



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 na
cartilagem articular em modelo
experimental de osteoartrite induzida
por transecção do ligamento cruzado
anterior.**

ANDERSON AMARO DOS SANTOS

São Carlos – SP

2012

ANDERSON AMARO DOS SANTOS

**Os efeitos do *laser* terapêutico na
cartilagem articular em modelo
experimental de osteoartrite induzida
por transecção do ligamento cruzado
anterior.**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia da Universidade
Federal de São Carlos, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

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

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto

São Carlos – SP

2012

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

S237eL Santos, Anderson Amaro dos.
Os efeitos do laser terapêutico na cartilagem articular em modelo experimental de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior / Anderson Amaro dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisioterapia. 2. Laserterapia. 3. Cartilagem articular. 4. Osteoartrite. 5. Laser de baixa intensidade. I. Título.

CDD: 615.82 (20ª)

Anderson Amaro dos Santos

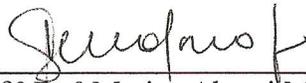
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 22/11/2012

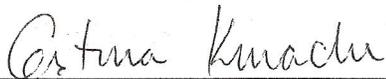
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Muniz Renno (Orientadora)
(UNIFESP)



Prof.^a Dr.^a Mariza Akemi Matsumoto
(Universidade do Sagrado Coração / Bauru - SP)



Prof.^a Dr.^a Cristina Kurachi
(IFSC/ USP)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Silvio e Fátima,
exemplo de pessoas dignas, pelo apoio
incondicional dado em todas as
etapas de minha vida.*

*E ao meu filho Eduardo que um dia
possa entender a distância em função
desta etapa de minha vida*

AMO e ADMIRO muito vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Cláudia Muniz Rennó, pessoa de extrema sabedoria e competência, os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade dada para que eu pudesse realizar este mestrado, pelos conhecimentos compartilhados e principalmente pela paciência, compreensão e amizade construída ao longo deste período. MUITO OBRIGADO!

Ao orientador Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, pessoa extremamente carismática e de muita sabedoria, agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse desenvolver este mestrado e principalmente por ter me dado a oportunidade de ministrar a minha primeira aula e assim ter me ensinado como deve se portar um professor. MUITO OBRIGADO!

Por fim, um agradecimento especial a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado a mim concedida. OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me proporcionado saúde para que eu pudesse realizar mais este projeto de vida.

À minha namorada Bruna, pela compreensão, companheirismo e, principalmente, por todo amor e felicidade que trouxe à minha vida.

Aos professores: Profa. Dra Mariza Akemi Matsumoto e Profa. Dra. Cristina Kurachi, que se dispuseram participar da banca examinadora proporcionando suas contribuições científicas.

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

Ao amigo Fernando (Zé), pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto, como também pelo companheirismo desde a graduação.

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

À Profa. Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto, pela ajuda nas análises dos resultados.

Ao Prof. Dr. Paulo Bossini, pelas sugestões na correção do texto.

À amiga Poliani, pela ajuda e principalmente pela paciência ao longo do desenvolvimento do nosso trabalho.

Aos amigos do laboratório: Carla e Kido pelos incentivos, conversas, risadas e jantares, tão importantes nos momentos de lazeres.

Aos amigos de infância: Leandro, Alexandre, André, Ricardo e Ullysses, pelas muitas cervejas compartilhadas.

Aos amigos osteopatas Alexandre e Berta, pela amizade e principalmente pela confiança que em mim depositaram.

À Claudia, 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.

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

MUITO OBRIGADO!!!

Vou-me embora pra Pasárgada

Vou-me embora pra Pasárgada
Lá sou amigo do rei
Lá tenho a mulher que eu quero
Na cama que escolherei
Vou-me embora pra Pasárgada
Vou-me embora pra Pasárgada

Aqui eu não sou feliz
Lá a existência é uma aventura
De tal modo inconsequente
Que Joana a Louca de Espanha
Rainha e falsa demente
Vem a ser contraparente
Da nora que nunca tive

E como farei ginástica
Andarei de bicicleta
Montarei em burro brabo
Subirei no pau-de-sebo
Tomarei banhos de mar!
E quando estiver cansado
Deito na beira do rio
Mando chamar a mãe-d'água
Pra me contar as histórias
Que no tempo de eu menino
Rosa vinha me contar
Vou-me embora pra Pasárgada

Em Pasárgada tem tudo
É outra civilização
Tem um processo seguro
De impedir a concepção
Tem telefone automático
Tem alcalóide à vontade
Tem prostitutas bonitas
Para a gente namorar

E quando eu estiver mais triste
Mas triste de não ter jeito
Quando de noite me der
Vontade de me matar
— Lá sou amigo do rei —
Terei a mulher que eu quero
Na cama que escolherei
Vou-me embora pra Pasárgada.
(MANOEL BANDEIRAS)

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) no comprimento de onda 685 nm nas fluências 10 J/cm² e 50 J/cm² aplicados na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos a um modelo experimental de osteoartrite (OA) induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 80 ratos machos (*Wistar*), que foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: Grupo Intacto (I); Controle Lesão (C); Lesão tratado com *laser* na fluência de 10 J/cm² (L10) e Lesão tratado com *laser* na fluência de 50 J/cm² (L50). Os grupos foram subdivididos em 2 subgrupos (n=10), com diferentes datas de sacrifício. O primeiro subgrupo foi sacrificado 5 semanas pós TLCA e foram realizadas 15 sessões de tratamento em 3 semanas. O segundo subgrupo foi sacrificado 8 semanas pós TLCA e foram realizadas 30 sessões de tratamento em 6 semanas. Os tratamentos se iniciaram 2 semanas pós TLCA. **Resultados:** Na análise semi-quantitativa de celularidade no período de 8 semanas, o grupo C apresentou maior graduação que o grupo I. Em relação ao conteúdo de proteoglicanas, no período de 5 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram menor quantidade de proteoglicanas que o grupo I, ainda, após 8 semanas, o grupo C apresentou menor quantidade de proteoglicanas que os grupos I e L10, e o grupo L50 apresentou menor quantidade de proteoglicanas que grupo I. Já a análise morfométrica de celularidade, revelou que após 8 semanas o grupo C apresentou maior número de condrócitos que os grupos I, L10 e L50. A análise morfométrica de espessura mostrou que em 5 semanas os grupos C e L50 apresentaram maior espessura que o grupo I, além disso, no período de 8 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram maior espessura que o grupo I. Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas quantidades de fibras totais de colágeno. Em relação às análises semi-quantitativas de imunohistoquímica, no período de 8 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram maior quantidade de condrócitos imunomarcados para TNF- α , IL1 β e MMP-13 em relação ao grupo I. Além disso, os grupos tratados (L10 e L50) apresentaram menor quantidade de condrócitos imunomarcados para MMP-13 que o grupo C. **Conclusão:** A LLLT no comprimento de onda 685 nm nas fluências de 10 J/cm² e 50 J/cm² foi benéfico à cartilagem articular do joelho de ratos submetidos ao modelo experimental de OA por TLCA. Contudo, o *laser* na fluência de 10 J/cm² foi mais eficaz, pois promoveu a síntese de proteoglicanas nos animais tratados no período de 8 semanas.

PALAVRAS-CHAVE: cartilagem articular, osteoartrite e terapia *laser* de baixa intensidade.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of laser therapy on the degenerative modifications in articular cartilage after anterior cruciate ligament transection (ACLT). **Methods:** We used eighty-male rats (Wistar), distributed into four groups: intact, injury control, injury laser treated, at 50 J/cm² and injury laser treated, at 10 J/cm². Animals were distributed into 2 subgroups, with different periods of sacrifice 5 and 8 weeks post-surgery. The animals were submitted to the surgery to induce OA by anterior cruciate ligament transection. Laser treatment started 2 weeks after the surgery and it was performed for 15 and 30 sessions. A laser 685 nm, at 10 and 50 J/cm², 30mW was used. **Results:** Initial signs of tissue degradation could be observed 5 weeks post- ACLT, with the decrease of proteoglycans concentration and increase of thickness in the CG. After 8 weeks post-surgery, analysis showed a progression in the degenerative process in the CG, revealed by the increase of cellularity and higher TNF- α , IL1 and MMP-13 immunoexpression. Laser therapy was able of modulating some of the aspects related to the degradative process, such as biomodulation of the number of chondrocyte proliferation, prevention of proteoglycans loss and decrease of MMP-13 immunoexpression. **Conclusion:** This study showed that 685nm laser, especially at 10 J/cm² prevented features related to the articular degenerative process in the knees of rats.

Keywords: articular cartilage, osteoarthritis and laser therapy

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT	= Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADM	= Amplitude de Movimento
ANOVA	= Análise de Variância
ATP	= Adenosina Trifosfato
C	= Grupo Controle Lesão
cm	= Centímetro
cm²	= Centímetro quadrado
DNA	= Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	= Ácido Etilenodiaminotetracético
g	= Grama
GA-Al-As	= Arseneto de Gálio
GAG	= Glicosaminoglicana
I	= Grupo Intacto
IL1β	= Interleucina-1 β
HE	= Hematoxilina-Eosina
He-Ne	= Hélio-Neônio
J/cm²	= Joule por Centímetro Quadrado
Laser	= Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
LLLT	= <i>Low level laser therapy</i> (Laser terapêutico de baixa potência)
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 extra celular
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
OMS	= Organização Mundial da Saúde
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: Procedimento cirúrgico para TLCA. (A) Tricotomia da região do joelho esquerdo; (B) Incisão longitudinal na região parapatelar; (C) O tendão patelar foi localizado e rebatido medialmente; (D) Acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior; (E) Transecção do ligamento cruzado anterior através de uma tesoura cirúrgica; (F) Teste de gaveta anterior; (G) Tendão patelar foi reposicionado e suturado, por fim, foi feita a sutura da incisão.....37

Figura 2: 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).....41

Figura 3: 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).....42

Figura 4: 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/cm² no período experimental de 5 semanas – (Seta) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração avermelhada; (Cabeça de seta) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração esverdeada (*) Corno anterior do menisco medial. (Barra 100 μm).....43

Figura 5: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa celularidade. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * $p \leq 0,05$45

Figura 6: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa do conteúdo de proteoglicanas. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * p≤ 0,05.....46

Figura 7: Média e desvio padrão da análise morfométrica de celularidade. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * p≤ 0,05.....47

Figura 8: Média e desvio padrão da análise morfométrica de espessura. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * p≤ 0,05.....48

Figura 9: Média e desvio padrão das fibras totais de colágeno. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas.....49

Figura 10: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para TNF- α . I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * p≤ 0,05.....50

Figura 11: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para IL1 β . I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * p≤ 0,05.....51

Figura 12: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para MMP-13. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm²; A: subgrupos do período experimental 5 semanas; B: subgrupos do período experimental 8 semanas. * p≤ 0,05.....52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sistema de graduação Histológicas-Histoquímicas para cartilagem articular.....	40
---	----

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Essa dissertação foi estruturada na forma de artigo, sendo dividida em três partes e redigida de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A primeira parte é constituída de uma contextualização e o objetivo. A segunda parte compreende o artigo intitulado: Os efeitos do laser terapêutico na cartilagem articular em modelo experimental de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.

A terceira parte é composta dos anexos com o parecer do comitê de ética (ANEXO A), primeira página do artigo submetido para publicação na revista *Osteoarthritis and Cartilage* (ANEXO B) e do email de comprovação da submissão do artigo intitulado “*Effects of low-level laser therapy on cartilage repair in an experimental model of osteoarthritis*” no periódico *Osteoarthritis and Cartilage* (ANEXO C).

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVEATURA E SÍMBOLOS

ÍNDICE DE TABELAS

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

PARTE 1.....	19
CONTEXTUALIZAÇÃO.....	19
1. Estrutura e Organização da Cartilagem Articular.....	19
2. Osteoartrite.....	20
3. Modelo Experimental de Osteoartrite por Transecção do Ligamento Cruzado Anterior.....	22
4. Terapia <i>Laser</i> de Baixa Intensidade.....	23
OBJETIVO.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
PARTE 2.....	30
ESTUDO.....	30
1. Resumo.....	30
2. <i>Abstract</i>	32
3. Introdução.....	33
4. Materiais e Métodos.....	35

4.1. Animais de Experimentação.....	35
4.2. Grupos Experimentais.....	35
4.3. Modelo Experimental de Osteoartrite.....	36
4.4. Protocolo de Tratamento.....	37
4.5. Eutanasia e Processamento Histológico das Articulações.....	38
4.6. Análise dos Cortes.....	39
4.6.1. Análise Semi-quantitativa de Celularidade.....	39
4.6.2. Análise Semi-quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanas.....	39
4.6.3. Análise Morfométrica de Celularidade.....	40
4.6.4. Análise Morfométrica de Espessura.....	41
4.6.5. Análise de Quantificação das Fibras Totais de Colágeno.....	42
4.6.6. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica.....	43
4.7. Análise Estatística.....	44
5. Resultados.....	45
5.1. Análise Semi-quantitativa de Celularidade.....	45
5.2. Análise Semi-quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanas.....	46
5.3. Análise Morfometria de Celularidade.....	47
5.4. Análise Morfometria de Espessura.....	48
5.5. Análise das Fibras Totais de Colágeno.....	49
5.6. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica – TNF- α	50
5.7. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica – IL1 β	51
5.8. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica – MMP-13.....	52
6. Discussão.....	53

7. Conclusão.....	59
8. Referências Bibliográficas.....	59
PARTE 3.....	64
ANEXOS.....	64
Anexo A.....	64
Anexo B.....	65
Anexo C.....	66

PARTE 1 :

CONTEXTUALIZAÇÃO

1. Estrutura e Organização da Cartilagem Articular

A cartilagem articular é um tecido avascular e aneural de lento *turnover* e remodelamento, e em condições normais há um balanço entre anabolismo e catabolismo para manter a homeostase do tecido (FELICE, 2002; AIGNER, SOEDER, HAAG, 2006). A cartilagem articular é especializada em suportar cargas aplicadas à articulação, além de proporcionar a melhor ação biomecânica, assim, o anabolismo é de vital importância para cartilagem manter sua integridade, já que está constantemente sujeita a estresse mecânico e proteólise catabólica (QUINN et al., 2005). Os condrócitos são as únicas células presentes na cartilagem articular e são os únicos responsáveis pela manutenção dos componentes da matriz extra celular (MEC) por meio de citocinas anabólicas e catabólicas (THOMAS et al., 2007).

A MEC é composta predominantemente por uma densa rede de fibras de macromoléculas de colágeno (60%), principalmente do tipo II, entretanto, também estão presentes os tipos V, VI, IX, X, XI, XII e XV (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003; ARCHER & FRANCIS-WEST, 2003). Esses colágenos se encontram embebidos em um firme gel hidratado de proteoglicanas. As proteoglicanas são formadas por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas (formadas por polissacarídeos sulfatado de condroitina 4, 6 e querato sulfato) ligadas a esse núcleo e podem ser encontradas como monômeros ou na forma agregada. O agregado de proteoglicanas é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatadas) com múltiplos monômeros de proteoglicanas ligadas a ele (GOLDRING, 2000; ALFORD & COLE, 2005). Por ser uma molécula hidrofílica, as proteoglicanas conferem resistência à compressão tecidual através de interações de tumefação osmótica, resistindo à perda de fluídos (SZAFRANKI, GRODZINSKY, BRUGER, 2004).

As mudanças morfológicas na cartilagem articular são influenciadas pelas demandas funcionais do tecido relacionadas à absorção e redistribuição de cargas compressivas, assim, a estrutura da cartilagem articular muda conforme a profundidade

a partir da superfície até o osso subcondral (ANGEL et al., 2003). Alguns autores dividem a cartilagem articular em camadas paralelas a superfície (camada superficial, camada média, camada profunda e cada calcificada), em que cada camada apresenta funções específicas relacionadas com suas estruturas (LYONS et al., 2006; VANWANSELE, LUCCHINETTI, STUSSI, 2002). Dessa maneira, é evidente que quando o tecido é submetido a cargas anormais além da sua capacidade de remodelamento, ocorre um favorecimento das atividades catalíticas, em que o condrócito altera seu estado metabólico e passa a sintetizar enzimas proteolíticas caracterizando o início de um processo degenerativo como a osteoartrite (OA) (FELICE et al., 2002, LEROUX et al., 2001).

2. Osteoartrite

A OA é a forma mais comum de artrite e constitui-se na principal causa de incapacidade e morbidade entre os idosos, além de estar associada a um elevado custo social (BROOKS, 2002; BREEDVELD, 2004). A organização mundial da saúde estima que no mundo 25% dos adultos acima de 65 anos sofrem de dor e apresentam incapacidade associada à doença (BREEDVELD, 2004). Segundo BOSOMWORTH (2009), a OA de joelho pode ser observada radiograficamente em 33% da população com mais de 60 anos de idade, sendo responsável por um aumento na incidência de incapacidade entre as pessoas que são acometidas por alguma doença crônica.

Autores afirmam que OA é uma lesão mecânica desencadeada frente a estímulos lesivos que alteram o estado metabólico dos condrócitos, estes passam a sintetizar citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que estimulam a produção de uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs) (CARTER et al., 2004; SZAFRANKI, GRODZINSKY, BRUGER, 2004; YASUDA, 2006). A cascata proteolítica que ocorre na OA e gera degradação dos colágenos e proteoglicanas, envolve colagenases, como a MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase neutrofílica) e MMP-13 (colagenase-3), gelatinases (MMP-9 e MMP-2), e estromelisinases, em particular MMP-3 (estromelisina-3) (AIGNER et al., 2006).

Diante de um processo lesivo desencadeado, a diminuição de proteoglicanas é uma das primeiras anormalidades detectáveis e aparece antes mesmo de sinais macroscópicos de deteriorização da superfície articular (NARMONEVA et al., 2003). Com a perda de proteoglicanas, o tecido perde sua função biomecânica uma vez que tem sua capacidade elástica diminuída, o que proporciona a evolução do processo da OA com perda dos componentes da MEC e deteriorização do tecido (GOTTLIEB et al., 2006; PRITZKER et al., 2006). Como os condrócitos aumentam sua taxa metabólica na tentativa de recuperar o tecido lesado, é possível observar um aumento no número de células, desorganização celular, presença de clones de condrócitos, hipertrofia de condrócitos e o processo culmina na morte celular por apoptose (PRITZKER et al., 2006; THOMAS et al., 2007).

Outra alteração que ocorre com a cartilagem articular sob processos lesivos mais avançados, é a diminuição de colágeno tipo II, ou até sua substituição por colágeno tipo I. Com o decorrer da lesão, é possível observar fibrilações no tecido, diminuição na espessura da matriz, fissuras no tecido que podem evoluir até as camadas mais profundas, presença de osteófitos marginais e por fim remodelamento do osso subcondral com total deformação do tecido articular (RENNER et al., 2006; DIAS et al., 2011; PRITZKER et al., 2006).

Vale ressaltar, que as articulações acometidas pela OA não conseguem manter a sua estrutura e função, o que provoca dores, rigidez, inflamação local e perda de mobilidade, levando a uma redução significativa na qualidade de vida dos pacientes que sofrem da doença. Neste contexto, diversos modelos experimentais de OA em diferentes espécies de animais têm sido amplamente utilizados nos estudos para compreensão dos aspectos fisiopatológicos inerentes a degeneração da cartilagem articular, como também para averiguar o potencial terapêutico de condutas em relação à modulação da doença (BENDELE, 2001; AMEYE & YOUNG, 2006).

3. Modelo Experimental de Osteoartrite por Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

Os modelos experimentais de OA podem ser classificados em espontâneos, geneticamente induzidos, induzidos cirurgicamente ou por injeção intra-articular de substâncias químicas. Não existe um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da OA humana e cada um apresenta vantagens e desvantagens (APPLETON et al., 2007; GALOIS, et al., 2004). O modelo que consiste na transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) de joelhos de ratos apresenta muitos aspectos patogênicos semelhantes à OA traumática que ocorre em humanos (KÄÄB et al., 2000, APPLETON et al., 2007).

Além do mais, a grande vantagem do modelo experimental de TLCA em ratos está no fato de o dano articular se desenvolver de forma progressiva, o que torna possível estabelecer o estágio da lesão em que se deseja desenvolver os estudos (BENDELE, 2001; GALOIS, et al., 2004; GERWIN et al., 2010). Alguns autores afirmam que os achados após 2 semanas da cirurgia de TLCA em ratos, correspondem aos estágios iniciais da OA com a presença de alterações histológicas no tecido e por volta de 12 semanas as alterações encontradas correspondem aos estágios mais avançados da doença com a observação de alterações estruturais do tecido. (BENDELE, 2001; APPLETON et al., 2007).

Como atualmente as opções de tratamento da OA incluem além de mudanças no estilo de vida para reduzir os fatores agravantes (como em relação à obesidade) e a prescrição de exercícios físicos adequados, também o uso de recursos farmacológicos (analgésicos e anti-inflamatórios) (CAMPBELL et al., 1994), contudo, a alta incidência de efeitos colaterais gastrointestinais, podem limitar a utilização dos fármacos (ZHANG et al., 2004). Conseqüentemente, novas terapias têm sido investigadas a fim de reduzir ou evitar os efeitos colaterais causados pelos anti-inflamatórios, 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).

4. Terapia *Laser* de Baixa Intensidade

Vale ressaltar que a palavra *laser* é um acrônimo para *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Assim, a LLLT é atualmente um recurso complementar e não invasivo que vem sendo utilizado com fins terapêuticos desde 1960 e constitui-se em um tratamento seguro e efetivo para uma série de condições patológicas nos mais diversos tecidos (KARU, 1998; ENWEMEKA et al., 2004). A ação do laser nos tecidos biológicos pode ser explicada pela teoria fotoquímica (KARU, 1987). De acordo com essa teoria, a irradiação laser é capaz de sensibilizar fotoreceptores (cromóforos) celulares, que quando estimulados realizam a conversão de energia eletromagnética em energia fotoquímica, o que altera a atividade bioquímica celular em relação à cadeia respiratória mitocondrial, resultando em mudança no estado redox, aumento na produção de superóxido e geração de singleto (KARU 1998; VLADIMIROV et al., 2004)

Vários autores evidenciaram que o LLLT aumenta o metabolismo celular caracterizado pelos aumentos das sínteses de DNA e RNA, e da síntese protéica, o que possibilita aceleração da regeneração tecidual pós-lesão, modulação do processo inflamatório e promoção do controle da dor musculoesquelética. (KITCHEN & PARTRIDGE, 1991; VLADIMIROV et al., 2004; PINHEIRO & GERBI, 2006). Baseado nesses efeitos, o *laser* vem ganhando espaço no tratamento da OA.

Neste contexto, estudos têm demonstrado efeitos importantes da LLLT na OA, como a proliferação de condrócitos e aumento das sínteses de proteoglicanas, colágenos e proteínas não colágenas (HERMAN & KHOSLA, 1988; KAMRAVA et al., 2009). LIN et al. (2004), observaram em joelho de coelhos que receberam injeção intra-articular de solução de papaína, que a LLLT no comprimento de onda 632 nm e densidade de potência $3,1 \text{ mW/cm}^2$ aplicada 3 vezes por semana durante 8 semanas, promoveu na cartilagem articular o aumento da presença de proteínas que previnem a morte celular de condrócitos. GOTTLIEB et al. (2006) que aplicaram o *laser* com comprimento de onda 692,6 nm nas fluências de 1 J/cm^2 e 4 J/cm^2 na cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos a TLCA, observaram aumento da síntese de proteoglicanas nos animais irradiados com a maior densidade de energia. BROSSEAU et al. (2005) verificaram diminuição do processo inflamatório, diminuição da dor e

ganho de ADM em pacientes com OA em articulações da mão e tratados com laser 860 nm na fluência 3 J/cm².

Os benefícios do *laser* terapêutico também são descritos através da constatação de uma melhor organização estrutural do tecido cartilaginoso que recebeu a irradiação. CALATRAVA et al. (1997) observaram em lesão osteocondral de joelhos de coelhos, que após aplicação dos *lasers* 632 nm e 904 nm, ambos na fluência de 8 J/cm², houve melhora da organização tecidual, com presença de condrócitos com aspecto morfológico arredondado e organizados em colunas. BAYAT et al. (2007) que aplicaram *laser* He-Ne (632 nm) na fluência de 13 J/cm² na cartilagem articular de joelhos de coelhos pós imobilização, 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. KAMALI et al. (2007) estudaram joelhos de coelhos submetidos a um defeito osteocondral e posteriormente tratados com LLLT comprimento de onda 890 nm na fluência de 4,8 J/cm², encontraram propriedades mecânicas superiores nas articulações irradiadas, o que foi atribuído a uma melhor organização estrutural do tecido.

Embora existam comprovações dos efeitos positivos da LLLT na recuperação tecidual da cartilagem articular, os mecanismos envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos. Além disso, 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, com o intuito de entender melhor o mecanismo de ação da LLLT na cartilagem articular com um processo degenerativo em curso, são necessários novos estudos. Neste contexto, a hipótese do estudo é que o *laser* terapêutico no comprimento de onda 685 nm seja capaz de promover uma melhora na organização estrutural da cartilagem articular de ratos com um processo degenerativo em curso.

OBJETIVO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade no comprimento de onda 685 nm nas fluências de 10 J/cm² e 50 J/cm² aplicados em dois períodos experimentais na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos a um modelo experimental de OA induzida por TLCA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aigner, T; Soeder, S; Haag, J. IL- 1 and BMPs: Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater.* 12: 49-56, 2006.

Alford, JW & Cole, BJ. Cartilage Restoration, Part 1. *American Journal of Sport Medicine.* 33, 2005.

Ameys LG & Young MF. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the 'Holy Grail'. *Current Opinion in Rheumatology* (18) 537-547, 2006.

Angel, J; Razzano, P; Grande, D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage repairs and response to injury. *Sports Med Arthrosc Rev.* 11:168-181,2003.

Appleton, CTG; McErlain, DD; Pitelka, V. et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Research e Therapy.* 9: 1-15, 2007.

Archer, CW & Francis-West, P. The chondrocyte. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 35: 401:404, 2003.

Baxter, GD. Therapeutic lasers: Theory and practice. United States of America: ed hurchill Linvingstone, 1997.

Bayat, M; Ansari, E; Gholami, N. et al. Effect of low-level helium-neon laser therapy on histological and ultrastructural of immobilized rabbit articular cartilage. *J. Photochemistry and photobiology.* 87:81-87, 2007.

Bendele, AM. Animals models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact.* 1 (4): 363-376, 2001.

Bosomworth, NJ. Exercise and knee osteoarthritis: benefit or hazard? *Can. Fam. Physician.* v. 55, n. 9, p. 871-878, 2009.

Breedveld, FC. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. *Rheumatology.* 43:14-18, 2004.

Brooks, PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol.* 14:573-577, 2002.

Brosseau, L; Wells, G; Marchand, S. Randomized controlled trial on low level laser therapy (LLLT) in the treatment of Osteoarthritis (OA) of hand. *Laser in Medicine.* 36:210-219, 2005.

Calatrava, IR; Valenzuela, JMS; Villamandos, RJG; et al. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: Experimental study. *Lasers in medical science.* 12:117-21, 1997.

Campbell, WW; Crim, MC; Dallal, GE; et al. Increased protein requirements in elderly people: new data and retrospective reassessments. *Am J Clin Nutr.* 60 (4) - 501-509, 1994.

Carter, DR; Beaupré, GS; Wong, M; et al. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop.* 27: 69-77, 2004.

Cho, HJ; Lim, SC; Kim SG; et al. Effect of Low-level Laser Therapy on Osteoarthropathy in Rabbit. *In vivo* 18: 585-592, 2004.

Dias CNK; Renner AF; Santos AA; et al. Progression of articular cartilage degeneration after application of muscle stretch. *Connective Tissue Research (early online)* 1-9 (2011).

Enwemeka, CS.; Parker, JC.; Dowdy, DS.; et al. The efficacy of Low-Power Lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. *Photomedicine and Laser Surgery.* 22(4):323-329, 2004.

Felice, JC; Costa, LFC; Duarte, DG; Chahade, WH. Elementos básicos de diagnóstico da osteoartrose. *Temas de Reumatologia Clínica.*11:68-81, 2002.

Galois L; Etienne S; Grossin L; Watrin-pinzano A; et al. Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis and Cartilage* (12) 779-786, 2004.

Gerwin, N; Bendele, AM; Glasson, S. et al. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage.* 18: 24-34, 2010.

Goldring, MB. The role of chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism.* 43:1916-1926, 2000.

Gottlieb, T; Jorgensen, B; Rohde, E. et al. The influence of irradiation low-level diode laser on the proteoglycan content in arthrotically cartilage in rabbits. *Medical laser application.* 21:53-59, 2006.

Herman, JH & Khosla, RC. In vitro effects of Nd:YAG laser radiation on cartilage metabolism. *J. Rheumatol.*15(12):1818-1826, 1988.

Käab, MJ; Clark, JM; Nötzli, HP. The acute structural changes of loaded articular cartilage following meniscectomy or ACL-transection. *Osteoarthritis Cartilage.* 8: 464-473, 2000.

Kamali, F; Bayat, M; Torkaman, G; et al. The therapeutic effect of low-level laser in repair of osteochondral defects in rabbit knee. *Photochem Photobiol B.* 88(1):11-5, 2007.

Kamrava, SV; Farhadi, M; Rezvan, F; et al. The histological and clinical effects of 630 nanometer and 860 nanometer low-level laser on rabbits ear punch holes. *24:949-954,* 2009.

Karu TI. Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy. *Journal of quantum electronics.* 23 (10): 1703-1713, 1987.

Karu, TI. The science of low-power laser therapy. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers; 1998.

Kitchen, SS.; & Partridge, CJ. A review of low laser therapy. *Physiotherapy*. 77:168-173, 1991.

Leroux, MA; Cheung, HS; BAU, J.L; et al. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage*. 9:633-40, 2001.

Lin, YS; Huang, MS; Chai, CY; Yang, RC. Effects of helium-neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 10(83): 758-765, 2004.

Low, L; Reed, A. *Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática*. 3 Ed. Barueri-SP. Manole. 2001.

Lyons, TJ; Sheena, F McC; Buckwalter, JA; et al. The normal human chondroosseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 7(52), 2006.

Narmoneva, DA; Cheung, H; Wang, JY. et al. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in canine model. *J Orthop Res* 20:83-91, 2002.

Pinheiro, ALB. & Gerbi, MEMM. Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery*. 24 (2) :169-178, 2006.

Pritzker, KPH.; Gay, S; Jimenez, SA; et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 14:13-29, 2006.

Quinn, TM; Hunziker, EB; Hauselmann, HJ. Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among location in the adult human knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13:672-678, 2005.

Renner, AF.; Carvalho, E; Soares, E; Mattiello-Rosa, SM. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:196-202, 2006.

Szafranki, JD; Grodzinsky, AJ; Bruger, E; et al. Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthritis and cartilage*. 12: 937-46, 2004.

Timofeyev, VT; Poryadin, GV; Goloviznin, MV, et al. Laser irradiation as a potential pathogenetic method for immunocorrection in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 8(1): 35-40, 2001.

Thomas, CM; Fuller, CJ; Whittles, CE; Sharit, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* 15:27-34, 2007.

Vanwanseele, B; Eckstein, F; Knecht, H; et al. Longitudinal analysis of cartilage atrophy in the knees of patients with spinal cord injury. *Arthritis Rheum*. 48:3377-3381, 2003.

Velosa, APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Colágeno na cartilagem osteoartrósica. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 43:160-166, 2003.

Vladimirov, YA; Osipov, AN; Klebanov, GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Moscow)*, 69: 81-90, 2004.

Yasuda, T. Cartilage destruction by matrix degeneration products. *Med Rheum*. 16: 197-205, 2006.

Zhang, W; Jones, A; Doherty, M. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann. Rheum. Dis*. 63 (8): 901-907, 2004.

PARTE 2:

ESTUDO

Os efeitos do laser terapêutico na cartilagem articular em modelo experimental de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.

Anderson Amaro dos Santos¹, Poliani Oliveira¹, Stela Marcia Mattiello¹, Karina Zambone Pinto², Nivaldo Antônio Parizotto¹, Ana Cláudia Muniz Rennó³.

¹Departamento de Fisioterapia – Universidade Federal de São Carlos.

²Departamento de Morfologia e Patologia – Universidade Federal de São Carlos.

³Departamento de Biociências – Universidade Federal de São Paulo.

1. RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da terapia *laser* de baixa intensidade (LLLT) no comprimento de onda 685 nm nas fluências 10 J/cm² e 50 J/cm² aplicados na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos a um modelo experimental de osteoartrite (OA) induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 80 ratos machos (*Wistar*), que foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: Grupo Intacto (I); Controle Lesão (C); Lesão tratado com *laser* na fluência de 10 J/cm² (L10) e Lesão tratado com *laser* na fluência de 50 J/cm² (L50). Os grupos foram subdivididos em 2 subgrupos (n=10), com diferentes datas de sacrifício. O primeiro subgrupo foi sacrificado 5 semanas pós TLCA e foram realizadas 15 sessões de tratamento em 3 semanas. O segundo subgrupo foi sacrificado 8 semanas pós TLCA e foram realizadas 30 sessões de tratamento em 6 semanas. Os tratamentos se iniciaram 2 semanas pós TLCA. Para avaliar os efeitos da LLLT, foram realizadas análises semi-quantitativas de celularidade e conteúdo de proteoglicanas, análises morfométricas de celularidade e espessura, quantificação das fibras totais de colágeno e análises semi-quantitativas de imunohistoquímica para TNF- α , IL 1 β e MMP-13. Para análise estatística foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro Wilks, em que nos dados considerados paramétricos foi aplicado o teste ANOVA com Post Hoc Tukey ($p \leq 0,05$) e nos dados considerados não paramétricos foi aplicado o teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Na análise semi-quantitativa de celularidade no período de 8 semanas, o grupo C apresentou maior graduação que o grupo I. Em relação ao conteúdo de proteoglicanas, no período de 5 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram menor quantidade de proteoglicanas que o grupo I, ainda, após 8 semanas, o grupo C apresentou menor quantidade de proteoglicanas que os grupos I e L10, e o grupo L50 apresentou menor quantidade de proteoglicanas que grupo I. Já a análise morfométrica de celularidade, revelou que após 8 semanas o grupo C apresentou maior número de condrócitos que os grupos I, L10 e L50. A análise morfométrica de espessura mostrou que em 5 semanas os grupos C e L50 apresentaram maior espessura que o grupo I, além disso, no período de 8 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram maior espessura que o grupo I. Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas quantidades de

fibras totais de colágeno. Em relação às análises semi-quantitativas de imunohistoquímica, no período de 8 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram maior quantidade de condrócitos imunomarcados para TNF- α , IL1 β e MMP-13 em relação ao grupo I. Além disso, os grupos tratados (L10 e L50) apresentaram menor quantidade de condrócitos imunomarcados para MMP-13 que o grupo C. **Conclusão:** A LLLT no comprimento de onda 685 nm nas fluências de 10 J/cm² e 50 J/cm² foi benéfico à cartilagem articular do joelho de ratos submetidos ao modelo experimental de OA por TLCA. Contudo, o *laser* na fluência de 10 J/cm² foi mais eficaz, pois promoveu a síntese de proteoglicanas nos animais tratados no período de 8 semanas.

PALAVRAS-CHAVES: cartilagem articular, osteoartrite e terapia *laser* de baixa intensidade.

2. ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of laser therapy on the degenerative modifications in articular cartilage after anterior cruciate ligament transection (ACLT). **Methods:** We used eighty-male rats (Wistar), distributed into four groups: intact, injury control, injury laser treated, at 50 J/cm² and injury laser treated, at 10 J/cm². Animals were distributed into 2 subgroups, with different periods of sacrifice 5 and 8 weeks post-surgery. The animals were submitted to the surgery to induce OA by anterior cruciate ligament transection. Laser treatment started 2 weeks after the surgery and it was performed for 15 and 30 sessions. A laser 685 nm, at 10 and 50 J/cm², 30mW was used. Semi-quantitative, morphometric, collagen fibers and immunohistochemistry analysis was performed. **Results:** Initial signs of tissue degradation could be observed 5 weeks post- ACLT, with the decrease of proteoglycans concentration and increase of thickness in the CG. After 8 weeks post-surgery, analysis showed a progression in the degenerative process in the CG, revealed by the increase of cellularity and higher TNF- α , IL1 and MMP-13 immunoexpression. Laser therapy was able of modulating some of the aspects related to the degradative process, such as biomodulation of the number of chondrocyte proliferation, prevention of proteoglycans loss and decrease of MMP-13 immunoexpression. **Conclusion:** This study showed that 685nm laser, especially at 10 J/cm² prevented features related to the articular degenerative process in the knees of rats.

Keywords: articular cartilage, osteoarthritis and laser therapy

3. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma das doenças mais comuns entre os idosos, sendo caracterizada pela progressiva degradação da cartilagem articular (BROOKS, 2002; BREEDVELD, 2004; GUPTA et al., 2005). A doença provoca deformidade no tecido articular com inflamação secundária dos tecidos periarticulares, alteração do osso subcondral e remodelamento da superfície articular (STEVEN & ABRAMSON, 2009). O processo degenerativo ocorre em função de eventos mecânicos e biológicos que provocam alteração da taxa metabólica dos condrócitos presentes nas articulações (MOBASHERI et al., 2002; CLARK et al., 2003; CARTER et al., 2004). ISHIGURO, KOJIMA & POOLE (2002), afirmam existir um desbalanço entre o anabolismo e catabolismo dos componentes da matriz extra celular (MEC) na cartilagem articular em processo artrótico.

A Organização Mundial da Saúde estima que no mundo, 25% dos adultos acima de 65 anos sofrem de dor e apresentam incapacidades associadas à OA (BREEDVELD, 2004). Aproximadamente 40% dos adultos acima de 70 anos sofrem de OA de joelho, destes, 80% apresentam limitações de movimentos e 25% não conseguem realizar as atividades de vida diária (BROOKS, 2002). Assim, a OA está relacionada a elevados custos sócio-econômicos, em que o impacto econômico está relacionado a gastos diretos com internações e medicações, além de gastos indiretos relacionados ao aumento da morbidade e de sintomas ligados a depressão entre os acometidos (BREEDVELD, 2004). Segundo PELOSO & SCHEIMAN (2001), o sistema de saúde canadense no ano de 1994 teve um gasto de \$113.600.000,00 relacionado a doenças reumáticas com prevalência da OA.

Diante da necessidade de desenvolvimento de tratamentos que possam amenizar os impactos inerentes a OA, tanto em relação à melhora da qualidade de vida dos pacientes, como em relação aos gastos públicos, um método de tratamento promissor não invasivo para o tratamento da OA é o uso da terapia *laser* de baixa intensidade - *Low Level Laser Therapy* (LLLT). Nas últimas décadas, o *laser* tem sido utilizado para diversos fins terapêuticos e os benefícios na recuperação tecidual estão demonstrados em inúmeros estudos *in vivo* (KARU et al., 1998; BROSSEAU et al., 2000; ENWEMEKA et al., 2004). O mecanismo de ação da luz *laser* se baseia na absorção da luz pelos cromóforos presentes nas células, a partir do qual altera as reações químicas celulares, o que estimula a cadeia respiratória mitocondrial e aumenta a síntese de ATP

(KARU & LUBART, 2000). Estudos também demonstraram que a LLLT possui capacidade de modular o processo inflamatório e promover analgesia, conseqüentemente, proporciona melhora da função articular relacionado a ganho de amplitude de movimento (GUR et al., 2004; SORIANO et al., 2006).

Pesquisas com modelo experimental de OA demonstraram que a LLLT promoveu redução do dano articular (CASTANO et al., 2007; GUERINO et al., 2000). CHO et al. (2004) observaram a completa restituição da superfície articular em cõndilos do fêmur de coelhos que sofreram lesão artrótica quimicamente induzida e tratados com *laser* através de um equipamento que emitia uma combinação de irradiações da luz *laser* na faixa do vermelho (He-Ne) e na faixa do infra-vermelho (Ga-As). Ainda, recentemente PECCIN et al. (2008) demonstraram que o *laser* He-Ne (632,8 nm) na fluência de 6 J/cm² induziu neoformação do tecido cartilaginoso em lesão osteocondral no joelho de coelhos. LIN et al. (2010) afirmaram que o *laser* terapêutico 810 nm na fluência de 3 J/cm² preveniu a degradação do tecido cartilaginoso evidenciado através da diminuição da expressão da caspase-3 no joelho de ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA).

Embora existam comprovações dos efeitos positivos da LLLT na recuperação tecidual da cartilagem articular, os mecanismos envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos. Além disso, 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, com o intuito de entender melhor o mecanismo de ação da LLLT na cartilagem articular com um processo degenerativo em curso, são necessários novos estudos. Neste contexto, a hipótese do estudo é que o *laser* terapêutico no comprimento de onda 685 nm seja capaz de promover uma melhora na organização estrutural da cartilagem articular com um processo degenerativo em curso. Assim, o presente estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos do laser terapêutico (685 nm), nas fluências 10 J/cm² e 50 J/cm² aplicados na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos a um modelo experimental de OA induzida por TLCA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais de experimentação

Para a realização deste estudo, foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça *Wistar*, com 3 meses de idade, massa corporal média de 250 kg, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, onde permaneceram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno padrão, alimentados com ração comercial (Primor rações) e água à vontade e 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). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar, protocolo CEEA n° 023/2010 (ANEXO A).

4.2. Grupos Experimentais

Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=20):

- Grupo intacto: os animais permaneceram em livre deambulação – **(I)**;
- Grupo controle lesão: os animais foram submetidos à TLCA, mas não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento – **(C)**;
- Grupo lesão, tratados com o *laser* 685 nm, na fluência de 10 J/cm^2 – **(L10)**;
- Grupo lesão, tratados com o *laser* 685 nm, na fluência de 50 J/cm^2 – **(L50)**.

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

4.3. Modelo Experimental de Osteoartrite

Para a realização do procedimento cirúrgico de TLCA no joelho esquerdo, os animais foram anestesiados com injeção de Ketamina (95mg/Kg) e Xilasina (12mg/Kg) e tricotomizados na região do joelho. Foi feito uma incisão longitudinal na região parapatelar. O tendão patelar foi localizado e rebatido medialmente, o que permitiu o acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior. Uma vez visualizado o ligamento, o mesmo foi cuidadosamente, seccionado com uma tesoura cirurgica. 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 suturado com fio reabsorvível, por fim, foi feito a sutura da incisão (WILLIAM et al., 1982; APPLETON et al., 2007) (Figura 1). Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso à água e ração até o momento da eutanásia.

Figura 1: Procedimento cirúrgico para TLCA. (A) Tricotomia da região do joelho esquerdo; (B) Incisão longitudinal na região parapatelar; (C) O tendão patelar foi localizado e rebatido medialmente; (D) Acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior; (E) Transecção do ligamento cruzado anterior através de uma tesoura cirúrgica; (F) Teste de gaveta anterior; (G) Tendão patelar foi reposicionado e suturado, por fim, foi feita a sutura da incisão.

4.4. Protocolo de Tratamento

Os protocolos de tratamento com terapia *laser* de baixa intensidade foram iniciados 2 semanas após a cirurgia. No primeiro subgrupo foram realizadas 15 sessões no período de 3 semanas e no segundo subgrupo foram realizadas 30 sessões no período de 6 semanas. 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, foi utilizada a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido.

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 $1,5^\circ$. Assim, para os grupos tratados foi utilizado o *laser* com as seguintes especificações: Comprimento de onda 685 nm na fluência de 10 J/cm^2 com tempo de cada irradiação de 10 segundos e fornecendo ao tecido uma quantidade de energia igual a 0,3 J e na fluência de 50 J/cm^2 com tempo de cada irradiação de 47 segundos e fornecendo ao tecido uma quantidade de energia igual a 1,4 J.

4.5. Eutanasia e Processamento Histológico das Articulações

Ao término dos respectivos períodos experimentais, os animais foram eutanasiados através de uma dose letal de anestésico (injetado intraperitonealmente) e imediatamente após foi realizada a ressecção cirúrgica das articulações dos joelhos esquerdo para confecção das lâminas histológicas. Os tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada a 4% por 24 horas e posteriormente foram submetidos ao processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 40% por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, o material foi processado em parafina e embocado. De cada bloco foram realizados 13 cortes seriados com $6 \mu\text{m}$ de espessura através de um micrótomo (Leica RM – 2145, Germany). Os cortes foram realizados no plano sagital e perpendiculares à superfície articular na região do côndilo medial do fêmur. Dos cortes obtidos, foram confeccionadas 3 lâminas com três cortes cada e 2 lâminas com dois cortes cada. As lâminas com três cortes foram coradas com Hematoxilina-Heosina (HE) para realizações das análises semi-quantitativa de celularidade e morfométricas (celularidade e espessura), Safranina-O fast Green para realização da análise semi-quantitativa do conteúdo de proteoglicanas e *Picro Sirius Red* para realização da quantificação das fibras totais de colágeno. Já, as lâminas com dois cortes cada, foram utilizadas para a análise de imunohistoquímica em relação à presença de condrócitos imunocorados para fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL1 β) e metaloproteína (MMP-13).

4.6. Análises dos cortes

4.6.1. Análise Semi-quantitativa de Celularidade

Para esta análise foram utilizadas as lâminas coradas com HE, em que os três cortes presentes nas lâminas foram analisadas por meio de microscopia de luz (Axiolab Zeiss) por 2 avaliadores treinados. Os cortes histológicos foram avaliados ao longo de toda sua extensão com um aumento de (100x). O sistema de graduação semi-quantitativo para celularidade utilizado no estudo foi o Sistema de graduação Histopatológico para cartilagem articular proposto por Mankin et al. (1971) e modificado segundo Renner et al. (2006) (Tabela 1). Vale ressaltar, que quanto maior a graduação atribuída, maior o grau de degeneração em relação à celularidade (MAKIN et al., 1971).

4.6.2. Análise Semi-quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanas

Para esta análise foram utilizadas as lâminas coradas com Safranina-O fast green, em que os três cortes presentes nas lâminas foram analisados por meio de microscopia de luz (Axiolab Zeiss) por 2 avaliadores treinados. Os cortes foram avaliados ao longo de toda sua extensão com um aumento de (100x). O sistema de graduação semi-quantitativo para do conteúdo de proteoglicanas utilizado no estudo foi o Sistema de graduação Histopatológico para cartilagem articular proposto por Mankin et al. (1971) e modificado segundo Renner et al. (2006) (Tabela 1). Vale ressaltar, que a perda de coloração encontra-se relacionada à perda de proteoglicanas e recebe maior graduação (MAKIN et al., 1971).

Tabela 1: Sistema de graduação Histopatológico para cartilagem articular.

Celularidade	
Normal	0
Hipercelularidade	1
Hipercelularidade Difusa	2
Hipocelularidade	3
Coloração por Safranina	
Normal	0
Redução Leve em até metade da área total	1
Redução leve na área total ou superfície	2
Redução intensa em até metade da área total	3
Redução intensa na área total ou superfície	4

4.6.3. Análise Morfométrica de Celularidade

A análise morfométrica de celularidade foi definida a partir da modificação da análise morfométrica de celularidade proposta por RENNER et al. (2006) e foram utilizadas as lâminas coradas com HE. Após a escolha aleatória de um corte por lâmina, este 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 de cada lâminas eram 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 2. 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.

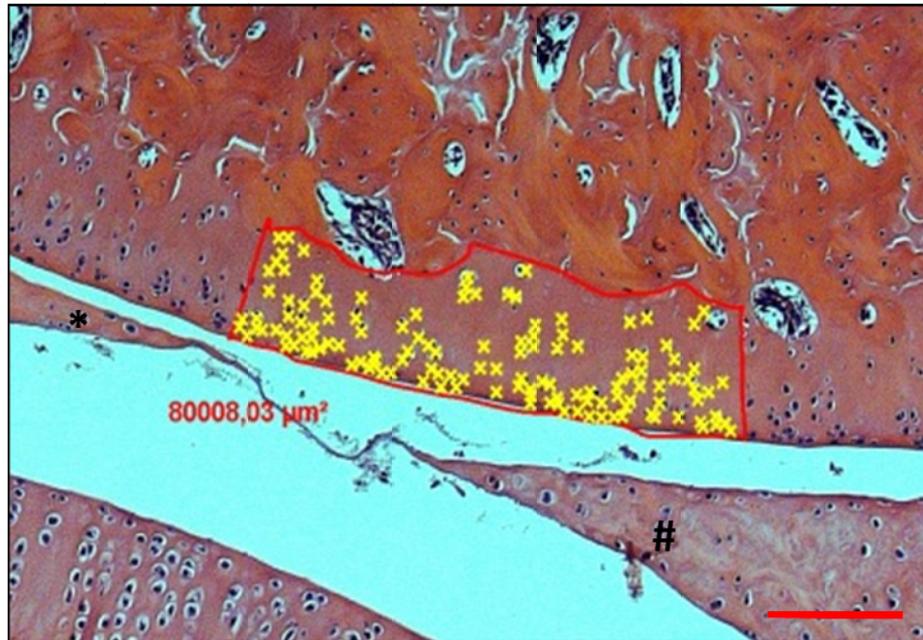


Figura 2: Fotomicrografia de um campo do cõndilo medial do fêmur localizado entre os cornos anterior e posterior do menisco medial - Lâmina corada com H&E pertencente a um dos animais do grupo controle intacto 8 semanas - Representa como foi realizado a análise morfométrica de celularidade nos campos selecionados. (X amarelos) Condrócitos presentes na área delimitada; (*) Corno anterior do menisco medial; (#) Corno posterior do menisco medial. (Barra 100 μm)

4.6.4. Análise Morfométrica de Espessura

A análise morfométrica de espessura foi definida a partir da modificação da análise morfométrica de espessura proposta por RENNERT et al. (2006) e 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 cõndilo 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 3. 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.

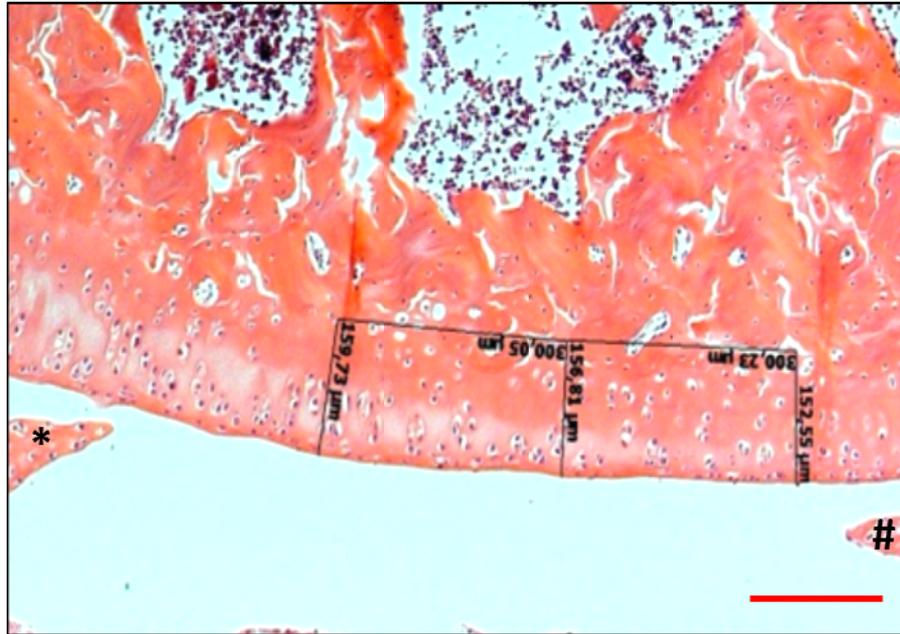


Figura 3: Fotomicrografia de um campo do côndilo medial do fêmur localizado entre os cornos anterior e posterior do menisco medial - Lâmina corada com H&E pertencente a um dos animais do grupo lesão 8 semanas - Representa como foi realizado a análise morfológica de espessura em um dos campos selecionados. . (*) Corno anterior do menisco medial; (#) Corno posterior do menisco medial. (Barra 100 µm)

4.6.5. 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 morfológica 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 4 mostra um campo de uma lâmina corada com Picro Sirius Red e observada sob luz polarizada.

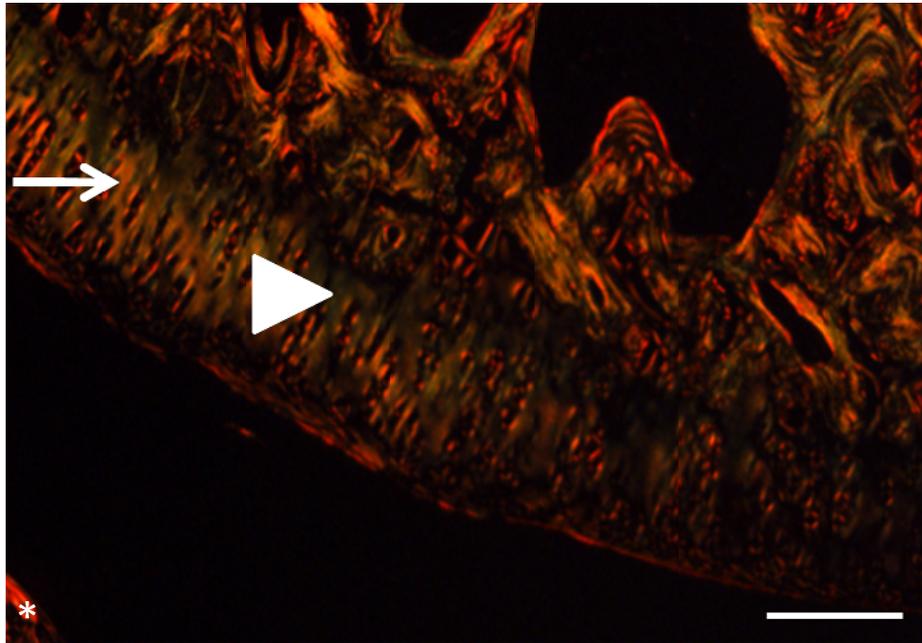


Figura 4: Fotomicrografia de um campo do cômulo medial do fêmur localizado próximo ao corno anterior do menisco medial - Lâmina corada com Picro Sirius Red para análise de birrefringência do colágeno pertencente o a um dos animais do grupo tratado com laser 10 J/cm^2 no período experimental de 5 semanas – (Seta) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração avermelhada; (Cabeça de seta) Indica fibras de colágeno que emitem um brilho de birrefringência na coloração esverdeada (*) Corno anterior do menisco medial. (Barra $100 \mu\text{m}$)

4.6.6. Análises Semi-quantitativas de Imunohistoquímica

Para a análise quantitativa de imunohistoquímica as lâminas foram imunocoradas para detectar a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) (polyclonal rabbit anti-rat, ab6671, abcam, Cambridge, MA, UK), interleucina 1 (IL1 β) (polyclonal rabbit anti-rat, sc-7884, Sta Cruz biotechnology, California, USA) e metaloproteína (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, foram aplicados em quatro lâminas de cada grupo os anticorpos primários nas seguintes diluições e tempos: TNF- α – 1:200 por 30 minutos, IL1 β – 1:50 por 120 minutos e 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 diaminobenzidina (DAB, SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) por 30 minutos, tempo necessário para o citoplasma dos condrócitos imunomarcados adquirir a coloração marrom. Por fim, foi realizado a coloração por hematoxilina e montagem das lâminas. Para o controle negativo, durante o processo os anticorpos primários foram omitidos.

A análise semi-quantitativa de imunohistoquímica utilizada neste estudo foi desenvolvida a partir da modificação da análise semi-qualitativa 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 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.

4.7. Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio 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 Wilk. 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 *Excel 2010*.

5. Resultados

Durante o período experimental, os animais não apresentaram complicações pós-cirurgia. Eles regressaram rapidamente à alimentação normal e não apresentaram perda de massa corporal. Deve-se ressaltar que nenhum animal morreu durante o experimento e não foi observado presença de infecção na área da incisão.

5.1. Análise Semi-quantitativa de Celularidade

A figura 5 mostra que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais dos grupos 5 semanas em relação à celularidade semi-quantitativa. Na comparação entre os grupos 8 semanas, os animais do grupo C apresentaram graduações estatisticamente maiores em comparação aos do grupo I. Os grupos tratados (L10 e L50) não apresentaram diferenças estatísticas tanto na comparação com o grupo I como na comparação com o grupo C.

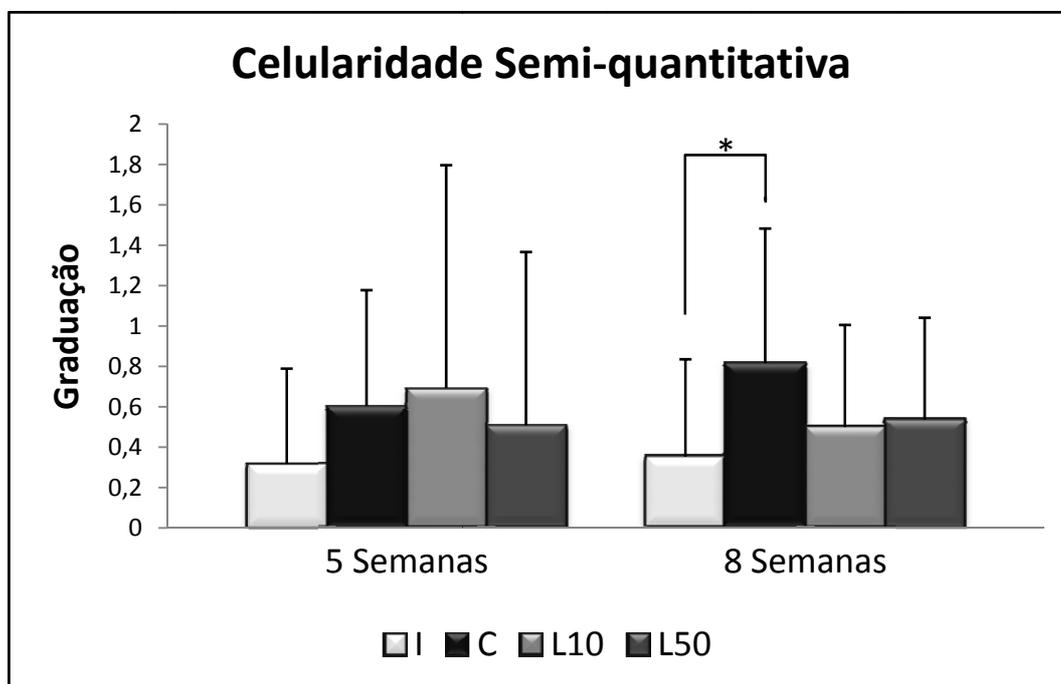


Figura 5: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa celularidade. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

5.2. Análise Semi-quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanas

Pode-se observar na figura 6, que na comparação entre os grupos 5 semanas, os animais dos grupos C, L10 e L50 apresentaram uma quantidade de proteoglicanas significativamente menor que o grupo I. Após 8 semanas, o grupo C apresentou uma quantidade de proteoglicanas significativamente menor em comparação aos grupos I e L10, além disso, o grupo L50 apresentou uma quantidade de proteoglicanas significativamente menor que o grupo I.

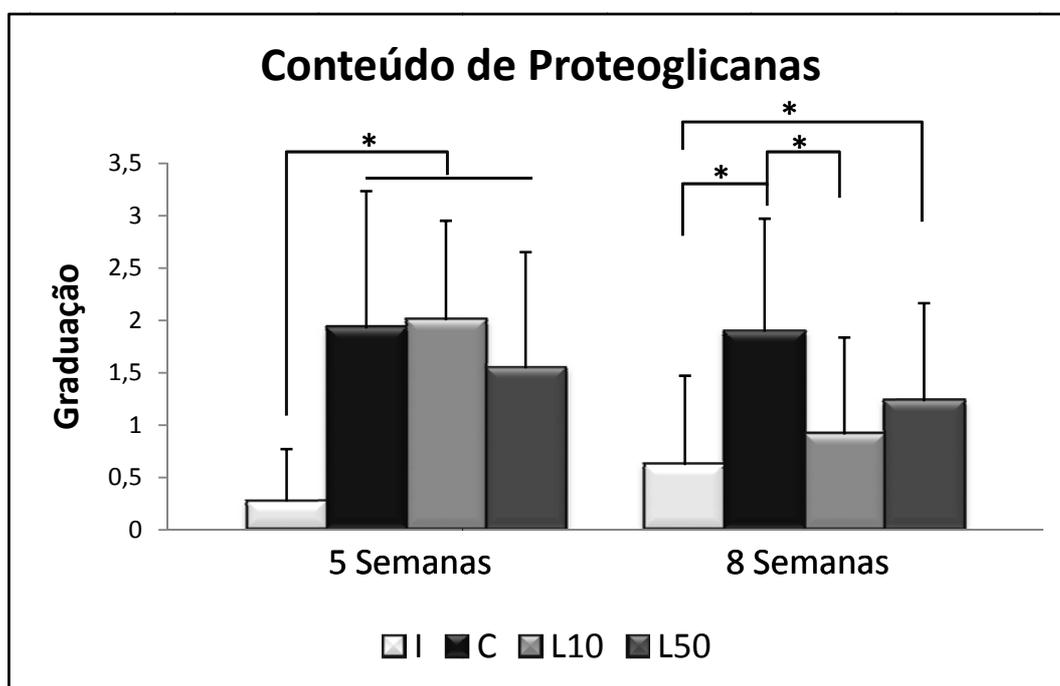


Figura 6: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa do conteúdo de proteoglicanas. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm^2 ; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm^2 . * $p \leq 0,05$.

5.3. Análise Morfométrica de Celularidade

Através da figura 7, observa-se que no período experimental de 5 semanas não ocorreram diferenças estatísticas entre os grupos. No período de 8 semanas, os animais do grupo C apresentaram uma quantidade de condrócitos estatisticamente maior que os animais dos grupos I, L10 e L50.

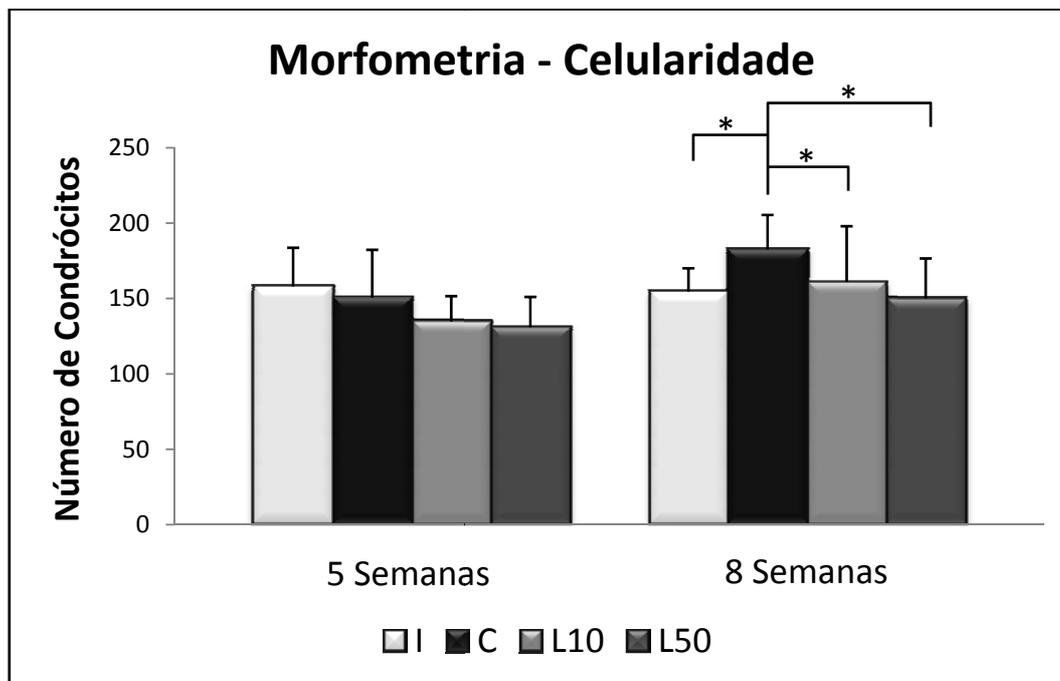


Figura 7: Média e desvio padrão da análise morfométrica de celularidade. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

5.4. Análise Morfométrica de Espessura

A figura 8 mostra que na comparação dos grupos no período de 5 semanas, os grupos C e L50 apresentaram espessura significativamente maior que o grupo I. No período de 8 semanas os grupos C, L10 e L50 apresentaram espessura significativamente maior que o grupo I.

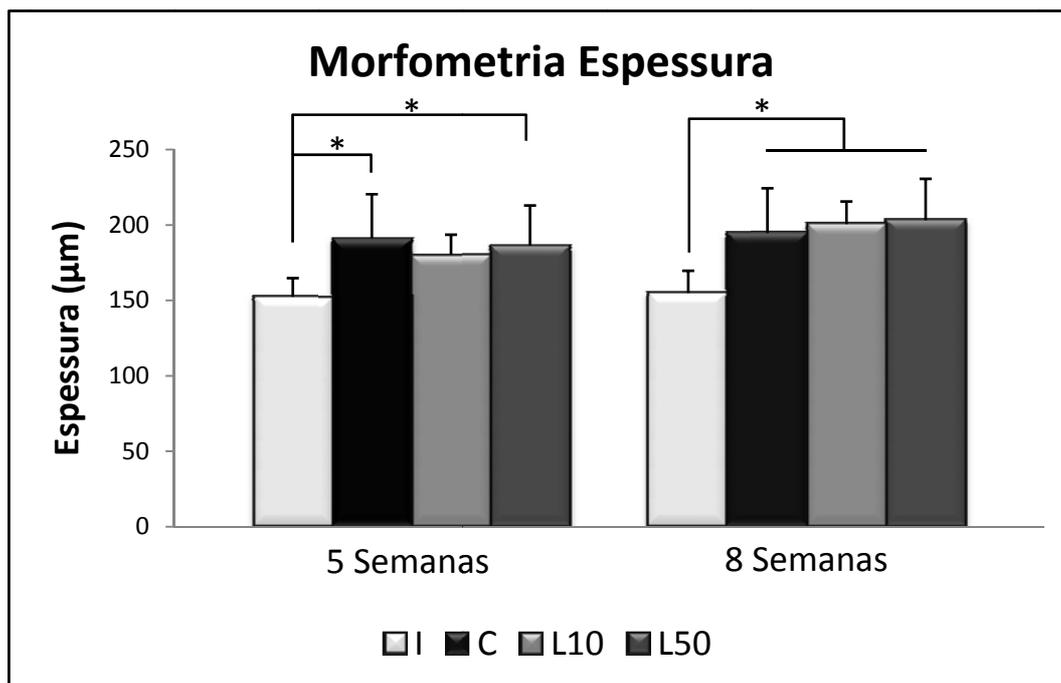


Figura 8: Média e desvio padrão da análise morfométrica de espessura. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

5.5. Análise das Fibras Totais de Colágeno

Pode-se observar através da figura 9, que em ambos os períodos experimentais não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em relação quantidade das fibras totais de colágeno.

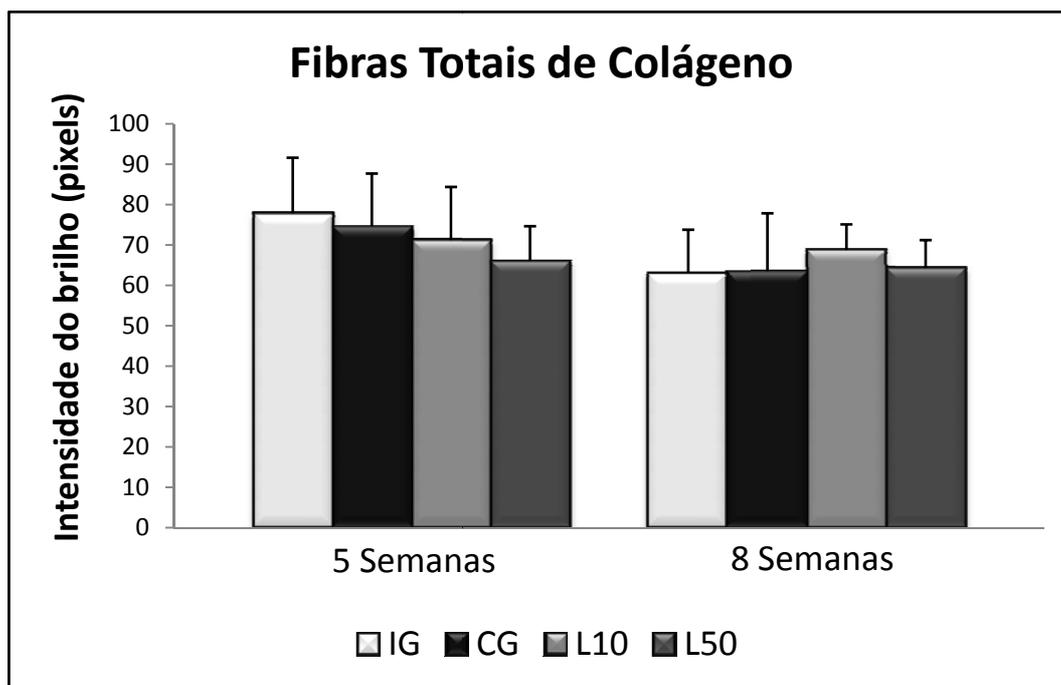


Figura 9: Média e desvio padrão das fibras totais de colágeno. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm².

5.6. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica – TNF- α

Através da figura 10, 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 entre os grupos 8 semanas, os animais dos grupos C, L10 e L50 apresentaram quantidades de condrócitos imunomarcados para TNF- α estatisticamente maiores em comparação aos do grupo I.

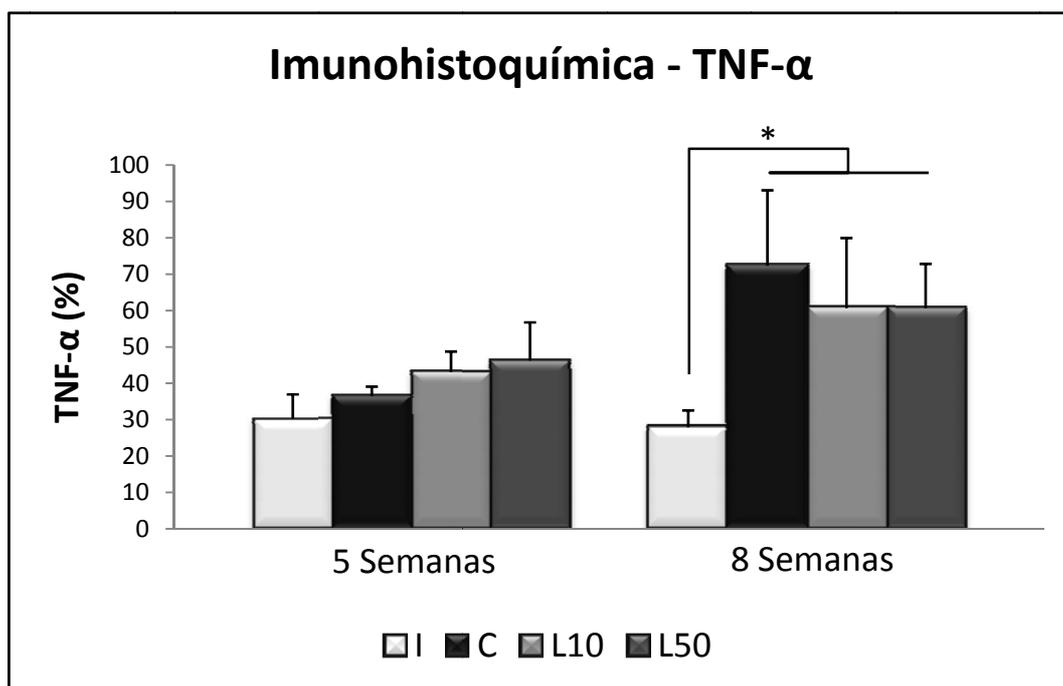


Figura 10: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para TNF- α . I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm². * p \leq 0,05.

5.7. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica – IL1 β

A figura 11 mostra que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais dos grupos 5 semanas quanto à quantidade de condrócitos imunomarcados para IL1 β . Em relação aos grupos 8 semanas, os animais do grupo C, L10 e L50 apresentaram quantidades de condrócitos imunomarcados para IL1 β significativamente maiores em comparação aos do grupo I.

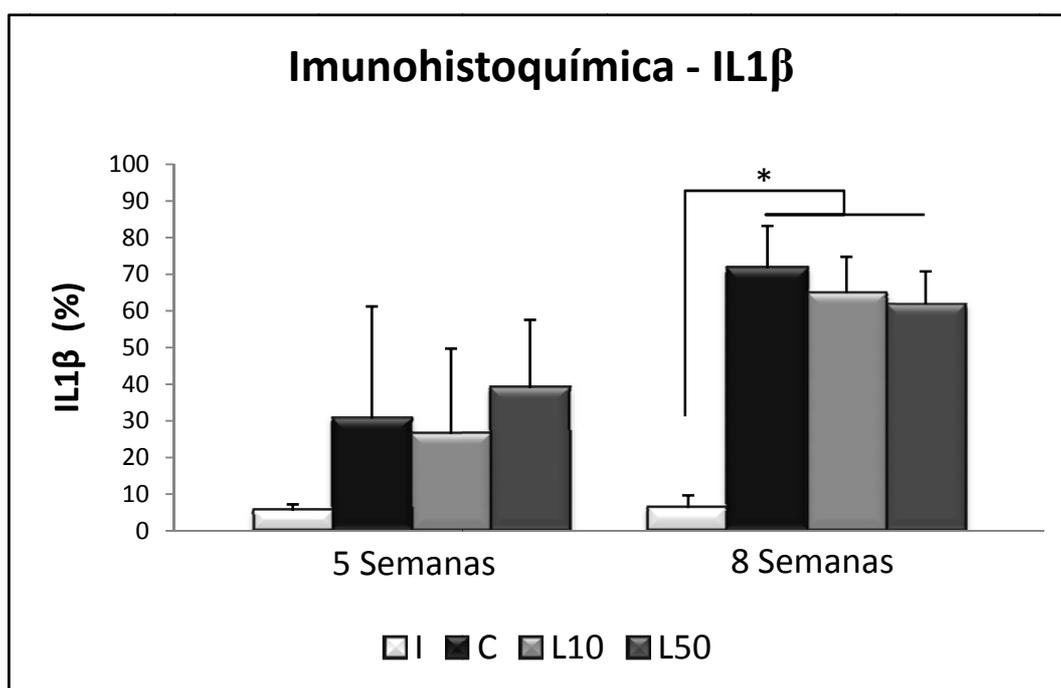


Figura 11: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para IL1 β . I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm². * p \leq 0,05.

5.8. Análise Semi-quantitativa de Imunohistoquímica – MMP-13

Pode-se observar na figura 12 que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais dos grupos 5 semanas quanto à quantidade de condrócitos imunomarcados para MMP-13. Em relação aos animais dos grupos 8 semanas, os animais do grupo C, L10 e L50 apresentaram quantidades de condrócitos imunomarcados para MMP-13 estatisticamente maiores em comparação aos do grupo I. Ainda, os grupos tratados (L10 e L50) apresentaram quantidades de condrócitos imunomarcados para MMP-13 estatisticamente menores que o grupo C.

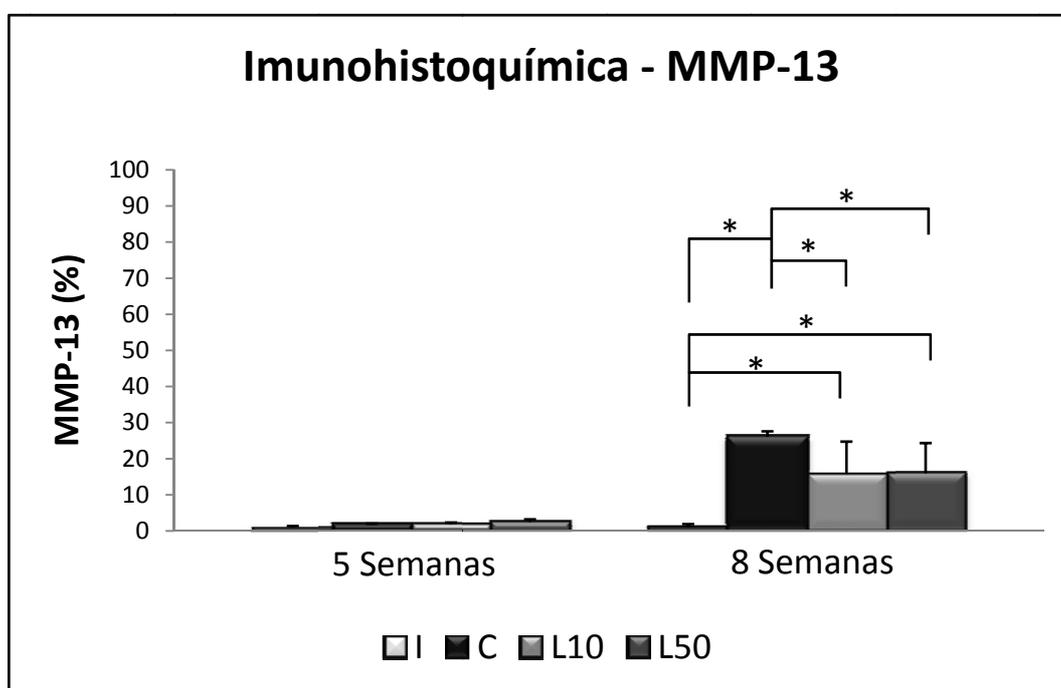


Figura 12: Média e desvio padrão da análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para MMP-13. I: Grupo intacto; C: Grupo controle lesão, L10: grupo tratado com laser na fluência 10 J/cm²; L50: Grupo tratado com laser na fluência de 50 J/cm². * p ≤ 0,05.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos da LLLT no comprimento de onda 685 nm, utilizado em 2 fluências (10 J/cm^2 e 50 J/cm^2), na articulação de joelhos de ratos submetidos ao modelo experimental de OA por TLCA. Para isso, foram realizadas análises semi-quantitativas de celularidade e conteúdo de proteoglicanas, análises morfométricas de celularidade e espessura, quantificação das fibras totais de colágeno, além de análises semi-quantitativas de imunohistoquímica para TNF- α , IL1 β e MMP-13.

Os resultados deste estudo demonstraram que em relação ao período de 5 semanas, apenas as análises semi-quantitativa de proteoglicanas e morfométrica de espessura apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. Na análise semi-quantitativa de proteoglicanas, os grupos irradiados e o grupo controle lesão apresentaram uma quantidade de proteoglicanas significativamente menor em relação ao grupo intacto. Já na análise morfométrica de espessura, o grupo controle lesão e irradiado com o *laser* 50 J/cm^2 apresentaram maior espessura que o grupo intacto. Quanto as comparações após 8 semanas da TLCA, o grupo controle lesão apresentou maior graduação na celularidade semi-quantitativa que o grupo intacto, sendo que os grupos tratados não apresentaram diferenças tanto em comparação ao grupo intacto como em comparação ao grupo controle lesão. Na análise semi-quantitativa de proteoglicanas, o grupo controle lesão apresentou menor quantidade de proteoglicanas em relação aos grupos intacto e irradiado com o *laser* 10 J/cm^2 , ainda, o grupo irradiado com *laser* 50 J/cm^2 apresentou menor quantidade de proteoglicanas apenas em comparação ao grupo intacto. A análise morfométrica de celularidade mostrou que o grupo controle lesão apresentou maior quantidade de condrócitos em relação aos grupos intactos e irradiados com o *laser* nas duas fluências. Já na análise morfométrica de espessura, os grupos CB, L10B e L50B apresentaram maior espessura que o grupo intacto. Não foram encontradas alterações quanto à presença de fibras totais de colágenos. As análises semi-quantitativas de imunohistoquímica mostraram que os grupos controle lesão e tratados apresentaram maiores quantidades de condrócitos imunomarcados para TNF- α , IL1 β e MMP-13 em relação ao grupo intacto, além disso, os grupos tratados apresentaram menor quantidade de condrócitos imunomarcados para MMP-13 que o grupo controle lesão.

Vários autores afirmam que na cartilagem articular em processo artrótico, os condrócitos aumentam sua taxa metabólica na tentativa de recuperar o tecido lesado, o que resulta em aumento no número de células, 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). Como no período de 5 semanas neste estudo não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na análise semi-quantitativa de celularidade, possivelmente o tempo pós TLCA não tenha sido suficiente para se observar alterações teciduais referentes ao número de condrócitos através das graduações empregadas. Contudo, 8 semanas pós-cirurgia, o grupo controle lesão apresentou sinais de degradação articular, comprovado pela maior graduação para celularidade semi-quantitativa.

Ainda em relação ao maior período experimental, os animais dos grupos irradiados, em ambas as fluências não apresentaram diferenças estatísticas em relação aos do grupo intacto, o que indica que a fotoestimulação foi efetiva para impedir o aumento da taxa metabólica dos condrócitos, que resulta na hiper celularidade inicial frente ao estímulo lesivo. Dessa forma, é provável que o *laser* tenha mantido a homeostase no tecido e, evitado assim, a evolução do processo degenerativo, que culmina na morte celular por apoptose. Esses resultados corroboram com os encontrados por LIN et al (2010) que afirmaram que a LLLT com comprimento de onda 810 nm na fluência de 3 J/cm², preveniu a degradação do tecido cartilaginoso evidenciado através da diminuição da expressão da caspase-3 relacionada a morte celular por apoptose no joelho de ratos submetidos à TLCA, em que os animais tratados apresentaram na cartilagem articular uma organização dos condrócitos semelhantes às dos animais intactos. BAYAT et al (2007) também relataram 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 J/cm² tratados 3 vezes por semanas.

Segundo NARMONEVA et al (2002), a diminuição de proteoglicanas é uma das primeiras anormalidades detectáveis em um processo degenerativo na cartilagem articular e aparece muito antes de sinais macroscópicos de deteriorização da superfície articular, o que está de acordo com os achados deste estudo, em que no período de 5 semanas os animais que sofreram a TLCA (grupo controle lesão e grupos tratados) apresentaram menor quantidade de proteoglicanas em comparação aos animais do grupo intacto, indicando o início do processo degenerativo. Como no segundo período

experimental, apenas os animais irradiados com o *laser* 10 J/cm² apresentaram maior quantidade de proteoglicanas que o grupo controle lesão e valores semelhantes ao grupo intacto, provavelmente o *laser* na fluência 10J/cm² tenha estimulado positivamente os condrócitos a produzirem a glicoproteína no tecido com processo degenerativo em curso. Esses resultados corroboram com LIN et al. (2006), que utilizaram o *laser* 632,6 nm, na densidade de potência de 3,1 mW/cm², em joelhos de ratas que receberam injeção intra-articular de solução de papaína e constataram um aumento de mucopolissacarídeo (sulfato de condroitina) nos joelhos irradiados. GOTTLIEB et al (2006) também observaram um aumento da quantidade de proteoglicanas na cartilagem articular de joelhos de coelhos submetidos à TLCA após a irradiação com *laser* 692,6 nm nas fluências de 1 e 4 J/cm², contudo a maior fluência foi mais efetiva. Estudos prévios sugerem que a fotoestimulação através da excitação de elétrons nos fotoreceptores promove o aumento das sínteses de ATP, DNA e proteínas, o que pode estar relacionado com o aumento da síntese de proteoglicanas nos animais tratados pela LLLT (10 J/cm²) do presente estudo. Dentro deste contexto, a estimulação da síntese de proteoglicanas pode contribuir para impedir a progressão do processo degenerativo na cartilagem articular artrítica, preservando as propriedades biomecânicas do tecido (LIN et al., 2006).

A análise morfométrica de celularidade do presente estudo, também não apresentou diferenças entre os grupos no período de 5 semanas, o que pode estar relacionado ao fato do tempo de lesão não ter sido suficiente para gerar alterações relacionadas à proliferação celular, haja visto, que no período de 8 semanas o grupo controle lesão demonstrou uma maior presença de condrócitos que o grupo intacto. Ainda, no período experimental de 8 semanas, os grupos tratados apresentaram celularidade semelhante ao grupo intacto. Esse fato pode evidenciar novamente que o *laser* tenha impedido o aumento do metabolismo dos condrócitos que resulta na proliferação celular relacionado à fase inicial do processo degenerativo da cartilagem articular. LIN et al. (2004) demonstraram que o *laser* He-Ne (632 nm) com densidade de potência 3,1 mW/cm², evitou alterações na quantidade de condrócitos e aumentou a concentração da proteína SP72 na cartilagem de coelhos que receberam uma injeção intra-articular de solução de papaína. Esta proteína pertence a um grupo de proteínas (*stress protein*) que impedem a alteração da taxa metabólica de células sob condições adversas e assim aumentam suas sobrevivências. ALVES et al. (2012), aplicaram a

LLLT ($\lambda=880$ nm e fluência $7,7$ J/cm²) em joelhos de ratos submetidos ao modelo experimental de OA induzida por injeção intraarticular de solução de ácido acético e também encontraram nos joelhos irradiados uma organização de condrócitos semelhante ao tecido sadio, e atribuíram estes achados ao fato do *laser* ter diminuído a presença de células inflamatórias na cartilagem articular com processo artrótico.

Na fase inicial da OA, também observa-se um aumento na espessura da cartilagem articular, 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 (SETTON et al, 1997; O'CONNOR et al 1997; LEROUX et al, 2001). No presente estudo, ocorreu um aumento na espessura do tecido tanto no período de 5 semanas (grupos controle lesão e tratados com *laser* na fluência de 50 J/cm²) e no período de 8 semanas (grupos controle lesão e tratados). No período experimental mais curto, o *laser* na fluência de 10 J/cm² retardou o espessamento do tecido, uma vez que a espessura da cartilagem articular dos animais tratados foi semelhante aos animais do grupo intacto. Contudo, apesar do *laser* ter modulado positivamente a atividade metabólica dos condrócitos em relação a celularidade e síntese de proteoglicanas no período de 8 semanas, o mesmo não foi capaz de impedir a síntese de outros componentes da MEC que caracteriza o aumento da espessura do tecido na fase inicial da lesão.

Autores afirmam que na evolução do processo degenerativo, a cartilagem articular sofre diminuição de colágeno II ou até sua substituição por colágeno tipo I (JUNQUEIRA, MONTES, SANCHEZ, 1982; VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003; VASILCEAC et al, 2010; DIAS et al, 2011). Por outro lado, FELICE et al. (2002) e POOLE et al. (2003) afirmam que a ruptura das fibras de colágeno ocorre posteriormente a perda do conteúdo de proteoglicanas, pois a perda da glicoproteína compromete as propriedades biomecânicas do tecido proporcionando maior atividade das colagenases. Como neste trabalho não foram encontradas alterações entre as quantidades de fibras totais de colágenos entre os grupos, é possível que nos períodos experimentais estudados a lesão não tenha evoluído até o estágio de ocorrer perdas de fibras de colágeno. Por outro lado, vale ressaltar que a metodologia empregada não é sensível para detectar a ocorrência de alterações no tipo de colágeno constituinte da MEC, neste sentido AROKOSKI et al. (2002) afirmam que na fase inicial do processo

degenerativo da cartilagem articular não ocorrem alterações no conteúdo de colágeno, apenas substituição do colágeno II.

É consenso entre os autores que a síntese de TNF- α e IL1 β pelos condrócitos é um indicativo de maior atividade catabólica no tecido, o que possibilita a progressão do processo degenerativo, pois tais citocinas são responsáveis em gerar uma resposta autócrina em que os condrócitos passam a sintetizar enzimas que degradam os componentes da MEC como as proteoglicanas (agrecanases) e colágenos (colagenases) (ABRAMSON & ATTUR, 2009; TETLOW et al., 2001; XIA et al., 2011). TETLOW et al. (2001), observaram em um estudo *in vitro*, que condrócitos retirados de uma tecido sadio quando na presença de TNF- α e IL 1 β , passam a sintetizar MMP-13, que é uma das principais enzimas responsáveis em degradar o colágeno II. Embora no período experimental de 5 semanas deste estudo não ter ocorrido diferenças entre os grupos quanto a presença de TNF- α , IL1 β e MMP-13, a afirmação dos autores estão de acordo com os dados apresentados no período de 8 semanas, em que os grupos que sofreram a TLCA (controle lesão e tratados) apresentaram maior quantidade de condrócitos imunomarcados para TNF- α , IL1 β e MMP-13 em relação ao grupo intacto.

Assim, é evidente que a LLLT aplicada neste estudo não foi eficaz em evitar as sínteses das citocinas inflamatórias TNF- α e IL 1 β , uma vez que os grupos tratados no maior período experimental apresentaram valores semelhantes ao grupo controle lesão quanto a presença de condrócitos imunomarcados para TNF- α e IL1 β . 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 intraarticular de hidróxido-apatita no joelho e posteriormente tratados com laser He-Ne (632,8 nm) na fluência de 8 J/cm². Contudo, os grupos tratados no período de 8 semanas apresentaram menores quantidades de condrócitos imunomarcados para MMP-13 em comparação ao grupo controle-lesão, o que indica uma tendência do *laser* em diminuir a síntese da colagenase. Portanto, o efeito benéfico da LLLT em diminuir a síntese de MMP-13 pelos condrócitos deve estar relacionado à uma ação no próprio condrócito no sentido de diminuir a expressão da colagenase e não na via autócrina TNF- α / IL1 β .

Em relação ao modelo experimental de OA induzida por TLCA, cuja principal característica é o dano articular se desenvolver de forma progressiva (BENDELE, 2001;

GALOIS et al, 2004; GERWIN et al, 2011), vale ressaltar que consiste em um modelo muito utilizado e que apresenta aspectos patogênicos semelhantes à OA traumática que ocorre em humanos (KAAB, CLARK; NOTZLI, 2000, APPLETON et al., 2007). Autores afirmam que após 2 semanas da cirurgia os achados histológicos correspondem à fase inicial da OA (APPLETON et al., 2007; BENDELE, 2011), o que está de acordo com os dados do presente estudo, em que o grupo controle lesão no período de 5 semanas apresentou aumento na espessura do tecido e perdas de proteoglicanas. No período de 8 semanas é possível constatar no grupo controle lesão a progressão da degeneração por meio das presenças de uma hiper celularidade, citocinas inflamatórias (TNF- α , IL1 β) e da colagenase MMP-13.

Como os resultados do presente estudo no período de 8 semanas apresentou respostas diferentes nas análises em relação as duas fluências propostas, é evidente que a resposta dos condrócitos frente à LLLT é dose dependente. Diante da existência de uma ampla janela terapêutica em que os cromóforos são específicos em absorver a energia fornecida ao tecido, é provável que o *laser* na fluência de 10 J/cm² foi mais eficaz em fornecer uma energia capaz de estimular os condrócitos a sintetizarem proteoglicanas. Nesse sentido, KARU (1987) e CASTANO et al (2007) afirmam que doses elevadas podem inibir a ação dos fotoreceptores e assim proporcionar resultados insatisfatórios da LLLT, inclusive promover morte celular. Segundo KARU & KOLYAKOV (2005), o comprimento de onda, a duração do tratamento, tempo de irradiação e a densidade de energia são fatores que influenciam no sucesso do tratamento, 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.

Dessa maneira, é limitação neste estudo a ausência de análises para determinar o estado metabólico do condrócito frente à LLLT em relação a indicadores de morte celular, como também análises para determinar a presença de colagenases que degradam o colágeno II. Como perspectivas futuras do grupo de pesquisa, está a realização de análises da presença de citocinas inflamatórias no plasma sanguíneo de ratos submetidos ao modelo experimental de OA induzida por TLCA através da técnica ELISA e posteriormente tratados com LLLT, uma vez que tanto a doença como o *laser* podem atuar de forma sistêmica, e assim, possibilitar concluir com maiores evidências os benefícios do *laser* como alternativa no tratamento da OA. Também está previsto o

início de uma nova linha de pesquisa para avaliar os efeitos da LLLT em pacientes acometidos por OA e assim constatar quais os benefícios clínicos proporcionados pela técnica aos pacientes.

7. Conclusão

Através dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a LLLT no comprimento de onda 685 nm nas fluências de 10 J/cm² e 50 J/cm² foi benéfico à cartilagem articular do joelho de ratos submetidos ao modelo experimental de OA por TLCA principalmente no período experimental de 8 semanas, pois impediu a hiperplasticidade característico das fases iniciais da OA, além de diminuir a expressão da colagenase MMP-13. Contudo, o *laser* na fluência de 10 J/cm² mostrou-se mais eficaz, pois também promoveu a síntese de proteoglicanas nos animais tratados do período de 8 semanas.

8. Referências Bibliográficas

Abramson, SB & Attur, M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 11: 227- 235, 2009.

Alves, ACA, Carvalho, PTC, Parente, M. et al. Low-level laser therapy in different of rheumatoid arthritis: a histological study. *Lasers Med Sci*. Published on line: 27 april 2012.

Appleton, CTG; McErlain, DD; Pitelka, V. et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Research e Therapy*. 9: 1-15, 2007.

Arokoski, JPA, Jurvelin, JS, Väätäinen, U, Helminen, HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports*. 10:186-98, 2000.

Bayat, M; Ansari, E; Gholami, N. et al. Effect of low-level helium-neon laser therapy on histological and ultrastructural of immobilized rabbit articular cartilage. *J. Photochemistry and photobiology*. 87:81-87, 2007.

Bendele, AM. Animals models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact*. 1 (4): 363-376, 2001.

Breedveld, FC. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. *Rheumatology*. 43:14-18, 2004.

Brooks, PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol.* 14:573-577, 2002.

Brosseau, L; Wells, G; Marchand, S. Randomized controlled trial on low level laser therapy (LLLT) in the treatment of Osteoarthritis (OA) of hand. *Laser in Medicine.* 36:210-219, 2005.

Calatrava, IR; Valenzuela, JMS; Villamandos, RJG; et al. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level laser therapy: Experimental study. *Lasers in medical science.* 12:117-21, 1997.

Castano AP; Dai TH; Yaroslavsky I; et al. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: importance of illumination time. *Lasers Surg Med* 39:543–550, 2007.

Carter, DR; Beaupré, GS; Wong, M; et al. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. *Clin Orthop.* 27: 69-77, 2004.

Clark, AL; Barclay, LD; Matyas, JR; et al. In situ chondrocyte deformation with physiological compression of the feline patelofemoral joint. *J Biomech.* 36: 553-568, 2002.

Cho, HJ; Lim, SC; Kim SG; et al. Effect of Low-level Laser Therapy on Osteoarthropathy in Rabbit. *In vivo* 18: 585-592, 2004.

Dias CNK; Renner AF; Santos AA; et al. Progression of articular cartilage degeneration after application of muscle stretch. *Connective Tissue Research (early online)* 1-9 (2011).

Enwemeka, CS.; Parker, JC.; Dowdy, DS.; et al. The efficacy of Low-Power Lasers in tissue repair and pain control: A meta-analysis study. *Photomedicine and Laser Surgery.* 22(4):323-329, 2004.

Felice, JC; Costa, LFC; Duarte, DG; Chahade, WH. Elementos básicos de diagnóstico da osteoartrose. *Temas de Reumatologia Clínica.* 11:68-81, 2002.

Fujita, I; Hirata, S; Ishikawa, M. et al. Apoptosis of hypertrophic chondrocytes in rat cartilaginous growth plate. *Orthopaedic Science.* 2:328-333, 1997.

Galois L; Etienne S; Grossin L; Watrin-pinzano A; et al. Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis and Cartilage* (12) 779-786, 2004.

Gerwin, N; Bendele, AM; Glasson, S. et al. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage.* 18: 24-34, 2010.

Gottlieb, T; Jorgensen, B; Rohde, E. et al. The influence of irradiation low-level diode laser on the proteoglycan content in arthrotically cartilage in rabbits. *Medical laser application.* 21:53-59, 2006.

Guerino MR; Baranauskas V; Guerino AC; Parizotto N. Laser treatment of experimentally-induced chronic arthritis. *Appl Surf Sci.* 154:561–564, 2000.

Gupta S; Hawker GA; Laporte A; et al. The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology* 44:1531–1537, 2005.

Gur A; Sarac AJ; Cevik R, Altindag O; Sarac S. Efficacy of 904nm gallium arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: a double-blind and randomize-controlled trial. *Lasers Surg Med* 35:229–235, 2004.

Ishiguro, N; Kojima, T; Poole, R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Med Sci.* 65:73-84, 2002.

Junqueira, LCU; Montes, GS; Sanchez, EM. The influence of section Thickness on the study of collagen by picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 74:153-156, 1982.

Kamrava, SV; Farhadi, M; Rezvan, F; et al. The histological and clinical effects of 630 nanometer and 860 nanometer low-level laser on rabbits ear punch holes. *24:949-954, 2009.*

Karu TI. Photobiological Fundamentals of Low-Power Laser Therapy. *Journal of quantum electronics.* 23 (10): 1703-1713, 1987.

Karu, TI. The science of low-power laser therapy. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers; 1998.

Karu, TI & Lubart, R. Effects of low-power light on biological systems. Amsterdam; Netherlands: proceeding of SPIE, v.4159, p. 1-7, 2000.

Karu TI & Kolyakov, SF. Exact action spectra for cellular response relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 23 (4): 355-61. 2005.

Kuhnt, K; D' Lima, DD; Hashimoto, S; Lotz, M. Review – Cell death in cartilage. *Osteoarthritis and cartilage.* 12:1-16, 2004.

Leroux, MA; Cheung, HS; BAU, J.L; et al. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage.* 9:633-40, 2001.

Lin, YS; Huang, MS; Chai, CY; Yang, RC. Effects of helium-neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation.* 10(83): 758-765, 2004.

Lin, YS; Huang, MH; Chai, CY. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. *OsteoArthritis and Cartilage.* 14:377-83, 2006.

Lin, HD; He, CQ, Luo, QL; et al. The effect of low-level to apoptosis of chondrocytes and caspase expression, including caspase-8 e caspase-3 in rabbit surgery-induced model of knee. *Rh Int Cl Exp Invest*. 2010.

Mankin, HJ; 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. *J Bone Joint Am*. 53:523-537, 1971.

Mobasheri, A; Carter, SD; Martin-Vasallo, P; et al. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int*. 26: 1-18, 2002.

Narmoneva, DA; Cheung, H; Wang, JY. et al. Altered swelling behavior of femoral cartilage following joint immobilization in canine model. *J Orthop Res* 20:83-91, 2002.

O'Connor, KM. Unweighting accelerates tidemark advancement in articular cartilage at knee joint of rats. *J Bone Miner. Res*. 12:580-589, 1997.

Ortiz, MCS; Carrinho, PM; Santos, AAS; et al. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte 1. *Fisio Brasil*, 2:221-40. 2001.

Paiotti, APR; Ribeiro, DA; Silva, RM; et al. Effect of COX-2 inhibitor lumiracoxib and the TNF- α antagonist etanercept on TNBS-induced colitis in Wistar rats. *J Mol Hist*. 43:307-317, 2012.

Peloso, PM & Scheiman, JM. The economic implications of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med*. 19;110 Suppl 3A:50S-4S, 2001.

Peccin MS, da Silva PRG, Renno AC, Ribeiro DA. Lowenergy helium-neon laser ensures knee cartilage repair: An experimental short-term assay in rabbits. *J Laser Appl*. 20(3):165-68, 2008.

Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, Tchetina E, Kobayashi M, Yasuda T, et al. Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Sym* (70) 115-123, 2003.

Pritzker, KPH.; Gay, S; Jimenez, SA; et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 14:13-29, 2006.

Renner, AF.; Carvalho, E; Soares, E; Mattiello-Rosa, SM. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:196-202, 2006.

Setton, LA; Mow, VC; Mullher, FJ; et al. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. *Osteoarthr. Cartil*. 5(1):1-16, 1997.

Soriano F, Campana V, Moya M, Gavotto A, Simes J, Soriano M, Soriano R, Spitale L, Palma J. Photobiomodulation of pain and inflammation in microcrystalline arthropathies: experimental and clinical results. *Photomed Laser Surg* 24:140–150, 2006.

Steven B & Abramson MA. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arth Res Ther*. 11 (3): 227 , 2009

Tetlow, CL; Adlam, DJ; Woolley, DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritis cartilage. *Arthritis & Rheumatism*. 44(3): 585-594, 2001.

Thomas, CM; Fuller, CJ; Whittles, CE; Sharit, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis and Cartilage* 15:27-34, 2007.

Vasilceac, FA; Renner, AF; Teodoro, WR; Mattiello-Rosa, SM. The remodeling of collagen fibers in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. *Rheumatol Int*. 2010.

Velosa, APP, Teodoro WR, Yoshinari NH. Colágeno na cartilagem osteoartrosica. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 43:160-166, 2003.

Xia, L; Luo, QL; Lin, HD; et al. The effect of different treatment time of millimeter wave on chondrocytes apoptosis, caspase-3, caspase-8 and MMP-13 expression rabbit surgically induced model of knee osteoarthritis. *Rheumatology International Clinical and experimental investigation*. 2001.

Williams, JM; Felden, DL; Peterson, RG; O'Connor, BL. Effects of surgically induced instability on rat Knee articular cartilage. *J Anat*, 134: 103-109, 1982.

Wei, F; Wei, X; Zhang, J; et al. Activation of Indian hedgehog promotes chondrocytes hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 20:755-763, 2012.

PARTE 3:**ANEXOS****1. 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
propp@power.ufscar.br - www.propp.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.


Prof. Dra. Keiko Okino Nonaka
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

2. Anexo B:

Primeira página do artigo intitulado: “*Low-Level Laser Therapy ensures cartilage repair in the knee osteoarthritis animal model*”, submetido para publicação no periódico *Osteoarthritis and Cartilage*.

Low-Level Laser Therapy ensures cartilage repair in the knee osteoarthritis animal model

Anderson Amaro dos Santos¹, Poliani Oliveira¹, Lara Rhom¹, Carla Roberta Tim¹,
Fernando Augusto Vasilceac¹; Karina Nogueira Zambone Pinto², Stela Marcia
Mattiello¹, Nivaldo Antonio Parizotto¹, Ana Claudia Muniz Renno³.

¹Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. São Carlos, São Paulo, Brazil.

²Department of Morphology and Pathology, Federal University of São Carlos. São Carlos, São Paulo, Brazil.

³Department of Physiotherapy, Federal University of São Paulo. Santos, SP, Brazil.

E-mail:

Anderson Amaro dos Santos: andersonamarofisio@hotmail.com

Poliani Oliveira: polifisio@hotmail.com

Lara Rhom: larinha_rohm@yahoo.com

Carla Roberta Tim: carlinha_tim@hotmail.com

Fernando Augusto Vasilceac: fefor@ig.com.br

Karina Nogueira Zambone Pinto: kazambone@hotmail.com

Stela Marcia Mattiello: stela@power.ufscar.br

Nivaldo Antônio Parizotto: nivaldoaparizotto@hotmail.com

Corresponding author: Ana Claudia Muniz Renno

Department of Biociences, Federal University of São Paulo. Av. Ana Costa, 95, Santos, São Paulo, 11050-250, Brazil. Phone (55)1332218303. E-mail: acmr_ft@yahoo.com

Running headline: Laser Therapy ensures cartilage repair

3. Anexo C

Email recebido em 01/10/2012 do periódico “*Osteoarthritis and Cartilage*” apontando a submissão do artigo intitulado “*Effects of low-level laser therapy on cartilage repair in an experimental model of osteoarthritis*”.

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

De: Osteoarthritis and Cartilage <OAC@elsevier.com>

Para: acmr_ft@yahoo.com.br

Enviadas: Quinta-feira, 1 de Novembro de 2012 10:50

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr Renno:

Thank you for the submission of your manuscript *Effects of low-level laser therapy on cartilage repair in an experimental model of osteoarthritis to Osteoarthritis and Cartilage*.

You have now successfully completed the on-line submission process. This acknowledgement and any queries are for the corresponding author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the corresponding author.

The manuscript is undergoing peer review. You will be notified by one of the Editors when the review is complete.

Kind regards,

Editorial Office

Osteoarthritis and Cartilage