, principalmente em doenças degenerativas como a OA. Além disso, o mecanismo pela qual a LLLT atua não está completamente esclarecido e, para muitos, o uso dessa modalidade terapêutica é ainda controversa. A utilização de uma ampla gama de doses por diferentes autores, somado à falta de padronização das condições experimentais, tornam difícil a comparação dos resultados publicados. Portanto, este estudo foi desenvolvido com o intuito de entender melhor o mecanismo de ação da LLLT na cartilagem articular acometida pela OA. Diante disso, a hipótese do estudo é que a terapia *laser* 830nm seja capaz de modular o processo inflamatório e prevenir o processo degenerativo na osteoartrite.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos do *laser* de baixa intensidade ($\lambda = 830 \text{ nm}$) com fluências de 10 J/cm^2 e 50 J/cm^2 no metabolismo da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos ao modelo experimental de OA em diferentes períodos experimentais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais para experimentação

Para a realização desse estudo foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem *Wistar*, com 3 meses de idade, massa corporal média de 250g.

Os animais foram procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia da mesma instituição, onde permaneceram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno padrão, alimentados com ração comercial (Primor rações) e água à vontade, mantidos em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ambiente higienizado).

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de eletrotermofototerapia da UFSCar e teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Parecer n° 023/2010) (ANEXO A).

3.2 Delineamento experimental

Os 80 animais utilizados neste estudo foram distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos (com 20 animais cada):

Grupo intacto (GI): os animais desse grupo não foram submetidos a nenhum procedimento e permaneceram em livre deambulação.

Grupo controle lesão (GC): os animais desse grupo foram submetidos à TLCA e não receberam nenhum tipo de tratamento.

Grupo laser 10 J/cm² (L10): os animais desse grupo foram submetidos à TLCA e foram tratados com o *laser* ($\lambda = 830$ nm), na fluência de 10 J/cm².

Grupo laser 50 J/cm² (L50): os animais desse grupo foram submetidos à TLCA e foram tratados com o *laser* ($\lambda = 830$ nm), na fluência de 50 J/cm².

Todos os grupos foram distribuídos em dois subgrupos, compostos por 10 animais cada, para a realização das análises em dois períodos experimentais. O primeiro subgrupo (subgrupo A) foi sacrificado 5 semanas pós-cirurgia e o segundo subgrupo (subgrupo B) foi sacrificado 8 semanas pós-cirurgia.

3.3 Modelo Experimental de Osteoartrite

Para a realização do procedimento cirúrgico de TLCA no joelho esquerdo, os animais foram pesados e em seguida, anestesiados proporcionalmente à massa corporal com uma associação de Ketamina e Xilazina (80/10mg/Kg) injetados por via intraperitoneal. Após a indução anestésica, a região do joelho esquerdo foi tricotomizada e logo após foi realizado uma incisão longitudinal na região parapatelar. O tendão patelar foi localizado e deslocado medialmente e o joelho foi flexionado, o que permitiu o acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior. Uma vez visualizado o ligamento, o mesmo foi cuidadosamente, com auxílio de uma tesoura cirúrgica, seccionado. O sucesso da cirurgia foi testado através do teste de gaveta anterior, ou seja, constatação do livre movimento posterior do fêmur sobre a tíbia. Em seguida o tendão patelar foi reposicionado, e por fim, foi feito a sutura da incisão (WILLIAM *et al.*, 1982; APPLETON *et al.*, 2007) (Figura 2). Os animais foram

mantidos em caixas individuais com livre acesso à água e ração até o momento da eutanásia.

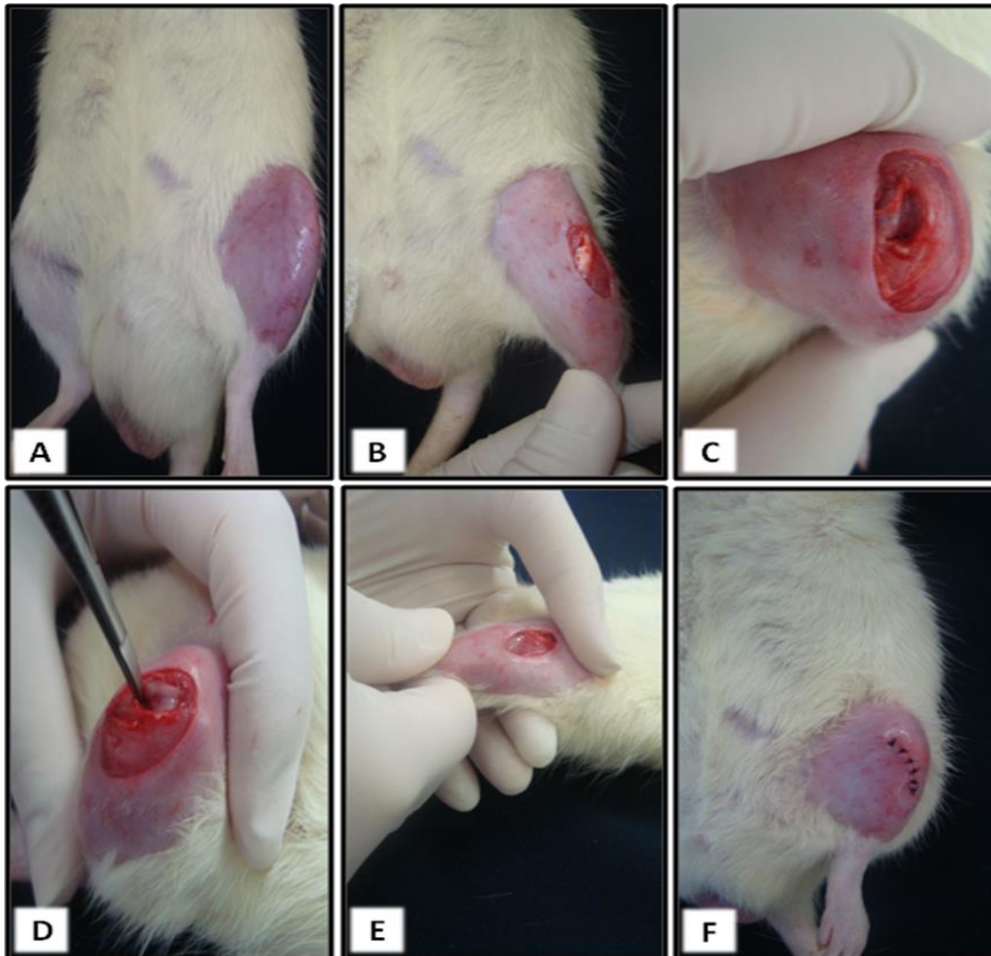


Figura 2: Procedimento cirúrgico para TLCA. (A) Tricotomia da região do joelho esquerdo; (B) Incisão longitudinal na região parapatelar; (C) Acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior; (D) Transecção do ligamento cruzado anterior através de uma tesoura cirúrgica; (E) Teste de gaveta anterior; (F) Tendão patelar reposicionado e sutura da incisão.

3.4 Protocolo de Tratamento

O equipamento emissor da radiação *laser* utilizado foi um modelo portátil Thera lase® (DMC, São Carlos, SP, Brasil), classe 3B, potência de saída de 30 mW, densidade de potência de $1,07 \text{ W/cm}^2$, área do feixe de $0,028 \text{ cm}^2$, divergência de $1,5^\circ$ (Figura 3). Assim, para os grupos tratados foi utilizado o *laser* com as seguintes especificações: Comprimento de onda 830nm na fluência de 10 J/cm^2 com tempo de irradiação de 10 segundos, fornecendo ao tecido uma quantidade de energia igual a 0,3 J e na fluência de 50 J/cm^2 com tempo de irradiação de 47 segundos, fornecendo ao tecido uma quantidade de energia igual a 1,4 J.

Os protocolos de tratamento com terapia *laser* de baixa intensidade foram iniciados 2 semanas após a cirurgia. Foram realizadas 15 sessões no período de 3 semanas no subgrupo A e 30 sessões no período de 6 semanas no subgrupo B. As sessões foram realizadas 5 vezes por semana. As irradiações foram feitas em 2 pontos, um na região medial e outro na região lateral do joelho esquerdo. Nas aplicações da laserterapia, foi utilizada a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido.

O equipamento *laser* foi aferido e calibrado no início e no final do experimento para comprovar as condições iniciais.

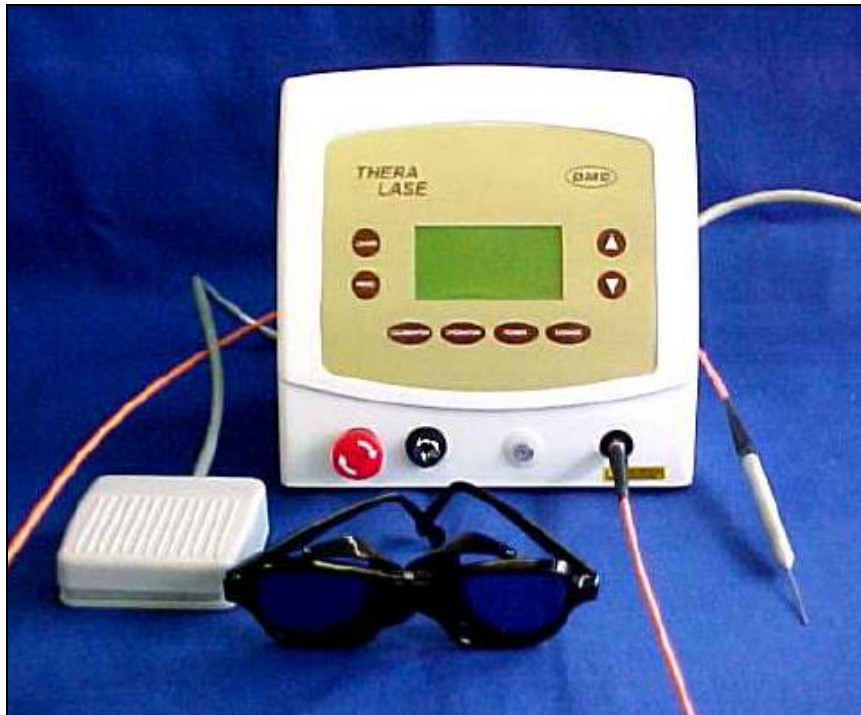


Figura 3 - Aparelho portátil de *laser* DMC, THERALASE Versão 24, classe 3B, Ga-Al-As diodo.

3.5 Eutanásia dos animais

Ao término dos respectivos períodos experimentais, os animais foram eutanasiados através de uma dose letal de anestésico (Ketamina e Xilasina) injetado por via intraperitoneal.

3.6 Coleta das amostras

Após a eutanásia, foi retirado 2ml de sangue dos animais através de punção cardíaca. Em seguida, foi realizada a ressecção cirúrgica da articulação do joelho esquerdo dos animais para confecção das lâminas histológicas.

3.7 Análises

3.7.1 Análise histológica

Para a realização da análise histológica, as articulações foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e posteriormente foram submetidas ao processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 4% (Merck) por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, as amostras foram processadas e incluídas em blocos de parafina. Na sequência, os blocos de parafina foram cortados com espessura padronizada de 5 μ m onde estes foram montados em lâminas histológicas. Os cortes foram realizados no plano sagital e perpendiculares à superfície articular na região do côndilo medial do fêmur.

3.7.1.1 Análise histológica descritiva

A análise qualitativa da cartilagem articular foi realizada por meio das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Foram analisados 3 cortes por lâmina, ao longo de toda sua extensão com aumento de 100x. Para tal, foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) e foram observadas as seguintes alterações: estrutura da cartilagem, quantidade de células e organização celular em cada animal.

3.7.1.2 Análise histológica através da graduação de Mankin

A análise semi-quantitativa da cartilagem articular foi realizada a partir do Sistema de graduação Histológicas-Histoquímicas de Mankin *et al.* (1971) (Tabela 1).

Três cortes em cada lâmina onde foram analisadas por meio de microscopia de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) por 2 avaliadores treinados. As lâminas foram coradas com Safranina-O Fast Green e a avaliação histológica dos cortes foi realizada ao longo de toda sua extensão com um aumento de 100X. Após a análise dos cortes, a média da graduação de Mankin dos dois avaliadores foi calculada.

Tabela 1: Sistema de graduação de Mankin (Mankin *et al.*, 1971).

1. Estrutura	
Normal	0
Irregularidades na superfície	1
Fibrilações e irregularidades na superfície	2
Fissuras na camada superficial	3
Fissuras na camada média	4
Fissuras na camada profunda	5
Completa desorganização	6
2. Células	
Normal	0
Hipercelularidade difusa	1
Clones	2
Hipocelularidade	3
3. Coloração por Safranina	
Normal	0
Redução leve	1
Redução moderada	2
Redução intensa	3
Corante não observado	4
4. Integridade da tidemark	
Intacta	0
Descontínua	1

3.7.1.3 Análise Morfométrica de Celularidade

A análise morfométrica de celularidade foi realizada a partir da análise proposta por RENNERT *et al.* (2006), com modificações, onde foram utilizadas as lâminas coradas com HE. Após a escolha aleatória de um corte por lâmina, o mesmo foi fotografado em três campos distintos do côndilo medial do fêmur, por meio de um microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75, Tokyo, Japão) em um aumento de (100x). Para garantir que as regiões fotografadas em cada lâmina fossem distintas, tomou-se como referência os cornos anterior e posterior do menisco medial do joelho. Assim, um campo foi fotografado na área da cartilagem próxima ao corno anterior, um segundo campo foi fotografado na área da cartilagem entre os cornos anterior e posterior e por fim, um último campo foi fotografado na região localizada na área da cartilagem próxima ao corno posterior. Em cada campo foi demarcado uma área de 80.000 μm^2 , como demonstrado na figura 4. As áreas foram delimitadas a partir da camada superficial da cartilagem articular até a camada da Zona calcificada. Dentro de cada área, os condrócitos foram marcados e contados a partir do programa Axionvision 3.1 Image Analysis (Carl Zeiss)®. De posse do número de condrócitos presentes em cada uma das três áreas, calculou-se a média do número de condrócitos referentes a cada lâmina.

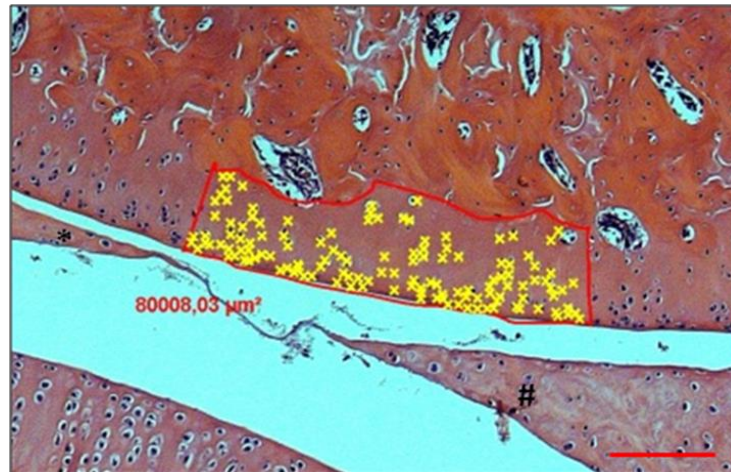


Figura 4: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado entre os cornos anterior e posterior do menisco medial - Lâmina corada com H&E pertencente a um dos animais do grupo controle intacto 8 semanas - Representa como foi realizado a análise morfométrica de celularidade nos campos selecionados. (X amarelos) Condrócitos presentes na área delimitada; (*) Corno anterior do menisco medial; (#) Corno posterior do menisco medial. (Barra 100 μm).

3.7.1.4 Análise Morfométrica de Espessura

Para avaliar a espessura do tecido cartilaginoso, foi realizada a análise morfométrica de espessura proposta por RENNERT *et al.* (2006), com modificações, onde foram utilizadas as lâminas coradas com HE. A análise, foi realizada através do programa Axionvision 3.1 Image Analysis (Carl Zeiss)[®], em que, após a escolha aleatória de um corte por lâmina, este foi fotografado em três campos distintos do côndilo medial do fêmur. A metodologia empregada para fotografar os campos foi a mesma descrita anteriormente na análise morfométrica de celularidade. Em cada região

foram feitas três medidas intercaladas com um intervalo de 300 μm , como demonstrado na figura 5. Cada medição foi feita perpendicular e a partir da camada superficial da cartilagem articular até o osso subcondral. Após obter todas as medidas, calculou-se a média da espessura da cartilagem articular referente a cada lâmina analisada.

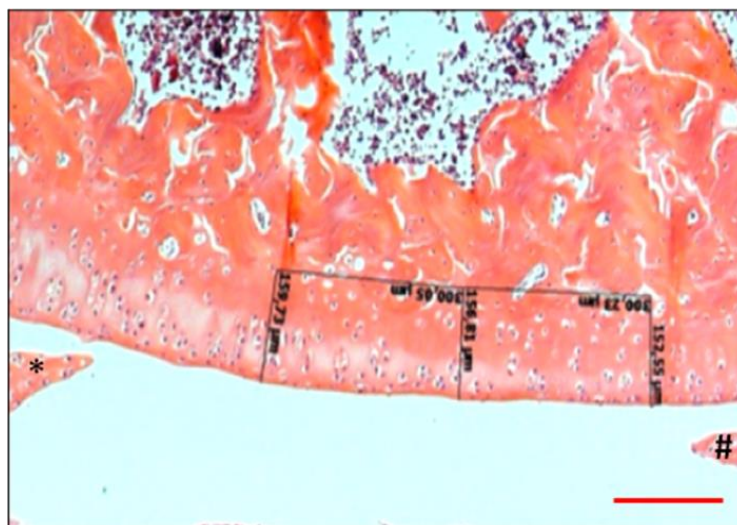


Figura 5: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado entre os cornos anterior e posterior do menisco medial - Lâmina corada com H&E pertencente a um dos animais do grupo lesão 8 semanas - Representa como foi realizado a análise morfológica de espessura em um dos campos selecionados. (*) Corno anterior do menisco medial; (#) Corno posterior do menisco medial. (Barra 100 μm)

3.7.2 Análise de Quantificação das Fibras Totais de Colágeno

As lâminas coradas com *Picro Sirius Red* foram submetidas à análise do brilho de birrefringência do colágeno por meio de microscopia de luz polarizada para quantificar as fibras totais de colágeno presentes na cartilagem articular. Após a escolha aleatória de um corte por lâmina, este foi fotografado em três campos distintos do côndilo medial do fêmur. A metodologia empregada para fotografar os campos foi a mesma descrita anteriormente na análise morfométrica de celularidade. Em cada campo foi quantificado as fibras totais de colágeno através do software Image J (Versão 1.45, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA) que identificou a intensidade do brilho de birrefringência calculando a intensidade em “pixels” da cor dada pelo *Picro Sirius Red* sob luz polarizada. Através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas e esverdeadas foi possível quantificar as fibras totais de colágeno presente em cada campo selecionado e posteriormente obter uma média para cada lâmina analisada. A figura 6 demonstra um campo de uma lâmina corada com *Picro Sirius Red* e observada sob luz polarizada.

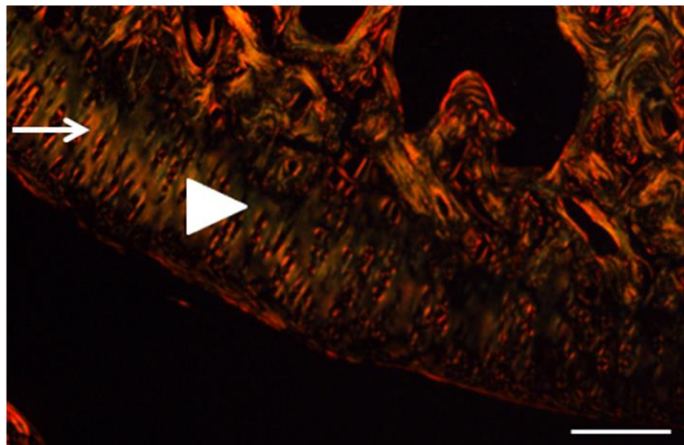


Figura 6: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado próximo ao corno anterior do menisco medial - Lâmina corada com *Picro Sirius Red* para análise de birrefringência do colágeno pertencente a um dos animais do grupo tratado com *laser* 10 J/cm^2 no período experimental de 5 semanas - (→) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração avermelhada; (▶) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração esverdeada (*) Corno anterior do menisco medial. (Barra $100 \mu\text{m}$)

3.7.3 Análises Semi-quantitativas - Imunohistoquímica

Para a análise semi-quantitativa de imunohistoquímica as lâminas foram marcadas para detectar a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) (polyclonal rabbit anti-rat, ab6671, abcam, Cambridge, MA, UK), interleucina 1 (IL-1 β) (polyclonal rabbit anti-rat, sc-7884, Sta Cruz biotechnology, California, USA) e metaloproteinase 13 (MMP-13) (polyclonal rabbit anti-rat, ab75606, abcam, Cambridge, MA, UK). Após a desparafinização e hidratação dos cortes foi realizado o bloqueio da peroxidase

endógena, em que os mesmos foram incubados em solução a 30% de peróxido de hidrogênio diluído em solução de salina tamponada (PBS) por 30 minutos. Em seguida, os anticorpos primários foram aplicados em quatro lâminas de cada grupo nas seguintes diluições e tempos: anti-TNF- α – 1:200 por 30 minutos, anti-IL-1 β – 1:50 por 120 minutos e anti-MMP-13 – 1:100 por 30 minutos. Após lavagem em PBS, foi aplicado o anticorpo secundário (ABC kit, PK-6200, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) na diluição 1:5 por 30 minutos. Em seguida os cortes foram novamente lavados em PBS e corados com diaminobenzidine (DAB, SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos. Por fim, foi realizada a coloração por hematoxilina e montagem das lâminas. Para o controle negativo, durante o processo os anticorpos primários foram omitidos.

A análise semi-quantitativa através da imunohistoquímica utilizada neste estudo foi desenvolvida a partir da modificação da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica proposta por Paiotti *et al.* (2012). Para a realização da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica, foi escolhido um corte por cada lâmina corada para TNF- α , IL1 β e MMP-13. Em seguida, por meio de microscopia de luz (Axiolab Zeiss) em um aumento de 400x e com o uso de um contador manual de células, foram contados ao longo da cartilagem articular do fêmur um total de 1000 células de forma a constatar a porcentagem de condrócitos imunocorados positivamente em cada corte analisado.

3.7.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Antes da eutanásia, 2ml de sangue foram colhidos através de punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em tubos secos, sem anticoagulante, por aproximadamente 2 horas até a retração do coágulo. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1500

rpm por 15 minutos e o soro separado e aliquotado em microtubos, identificados e congelados a -20°C até o uso.

As citocinas foram quantificadas através do método ELISA utilizando-se pares de anticorpos e respectivos padrões recombinantes obtidos comercialmente para cada citocinas pesquisada, seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). As alíquotas de soro foram submetidas à dosagem das citocinas Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de necrose tumoral α (TNF- α). As microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e permaneceram em “*overnight*” à temperatura ambiente. Após bloqueio com PBS as placas foram lavadas, adicionados sobrenadantes e efetuados curvas padrão de citocinas recombinantes. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por duas horas e em seguida realizada nova lavagem. Foram adicionados anticorpos anti-citocinas biotinilados e mantidos por mais uma hora a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em densidade óptica.

3.7.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas, tais como gráficos, na forma de médias e desvios-padrão. Para a verificação da normalidade dos dados em cada análise, foi aplicado o teste de Shapiro Wilks. Nos dados considerados paramétricos foi aplicado o teste paramétrico ANOVA com Post Hoc Tukey ($p \leq 0,05$). Já nos dados considerados não paramétricos foi aplicado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Foram utilizados o software estatístico *Statistic 7* e o software Exel 2010.

4. RESULTADOS

Durante o período experimental, os animais não apresentaram complicações pós-operatórias. Os animais regressaram rapidamente à sua dieta normal e não demonstraram perda de massa corpórea. Além disso, nenhum animal teve óbito durante o experimento e não foi detectada a presença de infecção na área de lesão.

4.1 Análise Histológica

4.1.1 Análise histológica descritiva

A análise histológica revelou que após 5 semanas, o GI apresentou estrutura da cartilagem normal, com células organizadas, onde os condrócitos apresentaram-se dispostos em paralelo na região superficial e em colunas na região intermediária (Figura 7A). No grupo controle, pode ser observado uma leve fibrilação e presença de irregularidades na superfície articular, além da presença de condrócitos dispostos de maneira desorganizada (Figura 7C). Nos grupos tratados com laserterapia, em ambas as fluências, observou-se leve irregularidade da superfície articular com sinais iniciais de fibrilação e moderada presença de células organizadas (Figura 7E e 7G).

Após 8 semanas, a estrutura da cartilagem articular no GI apresentou-se normal, com condrócitos organizados e sem a presença de fibrilação na superfície articular (Figura 7B). Foi observado que nos animais do grupo GC, o processo degenerativo progrediu, onde foi detectada a presença de intensa fibrilação, irregularidades na superfície articular e hiper celularidade, além de desorganização dos condrócitos (Figura 7D). O grupo L10 apresentou moderada quantidade de condrócitos e leve presença de fibrilação e irregularidades comparado com o controle (Figura 7F). Além

disso, o grupo L50 apresentou leve presença de fibrilação e irregularidades na superfície articular, moderada quantidade de condrócitos, com maior desorganização celular quando comparada com ao L10 (Figura 7H).

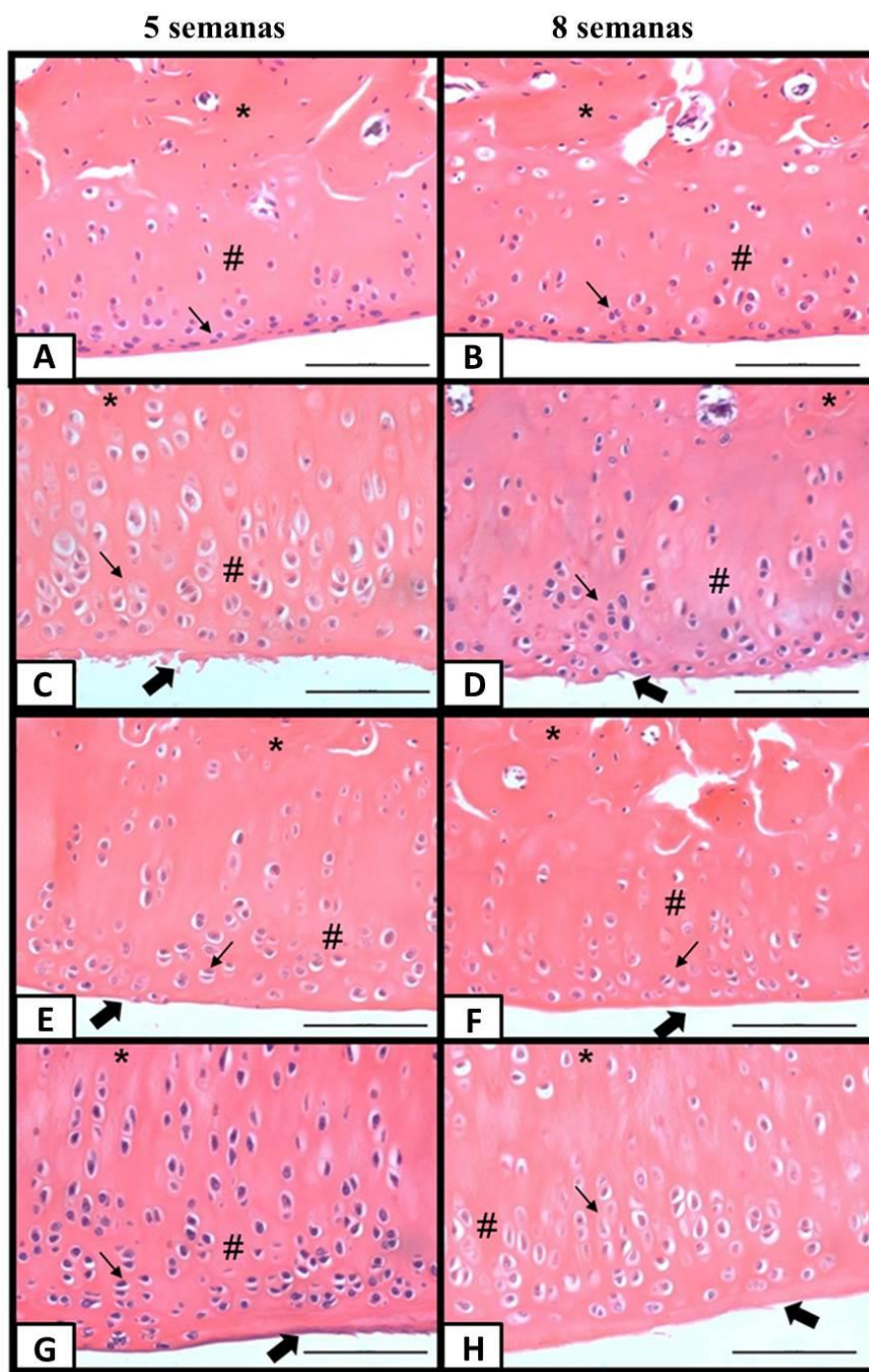


Figura 7 – Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. Organização dos condrócitos (→), fibrilação e irregularidades na superfície (➡) cartilagem articular (#), osso subcondral (*) A - GI 5 semanas; B – GI 8 semanas; C – GC 5 semanas; D – GC 8 semanas; E – L10 5 semanas; F – L10 8 semanas; G – L50 5 semanas; H – L50 8 semanas. Barra 100µm.

4.1.2 Análise histológica através da graduação de Mankin

A análise realizada pela graduação de Mankin demonstrou que, após 5 semanas, o GI apresentou pontuação significativamente menor na graduação de Mankin comparado com GC e L50. Após 8 semanas, os animais do GI apresentaram significativamente menor pontuação do Mankin comparado ao GC, L10 e L50 (Figura 8). Nenhuma outra diferença foi observada.

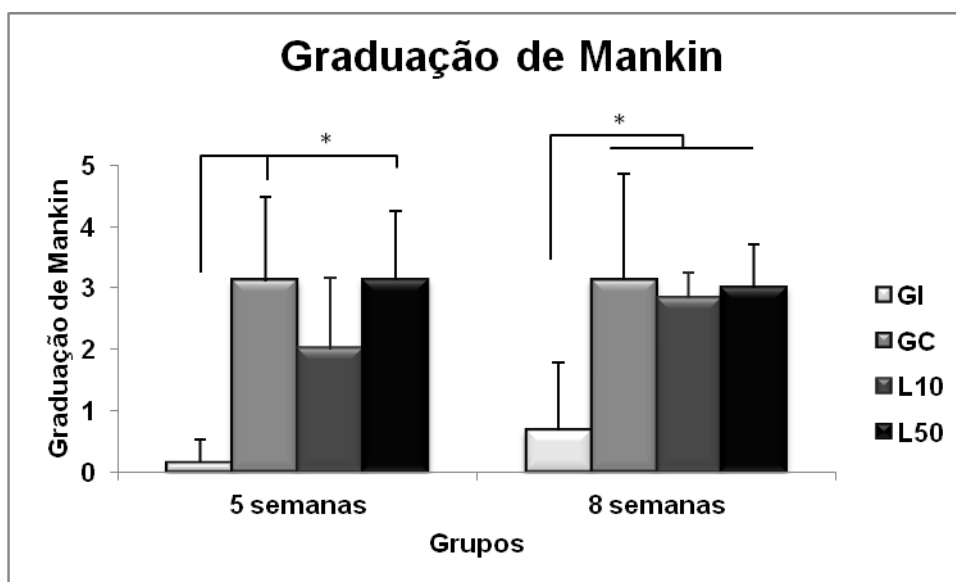


Figura 8- Médias e desvios-padrão da graduação de Mankin. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

4.1.3 Análise morfométrica

4.1.3.1 Celularidade

Através da figura 9, pode-se observar resultados similares de celularidade entre os grupos após 5 semanas. No segundo período avaliado, o número de condrócitos no GC foi significativamente maior quando comparado ao GI, L10 e L50. Nenhuma outra diferença foi observada.

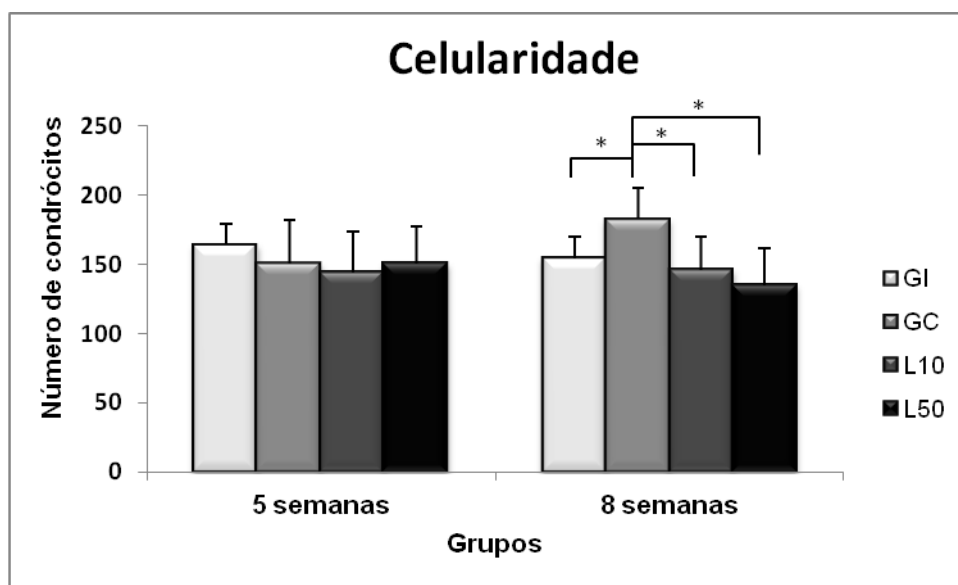


Figura 9- Médias e desvios-padrão da celularidade. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

4.1.3.2 Espessura

De acordo com a figura 10, observa-se que o GI apresentou menor espessura da cartilagem quando comparado com o GC e L50. Após 8 semanas, o GI demonstrou espessura significativamente menor comparado com os demais grupos experimentais (GC, L10 e L50).

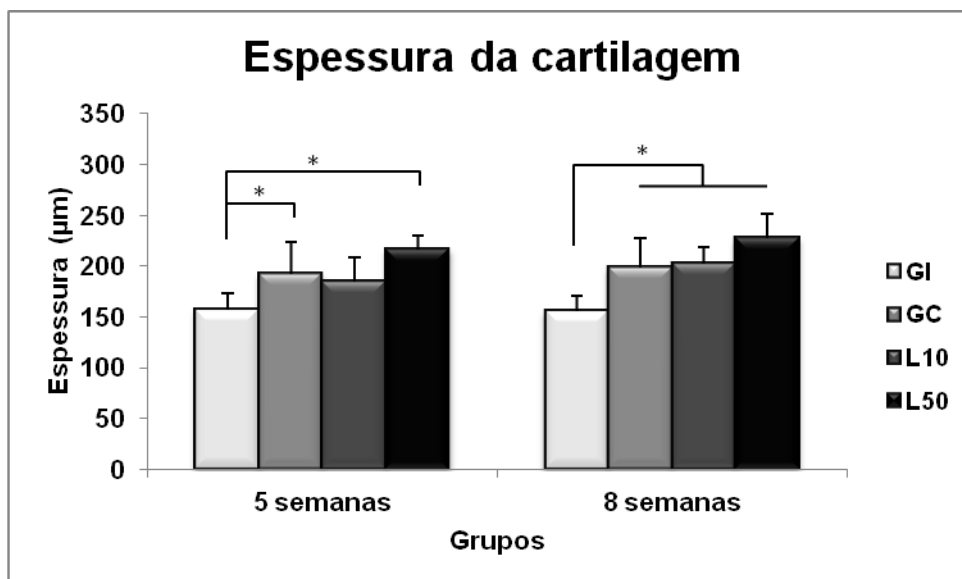


Figura 10- Médias e desvios-padrão da espessura da cartilagem. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

4.2 Análise das Fibras Totais de Colágeno

Pode-se observar através da figura 11, que em ambos os períodos experimentais não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em relação à quantidade das fibras totais de colágeno.

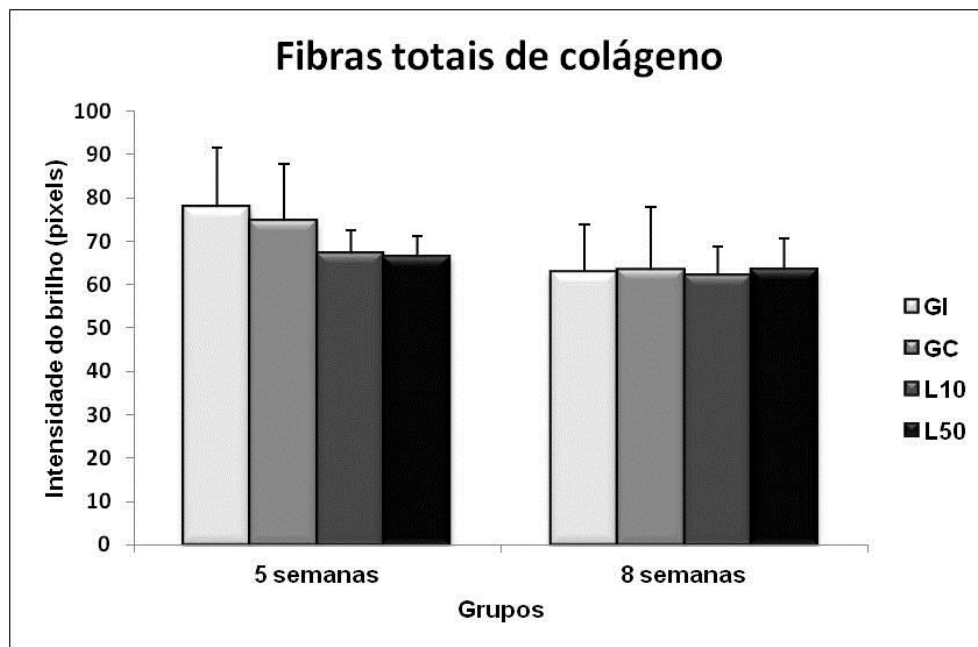


Figura 11- Médias e desvios-padrão das fibras totais de colágeno. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm².

4.3 Análise Semi-quantitativa através da Imunohistoquímica - Detecção da citocina IL-1 β

A figura 12 apresenta os resultados da imunoexpressão da citocina IL-1 β . Os resultados indicam menor expressão de IL-1 β no GI comparado com os demais grupos experimentais, em ambos os períodos analisados (5 e 8 semanas pós cirurgia).

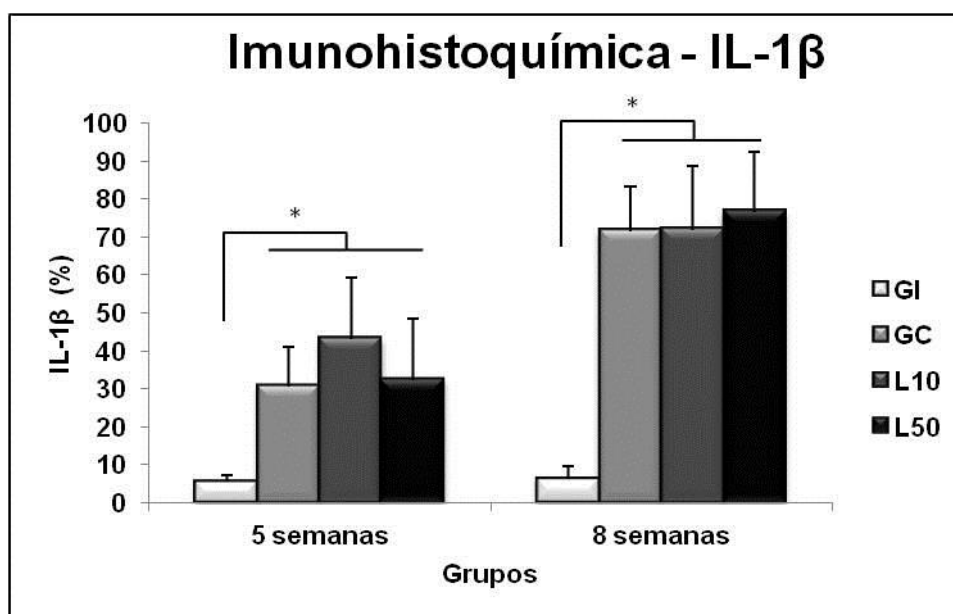


Figura 12- Médias e desvios-padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para IL-1 β . **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p \leq 0,05.

4.4 Análise Semi-quantitativa através da Imunohistoquímica - Detecção da citocina TNF- α

Através da figura 13, observa-se que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais dos grupos 5 semanas em relação à quantidade de condrócitos imunomarcados para TNF- α . Na comparação dos resultados apresentados nos grupos de 8 semanas, os grupos GC, L10 e L50 apresentaram maior quantidade de condrócitos imunomarcados para TNF- α quando comparados ao GI.

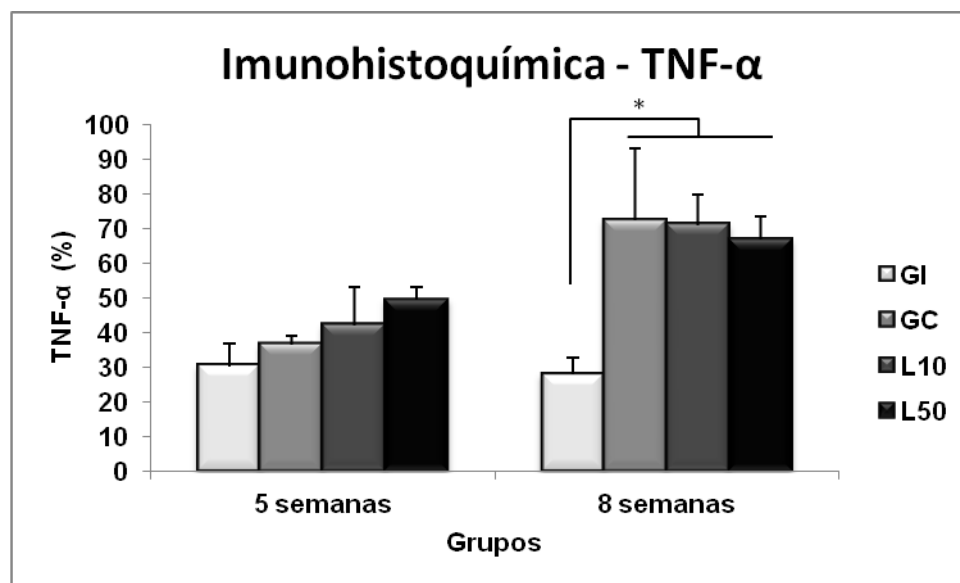


Figura 13- Médias e desvios-padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para TNF- α . **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p \leq 0,05.

4.5 Análise Semi-quantitativa através da Imunohistoquímica – Detecção da citocina MMP-13

A imunoexpressão de MMP-13 revelou que no primeiro período experimental, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais. No segundo período experimental (8 semanas), foi observada menor expressão de MMP-13 no GI comparado aos grupos GC, L10 e L50 (Figuras 14).

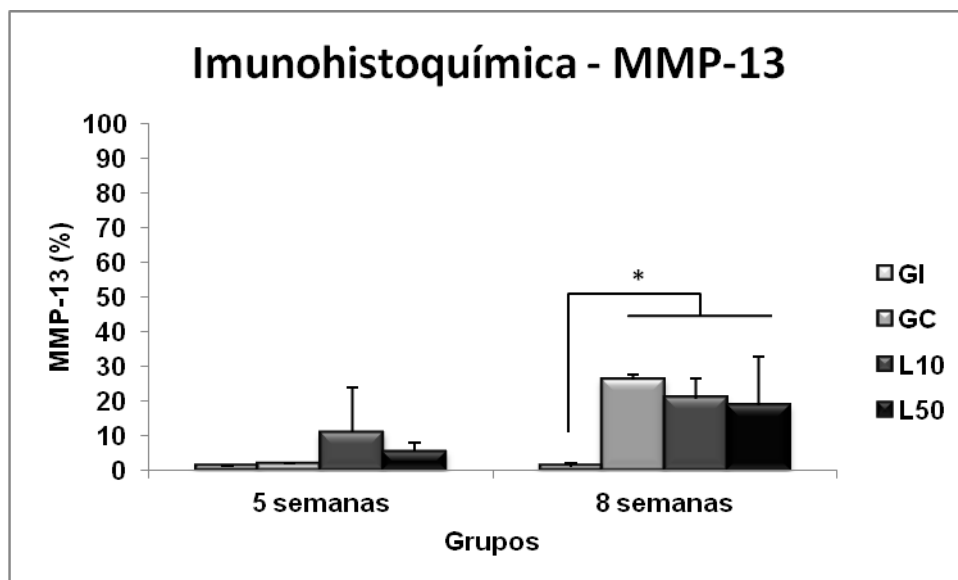


Figura 14- Médias e desvios-padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para MMP-13. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

4.6 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina IL-4

Através da figura 15, pode-se observar que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na expressão da citocina IL-4, após 5 semanas. Porém a mesma encontrou-se aumentada nos animais do grupo L50, após 8 semanas, comparado com os demais grupos experimentais. Nenhuma outra diferença foi observada entre os demais grupos.

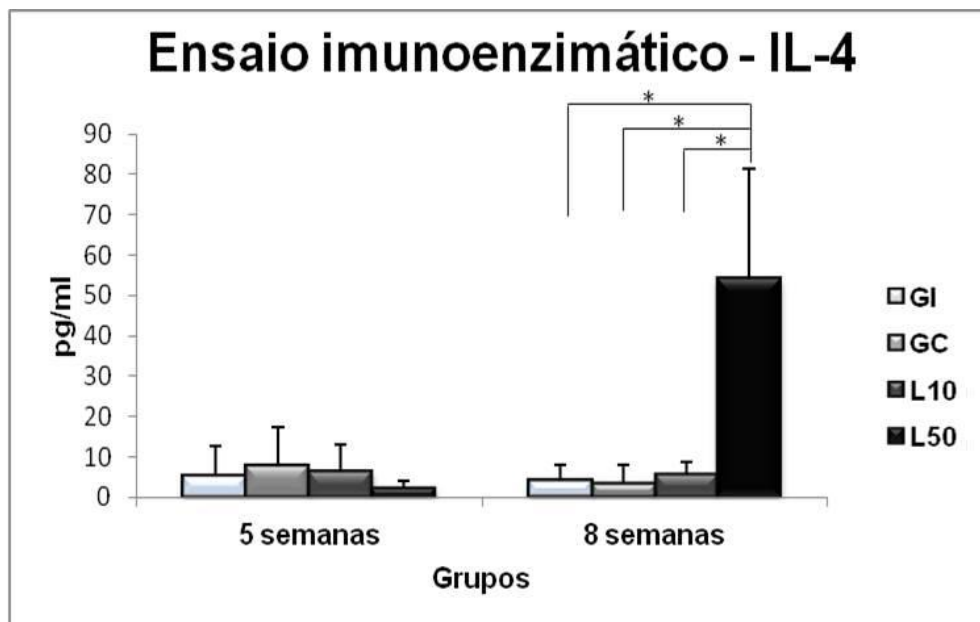


Figura 15: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina IL-4. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina IL-6

A figura 16 demonstra que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na expressão da citocina IL-6 em ambos os períodos analisados.

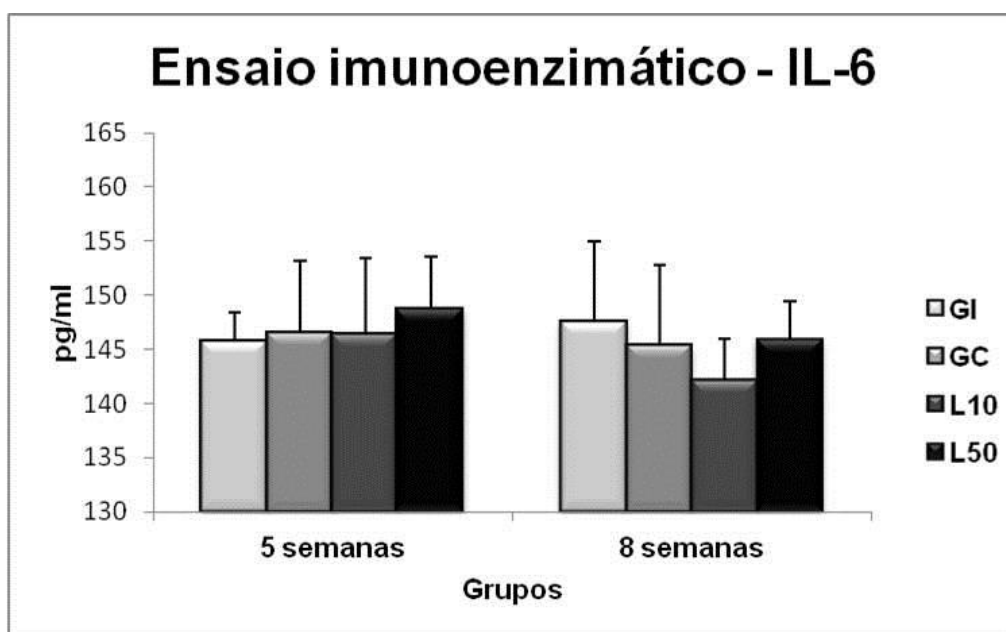


Figura 16: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina IL-6. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm².

4.8 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina IL-10

O ensaio imunoenzimático para a IL-10 revelou que após 5 semanas, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Porém, após 8 semanas, o grupo L50 apresentou maior quantidade sérica da citocina IL-10 quando comparado aos grupos GI, GC e L10 (figura 17).

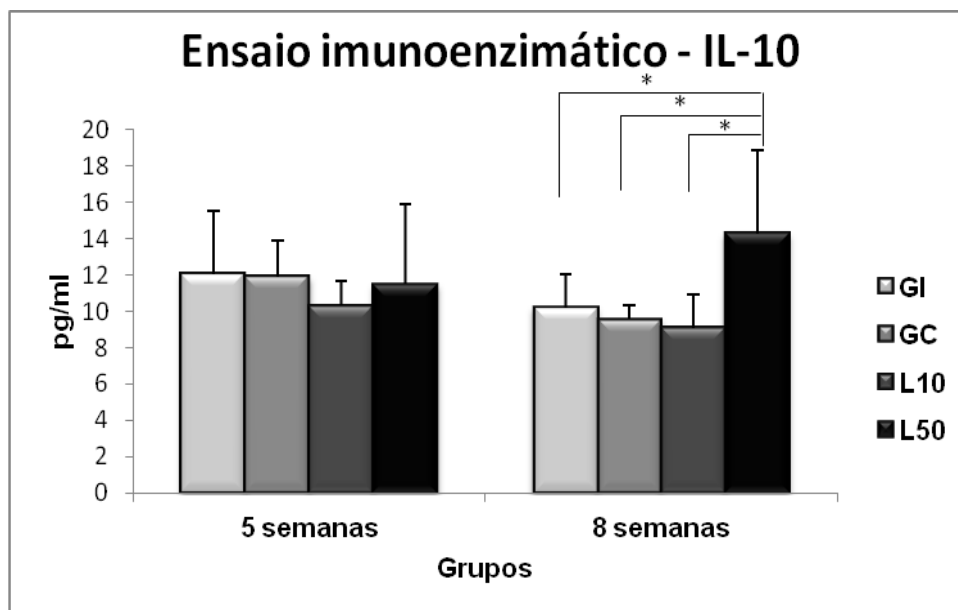


Figura 17: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina IL-6. **GI:** grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm². * p ≤ 0,05

4.9 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) – Quantificação da citocina TNF- α

Através da figura 18, pode-se observar que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na quantificação da citocina TNF- α .

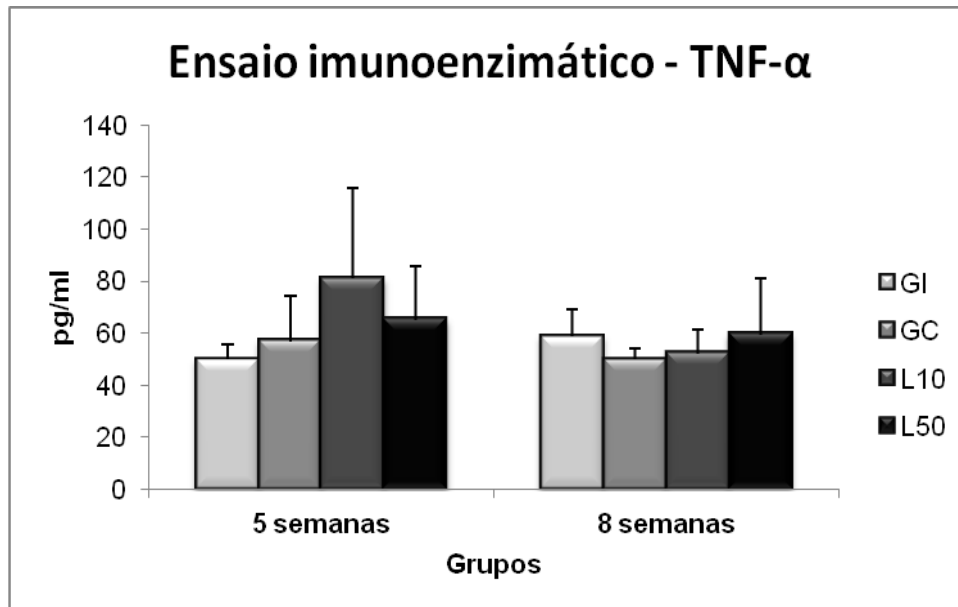


Figura 18: Médias e desvios padrão do ensaio imunoenzimático para a citocina TNF- α .
GI: grupo intacto; **GC:** grupo controle lesão; **L10:** grupo lesão e tratado com *laser* 10 J/cm²; **L50:** grupo lesão e tratado com *laser* 50 J/cm².

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos do *laser* 830nm na degeneração da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos a um modelo experimental de OA. Os resultados histológicos demonstraram que ambos os grupos tratados com LLLT apresentaram estrutura tecidual mais organizada e menor número de condrócitos quando comparado com o grupo controle lesão. No entanto, não foi observada diferença significativa nos resultados apresentados pela graduação de Mankin. Além disso, os grupos OA apresentaram um aumento na espessura da cartilagem e aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e da MMP-13 nos grupos controle e tratados. O *laser* parece ter influência positiva sobre a resposta inflamatória, pois aumentou a expressão das citocinas IL-4 e IL-10 no grupo L50, favorecendo um efeito regulatório do processo inflamatório.

A análise histológica qualitativa revelou após 5 semanas que, os grupos lesados, tanto controle quanto tratados, apresentaram fibrilação e irregularidades na superfície articular e que os grupos tratados apresentaram melhor organização dos condrócitos. Após 8 semanas, os grupos tratados apresentaram melhor aspecto do tecido cartilaginoso e também melhor organização tecidual comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboram com Lin *et al.* (2010), que utilizaram o *laser* infravermelho ($\lambda = 810\text{nm}$; fluência de $3\text{J}/\text{cm}^2$) e encontraram resultados positivos da LLLT em joelhos de ratos submetidos à TLCA. Os autores observaram que o *laser* promoveu organização dos condrócitos na cartilagem articular semelhante a dos animais intactos. Da mesma forma, Bayat *et al.* (2007), também encontraram uma melhor organização dos condrócitos em modelo experimental de OA induzida por imobilização do joelho de coelhos e tratados com *laser* 632 nm na fluência $13\text{ J}/\text{cm}^2$ 3 vezes por semana. Com

isso, neste estudo pode ser sugerido uma ação benéfica do *laser* sobre o tecido cartilaginoso pois possivelmente a *laser*terapia tenha favorecido a homeostase tecidual através da estimulação dos condrócitos, os quais responderam positivamente, mantendo sua organização e os níveis celulares, evitando com isso a progressão do processo degenerativo.

O sistema de graduação de Mankin é amplamente utilizado para a avaliação das alterações causadas pela OA, onde observa-se que quanto maior a graduação, maior o grau de acometimento da cartilagem articular (JEAN *et al.*, 2007; PEARSON *et al.*, 2011). Este é um sistema clássico de avaliação, sendo uma das escalas mais utilizadas na literatura (PEARSON *et al.*, 2011). No presente estudo, foi observado um aumento da graduação de Mankin nos grupos GC e L50 quando comparados ao GI após 5 semanas. No entanto, após 8 semanas, a graduação de Mankin apresentou-se aumentada nos grupos GC, L10 e L50 quando comparados ao grupo intacto. Esses dados apontam que o modelo utilizado neste estudo foi válido, pois promoveu alterações na cartilagem 5 e 8 semanas após a TLCA.

Após 5 semanas, o grupo L10 apresentou graduação de Mankin semelhante ao grupo GI, no entanto, esse achado não se prolongou no período de 8 semanas. Esse resultado sugere que a menor fluência possa ter atuado positivamente nos estágios iniciais do processo de degeneração da cartilagem, através da modulação da atividade celular dos condrócitos. Esse fator positivo não foi observado no decorrer do processo degenerativo relacionado à OA (8 semanas).

A graduação de Mankin envolve a análise de várias variáveis na cartilagem articular como estrutura do tecido, quantidade de células, perda de proteoglicanos e a integridade da tidemark. Diante disso, apesar do efeito positivo na celularidade,

provavelmente o *laser* não apresentou o mesmo efeito referente aos outros parâmetros, como a perda de proteoglicanas, o que pode ter resultado na diferença significativa nesse parâmetro nos grupos irradiados. Santos (2012) avaliou o conteúdo de proteoglicanas no joelho de ratos com OA e concluiu que o laser (685nm) na fluência de $10\text{J}/\text{cm}^2$ estimulou maior quantidade de proteoglicanas que o grupo controle lesão e valores semelhantes ao grupo intacto, porém não encontrou resultados positivos quando utilizou a fluência de $50\text{J}/\text{cm}^2$. Provavelmente o *laser* na fluência $10\text{J}/\text{cm}^2$ tenha estimulado positivamente os condrócitos a produzirem a glicoproteína no tecido com processo degenerativo em curso.

Autores afirmam que no início do processo da OA, os condrócitos aumentam sua taxa metabólica, onde estes começam a se proliferar, na tentativa de reparar o tecido lesado (GOLDRING, 2000; PRITZKER *et al.*, 2006; GOLDRING; GOLDRING 2007). Essas alterações resultam em hiper celularidade, desorganização celular, presença de condrócitos hipertrofiados, culminando na morte celular por apoptose (FUJITA *et al.*, 1997; KUHNT; LIMA; HASHIMOTO, 2004; PRITZKER *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2007). Os resultados obtidos na análise morfométrica de celularidade do presente estudo revelam que no período experimental de 5 semanas, não foi possível observar alterações em relação a quantidade de condrócitos entre os grupos. Possivelmente o tempo pós TLCA não tenha sido suficiente para gerar alterações teciduais referentes a proliferação celular. Porém, o período de 8 semanas utilizado neste estudo foi suficiente para observar alterações teciduais ocasionadas pelos estímulos lesivos, uma vez que o grupo GC apresentou valores estatisticamente maiores de celularidade em relação aos grupos tratados e ao grupo intacto, indicando sinais de degeneração articular neste grupo experimental. Esses resultados corroboram com os resultados histológicos

qualitativos e sugerem que a *laser*terapia influenciou positivamente o metabolismo celular, sendo capaz de manter a homeostase do tecido, prevenindo a hiper celularidade, evitado assim, a evolução do processo degenerativo.

Esses achados estão de acordo com os encontrados por Santos (2012), que observou que o LLLT no comprimento de onda de 685nm, nas fluências de 10J/cm² e 50J/cm², aplicado no joelho de ratos após TLCA e no mesmo período experimental deste estudo, foi capaz de prevenir a hiper celularidade inicial da OA.

A análise morfométrica de espessura do presente estudo demonstrou um aumento na espessura do tecido tanto no período de 5 semanas (GC e L50) quanto no período de 8 semanas (GC, L10 e L50), sinalizando as alterações presentes na fase inicial da OA, em que os condrócitos aumentam suas atividades anabólicas e catabólicas e passam a produzir tanto componentes da MEC como enzimas proteolíticas, na tentativa de impedir a degradação do tecido (LEROUX *et al.*, 2001; GOLDRING, *et al.*, 2007). O *laser* na fluência de 10 J/cm² retardou o espessamento do tecido após 5 semanas, no entanto o efeito do *laser* sobre a espessura não se prolongou após 8 semanas. Tais achados também corroboram com os encontrados por Santos (2012) que observou aumento da espessura da cartilagem articular de ratos submetidos à TLCA e tratados com *laser* ($\lambda= 685\text{nm}$; fluência de 50J/cm²), no mesmo período experimental deste estudo. Ainda, este autor observou que o *laser* no período experimental de 5 semanas, retardou o espessamento do tecido, uma vez que a espessura da cartilagem articular dos animais tratados foi semelhante aos animais do grupo intacto. Os resultados do presente estudo também estão de acordo com Bayat *et al.* (2007), que encontraram um aumento da espessura da cartilagem após a irradiação *laser* 632nm, na fluência de 13 J/cm² em um modelo experimental de OA. Os autores consideraram este

resultado como uma resposta benéfica em relação a estrutura tecidual e atribuíram esse resultado ao *laser*, que poderia ter estimulado o metabolismo tecidual. Assim, apesar do *laser* na dosimetria do presente estudo ter modulado positivamente a atividade metabólica dos condrócitos em relação à celularidade, é provável que o mesmo não tenha sido capaz de impedir a síntese de outros componentes da MEC que caracteriza o aumento da espessura do tecido na fase inicial da lesão.

Como exposto anteriormente, o colágeno é o componente mais importante da cartilagem articular e sofre modificações na situação patológica de OA, pela ruptura da sua rede de fibras e diminuição de seu conteúdo (VELOSA; TEODORO; YOSHINARI, 2003; VASILCEAC *et al.*, 2010). Nesse estudo, não foi observado alterações na quantidade das fibras totais de colágeno entre os grupos. Possivelmente os períodos experimentais estudados não foram suficientes para observar mudanças nas fibras de colágeno da cartilagem articular, onde a lesão não tenha evoluído até o estágio de ocorrer perda das fibras de colágeno.

Durante a progressão da OA, uma série de marcadores pró-inflamatórios são ativados, incluindo a IL-1 β , TNF- α e MMP-13 (GOLDRING, 2000). A ação desses mediadores inflamatórios levam a um aumento nas vias catabólicas, inibindo a síntese de matriz e promovendo apoptose celular (ROUSSEAU; GARNERO, 2012). A produção excessiva de IL-1 β e TNF- α altera o balanço do remodelamento da matriz cartilaginosa, desencadeando modificações estruturais da cartilagem articular (ROUSSEAU; GARNERO, 2012; VINCENT *et al.*, 2012). A IL-1 β e TNF- α são importantes reguladores de metaloproteinase (MMP) na OA (GOLDRING, 2000). Tetlow *et al.* (2001), observaram em um estudo *in vitro*, que condrócitos retirados de um tecido sadio na presença de TNF- α e IL 1 β , passaram a sintetizar MMP-13, que é

uma das principais enzimas responsáveis em degradar o colágeno tipo II. No presente estudo, após 5 semanas foi encontrado aumento da expressão de IL-1 β nos grupos GC, L10 e L50 mas não houve diferença na expressão de TNF- α e MMP-13 entre os grupos. Após 8 semanas, houve aumento significativo da expressão de de IL-1 β , TNF- α e MMP-13 nos grupos controle e tratados, em ambas as fluências avaliadas comparado com os animais do grupo intacto. Como a expressão de IL-1 β já estava presente em 5 semanas, pode-se sugerir que a IL-1 β tenha estimulado a expressão de TNF- α e MMP-13 pelos condrócitos, como observado por Tetlow *et al.* (2001). Diante disso, fica evidente que a expressão de mediadores próinflamatórios nos grupos tratados demonstra que o *laser* não foi eficiente para modular esses mediadores em estágios iniciais de OA.

Como o TNF- α é uma importante citocina catabólica que está presente nos processos degenerativos da OA (GOLDRING, 2000), sua expressão também foi avaliada em nível sistêmico a partir do sangue dos animais, através do método ELISA. Após o teste de ELISA, não foi observado diferença na expressão deste marcador entre os grupos, tanto de 5 quanto de 8 semanas. Estes achados não corroboram com Soriano *et al.* (2006), que encontraram diminuição da presença de TNF- α nos níveis plasmáticos de ratos submetidos ao modelo experimental de OA por injeção intra-articular de hidróxido-apatita no joelho e posteriormente tratados com *laser* He-Ne (632,8 nm) na fluência de 8 J/cm². Porém é difícil a comparação entre os estudos, pois o modelo experimental e os parâmetros utilizados do *laser* são diferentes dos empregados neste estudo. No entanto, os níveis séricos de TNF- α encontrados neste estudo, não se apresentaram diferentes entre os grupos experimentais, podendo, com isso inferir que, embora tenham sido observadas alterações estruturais e metabólicas no local da lesão, o

período experimental não foi suficiente para observar alterações sistêmicas do TNF- α no processo inflamatório.

Outra citocina importante nos processos OA é a IL-6. Embora seu papel seja controverso, há evidências que esta citocina possa ter um duplo papel na patogênese da OA. Esta citocina é classificada como regulatória e pode ser sintetizada por células estimuladas pela IL-1 β e pelo TNF- α (GOLDRING, 2000). No presente estudo, não foi observada diferença na expressão de IL-6 entre os grupos experimentais, em ambos os períodos analisados. Esses resultados discordam dos encontrados por Pallotta *et al.* (2012), que avaliaram os efeitos do *laser* 810nm, 5W/cm² em artrite aguda induzida por injeção de carragenina. Os autores observaram que a LLLT foi eficiente em reduzir os níveis de IL-6 no fluido sinovial.

Além das citocinas catabólicas, também encontram-se no tecido OA as citocinas inibitórias, com destaque para a IL-4 e IL-10. Essas citocinas são classificadas como anti-inflamatórias e inibem a liberação de outras citocinas como por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α (GOLDRING; 2000; VALE *et al.*, 2003). Como exposto acima, tanto as citocinas catabólicas quanto as inibitórias estão presentes na cartilagem osteoartrítica, sendo que o equilíbrio dessas citocinas é importante na determinação da severidade da doença (GOLDRING, 2000). Foi observado nesse estudo que, pós 5 semanas, não houve diferenças na expressão de IL-4 e IL-10 no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais. No entanto, os níveis de ambas citocinas estavam aumentados no grupo L50 após 8 semanas. Diante desses resultados, pode-se sugerir que o *laser* tenha atuado de forma benéfica, na tentativa de modular positivamente o processo inflamatório a nível sistêmico.

A literatura demonstra que o LLLT tem um efeito dose-dependente no tecido e que ainda há muitas lacunas na literatura a respeito dos melhores parâmetros a serem utilizados na tentativa de melhor estimular o tecido (KARU; KOLYAKOV 2005; RENNO *et al.*, 2007; DA ROSA *et al.*, 2012). Dentro deste contexto, foi realizado nesse estudo a comparação entre duas fluências diferentes. Foi observado que na menor fluência e no menor período experimental ($10\text{J}/\text{cm}^2$, 5 semanas), o *laser* apresentou um efeito positivo através da modulação da atividade celular dos condrócitos, demonstrado pela menor graduação de Mankin e menor espessura do tecido. Além disso, o *laser* também apresentou efeito positivo após 8 semanas, pois preveniu a hiper celularidade. Em contrapartida, na maior fluência e no menor período experimental ($50\text{J}/\text{cm}^2$, 5 semanas), não foi observado efeito positivo. No entanto, após 8 semanas, o *laser* parece modular a resposta inflamatória a nível sistêmico. Sendo assim, existe uma especificidade de absorção da irradiação *laser* pelos diferentes tecidos biológicos, o que determina a existência de uma janela terapêutica para fotoestimulação efetiva em cada tipo de tecido (KARU; KOLYAKOV 2005).

Em relação ao modelo experimental utilizado nesse estudo, Hayami *et al.*, (2006) afirmam que o modelo de TLCA é adequado para avaliar os efeitos de agentes terapêuticos na OA, pois permite que a doença se instale de forma lenta e progressiva. Além disso, esse modelo apresenta aspectos patogênicos semelhantes à OA traumática que ocorre em humanos (KAAB, CLARK; NOTZLI, 2000, HAYAMI *et al.*, 2006; APPLETON *et al.*, 2007). Autores afirmam que 2 semanas após a cirurgia os achados histológicos correspondem à fase inicial da OA (HAYAMI *et al.*, 2006; APPLETON *et al.*, 2007; BENDELE, 2011). Ainda, Hayami *et al.* (2006) afirmam que após a décima semana após TLCA, a doença começa a apresentar um estágio mais avançado. Essa

afirmação esta de acordo com os dados do presente estudo, pois no período de 5 semanas foi observado no grupo controle aumento na graduação de Mankin, aumento da espessura além da expressão aumentada de IL-1 β quando comparado ao grupo intacto. A progressão da doença foi observada após 8 semanas, demonstrado através do aumento da graduação de Mankin, maior espessura, hiper celularidade, como também aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α e da colagenase MMP-13 no grupo controle.

Com isso, apresenta-se como limitação do estudo a ausência de um período experimental mais prolongado, de modo que se possa avaliar a ação da laserterapia a longo prazo sobre o metabolismo da cartilagem osteoartrítica. Além disso, estudos futuros com a avaliação de outros marcadores inflamatórios e outros parâmetros de irradiação devem ser realizados para esclarecer os efeitos da terapia *laser* na cartilagem articular, de modo que, esse recurso possa ser aplicado de forma segura e eficaz em estudos clínicos, para se determinar os reais efeitos dessa terapia em pacientes com OA.

6. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que o *laser* de baixa intensidade, com comprimento de onda de 830nm, nas fluências de 10 e 50J/cm², foi benéfico no metabolismo da cartilagem articular do joelho de ratos com OA induzida por TLCA, principalmente minimizando os efeitos da hiperplasticidade inicial dos condrócitos frente ao estímulo lesivo. Além disso, o *laser* na fluência de 50J/cm² após 8 semanas, aumentou a expressão sérica das citocinas IL-4 e IL-10, favorecendo um efeito regulatório do processo inflamatório, o qual é determinante para maior gravidade da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL- 1 and BMPS: Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **European Cells & Materials**, v. 12, p. 49-56, 2006.

AMEYE, L.G.; YOUNG, M.F. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the 'Holy Grail'. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 5, p. 537-47, 2006.

APPLETON, C.T.; MCERLAIN, D.D.; PITELKA, V.; SCHWARTZ, N.; BERNIER, S.M.; HENRY, J.L. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Research e Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2007.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. United States of America: Ed Churchill Livingstone, 1997.

BAYAT, M.; ANSARI, E.; GHOLAMI, N.; BAYAT, A. Effect of low-level helium-neon laser therapy on histological and ultrastructural features of immobilized rabbit articular cartilage. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 2, p.81-7, 2007.

BECKERMAN, H.; DE BIE, R.; BOUTER, L.; DE CUYPER, H.; OOSTENDORP, R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v. 72, n. 7, p. 483-91, 1992.

BENDELE, A. M. Animals models of osteoarthritis. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 1, n. 4, p. 363-376, 2001.

BONDESON, J.; WAINWRIGHT, S.D.; LAUDR, S.; AMOS, N.; HUGHES, C. The rolo of sinovial macrophages and macrophage-produceec cytocines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**; v. 8, n. 6, p. R187, 2006.

BORGES, D.S.; MORETTI, J.A.; PARIZOTTO, N.A.; CHARGAS, E.F. Influência do laser arseneto de gálio (Ga-As) sobre a dor no modelo experimental de contorsão abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.1, p.1-7, 1996.

BOSSINI, P.S.; FANGEL, R.; HABENSCHUS, R.M. ; RENNO, A.C.M. ; BENZE, B.; ZUANON, J.A.; *et al.* Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 209-213, 2009.

BROOKS, P. M. Imapct of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and helth economic implications. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 14, p. 573-577, 2002.

BROSSEAU, L.; WELCH, V.; WELLS, G.; TUGWELL, P.; DE BIE, R.; GAM, A.; *et al.* Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis. **The Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 8, p. 1961-9, 2000.

CHO, H.J.; LIM, S.C.; KIM, S.G.; KIM, Y.S.; KANG, S.S.; CHOI, S.H.; *et al.* Effect of low-level laser therapy on osteoarthropathy in rabbit. **In vivo**, v. 18, n. 5, p. 585-91, 2004.

COLLS, J. **La terapia laser hoy**. Barcelona: Edición Centro de Documentacion Laser, 1985.

COOMBE, A.R.; HO, C-TG.; DARENDELILER, M.A.; HUNTER, N.; PHILIPS, J.R.; CHAPPLE, C.C.; YUM, L.W.P. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clinical Orthodontics and Research**, v.4, n. 1, p. 3–14, 2001.

CORNELIS, F.M.; LUYTEN, F.P.; LORIES, R.J. Functional effects of susceptibility genes in osteoarthritis. **Discovery Medicine**, v. 12, n. 63, p. 129-39, 2011.

BREEDVELD, F. C. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. **Rheumatology**, v. 43, p. 14-18, 2004.

CRESSONI, M.D.; GIUSTI, H.H.; PIÃO, A.C.; DE PAIVA CARVALHO, R.L.; ANARUMA, C.A.; CASAROTTO, R.A. Effect of GaAlAs laser irradiation on the epiphyseal cartilage of rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 4, p. 527-32, 2010.

DA ROSA, A.S.; DOS SANTOS, A.F.; DA SILVA, M.M.; FACCO, G.G.; PERREIRA, D.M.; ALVES, A.C.; *et al.* Effects of low-level laser therapy at wavelengths of 660 and 808 nm in experimental model of osteoarthritis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 161-6, 2012.

DIAS, C.N.K.; RENNER, A.F.; SANTOS, A.A.; VASILCEAC, F.A.; MATTIELLO, S.M. Progression of articular cartilage degeneration after application of muscle stretch. **Connective Tissue Research**, v. 53, n. 1, p. 39-47, 2012.

ENWEMEKA, C.S.; PARKER, J.C.; DOWDY, D.S.; HARKNESS, E.E.; SANFORD, L.E.; WOODRUFF, L.D. The efficacy of Low-Power Lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 4, p. 323-329, 2004.

FELICE, J.C.; COSTA, L.F.C.; DUARTE, D.G.; CHAHADE, W.H. Elementos básicos de diagnóstico da osteoartrose. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 11, p. 68-81, 2002.

FUJITA, I.; HIRATA, S.; ISHIKAWA, H.; MIZUNO, K.; ITOH, H. Apoptosis of hypertrophic chondrocytes in rat cartilaginous growth plate. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 2, n.5, p. 328-33, 1997.

- GOLDRING, M.B. The role of chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis Rheumatism**, v. 43, n.9, p.1916-26, 2000.
- GOLDRING, M.B.; GOLDRING, S.R. Osteoarthritis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 3, p. 626-34, 2007.
- GOLDRING, M.B.; OTERO, M. Inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, n. 5, p. 471-8, 2011.
- GOTTLIEB, T.; JORGENSEN, B.; ROHDE, E.; MÜLLER, G.; SCHELLER, E.E. The influence of irradiation low-level diode laser on the proteoglycan content in arthrotically cartilage in rabbits. **Medical laser application**, v. 21, n. 1, p. 53-59, 2006.
- HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; ZHUO, Y.; WESOLOWSKI, G.A.; RODAN G.A.; DUONG, T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, v. 38, n. 2, p. 234-43, 2006.
- HONMURA, A.; ISHII, A.; YANESE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser radiation of hyperalgesia in carrageenin-induced inflamaion. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 13, p. 463-469, 1993.
- ISHIGURO, N.; KOJIMA, T.; POOLE, R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. **Journal of Medical Sciences**, v. 65, p. 73-84, 2002.
- JEAN, Y.H.; WEN, Z.H.; CHANG, Y.C.; HSIEH, S.P.; TANG, C.C.; WANG, Y.H.; *et al.* Intra-articular injection of the cyclooxygenase- 2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression inanterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 6, p. 638-45, 2007.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro; Ed. Guanabara Koogan, 2011.
- JUNQUEIRA, L.C.; MONTES, G.S.; SANCHEZ, E.M. The influence of section thickness on the study of collagen by the Pricrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, n. 1, p. 153-6, 1982.
- KAMALI, F.; BAYAT, M.; TORKAMAN, G.; EBRAHIMI, E.; SALAVATI, M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 88, n. 1, p. 11-5, 2007.
- KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2011.

KARU, T.I. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proceedings of effects of low power light on biological systems**, v. 2630, p. 2-9, 1995.

KARU, T.I. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T.I.; LUBART, R. **Effect of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p. 1-7, 2000.

KARU, T.I. **The science of low-power laser therapy**. Australia: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.

KARU, T.I.; KOLYAKOV, S.F. Exact action spectra for cellular response relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 355-61, 2005.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia: Prática Baseada em Evidências**. 11ª ed. Ed. Manole Ltda, 2003.

KITCHEN, S.S.; PARTRIDGE, C.J. Review of low level laser therapy. **Physiotherapy**, v. 77, n. 33, p. 161-168, 1991.

KUHNT, K.; D' LIMA, D.D.; HASHIMOTO, S.; LOTZ, M. Cell death in cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7ª ed. Filadélfia; Ed. Elsevier Saunders, 2005.

LEROUX, M.A.; CHEUNG, H.S.; BAU, J.L.; WANG, J.Y.; HOWELL, D.S.; SETTON, L.A. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 7, p. 633-40, 2001.

LIN, Y.S.; HUANG, M.H.; CHAI, C.Y. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 4, p. 377-83, 2006.

LIN, Y.S.; HUANG, M.S.; CHAI, C.Y.; YANG, R.C. Effects of helium-neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 10, n. 83, p. 758-765, 2004.

LIRANI, A.P.; JORGETTI, V.; LOPES DA SILVA, O. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n.6, p. 735-40, 2006.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**. 3ª ed., Barueri-SP; Ed. Manole Ltda, 2001.

MANKIN, H.J.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 53, n. 3, p. 523-537, 1971.

MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J.P.; ROUGHLEY, P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 2, p. 351-84, 2008.

NAITO, K.; WATARI, T.; OBAYASHI, O.; KATSUBE, S.; NAGAOKA, I.; KANEKO, K. Relationship between serum undercarboxylated osteocalcin and hyaluronan levels in patients with bilateral knee osteoarthritis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 29, n. 5, p. 756-60, 2012.

NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H.; SANO, K.; NISHISAKA, T.; OZAWA, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblast. **Bone**, v. 40, n. 1, p. 140-148, 2007.

NORKIN, C.C.; LEVANGIE, P.K. **Articulações estrutura e função: uma abordagem prática e abrangente**. 2ª ed. Rio de Janeiro; Ed. Revinter, 2001.

ORTIZ, M.C.S. **Efeito do laser de baixa potência sobre o processo inflamatório articular de coelhos**. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde) – Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001. 161p.

ORTIZ, M.C.S.; CARRINHO, P.M.; SANTOS, A.A.S. dos; GOLÇALVES, R.C.; PARIZOTTO, N.A. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-40, 2001.

OSTALOWSKA, A.; BIRKNER, E.; WIECHA, M.; KASPERCZYK, S.; KASPERCZYK, A.; KAPOLKA, D.; ZON-GIEBEL, A. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 2, p. 139-145, 2006.

PAIOTTI, A.P.; RIBEIRO, D.A.; SILVA, R.M.; MARCHI, P.; OSHIMA, C.T.; NETO, R.A.; *et al.* Effect of COX-2 inhibitor lumiracoxib and the TNF- α antagonist etanercept on TNBS-induced colitis in Wistar rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 43, n. 3, p. 307-17, 2012.

PEARSON, R.G.; KURIEN, T.; SHU, K.S.; SCAMMELL, B.E. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 3, p. 324-31, 2011.

PEREIRA, D.; PELETEIRO, B.; ARAÚJO, J.; BRANCO, J.; SANTOS, R.A.; RAMOS, E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, n. 11, p. 1270-85, 2011.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 169-178, 2006.

PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, M.G.; MARTINS, P.P.M.; RAMALHO, L.M.P.; OLIVEIRA, M.A.M.; JUNIOR, A.N.; *et al.* Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Therapy**, v. 13, p. 73-9, 2001.

PORTH, C.M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8 ed., Rio de Janeiro; Ed. Guanabara Koogan, 2010.

PRITZKER, K.P.; GAY, S.; JIMENEZ, S.A.; OSTERGAARD, K.; PELLETIER, J.P.; REVELL, P.A.; SALTER, D.; VAN DEN BERG, W.B. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 1, p. 13-29, 2006.

RENNER, A.F.; CARVALHO, E.; SOARES, E.; MATTIELLO-ROSA, S.M. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 2, p. 196-202, 2006.

RENNO, A.C.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 4, p. 275-80, 2007.

ROUSSEAU, J.C.H.; GARNERO, P. Biological markers in osteoarthritis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 265-77, 2012.

SANTOS, A.A. **Os efeitos do laser terapêutico na cartilagem articular em modelo experimental de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

SHARMA, L.; KAPOOR, D.; ISSA, S.; Epidemiology of osteoarthritis: an update. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 2, p. 147-56, 2006.

SNYDER-MACKLER, L.; BORK, C. E. Effect of helium-neon laser irradiation on peripheral sensory nerve latency. **Physical Therapy**, v. 68, n. 2, p. 223-5, 1988.

SORIANO, F.; CAMPANA, V.; MOYA, M.; GAVOTTO, A.; SIMES, J.; SORIANO, M.; *et al.* Photobiomodulation of pain and inflammation in microcrystalline arthropathies: experimental and clinical results. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n.2, p. 140-50, 2006.

SUN, G.; TUNER, J. Low-level laser therapy in dentistry. **Dental Clinics North America**, v. 48, n. 4, p. 1061-76, 2004.

TAGUCHI, Y.; KUROKAWA, Y.; OHARA, I.; OUCHI, H. Thermographic changes following laser irradiation for pain relief. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 9, n. 2, p. 143-146, 1991.

TETLOW, C.L.; ADLAM, D.J.; WOOLLEY, D.E. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritis cartilage. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n.3, p. 585-594, 2001.

THOMAS, C.M.; FULLER, C.J.; WHITTLES, C.E.; SHARIT, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n.1, p.27-34, 2007.

TIMOFEYEV, V.T.; PORYADIN, G.V.; GOLOVIZNIN, M.V. Laser irradiation as a potential pathogenetic method for immunocorrection in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 8, n. 1, p. 35-40, 2001.

TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; GUZZARDELLA, G.A.; MORRONE, G.; CARPI, A.; *et al.* Laser biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 55, n. 2, p. 117-20, 2001.

VASILCEAC, F.A.; RENNER, A.F.; TEODORO, W.R.; MATTIELLO-ROSA, S.M. The remodeling of collagen fibers in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International**, v. 31, n. 6, p. 737-42, 2011.

VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A.; ROCHA, F.A.; FERREIRA, S.H.; POOLE, S.; *et al.* Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 102-8, 2003.

VELOSA, A.P.P.; TEODORO, W.R.; YOSHINARI, N.H. Colágeno na cartilagem osteoartrósica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 3, p.160-6, 2003.

VINCENT, K.R.; CONRAD, B.P.; FREGLY, B.J.; VINCENT, H.K. The pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. **PM&R The Journal of Injury, Function and rehabilitation**, v. 4, n. 5, p. S3-9, 2012.

VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

WILLIAMS, J.M.; FELDEN, D.L.; PETERSON, R.G.; O'CONNOR, B.L. Effects of surgically induced instability on rat Knee articular cartilage. **Journal of Anatomy**, v. 134, n. 1, p. 103-9, 1982.

YASUDA, T. Cartilage destruction by matrix degradation products. **Modern Rheumatology**, v. 16, p. 197-205, 2006.

ZHANG, W.; JONES, A.; DOHERTY, M. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 8, p. 901-907, 2004.

ZHANG, L.; ZHAO, J.; KUBOYAMA, N.; ABIKO, Y. Low-level laser irradiation treatment reduces CCL2 expression in rat rheumatoid synovia via a chemokine signaling pathway. **Lasers in Medical Science**, v. 26, n. 5, p. 707-17, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do comitê de ética em experimentação animal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luis, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal
nº 040/2010

Protocolo nº. 023/2010.

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar em sua 44ª. Reunião **APROVOU** o projeto "os efeitos do laser terapêutico na cartilagem articular em modelo experimental de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior" apresentado pelos pesquisadores Poliani de Oliveira e Anderson Amaro dos Santos.

São Carlos, 17 de agosto de 2010.


Profª. Dra. Keico Okino Nonaka
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

ANEXO B:

Primeira página do artigo intitulado: “*Effects of low level laser therapy in an experimental model of osteoarthritis in knee of rats*”, submetido para publicação no periódico “*Lasers in Surgery & Medicine*”.

**Effects of low level laser therapy in an experimental model of
osteoarthritis in knee of rats**

Poliani Oliveira, MS,¹ Anderson A. Santos, MS¹ Tamara Rodrigues,¹ Carla R. Tim, MS,¹ Karina Z. Pinto, PhD,² Stela M. Mattiello, PhD,¹ Nivaldo A. Parizotto, PhD,¹ Fernanda Freitas Anibal, PhD², and Ana Claudia Muniz Renno, PhD³

¹Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brazil.

²Department of Morphology and Pathology, Federal University of São Carlos. CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brazil.

³Department of Bioscience, Federal University of São Paulo. CEP 11050-250 Santos, SP, Brazil.

Corresponding author: Ana Claudia Muniz Renno

Department of Bioscience, Federal University of São Paulo. Av. Ana Costa, 95, Santos, São Paulo, 11050-250, Brazil. Phone +55 13 32218303. E-mail:acmr_ft@yahoo.com

ANEXO C

Email recebido em 26/01/2013 do periódico “*Lasers in Surgery & Medicine*” apontando a submissão do artigo intitulado “*Effects of low level laser therapy in an experimental model of osteoarthritis in knee of rats*”.

----- Mensagem encaminhada -----

De: "lsm@manuscriptmgt.com" <lsm@manuscriptmgt.com>

Para: acmr_ft@yahoo.com.br

Enviadas: Sábado, 26 de Janeiro de 2013 12:37

Assunto: Lasers in Surgery & Medicine - Manuscript LSM-13-0026

26-Jan-2013

Manuscript number: LSM-13-0026

Dear Ms. Renno:

Thank you for submitting your manuscript entitled Effects of 830nm laser in cartilage structure and inflammatory markers in an experimental model of osteoarthritis by Oliveira, Poliani; Santos, Anderson; Rodrigues, Tamara; Tim, Carla; Pinto, Karina; Matiello, Stela; Parizotto, Nivaldo; Anibal, Fernanda; Renno, Ana. We will be passing it on to the editors for evaluation shortly. Please note, however, that if the format or any part of your paper to include text; abstract and/or references or figures are not styled according to our author instructions we will not be able to process your submission. In such case, we will contact you and we will unsubmit your paper back to you for proper formatting and re-submission.

To track the progress of your manuscript through the editorial process using our new web-based system, simply point your browser to:

<http://mc.manuscriptcentral.com/lsm>

May we also kindly ask you to always include the manuscript ID number LSM-13-0026 in any future correspondence regarding this article.

If you experience problems associated with the submission web site, please click on the "Get Help Now" link at

<http://mc.manuscriptcentral.com/lsm>

J. Stuart Nelson

Lasers in Surgery & Medicine Editor-in-Chief