

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

**LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO TRATAMENTO DA ARTRITE  
INDUZIDA POR ZYMOSAN**

**Lúcia Mara Januário dos Anjos**

Juiz de Fora, 2018

**LÚCIA MARA JANUÁRIO DOS ANJOS**

**LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO TRATAMENTO DA ARTRITE  
INDUZIDA POR ZYMOSAN**

Tese de Doutorado do Curso de Pós  
Graduação em Ciências Biológicas: Área:  
Imunologia e Doenças Infecto  
Parasitárias, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências Biológicas, Área:  
Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias

**Orientadora: Jacy Gameiro**  
**Co-orientadora: Flávia de Paoli**

Juiz de Fora, 2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Januário dos Anjos, Lucia Mara .

LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO TRATAMENTO DA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN / Lucia Mara Januário dos Anjos. -- 2018.

110 f. : il.

Orientadora: Jacy Gameiro

Coorientadora: Flávia de Paoli

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2018.

1. LLLT. 2. artrite. 3. citocinas. 4. quimiocinas. 5. metaloproteinase de matriz. I. Gameiro, Jacy, orient. II. de Paoli, Flávia, coorient. III. Título.

**LÚCIA MARA JANUÁRIO DOS ANJOS**

**LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO TRATAMENTO DA ARTRITE  
INDUZIDA POR ZYMOSAN**

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

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr. Adenilson de Souza da Fonseca – UERJ

---

Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral – UFMG

---

Profa. Dra. Heloisa D'Avila da Silva Bizarro – UFJF

---

Profa. Dra. Patrícia Elaine de Almeida – UFJF

---

Profa. Dra. Jacy Gameiro  
Orientadora

---

Profa. Dra. Flávia de Paoli  
Co-orientadora

Juiz de Fora, 2018

## DEDICATÓRIA

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

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

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

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

Ao meu marido João Paulo e filho Benjamin, vocês são o motivo da minha alegria e perseverança. Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

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

À Profa. Flávia de Paoli, profissional brilhante ao qual sempre irei me espelhar, pela orientação, suporte financeiro ao projeto e por todo o conhecimento tão generosamente passado a mim.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias, Obesidade e Câncer (LIDIPO), em especial a Polly, que me auxiliou com os experimentos de citometria e ELISA, muitas vezes ficando até altas horas da noite sem perder o bom humor e a disposição.

A todos os alunos, professores, técnicos e terceirizados do Laboratório de Imunologia do ICB, por disponibilizar o laboratório e equipamentos tão importantes para a realização deste trabalho. Em especial ao Prof. Gilson, pela ajuda com as análises dos dados obtidos na citometria de fluxo.

Ao Prof. Adenilson (UERJ) pela generosidade em nos emprestar equipamentos, por nos auxiliar na padronização das técnicas de RT-qPCR.

Às agências de fomento brasileiras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelos auxílios financeiros.

## RESUMO

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por inflamação das articulações e associada à incapacidade motora e laboral dos pacientes. Tendo em vista que as estratégias atuais para o tratamento da AR podem apresentar sérios efeitos colaterais e nem sempre resultam em melhora clínica, a terapia com laser de baixa potência (LLLT) surgiu como alternativa para o tratamento da artrite, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e de regeneração tecidual. Entretanto, os mecanismos anti-inflamatórios da LLLT nos tecidos biológicos ainda não são completamente conhecidos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os mecanismos imunológicos e a participação das metaloproteinases de matriz (MMP) e seu inibidor (TIMP2), na resolução do processo inflamatório articular após o tratamento com LLLT. Para isso, um processo inflamatório foi induzido nas articulações talocrural e subtalar dos membros posteriores de camundongos C57BL/6, através da administração de zymosan na região periarticular. Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 8): (ZY) artrite induzida por zymosan e não tratado, (ZY + 3Jcm<sup>-2</sup>) artrite induzida por zymosan + LLLT em 3Jcm<sup>-2</sup>, (ZY + 30Jcm<sup>-2</sup>) artrite induzida por zymosan + LLLT em 30Jcm<sup>-2</sup> e (ZY + DEXA) artrite induzida por zymosan e tratado com dexametasona. As condições da LLLT foram: 830nm, 10mW e densidades energéticas de 3Jcm<sup>-2</sup> e 30Jcm<sup>-2</sup>, no modo contínuo de emissão. A irradiação foi realizada durante 4 dias consecutivos, iniciando 5 horas após a indução da inflamação. Os animais foram eutanasiados 24h após a última aplicação da LLLT e as seguintes análises foram realizadas no tornozelo: morfológica, níveis relativos de mRNA de quimiocinas, citocinas, MMPs e TIMP2 por RT-qPCR, quantificação de citocinas por ELISA e quantificação da expressão tecidual de MMP13 e TIMP2 por imunohistoquímica. No linfonodo poplíteo foi realizada análise de citometria de fluxo para identificação e quantificação das populações de leucócitos. As análises morfológicas revelaram a presença de infiltrado celular no tecido conjuntivo adjacente à região periarticular, após a administração de zymosan. Foi observada diminuição dos níveis teciduais de citocinas após LLLT e alteração nos níveis de mRNA de citocinas e quimiocinas com importância na fisiopatologia da AR, diferentemente, dependendo da densidade de

energia utilizada. O grupo ZY + 3Jcm<sup>-2</sup> demonstrou aumento na maioria das populações de leucócitos analisadas, bem como na expressão de proteínas co-estimulatórias em macrófagos e células dendríticas do linfonodo proximal à inflamação. Adicionalmente, foi observado maior população de células Treg nos grupos LLLT, e no grupo ZY + 30Jcm<sup>-2</sup>, mais células Treg CD8<sup>+</sup> expressando níveis elevados de CD25. Embora LLLT tenha diminuído os níveis de mRNA da maioria das MMPs analisadas e aumentado de TIMP2, foi observado aumento da expressão tecidual de MMP13 e TIMP2 na região inflamatória do grupo ZY + 3Jcm<sup>-2</sup>. Tendo em vista a totalidade dos resultados, o LLLT em ambas as densidades de energia, apresentou efeitos anti-inflamatórios positivos para o tratamento da AR, uma vez que diminuiu os níveis da maioria das citocinas, quimiocinas e MMPs nos tecidos inflamados, além de modificar o quantitativo e o fenótipo dos leucócitos linfonodais, especialmente de células Treg.

Palavras chave: LLLT; artrite; citocinas; quimiocinas; resposta imunológica; metaloproteinase de matriz.

## ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (AR) is a chronic inflammatory disease, characterized by joint inflammation and associated with motor and labor incapacity. Since treatment strategies could present a serious side effects and not always achieved clinic improvement, the Low Level Laser Therapy (LLLT) have being considered as an alternative to arthritis treatment, due to its anti-inflammatory and healing abilities. However, LLLT anti-inflammatory mechanisms in biological tissues is not completely understood. Then, this study aimed to evaluate immunological mechanisms and contribution of matrix metalloproteinases (MMPs) and its inhibitor (TIMP) on inflammation resolution process induced by LLLT. Arthritis was induced in C57BL/6 mice by zymosan injection into periarticular region. Experimental animals were divided in 4 groups (n=8): (ZY) arthritis induced by zymosan and untreated; (ZY + 3Jcm<sup>-2</sup>) arthritis induced by zymosan and treated with LLLT at 3Jcm<sup>-2</sup>; (ZY + 30Jcm<sup>-2</sup>) arthritis induced by zymosan and treated with LLLT at 30Jcm<sup>-2</sup>; (ZY + DEXA) arthritis induced by zymosan and treated with dexamethasone. LLLT parameters were: 830nm, 10mW energy densities at 3 Jcm<sup>-2</sup> e 30 Jcm<sup>-2</sup>, in continuous wave emission mode. Irradiation sections and dexamethasone treatment were carried out 4 days consecutively, starting 5 hours after arthritis induction. Animals were euthanized 24h after the last treatment section and the following analysis were procedure at ankle: morphological, cytokine mRNA relative levels, chemokines, MMPs and TIMP2 by RT-qPCR, quantification of cytokines tissue expression by ELISA and MMP13 and TIMP2 by imunohistochemistry. In popliteal lymph node, leukocytes populations were identficated and quantificated by flow cytometry. Morphological analysis showed inflammatory infiltration at adjacent connective tissue of joints, after zymosan injection. After LLLT, it was observed cytokines tissue expression decrease and mRNA levels alteration of important cytokines and chemokines in pathophysiology of AR, depending of energy density used. The ZY + 3Jcm<sup>-2</sup> group showed an increase leukocytes populations, as well as, higher expression of costimulatory proteins in macrophages and dendritic cells of popliteal lymph node. Additionally, it was observed higher Treg population in LLLT groups than ZY group. More, ZY + 30Jcm<sup>-2</sup> showed higher Treg CD8<sup>+</sup> population presenting CD25<sup>high</sup>. LLLT decreased mRNA levels of almost MMPs analyzed and increased of TIMP2, except for ZY + 3Jcm<sup>-2</sup>

group in which was observed MMP13 and TIMP2 tissue expression increase. Taken together, all results showed that LLLT, at both energy densities used, presented positive anti-inflammatory effects for RA treatment, since it decreases the levels of cytokines, chemokines and MMPs at inflamed tissues. LLLT could also alter number and phenotype leukocytes in lymph node, especially Treg cells.

Keywords: LLLT; arthritis; cytokines; chemokines; immunological response; matrix metalloproteinase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático de uma articulação sinovial, demonstrando seus componentes teciduais. .... 21
- Figura 2** - Desenho esquemático demonstrando a ativação de células T sinoviais na AR e seus mecanismos efetores..... 30
- Figura 3** - Desenho esquemático representando as citocinas e células imunes envolvidas na AR ..... 32
- Figura 4** - Desenho esquemático demonstrando a anatomia óssea e articular do pé e tornozelo em humanos e camundongos..... 39
- Figura 5** - Desenho esquemático representando a sinalização intracelular após permeabilização mitocondrial em resposta a absorção de radiação visível ou infravermelho (IV) pelo fotoceptor citocromo c oxidase ..... 43
- Figura 6** - Administração de Zymosan na região da articulação talocrural e subtalar 49
- Figura 7** - Cronograma experimental..... 50
- Figura 8** - Planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia..... 52
- Figura 9** - Imagem ilustrativa demonstrando a região da articulação talocrural e destacando o edema observado 5h após administração de Zymosan..... 60
- Figura 10** - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular de um animal normal (sem artrite) ..... 61
- Figura 11** - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal eutanasiado 5h após administração com zymosan ..... 61
- Figura 12** - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal eutanasiado 101h (4 dias) após administração com zymosan ..... 62

**Figura 13** - Fotomicrografia do infiltrado inflamatório, demonstrando as células infiltrativas no animal eutanaziado 5h e 101h após administração com zymosan ..... 62

**Figura 14** - Níveis relativos de mRNA de citocinas no tornozelo inflamado de camundongos..... 63

**Figura 15** - Níveis relativos de mRNA de citocinas no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de RTq-PCR..... 64

**Figura 16** - Níveis de citocinas (pg/mL) no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de ELISA ..... 65

**Figura 17** - Níveis relativos de mRNA de quimiocinas no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de RTq-PCR..... 67

**Figura 18** - Contagem total de leucócitos do linfonodo proximal à inflamação (pool de 2 animais) utilizando a Câmara de Neubauer ( $\times 10^4$  células). ..... 68

**Figura 19** - Quantificação de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) e células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) no linfonodo proximal à inflamação por citometria de fluxo. .... 69

**Figura 20** - Expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) do linfonodo proximal à inflamação..... 70

**Figura 21** - Expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) do linfonodo proximal à inflamação ..... 71

**Figura 22** - Expressão concomitante das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) e células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) do linfonodo proximal á inflamação..... 72

**Figura 23** - Quantificação de células NK, NKT e CD3<sup>+</sup> no linfonodo proximal á inflamação..... 73

**Figura 24** - Quantificação de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> na população de CD3<sup>+</sup> do linfonodo proximal à inflamação ..... 74

**Figura 25** - Quantificação de células Treg dentre a população CD4<sup>+</sup> do linfonodo proximal à inflamação ..... 75

**Figura 26** - Quantificação de células Treg dentre a população CD8<sup>+</sup> do linfonodo proximal à inflamação ..... 76

**Figura 27** - Comparação entre o número de células Treg CD4 e Treg CD8 dos grupos tratados com LLLT ..... 77

**Figura 28** Intensidade de fluorescência média do marcador CD25 em células TCD4 e TCD8 do linfonodo proximal à inflamação ..... 77

**Figura 29** - Níveis relativos de mRNA de metaloproteinases de matriz e seu inibidor no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de RTq-PCR ..... 79

**Figura 30** - Expressão tecidual de MMP13 no tecido conjuntivo adjacente às articulações talocrural e subtalar..... 80

**Figura 31** - Expressão tecidual de TIMP2 no tecido conjuntivo adjacente às articulações talocrural e subtalar. .... 80

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Distribuição dos animais nos grupos experimentais ..... 48

**Tabela 2** - *Primers* utilizados nos ensaios de RTq-PCR..... 55

**Tabela 3** - Anticorpos e fluorocromos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. 59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |  |
|----------------|--|
| AR             | Artrite Reumatóide   |
| OA             | Osteoartrite   |
| AINEs          | Anti-inflamatórios não esteróides                                      |
| DMCD           | Drogas Modificadoras do Curso da Doença                                |
| LLLT           | " <i>Low Level Laser Therapy</i> " Terapia com Laser de Baixa Potência |
| GAG            | Glicosaminoglicanos sulfatados   |
| IGF-1          | Fator de crescimento insulínico-1                                      |
| TGF- $\beta$   | Fator de crescimento transformador $\beta$                             |
| MMP            | Metaloproteinases de matriz  |
| ADAMT          | "A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs"       |
| TIMP           | Inibidor tecidual de metaloproteinases                                 |
| ZY             | Zymosan A  |
| TLR2           | Receptor <i>toll-like</i> tipo 2                                       |
| TLR6           | Receptor <i>toll-like</i> tipo 6                                       |
| NF- $\kappa$ B | Fator de Transcrição Nuclear $\kappa$ B                                |
| TNF- $\alpha$  | Fator de necrose tumoral $\alpha$                                      |
| IL             | Interleucina   |
| HLA            | Human leukocyte antigen  |
| Ig             | Imunoglobulina   |
| CD             | Cluster of Differeciation  |
| NK             | " <i>Natural killer</i> " Matadora Natural                             |
| NKT            | " <i>NK like T cell</i> " NK tipo célula T                             |
| COX            | Ciclooxygenases  |
| PG             | Prostaglandinas  |
| TXA            | Tromboxanas  |
| LTB            | Leucotrienos   |
| IFN            | Interferon   |
| LT $\beta$     | Linfotoxina- $\beta$   |
| M-CSF          | Fator Estimulador de Colônia de Macrófago                              |
| G-CSF          | Fator de estimulação de colônias de granulócitos                       |
| GM-            | Fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos          |
| NOD            | Domínio de oligomerização nucleotídica                                 |

|                  |  |
|------------------|--|
| NLR              | Receptores de ligação a nucleotídeo  |
| Th               | "T <i>helper</i> " T auxiliar  |
| PAMP             | Padrões moleculares associados a patógenos                                 |
| DAMP             | Padrões moleculares associados a danos                                     |
| CDp              | Células dendríticas plasmocitóides   |
| MHC              | Moléculas do complexo de histocompatibilidade                              |
| BAFF             | Fator de ativação de célula B  |
| FoxP3            | "Forkhead box 3"   |
| TCR              | Receptor de célula T   |
| PI3K             | Fosfoinositol 3 quinase  |
| Treg             | Células T regulatória  |
| ICAM             | Molécula intracelular de adesão  |
| LFA              | Antígeno associado a função de leucócitos                                  |
| APRIL            | Ligante indutor de proliferação  |
| ACCP             | Anti peptídeos citrulinados cíclicos                                       |
| PMN              | Células polimorfonucleares   |
| FLS              | "Fibroblast-like synoviocytes "  |
| ROS              | " <i>Reactive Oxygen Species</i> " Espécies reativas de oxigênio           |
| DNA              | " <i>Deoxyribonucleic Acid</i> " Ácido Desoxirribonucléico                 |
| RNA              | " <i>Ribonucleic Acid</i> " Ácido ribonucléico                             |
| Fas              | CD95 (cluster of differentiation 95)                                       |
| FasL             | Ligante de Fas   |
| RANKL            | Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear -κB                          |
| MTX              | Metotrexato  |
| pHi              | Potencial hidrogeniônico intracelular                                      |
| Ca <sup>2+</sup> | Cálcio Iônico  |
| cAMP             | Adenosina Monofosfato Cíclico  |
| ATP              | Adenosina Trifosfato   |
| ΔΨm              | Potencial Elétrico da Membrana Mitocondrial                                |
| Eh               | Potencial Redox Intracelular   |
| Bcl-2            | B-cell lymphoma 2  |
| GSK3β            | Proteína Glicogênio Sintase Quinase 3β                                     |
| iNOS             | " <i>Inducible nitric oxide synthase</i> " Óxido Nítrico Sintase Induzível |
| DAB              | Diaminobenzidina   |
| cDNA             | DNA complementar   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| mRNA               | RNA mensageiro  |
| RT-                | Reação em cadeia da polimerase em tempo real                    |
| ELISA              | Imunoensaio enzimático  |
| NCBI               | "National Center for Biotechnology Information" Centro Nacional |
| H&E                | Hematoxilina e Eosina   |
| NADPH              | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato                       |
| DEXA               | Dexametasona  |
| J/cm <sup>-2</sup> | Joules por centímetro quadrado                                  |
| Ct                 | "Threshold cycle" ou limiar do ciclo                            |
| $\Delta\Delta Ct$  | Delta delta Ct  |
| PBS                | "Phosphate buffer solution" ou solução tampão fosfatos          |
| RT                 | "Room temperature" ou temperatura ambiente                      |
| SFB                | Soro fetal bovino   |
| RPMI               | " Roswell Park Memorial Institute medium"                       |
| FACS               | "Fluorescence activated cell sorting buffer"                    |
| MFI                | Intensidade de fluorescência média                              |

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | <b>19</b> |
| 1.1 SISTEMA ARTICULAR  | 20        |
| 1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE ARTRITE  | 23        |
| 1.3 ARTRITE REUMATÓIDE (AR)  | 24        |
| 1.3.1 Processo inflamatório articular  | 26        |
| 1.3.2 Imunidade inata e adaptativa   | 27        |
| 1.3.3 Resposta do tecido mesenquimal   | 34        |
| 1.3.4 Danos na arquitetura articular   | 35        |
| 1.3.5 AR e as articulações talocrural e subtalar   | 39        |
| 1.3.6 Tratamento da AR   | 40        |
| <b>1.4 LASER</b>   | <b>41</b> |
| 1.4.1 Lasers e processo inflamatório   | 44        |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | <b>47</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL   | 47        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 47        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>48</b> |
| 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS  | 48        |
| 3.2 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PELO ZYMOSAN  | 49        |
| 3.3 EXPOSIÇÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA   | 49        |
| 3.4 TRATAMENTO COM DEXAMETASONA  | 51        |
| 3.5 EUTANASIA E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS   | 51        |
| 3.6 EXPRESSÃO DE MMPs E TIMP2 NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DA ARTICULAÇÃO                          | 53        |
| 3.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E <i>real time</i> quantitative PCR (RT-qPCR) DO TORNOZELO INFLAMADO   | 53        |
| 3.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO TORNOZELO INFLAMADO  | 56        |
| 3.9 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO LINFONODO PROXIMAL À INFLAMAÇÃO | 57        |
| 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA   | 59        |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | <b>60</b> |
| 4.1 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR ZYMOSAN NA REGIÃO ARTICULAR  | 60        |
| 4.2 NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NA ARTICULAÇÃO INFLAMADA                        | 63        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.3 EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS NA ARTICULAÇÃO INFLAMADA .....   | 65         |
| 4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS CD80 E CD86 NO LINFONODO PROXIMAL (POPLÍTEO) À INFLAMAÇÃO..... | 68         |
| 4.5 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE ADQUIRIDA NO LINFONODO PROXIMAL (POPLÍTEO) À INFLAMAÇÃO .....                                | 72         |
| 4.6 NÍVEIS DE METALOPROTEINASES E SEU INIBIDOR NA ARTICULAÇÃO INFLAMADA.....  | 78         |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>81</b>  |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>8 ARTIGO SUBMETIDO Á REVISTA JOURNAL OF BIOPHOTONICS (IF:4,328) EM ABRIL DE 2018.....</b>  | <b>109</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

Artrite é uma desordem musculoesquelética de etiologia multifatorial caracterizada pela inflamação dos tecidos que compõem a articulação e pela perda da cartilagem articular (SALTER, 2001). Os sintomas clínicos são dor e edema, e com a evolução da doença, limitação da amplitude de movimentos e crepitação articular (LIANZA, 2001). De grande importância epidemiológica devido à alta prevalência na população mundial, a artrite pode ser induzida por diferentes estímulos, como por exemplo, lesão mecânica ou deposição de cristais, observados na osteoartrite (OA) ou ainda, decorrente de processos autoimunes, como na artrite reumatóide (AR) (FIRESTEIN, 2003; MICHAEL; SCHLUTER-BRUST; EYSEL, 2010). Segundo o relatório sobre o impacto global de patologias realizado pela Organização Mundial da Saúde, as desordens musculoesqueléticas são responsáveis por mais de um quinto (21,4%) de todos os anos vividos com incapacidade no mundo, perdendo apenas para problemas de saúde mental (23,2%) (VOS et al., 2012)

A AR é uma doença autoimune inflamatória, caracterizada pela degeneração crônica das articulações sinoviais. Com a progressão da doença, modificações na estrutura articular decorrentes da sinovite (inflamação da membrana sinovial), e em alguns casos, complicações sistêmicas e morte precoce são observados. Com importante impacto socioeconômico mundial uma vez que leva à perda da capacidade laboral e da qualidade de vida dos pacientes, a AR apresenta etiologia multifatorial e o processo patológico envolve a falha nos mecanismos de tolerância imunológica (CROSS et al., 2014; IDE et al., 2011; MAHDI et al., 2009).

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

imunossupressoras (MCINNES; SCHETT, 2017). Uma vez que estes tratamentos podem apresentar importantes efeitos colaterais, se utilizados a longo prazo e nem sempre alcançam melhora clínica (KIELY et al., 2009; SMOLEN et al., 2017), um grande esforço tem sido empregado na busca por novas terapias que apresentem efeito anti-inflamatório, mas que não suprimam indiscriminadamente o sistema imune (CHOY, 2012).

Neste contexto, as terapias baseadas em lasers de baixa potência, do inglês *Low Level Laser Therapy* (LLLT), surgiram como alternativa não invasiva para o tratamento da artrite, devido às suas propriedades anti-inflamatórias (ANTUNES et al., 2007), de regeneração tecidual (POSTEN et al. 2007) e de redução da dor e edema (GUR et al., 2004). LLLT, forma de fototerapia que envolve a exposição a radiações pertencentes à região que abrange a luz vermelha e infravermelha do espectro eletromagnético, induz reações biológicas não destrutivas e não térmicas com finalidade terapêutica no local da irradiação (WU et al., 2007).

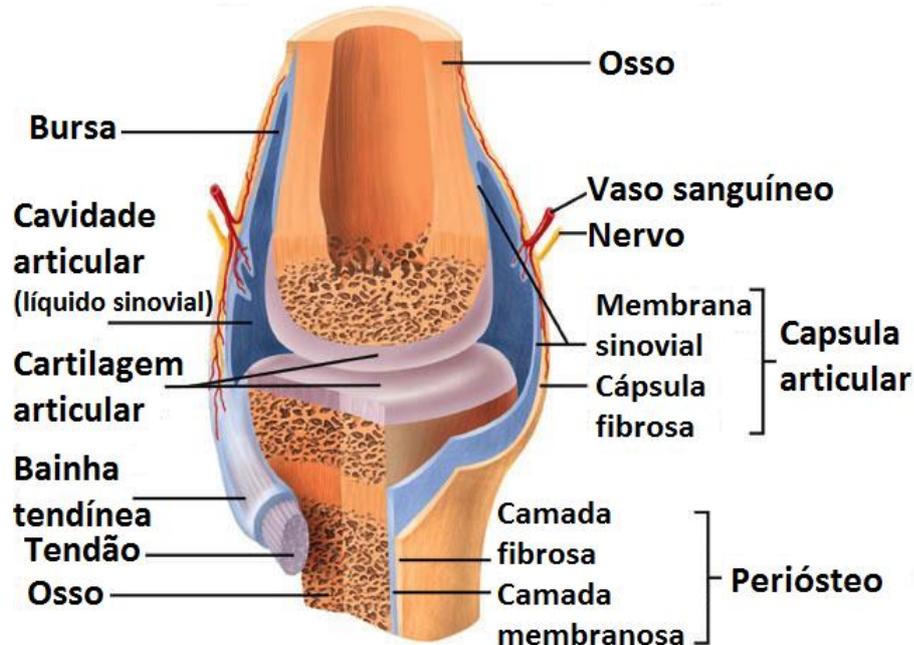
Embora apresente reconhecido efeito anti-inflamatório e seja largamente utilizado na clínica nos dias atuais, os mecanismos efetores do LLLT não são totalmente conhecidos, especialmente no que se refere aos efeitos deste sobre os componentes do sistema imune. Para tanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a resposta imune e o perfil de enzimas proteolíticas de matriz e seu inibidor na artrite aguda induzida por zymosan em camundongo (ASQUITH et al. 2009) após o tratamento com LLLT.

## **1.1 SISTEMA ARTICULAR**

A articulação sinovial (figura 1) é constituída por duas superfícies ósseas, recobertas pela cartilagem articular, ligamentos e membrana sinovial (cápsula fibrosa), a qual delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial (NAGASE; KASHIWAGI, 2003).

O tecido cartilaginoso é um tecido conjuntivo especializado, avascular, composto de condrócitos e com grande quantidade de matriz extracelular. Essa matriz é composta por uma densa rede de fibras colágenas, proteoglicanos agregados e não agregados, água, sais inorgânicos e pequenas quantidades de

outras proteínas, glicoproteínas não colagênicas e lipídios. A principal macromolécula encontrada na matriz é o colágeno (60%), podendo ser dos tipos IX, XI, mas predominantemente do tipo II. Este colágeno fica envolvido em um firme gel hidratado de proteoglicanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).



**Figura 1.** Desenho esquemático de uma articulação sinovial, demonstrando seus componentes teciduais. (<https://www.studyblue.com/notes/note/n/knr-181-exam-2/deck/6085759>).

O proteoglicano é constituído de cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), como o condroitim sulfato (formando um grande proteoglicano - agregam) e queratam sulfato, os quais estão associados a um núcleo proteico central. Esses proteoglicanos podem ser encontrados como monômeros e também na forma agregada. O agregado de proteoglicanos é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatada) com múltiplos monômeros de proteoglicanos ligados a ele (GOLDRING, 2000; TYYNI; KARLSSON, 2000; VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STÜSSI, 2002). Os glicosaminoglicanos e os grandes proteoglicanos são responsáveis pela ligação com as moléculas de água, mantendo assim a cartilagem hidratada (CLARKE, 2008).

Distribuídos em lacunas entre essa matriz, os condrócitos são responsáveis pela síntese e manutenção dos seus componentes, de forma anabólica ou catabólica, segundo os estímulos do microambiente (GOLDRING, 2000; TYYNI; KARLSSON, 2000). Dentre as substâncias anabólicas, o fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) e o fator de crescimento transformador  $\beta$

(transforming growth factor  $\beta$ /TGF- $\beta$ ) são as mais importantes. O IGF-1 contribui significativamente para a homeostase da cartilagem sob condições normais, enquanto o TGF- $\beta$  só aumenta a síntese de proteoglicanos quando a cartilagem está sob influência de um processo inflamatório (ANGEL; RAZZANO; GRANDE, 2003).

O metabolismo catabólico da matriz extracelular é realizado por uma variedade de enzimas proteolíticas, como as MMPs (metaloproteinases de matriz) e as ADAMTs (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) produzidas por uma ampla gama de células. Durante o catabolismo da cartilagem, a cascata proteolítica envolve MMPs tipo colagenases, gelatinases, estromelinas, e MMPs ancoradas à matriz, sendo suas atividades controladas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), todos sintetizados pelos condrócitos. A relação entre as MMPs e seus inibidores é rigidamente controlada por estas células para garantir a homeostasia tecidual (COHEN; FOSTER; MOW, 1998; VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STÜSSI, 2002). As atividades enzimáticas das ADAMTs incluem clivagem do colágeno, inibição da angiogênese e degradação dos proteoglicanos da cartilagem. As agrecanases (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, and -15) têm demonstrado importante papel na patologia de doenças reumáticas como Osteoartrite (OA) e Artrite Reumatóide (AR) (BURRAGE; MIX; BRINCKERHOFF, 2006).

Apesar de serem responsáveis pelos processos de anabolismo e catabolismo da matriz cartilaginosa, os condrócitos são células quiescentes no tecido normal adulto, permanecendo com baixa atividade de metabolismo de colágeno, sendo a meia vida calculada do colágeno tipo II 120 anos, enquanto do agrecan é 120 dias (HOUARD; GOLDRING; BERENBAUM, 2013).

Como a cartilagem é avascular, os condrócitos vivem em um ambiente de hipóxia, o que confere ao tecido certa proteção, uma vez que a síntese e a liberação de MMP-1 e MMP-13, assim como a clivagem do colágeno tipo II, são menores neste ambiente quando comparado ao ambiente normal de oxigenação. O oxigênio e os nutrientes são obtidos dos vasos que irrigam a cápsula articular, a sinóvia e o osso subcondral (STRÖBEL et al., 2010). A carga mecânica exercida sobre a articulação induz a movimentação dos fluidos entre líquido sinovial e cartilagem promovendo a difusão de moléculas, facilitando assim a nutrição da cartilagem (HARA; URBAN; MAROUDAS, 1990).

A membrana sinovial normal reveste as articulações, exceto na região de cartilagem articular. A superfície interna dessa membrana é composta por dois tipos de células: sinoviócitos do tipo A, que se assemelham estrutural e funcionalmente a macrófagos, e os do tipo B, os quais têm características de fibroblastos. Estas células repousam sobre um tecido conjuntivo que pode ser frouxo, denso ou adiposo (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

## 1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE ARTRITE

Animais têm sido extensivamente utilizados para o estudo da artrite. Apesar de certas limitações, muitos destes estudos em roedores apresentaram significativo progresso no entendimento dos mecanismos patológicos fundamentais e possibilitaram avanços no tratamento da doença. Dentre estes, a administração de zymosan (ZY) na cavidade articular de roedores produz uma sinovite grave e erosiva (KEYSTONE et al., 1977), que induz uma resposta imune *in vivo* por ativação de macrófagos e outras células mononucleares. A sintomatologia apresentada é semelhante àquela observada na AR, como edema, infiltrado celular sinovial, destruição cartilaginosa e óssea e perda motora (ASQUITH et al., 2009).

O zymosan, um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, é composto primariamente de resíduos de  $\beta(1-3)$ -glicose e manose (BOHN; BEMILLER, 1995). *In vitro*, o zymosan é utilizado como um modelo de indução de resposta imune inata pois é capaz de estimular a produção de citocinas inflamatórias e pode ativar o sistema complemento na ausência de imunoglobulinas (UNDERHILL et al., 1999). O zymosan é reconhecido e fagocitado principalmente por monócitos e macrófagos, levando à ativação das células de defesa (UNDERHILL, 2003). A administração intra-articular de zymosan promove, em até três dias após a indução, um aumento de permeabilidade vascular e migração celular, levando à sinovite erosiva grave. A seguir, desenvolve-se uma sinovite com infiltrado mononuclear e resposta dos fibroblastos, lembrando à sinovite crônica que caracteriza o *pannus* reumatóide (ASQUITH et al., 2009).

A resposta inflamatória desencadeada pelo zymosan está relacionada com sua fagocitose, realizada por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos por

intermédio da ligação do zymosan ao receptor *toll-like* tipo 2 (TLR2) ou TLR6 (OZINSKY et al., 2000; UNDERHILL et al., 1999). Uma vez ligado ao seu receptor, o zymosan induz a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas, IL-1, IL-6, IL-8, e IL-18, bem como a expressão de moléculas coestimuladoras. Adicionalmente, o zymosan é capaz de induzir a maturação de células dendríticas *in vitro* e estimular a produção de IL-2 por essas células, indicando ligação entre as respostas imunológicas inata e adaptativa (GRANUCCI et al., 2003).

### 1.3 ARTRITE REUMATÓIDE (AR)

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

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

As manifestações clínicas da doença podem ser divididas em articulares e extra-articulares. As manifestações articulares podem ser reversíveis em sua fase inicial, porém a sinovite persistente não controlada leva a destruição óssea e cartilaginosa, lesões tendinosas e ligamentares irreversíveis (WOOLF; PFLEGER, 2003). Embora as manifestações articulares sejam as mais características, a AR pode acometer outros órgãos e sistemas, sendo que as manifestações extra-articulares mais frequentes incluem quadros cutâneos, oculares, pleuropulmonares,

cardíacos, hematológicos, neurológicos e osteometabólicos (TURESSON et al., 2007). Em pacientes com manifestações extra-articulares observa-se evolução mais grave da doença, com atividade mais intensa, redução da capacidade funcional, da resposta terapêutica (menor ocorrência de remissão) e da expectativa de vida, em relação aos pacientes com manifestações exclusivamente articulares (MOTA et al., 2013).

Fatores genéticos e ambientais estão associados com o desenvolvimento da AR e em conjunto influem na evolução do quadro clínico, sendo o tabagismo o fator de risco ambiental melhor estabelecido para a doença, uma vez que o tabaco promove a citrulinização de proteínas próprias (MAHDI et al., 2009). Estudos de hereditariedade sugerem que 60% da população predisponente à AR apresentam fatores genéticos associados ao surgimento da doença (MACGREGOR et al., 2000). Inúmeros marcadores genéticos foram descritos em associação com a ocorrência da AR, porém, somente os alelos de HLA-DRB1 (shared epitope-SE), envolvidos na expressão do antígeno leucocitário humano (Human Leucocyte Antigen - HLA) responsável pela apresentação de autoantígenos, e dos genes PTPN22, envolvido na expressão da proteína tirosina fosfatase tipo 22 (responsável pela regulação do limiar de ativação dos linfócitos), são as alterações genéticas associadas bem estabelecidas, com forte nível de evidência. Alguns estudos sugerem que o epítipo compartilhado SE influi na seleção do repertório de células T (linfócitos T), direcionando a diferenciação para Th17, na apresentação antigênica ou na alteração da afinidade pelo antígeno, tendo um importante papel na promoção da resposta adaptativa autoimune (DE ALMEIDA et al., 2010; SNIR et al., 2009).

Agentes infecciosos, como o vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, espécies de *Proteus* e *Escherichia coli*, e seus produtos têm sido associados ao surgimento da AR. Embora os mecanismos patológicos ainda não estejam totalmente elucidados, estudos sugerem mimetismo molecular do epítipo compartilhado por algumas proteínas microbianas (KAMPHUIS et al., 2005). A formação de complexos imunes durante a infecção pode induzir a produção do Fator Reumatóide, anticorpo contra imunoglobulinas do tipo IgG, o qual tem sido largamente utilizado como marcador para o diagnóstico da AR e está implicado na patogênese da doença (MCINNES; SCHETT, 2011a).

A maior incidência entre as mulheres tem sido associada com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a produção de citocinas. Uma vez que o sistema

nervoso central está normalmente envolvido com a regulação do sistema imune e a homeostase, a neuroimunomodulação feminina pode estar associada com o desenvolvimento da artrite, atuando localmente (diversos neurotransmissores são expressos na sinovite observada na AR) ou centralmente (citocinas são rapidamente reguladas positivamente pelo hipotálamo durante uma inflamação periférica) (CAPELLINO et al., 2010).

### **1.3.1 Processo inflamatório articular**

O processo inflamatório articular ou sinovite inicia-se com o influxo de leucócitos em reflexo à quimiotaxia destas células em migrar para o compartimento sinovial e proliferar, o que resulta na hiperplasia da membrana sinovial, normalmente hipocelular (MCINNES; SCHETT, 2007). Essa migração é induzida pela ativação de células dos microvasos sinoviais, as quais aumentam a expressão de moléculas de adesão (incluindo integrinas, selectinas, e membros da superfamília das imunoglobulinas) e citocinas. A neoangiogênese, induzida pela exacerbação das condições de hipóxia local e a ação de citocinas, assim como a linfoangiogênese, são fenômenos típicos observados no início da sinovite da AR (SZEKANECZ et al., 2009). Dentre as células hiperplásicas no compartimento sinovial estão fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células TCD4<sup>+</sup>, células TCD8<sup>+</sup>, células natural killer (NK), células natural killer tipo linfócitos T (NK like T cell-NKT), células B e plasmócitos (FIRESTEIN, 2003).

Dentre os diversos mediadores envolvidos no processo inflamatório, encontram-se os eicosanóides e as citocinas. Os eicosanóides são formados após a ativação de complexos enzimáticos. Destes, as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) originam produtos oxigenados como as prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXAs), leucotrienos (LTBs); as lipoxigenases (5, 12 e 15 lipoxigenases) geram os ácidos hidroperoxi- e hidroxí-eicosatetraenóicos e citocromo P450, origina os epóxidos e as lipoxinas (SMITH, 1992). Dentre as PGs, deve-se ressaltar a PGE<sub>2</sub>, que promove vasodilatação, potencializa o aumento da permeabilidade vascular causado pela histamina e a bradicinina e está envolvida no fenômeno da dor (CIRINO, 1998).

As citocinas, por sua vez, são uma família de mediadores protéicos produzidas por vários tipos celulares, importantes em interações intercelulares e na indução e modulação de um grande número de processos inflamatórios e metabólicos. Participam ativamente da resposta imune, principalmente na ativação e proliferação dos linfócitos; estão envolvidas também na resposta pirogênica e de fase aguda da AR (MCINNES; SCHETT, 2011b).

As mudanças no microambiente combinadas com a reorganização na arquitetura sinovial, são condições favoráveis ao desenvolvimento da inflamação articular, que por sua vez pode levar a destruição da cartilagem adjacente devido à ativação de osteoclastos, condrócitos e fibroblastos (MCINNES; SCHETT, 2011b).

### 1.3.2 Imunidade inata e adaptativa

Diversas células efetoras da imunidade inata atuam na sinovite, incluindo macrófagos, mastócitos, células NK, células NKT, células dendríticas plasmocitóides e neutrófilos. O Fator de estimulação de colônias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor* - M-CSF), o Fator de estimulação de colônias de granulócitos (*granulocyte colony-stimulating factor* - G-CSF), e o Fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - GM-CSF) estimulam o efluxo da medula óssea, a migração para o tecido sinovial e a maturação destas células (CORNISH et al., 2009).

Os macrófagos possuem papel central na sinovite, atuando através da liberação de citocinas, como TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, produção de eicosanóides (metabólitos da ciclo-oxigenase pela cascata do ácido araquidônico) e MMPs, e assim como as células dendríticas, fagocitose e apresentação de antígenos às células T. O padrão de expressão de citocinas e a indução da óxido nítrico sintase sugerem um fenótipo predominante de macrófagos M1. Na sinovite os macrófagos são ativados por receptores do tipo Toll (toll-like receptors -TLRs), como TLR 2, 3, 4, 6 e 8, e pelos receptores NOD like NLR (proteínas de domínio de oligomerização nucleotídica - NOD, tipo receptores de ligação a nucleotídeo - NLRs), que reconhecem uma variedade de padrões moleculares associados a

patógenos (*pathogen associated molecular patterns* - PAMPs) e a danos (*damage associated molecular patterns* - DAMPs), como vírus e ligantes endógenos, incluindo a proteína de choque térmico (HSP70- função citoprotetora) e fibronectina (BRENTANO et al., 2005; SEIBL et al., 2003). A expressão de TLRs é reconhecidamente estabelecido no quadro crônico da AR, e está relacionado não somente com o início da doença como também na sua perpetuação (MCINNES; SCHETT, 2011b). A ativação também é direcionada pelas citocinas, interações com as células T, com complexos imunes, agonistas de receptores hepáticos, como a lipoproteína de baixa densidade e a lipoproteína de alta densidade, e um ambiente rico em proteases através da ativação do receptor de protease 2 (LIEW; MCINNES, 2002).

As células dendríticas plasmocitóides - CDp (subpopulação de células dendríticas) hiperplásicas no tecido sinovial produzem altos níveis de interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), que aumenta a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade I e II (MHC I e MHC II) nas CDp, tornando-as mais potentes na apresentação de antígenos, especialmente na forma de apresentação cruzada. O IFN- $\alpha$  produzido pela CDp também atua, juntamente com GM-CSF, induzindo a diferenciação de monócitos em mais células dendríticas mielóides (RÖNNBLÖM; ELORANTA, 2013).

Os neutrófilos contribuem com a inflamação através da síntese de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18, IL-15 e fator de ativação de célula B (B-cell activating factor/ BAFF), quimiocinas, prostaglandinas, proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem com ambiente de hipóxia na sinovite. Ativados por complexos imunes, componentes do sistema complemento e citocinas, os neutrófilos participam do início e dos diversos processos patológicos observados na doença (CASCÃO et al., 2010; EDWARDS; HALLETT, 1997).

Os mastócitos, associados com a ligação entre a imunidade inata e adaptativa da AR, produzem altos níveis de aminas vasoativas, citocinas, quimiocinas e proteases através da ligação de TLRs ou da ligação ao receptor  $\gamma$  e  $\epsilon$  da porção constante (fraction constant-Fc) das Imunoglobulinas (Igs) (HUIZINGA et al., 2010; WOOLLEY; PH; SC, 2003). Os anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos, marcador de progressão da AR, pertencem a classe das IgE, e são capazes de ativar mastócito através da ligação com a porção  $\epsilon$  da Ig (SCHUERWEGH et al., 2013).

As células NK são fonte significativa de citocinas na AR. Embora seja conhecida a ativação e a elevação da atividade citotóxica, assim como o aumento da liberação de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pelas NK, através da ação das citocinas IL-12, IL-15 e IL-18, os mecanismos de ação destas células na AR ainda são pobremente conhecidos (MCINNES; SCHETT, 2007). Entretanto estudos sugerem que NK e NKT atuam na regulação das células T nos processos de autoimunidade (SHI; VAN KAER, 2006).

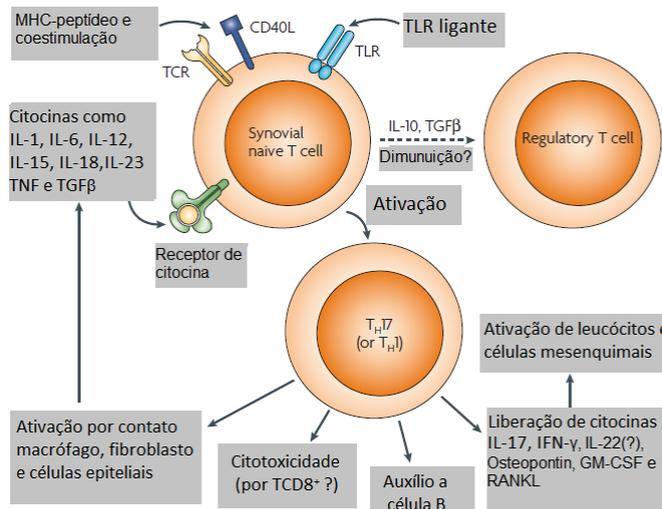
Os fatores genéticos associados a AR e a presença de autoanticorpos determinam um papel central da resposta imune adaptativa na patogênese da doença. A presença de células T que reagem contra peptídeos próprios citrulinados cíclicos, colágeno tipo II e glicoproteína de cartilagem 39 (GP39), assim como os fatores genéticos associados ao HLA de classe II e a proteína linfóide específica PTPN22 detectados em muitas células T durante a sinovite da AR, foram demonstrados apontando importante participação das células T na patogênese da doença (MCINNES; SCHETT, 2007; PANAYI, 2006).

Na AR o líquido sinovial apresenta abundantes células mielóides e células dendríticas plasmocitoídes que expressam citocinas (IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23), moléculas de HLA II e moléculas coestimulatórias necessárias à apresentação de antígenos e à ativação das células T, preferencialmente para um perfil Th1 (limphocytes type 1 helper T) (LEBRE et al., 2008). Oligoclonagem de linfócitos T no líquido sinovial, reações nos centros germinativos e hipermutação de linfócitos B sugerem apresentação antigênica de linfócitos B a linfócitos T helper no local da inflamação (CANTAERT et al., 2009; HUMBY et al., 2009).

As citocinas derivadas de macrófagos e fibroblastos sinoviais, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 e TGF $\beta$ , estão relacionadas com a diferenciação para Th1 e/ou Th17, assim como as derivadas das células mielóides e dendríticas, IL-12, IL-23, IL-15 e IL-18. As citocinas relacionadas com a expansão e a ação efetora das células T regulatórias (Treg) na AR ainda não foram definidas mas provavelmente incluem as citocinas regulatórias IL-10, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Essa suposição se baseia nos resultados observados em estudos com a administração de bloqueadores de TNF- $\alpha$  no tratamento da AR, nos quais se observa aumento da população das Tregs FoxP3<sup>+</sup> (MCINNES; SCHETT, 2007).

As células T sinoviais podem ser ativadas pela sinalização iniciada via receptor (T-cell receptor/TCR) com coestimulação ou por citocinas presentes no

ambiente sinovial como, IL-12, IL-23, IL-6 e TGF- $\beta$ , assim como os promotores de diferenciação de Th1 e Th17. Uma vez ativadas, as células T atuam através da liberação de citocinas, através do auxílio às células B, e no caso de células TCD8<sup>+</sup> efetoras, auxílio na sua atividade citotóxica (MCINNES; SCHETT, 2007) (figura 2).



**Figura 2.** Desenho esquemático demonstrando a ativação de células T sinoviais na AR e seus mecanismos efetores. Adaptado de: McInnes e Schett, 2007.

As células T podem também ativar macrófagos, fibroblastos e células epiteliais através de contato direto. A forma de ativação, seja via TCR ou por citocinas e o fenótipo das células T (Th1 ou Th2) determinam as cascatas de sinalização pelo fosfoinositol 3 quinase (phosphoinositide 3-kinase/PI3K) ou pelo fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B) nas células em contato e em consequência o perfil de citocina e quimiocina produzido por estas células (BRENNAN et al., 2002; DAYER; BURGER, 2004). As interações entre célula T e macrófago pode ser suprimida pela IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (DAYER; BURGER, 2004).

Apesar da AR ser convencionalmente considerada uma doença mediada por linfócito Th1 tem-se aumentado a atenção para o papel dos linfócitos Th17, uma subpopulação de linfócitos T que produz IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- $\alpha$  (MIOSSSEC, 2017). A IL-17, que atua sinergicamente com o TNF- $\alpha$ , promove a ativação de fibroblastos e condrócitos. Macrófagos e células dendríticas induzidas por TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23 proporcionam um ambiente de citocinas que promove a diferenciação de Th17, a supressão da diferenciação das células T regulatórias (Treg), assim como a indução de um perfil pró-inflamatório ao invés do perfil homeostático nas células T (GENOVESE et al., 2010). O desequilíbrio entre

Th17 e Treg também pode decorrer do bloqueio da atividade da Treg pelo TNF- $\alpha$  (NADKARNI; MAURI; EHRENSTEIN, 2007). Além disso, células T regulatórias naturais detectadas em tecidos de pacientes com AR parecem apresentar capacidade funcional limitada (ESENSTEN; WOFSY; BLUESTONE, 2011; SKAPENKO et al., 2005).

Um mecanismo de patogênese antígeno inespecífico adicional é a ativação de macrófagos e fibroblastos pelo contato com células T, através de interações entre CD40 e CD40L, CD200 e CD200L, molécula intracelular de adesão 1 (ICAM1) e antígeno associado a função de leucócitos 1 (LFA-1) (DANNING et al., 2000).

A resposta humoral tem papel central na AR, já comprovado pela eficácia do rituximab (droga indutora de morte em linfócitos B CD20<sup>+</sup>) no tratamento da doença (EDWARDS et al., 2004). Células B sinoviais estão principalmente localizadas em agregados de células T e células B, mantidos pela expressão de fatores, como o ligante indutor de proliferação (proliferation-inducing ligand/APRIL), BAFF, e CC e CXC quimiocinas, como CXCL13 e CCL21, por macrófagos, fibroblastos e células dos tecidos sinoviais (OHATA et al., 2005; SEYLER et al., 2005; TAKEMURA et al., 2001).

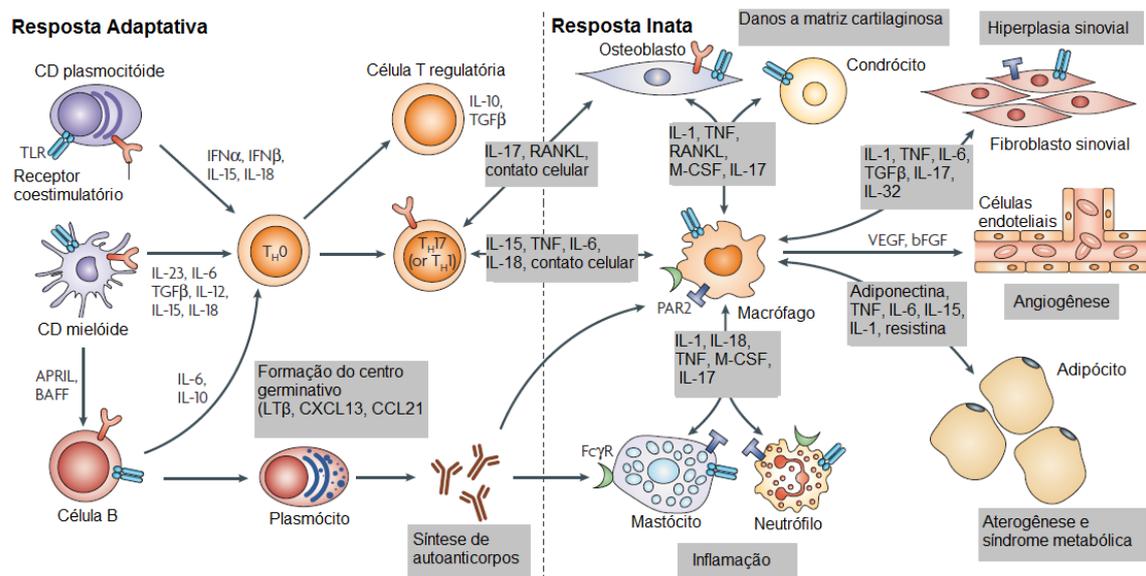
As células B atuam na sinovite através da produção de autoanticorpos, produção de citocinas e quimiocinas, como IL-6, IL-10 e linfotóxina  $\beta$  (LT $\beta$ ), e formação de imunocomplexos. As citocinas produzidas pelas células B ativam células dendríticas foliculares (células especializadas, residentes no estroma dos folículos e nos centros germinativos, que possuem longos dendritos e carregam antígeno intacto em sua superfície), induzem a neolinfogênese e contribuem para o ciclo de retroalimentação entre células T-macrófago e célula T-célula B (MCINNES; SCHETT, 2007).

Os anticorpos produzidos na AR são os anti IgG, conhecidos como Fator Reumatóide, ou os anti peptídeos citrulinados cíclicos (ACCP). Estudos têm sugerido que o papel das células B na patogênese da AR não está associado somente a produção de autoanticorpos, como também na apresentação de antígenos e produção de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$  e linfotóxina  $\beta$ ) (MCINNES; SCHETT, 2011b).

As citocinas são relacionadas à todas as fases da patogênese da AR, pela promoção da autoimunidade, pela manutenção da sinovite crônica e pelo

direcionamento da destruição aos tecidos articulares, além de integrar os mecanismos regulatórios da imunidade (MCINNES; SCHETT, 2007).

Diversas subpopulações celulares produzem citocinas durante a inflamação sinovial, e o padrão desta produção pode variar de acordo com o estágio da doença (figura 3).



**Figura 3.** Desenho esquemático representando as citocinas e células imunes envolvidas na AR. As citocinas atuam em diversos processos relacionados à patogênese da AR. Nas articulações reumáticas, o desequilíbrio entre a atividade das citocinas pro e anti-inflamatórias favorece a indução da autoimunidade, a inflamação crônica e o conseqüente dano à estrutura articular. APRIL, ligante indutor de proliferação; BAFF, fator ativador de células B; bFGF, fator de crescimento de fibroblasto básico; CCL21, CC-quimiocina ligante 21; CXCL13, CXC- quimiocina ligante 13; FcγR, receptor Fc para IgG; IFN, interferon; IL, interleucina; LTβ, linfotóxina-β; M-CSF, fator estimulador de colônia de macrófago; PAR2, receptor 2 protease ativada; RANKL, ligante do receptor ativador do fator nuclear-κB (RANK); TGFβ, fator de transformação do crescimento-β; TH, T helper; TLR, receptor Toll-like; TNF, fator de necrose tumoral; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. (Adaptado de McInnes e Schett, 2007).

Os macrófagos apresentam importante papel na progressão degenerativa da AR devido às suas atividades na apresentação antigênica e osteoclastogênese, e ainda, por ser a maior fonte das citocinas pro-inflamatórias TNF-α, IL-1 and IL-6. O TNF-α atua na ativação de leucócitos e células endoteliais, promove estimulação para produção de outras citocinas como IL-1β, induz a produção de citocinas pelos monócitos e a liberação de prostaglandinas, induz apoptose e estresse oxidativo em células polimorfonucleares (PMN), além de diminuir a proliferação dos fibroblastos sinoviais e a síntese de colágeno. O TNF-α também é responsável pela sensibilização dos nociceptores (receptores relacionados à sensação de dor), angiogênese, e supressão das Treg (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996). A IL-1β induz o aumento da liberação de citocinas e quimiocinas pelos fibroblastos sinoviais

e regula positivamente a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (DAYER; BRESNIHAN, 2002). Em conjunto, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estimulam a liberação de MMPs e a produção de IL-6. A IL-6 por sua vez, promove a ativação local de leucócitos e a indução da produção de autoanticorpos, assim como também atua nas respostas sistêmicas de fase aguda, como anemia, disfunções cognitivas e desregulação do metabolismo de lipídeos (MCINNES; SCHETT, 2011b).

A IL-17, produzida principalmente pelas células Th17, direciona para diferenciação, maturação, ativação e produção de citocinas pelos neutrófilos, ativação e produção de citocinas pelos monócitos, ativação e produção de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e MMPs pelos fibroblastos (WEAVER et al., 2007), e sinergicamente com o TNF, a ativação das células dendríticas (MIOSSEC; KOLLS, 2012).

As citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  e IL-10 são produzidas por diversas células, incluindo as células T regulatórias (Treg), e atuam na modulação da inflamação articular. IL-10, também produzida por células B regulatória, pode inibir a liberação de citocinas pela célula T e promover sua anergia, induzir a maturação de células Treg, diminuir a ativação e a produção de citocinas das células dendríticas (DC), e a liberação de MMPs e colágeno produzidos pelos fibroblastos sinoviais. TGF- $\beta$ , também produzido por fibroblastos sinoviais, apresenta efeitos ambivalentes na inflamação dependendo da presença ou ausência de IL-6: na presença, pode promover a diferenciação das células T para o fenótipo Th17, e na ausência, pode favorecer o fenótipo Treg (ASIF AMIN; FOX; RUTH, 2017; FIRESTEIN, 2003; MCINNES; SCHETT, 2007).

Um das características da AR é a expressão deficiente de diversas citocinas regulatórias, o que contribui ainda mais para o desequilíbrio entre o perfil de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na articulação. Embora IL-10 e IL-11 sejam expressas por células mononucleares sinoviais, a concentração local destas citocinas é insuficiente para controlar o ambiente predominantemente pró-inflamatório (FELDMANN; BRENNAN; MAINI, 1996).

As quimiocinas são citocinas quimioatraentes que atuam sobre diversos tipos celulares, promovendo especialmente o recrutamento de leucócitos e angiogênese. Classificadas, segundo a posição dos resíduos de cisteína, as 4 famílias CXCL, CCL, XCL, ou CX3CL1, apresentam classicamente funções distintas. As CXCL estão normalmente associadas ao recrutamento de neutrófilos, as CCL ao

recrutamento de monócitos e linfócitos, e as XCL e CX3CL1 ao recrutamento de linfócitos (linfotáticas) (KOCH, 2005).

O perfil de expressão de quimiocinas muda de acordo com o estágio da AR (KOCH, 2005). Estudos demonstraram a elevação da expressão de CXCL5 e CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) no soro e no homogeneizado da articulação de ratos, antes mesmo do surgimento da sintomatologia. Em contraste, CCL2 está envolvida nas fases tardias da doença (KASAMA et al., 1995). CXCL8 tem importante papel na quimiotaxia de neutrófilos (KASAMA et al., 1995) e a CCL3 na quimiotaxia de monócitos (KOCH et al., 1995). Já a CXCL1, CXCR4 e a CCR5 parecem atuar na elevação da severidade da doença em modelos animais (KASAMA et al., 1995; MATTHYS et al., 2001). Estudos com a administração de anticorpos anti-CXCL10 resultaram em supressão da doença (SALOMON et al., 2002), assim como a administração em humanos de antagonistas de CCR1 (HARINGMAN, 2003), sugerindo possíveis novos alvos terapêuticos (KOCH, 2005).

A AR também possui efeito sistêmico e está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, eventos cerebrovasculares e falhas cardíacas. A circulação sistêmica de produtos inflamatórios, como citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), reativos de fase aguda, complexos imunes e partículas lipídicas alteradas, pode aumentar a ativação endotelial e tornar placas ateromatosas instáveis. As citocinas podem também tornar os músculos e tecidos adiposos resistentes à insulina, resultando em uma síndrome metabólica inflamatória. A inflamação na AR também afeta o cérebro (fadiga e redução das funções cognitivas), o fígado (eleva a produção de proteínas de fase aguda), os pulmões (pode causar inflamação e doenças fibróticas), glândulas exócrinas (Síndrome de Sjogren's secundária) os músculos (sarcopenia) e o ossos (osteoporose). Entre pacientes com AR também é mais elevado o risco de linfoma, uma vez que a seleção clonal das células B e os distúrbios de regulação do sistema imune são mecanismos presentes em ambas às patologias (MCINNES; SCHETT, 2011b).

### 1.3.3 Resposta do tecido mesenquimal

A membrana sinovial contém normalmente células mesenquimais, fibroblastos relacionados à sinoviócitos (fibroblast-like synoviocytes/FLS) e macrófagos residentes. Na AR, os FLS assumem um fenótipo semiautônomo caracterizado pela independência de ancoragem, perda da inibição de contato e expressão de altos níveis de citocinas e quimiocinas, moléculas de adesão, metaloproteinases de matriz e inibidores teciduais de metaloproteinases (BRADFIELD et al., 2003). Os FLS também contribuem para a destruição local da cartilagem e para a cronicidade da inflamação sinovial, uma vez que promovem um microambiente favorável para a sobrevivência de células T e B e para a formação da resposta imune adaptativa (FILER et al., 2006).

Os mecanismos para a persistência da hiperplasia sinovial ainda não estão completamente elucidados, mas algumas hipóteses compreendem a maior resistência a apoptose, ao qual pode ser decorrente de mutações no gene supressor de tumor p53 (AUPPERLE et al., 1998), ou sua regulação negativa pelo synoviolin (AMANO et al., 2003), expressão de proteínas relacionadas à estresse como a proteína do choque térmico 70, que por sua vez induz a sobrevivência dos FLS (SCHETT et al., 1998), e modulação das funções do retículo endoplasmático pelo synoviolin e pela E3 ubiquitina ligase, regulando o balanço entre proliferação celular e apoptose (AMANO et al., 2003). Em adição, a metilação ou acetilação de reguladores de ciclo celular e a expressão de microRNAs podem também ser fatores críticos para a hiperplasia observada na sinovite (STANCZYK et al., 2008).

### 1.3.4 Danos na arquitetura articular

A cartilagem articular é composta por duas camadas, uma não mineralizada e outra camada mineralizada adjacente ao osso, as quais possuem condrócitos responsáveis pelo metabolismo deste tecido. Os osteoclastos somente atuam na reabsorção da camada mineralizada da cartilagem. Dois mecanismos atuam na destruição da cartilagem: os condrócitos passam do estado de produção

anabólica de matriz extracelular para o estado catabólico, caracterizado pela formação de ADAMTS (desintegrinas e metaloproteinases com motivos trombospondina) e MMPs que clivam proteoglicanos e fibras colágenas componentes da cartilagem, respectivamente. Esta mudança de perfil metabólico dos condrócitos ocorre em resposta à ação de citocinas, particularmente IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-18 e TNF. Outro mecanismo é a produção de enzimas de degradação de matriz por fibroblastos sinoviais, neutrófilos e potencialmente, mastócitos, localizados próximos a região articular (MCINNES; SCHETT, 2007).

As MMPs constituem um grupo de endopeptidases dependentes de zinco que apresentam importante papel no remodelamento do tecido conectivo observado normalmente no organismo, assim como em processos patológicos, a exemplo da AR (RENGEL; OSPELT; GAY, 2007). As MMPs tipo colagenases, MMP-1, -8 e -13, clivam a região de tripla hélice do colágeno intersticial, já as gelatinases, MMP-2 e -9 atuam na degradação do colágeno desnaturado após a ação das colagenases, as estromelinas degradam os proteoglicanos e a MMP-14, MMP ancorada a membrana, é o ativador de MMP-2 além de atuar na invasão de fibroblastos sinoviais nas regiões de cartilagem danificadas (ASIF AMIN; FOX; RUTH, 2017; YAMANAKA et al., 2000).

Todas as colagenases clivam colágeno em tripla hélice, entretanto há certa preferência pelo tipo de substrato/colágeno para cada MMP além de diferirem pelo tipo celular que primariamente às produzem. MMP-1 é mais efetiva contra colágeno tipo III e primariamente é produzida por células sinoviais, MMP-8 produzida por neutrófilos, cliva preferencialmente colágeno tipo I, enquanto a MMP-13 apresenta maior atividade contra o colágeno tipo II e tem expressão predominante em condrócitos. Devido a sua capacidade de hidrolisar, preferencialmente colágeno tipo II, a MMP13 tem importante papel na homeostase da cartilagem articular, sendo o aumento da sua síntese relacionada à AR (BURRAGE; MIX; BRINCKERHOFF, 2006).

Embora apresentem substratos similares, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 apresentam diferentes funções na AR. A MMP-2 é constitutivamente expressa pela maioria das células, incluindo os fibroblastos e não é usualmente induzida por citocinas e fatores de crescimento. Apesar dos elevados níveis nos tecidos sinoviais em processo de sinovite, a MMP-2 apresenta efeito supressivo sobre a inflamação, atuando na diminuição de anticorpos indutores da AR e mais recentemente, sabe-se

que a MMP-2 também é capaz de clivar e inativar a IL-17, importante citocina pró-inflamatória na patogênese da AR. Em contraste, os níveis basais de MMP-9 são indetectáveis na maioria das células normais, mas elevados em células tumorais e inflamatórias, como nos fibroblastos sinoviais durante a artrite. Podendo ser induzida por citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , MMP-9 apresenta efeitos estimulatórios sobre a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias. De fato, os elevados índices séricos e no fluido sinovial de MMP-9 são positivamente correlacionado com a progressão e severidade da AR (KIM et al., 2011; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; XUE et al., 2014).

Nas articulações normais a expressão fisiológica destas MMPs é baixa, mas torna-se elevada em condições patológicas como na Osteoartrite (OA) e AR. Na articulação, a MMP-2 e -14 são constitutivamente expressas, e em contraste, MMP-1, -3, -9 e -13 são induzidas pelas citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- $\alpha$  num processo de sinalização intracelular relacionada à ativação do fator de transcrição nuclear AP-1 (proteína ativadora 1/ activator protein 1) e do Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (BURRAGE; MIX; BRINCKERHOFF, 2006).

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são inibidores fisiológicos das MMPs, produzidos pelas mesmas células do tecido conjuntivo que produzem as MMPs. Atualmente, quatro famílias foram identificadas: TIMP-1, -2, -3, e -4). Uma vez que a estrutura terciária de todas as TIMPs é conservada, todas podem inibir qualquer MMP, com exceção do TIMP-1 e a MMP-14, embora haja maiores afinidades sobre certas MMPs: TIMP-1 forma preferencialmente complexo com a MMP-9, enquanto o TIMP-2 atua sobre a MMP-2. No ambiente inflamatório da artrite os níveis elevados de MMPs geralmente excedem os de TIMPs (BREW, K., & NAGASE, 2010).

O Fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) é outro regulador da expressão das MMPs. Estudos recentes têm relacionado o aumento da expressão de MMP-13 com o aumento nos níveis de TGF- $\beta$  na artrite (AREF-ESHGHI et al., 2015).

A IL-1 $\beta$  possui importante papel na degradação da cartilagem, através da inibição da síntese de matriz e da indução da produção das metaloproteinases MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13 e MMP-14 (KOSHY et al., 2001). A IL-17 atua diretamente e sinergicamente com a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  na promoção do catabolismo dos condrócitos (MCINNES; SCHETT, 2007).

A hiperplasia sinovial é o fator que mais contribui para os danos na cartilagem na AR. A perda de mecanismos de defesa normais, como a redução da expressão de lubricin (proteoglicano 4) (RHEE et al., 2005), podem resultar em alterações nas características das proteínas ligadas à superfície da cartilagem, promovendo a adesão dos FLS e invasão. A síntese de MMPs (particularmente, MMP-1, 3, 8, 13, 14 e 16) pelos fibroblast like synoviocytes promove a degradação do colágeno tipo II, processo que altera a composição de glicosaminoglicanos e a capacidade de retenção de água pela cartilagem, o que resulta em disfunções bioquímicas e mecânicas. A MMP-14 é a proteinase predominantemente expressa pelos FLS para degradar a matriz cartilaginosa (SABEH; FOX; WEISS, 2010). Enzimas de inibição endógenas, como as TIMPs, falham na tentativa de inibir a degradação da cartilagem. Adicionalmente, a própria cartilagem articular possui limitado potencial regenerativo. Fisiologicamente os condrócitos regulam a formação e a clivagem da matriz extracelular, mas sobre influência de citocinas, particularmente IL-1 e IL-17, e espécies reativas de nitrogênio, essas células morrem por apoptose (MCINNES; SCHETT, 2011b).

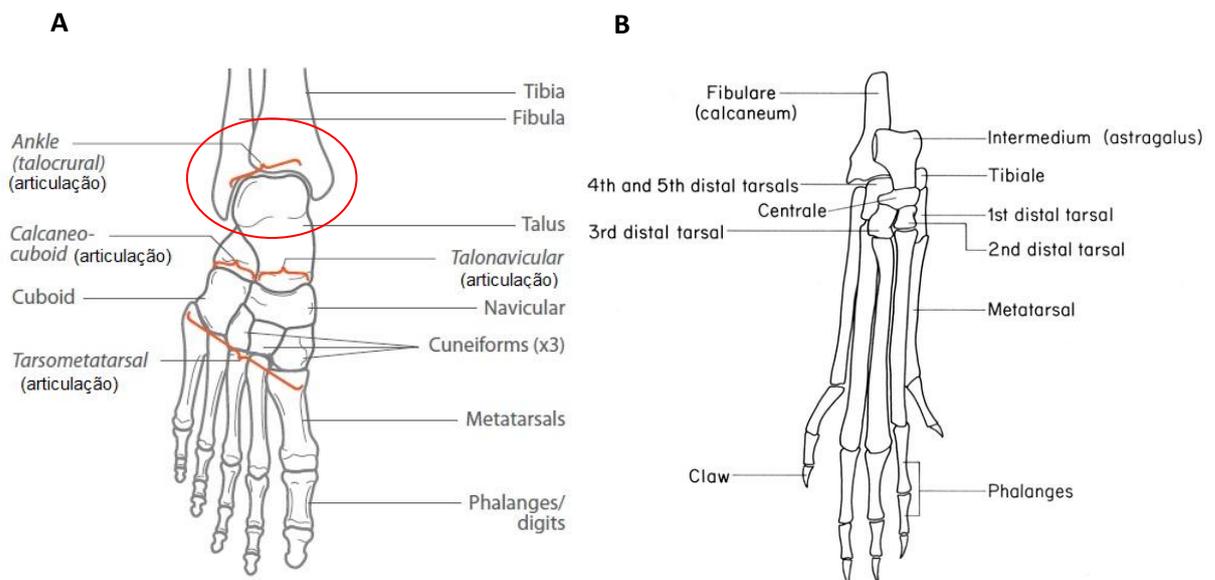
A morte de condrócitos faz parte da patogenia de diversas artropatias inflamatórias. Duas características relacionadas à morte destas células são importantes para a estrutura da cartilagem: por não haver fagócitos no tecido cartilaginoso, os condrócitos mortos permanecem na matriz podendo afetar sua estrutura e as funções de condrócitos viáveis; por não possuir linhagens celulares mesenquimais e não ser vascularizado, o que dificulta o recrutamento de precursores, os condrócitos mortos não são substituídos ou são substituídos de forma muito lenta, e dependendo da extensão do dano pode afetar a estrutura e função da cartilagem. A apoptose de condrócitos não é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 ou TNF, mas pode ser induzida por óxido nítrico e pela ligação de FAS e FASL expressos em sua membrana (LOTZ; HASHIMOTO; KÜHN, 1999).

As erosões ósseas na AR estão associadas ao aumento e prolongamento da inflamação (VISSER et al., 2002). As citocinas produzidas, especialmente por fibroblastos e células Th1, como o fator de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B, RANKL, promovem a diferenciação dos osteoclastos e a invasão da superfície do periósteo adjacente à cartilagem (GRAVALLESE et al., 1998). TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-17 amplificam a diferenciação e ativação dos osteoclastos (SCHETT; TEITELBAUM, 2009),

enquanto IL-4, IL-10, GM-CSF e IFN- $\gamma$  inibem sua diferenciação (MCINNES; SCHETT, 2007). Os osteoclastos possuem maquinaria ácido-enzimática capaz de destruir tecidos mineralizados, incluindo cartilagem mineralizada e o osso subcondral. Essa destruição resulta em profunda reabsorção óssea com formação de pontos de erosão, onde o tecido ósseo é substituído por células inflamatórias. A ruptura da região cortical óssea permite o acesso das células inflamatórias sinoviais à medula óssea, podendo estender a inflamação para este local (osteíte) (JIMENEZ-BOJ et al., 2005).

### 1.3.5 AR e as articulações talocrural e subtalar

O pé contém várias articulações sinoviais que podem ser afetadas pela AR. Conseqüentemente o acometimento destas articulações está presente em 80-90% das pessoas que apresentam AR, sendo o envolvimento das articulações do tornozelo observado em cerca de 20-40% dos pacientes (JAAKKOLA; MANN, 2004; KERRY; HOLT; STOCKLEY, 1994; MICHELSON et al., 1994). A figura 4 apresenta a anatomia óssea e articular do pé e tornozelo.



**Figura 4** - Desenho esquemático demonstrando a anatomia óssea e articular do pé e tornozelo em humanos (A) e camundongos (B). A - HELLIWELL et al. 2011; B-<http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>.

A inflamação sinovial nas articulações do pé e tornozelo causa o alongamento e o enfraquecimento da cápsula sinovial, a perda da integridade das estruturas estabilizadoras das articulações (ligamentos colaterais) e destruição da cartilagem articular. A perda da estabilidade das articulações torna-as mais suscetíveis á deformidades impostas pelas forças musculares e mecânicas geradas pela caminhada e pelo uso de sapato (JAAKKOLA; MANN, 2004).

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

### **1.3.6 Tratamento da AR**

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

Analgésicos e AINE's são largamente utilizados no tratamento de AR para diminuição da dor e da rigidez. Entretanto, os AINE's têm perdido seu papel histórico como primeira opção farmacológica do tratamento devido ao seu efeito limitado, incapacidade de modificar o curso da doença á longo prazo e pelos seus efeitos colaterais tóxicos, em especial os cardíacos e gastrointestinais (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Já a utilização dos corticosteróides demonstrou-se eficaz na supressão da inflamação e na diminuição da destruição articular, quando utilizado no período inicial da doença. Entretanto, o uso na fase tardia deve ser moderado devido aos seus significativos efeitos colaterais (SMOLEN et al., 2017).

Entre as DMCD sintéticas, o metotrexato (MTX) é atualmente considerado o fármaco padrão, sendo eficaz no tratamento da AR ativa e recente ao reduzir

sinais e sintomas, a progressão das lesões ósseas e cartilaginosas e melhorar o estado funcional do paciente. Entre as DMCD biológicas os mais utilizados são os bloqueadores do TNF (potente citocina inflamatória que promove a liberação de outras citocinas inflamatórias, particularmente as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 e estimula a produção de proteases), que em associação a MTX ou a outra DMCD sintética, possui benefício clínico, de remissão e funcional. Contudo, o aumento do risco de eventos adversos graves e de reação local a administração já foi descrito (KIELY et al., 2009; MOTA et al., 2013).

O tratamento para os quadros com acometimento das articulações do pé e tornozelo consistem em tratamento farmacológico, utilização de órtese e, em quadros mais avançados, cirurgias, como a artrodese (fusão dos dois ossos que formam a articulação) (JAAKKOLA; MANN, 2004).

Tendo em vista que a hiperplasia sinovial é tanto o marcador da AR, quanto o principal fator que contribui para a progressão das lesões (BURMESTER et al., 2012), os tratamentos direcionados à eliminação da inflamação, com alvo nas citocinas, quimiocinas e na coestimulação das células B e células T, têm obtido resultados promissores na AR (HARINGMAN, 2003; SMOLEN et al., 2017).

Apesar do progresso no desenvolvimento destas terapias, somente uma pequena parte dos pacientes atingem remissão clínica sustentada (BURMESTER; FEIST; DÖRNER, 2014).

Nas últimas décadas, a fototerapia utilizando o laser de baixa potência tem sido introduzida como alternativa não medicamentosa para o tratamento da AR, por propiciar reações fotoquímicas favoráveis a resolução dos processos inflamatórios e de regeneração tecidual (BROSSEAU et al., 2010). Porém, há controvérsias quanto a sua efetividade e seus mecanismos efetores ainda não são completamente conhecidos.

#### **1.4 LASER**

Laser é um acrônimo para “*(L)ight (A)mplification by (S)timulated (E)mision of (R)adiation*”, ou seja, amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação. Trata-se de um dispositivo constituído de um material capaz de emitir luz

quando estimulado numa cavidade óptica composta por dois espelhos (um de frente para o outro) (SVELTO; HANNA, 2010). Um feixe de luz emitido por um laser se caracteriza por ser colimado, monocromático, coerente e de alta densidade de energia, enquanto um feixe de luz branca, emitida pelas lâmpadas comuns, é divergente, apresenta diferentes comprimentos de onda, fases e, em geral, baixas densidades de energia (O'SHEA et al., 1978). Os lasers podem ser diferenciados pelo comprimento de onda (ou frequência) emitido, pelo modo de emissão (contínuo ou pulsado) ou ainda pela sua potência (baixa, média ou alta) (NIEMZ, 2007).

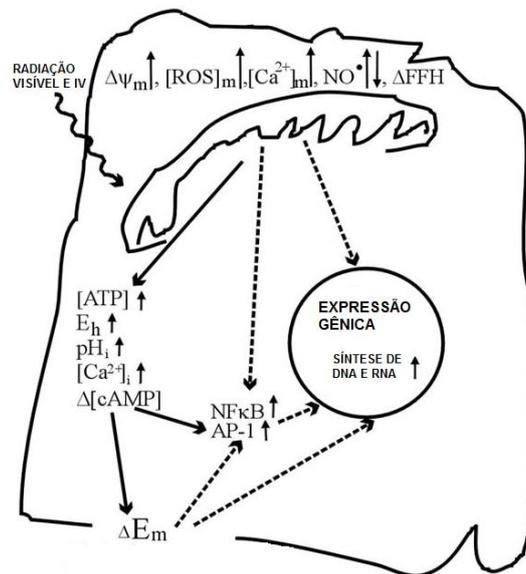
Terapias baseadas em lasers de baixa potência, do inglês *Low Level Light Therapy* (LLLT) têm sido utilizadas com sucesso para aplicações clínicas (REDDY, 2004). Radiações visíveis e pertencentes ao infravermelho do espectro eletromagnético parecem ser efetivas em tais terapias. Na literatura são encontrados estudos sobre os efeitos biológicos dos lasers de baixa potência em culturas de células eucarióticas e procarióticas (BARBOZA et al., 2015; CANUTO et al., 2015; FONSECA et al., 2010; HUANG et al., 2011), em animais (DOS ANJOS et al., 2017; MANTINEO; PINHEIRO; MORGADO, 2014) e em humanos (DE MARCHI et al., 2012; ESLAMIAN et al., 2012).

Atribuem-se os resultados clínicos positivos em terapias baseadas em lasers de baixa potência a uma sequência de eventos em nível molecular e celular, nos quais os fatores determinantes na resposta fotoquímica, fotofísica e/ou fotobiológica são o comprimento de onda e a intensidade utilizadas, a fluência aplicada e a concentração de cromóforos ativos e as propriedades ópticas (reflexão, transmissão, absorção, espalhamento e anisotropia) do tecido tratado, bem como o seu estado fisiológico (KARU, 1988, 2003).

A ação dos lasers de baixa potência está baseada na absorção da luz pelas células, nas quais modulam reações bioquímicas e estimulam a atividade mitocondrial (KARU, 2010). Esses efeitos tanto podem acelerar a síntese de DNA, RNA e de proteínas regulatórias do ciclo celular, promovendo assim uma proliferação (GAO; XING, 2009), quanto aumentar a produção de ROS, o que poderia desencadear alterações em enzimas responsáveis pelos mecanismos de reparo do DNA e conseqüentemente, danos subletais e até mesmo irreversíveis no DNA (DE SOUZA DA FONSECA et al., 2012; FONSECA et al., 2010; TRAJANO et al., 2016).

Os eventos observados entre a absorção da radiação a laser e os efeitos biológicos observados na célula compreendem as cascatas de sinalização intracelulares secundárias. Primariamente os fótons são absorvidos pelo fotoceptor, como a citocromo c oxidase (enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial), provocando mudanças nas propriedades óxido-redutoras de componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Como consequência ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, de íons cálcio e alteração no potencial elétrico da membrana mitocondrial (como representado na figura 7). Estas modificações mitocondriais levam a alterações nos parâmetros homeostáticos celulares ( $pH_i$ ,  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[cAMP]$ ,  $E_h$ ,  $[ATP]$ ), culminando com o aumento na síntese de DNA e RNA, dentre outras implicações (KARU, 2008).

Dentre os efeitos geralmente associados aos benefícios clínicos da LLLT estão a proliferação e a diferenciação celular (WU; XING, 2014). O aumento da proliferação, em resposta à irradiação com laser de baixa potência, tem sido atribuída ao aumento na expressão de fatores sensíveis ao estado redox da célula, como NF $\kappa$ B ou as proteínas da família das Src quinases (ALEXANDRATOU et al., 2002; KARU, 1999; LUBART; BREITBART, 2000).



**Figura 5** – Desenho esquemático representando a sinalização intracelular após permeabilização mitocondrial em resposta a absorção de radiação visível ou infravermelho (IV) pelo fotoceptor citocromo c oxidase. As setas  $\uparrow$  indicam elevação e  $\downarrow$  indicam diminuição nos valores, e os colchetes  $[\ ]$  concentração.  $\Delta E_m$ =potencial de membrana;  $\Delta\Psi_m$ =potencial elétrico da membrana mitocondrial; ROS=espécies reativas de oxigênio;  $\Delta FFH$ = alterações na homeostasia fusão-fissão mitocondrial;  $E_h$ =potencial redox intracelular;  $pH_i$ =pH intracelular; cAMP=adenosina monofosfato cíclico; ATP=adenosina trifosfato; AP-1=proteína ativadora 1; NF $\kappa$ B=fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B. Adaptado de KARU, 2008.

As Src quinases possuem importante papel em processos celulares como proliferação, migração, ancoragem e sobrevivência e são ativadas pelo ROS produzido em resposta à irradiação pelo laser (PARSONS; PARSONS, 2004).

A LLLT pode conferir também efeito protetor à célula ao suprimir a expressão de p53, inibidor da proteína antiapoptótica Bcl-2 ou atuar diretamente na indução da expressão de Bcl-2 a nível pós-transcricional (SHEFER et al., 2002).

Pesquisas recentes têm demonstrado que os efeitos do LLLT em células animais podem ser representados por uma parábola. Com o aumento da dose os efeitos estimulatórios sobre a célula são diminuídos gradualmente e, quando o limiar é atingido, os efeitos inibitórios sobre as células emergem (HUANG et al., 2011). A inibição celular causada pela LLLT em fluências elevadas tem sido relatada em diversos trabalhos como descrito por Wu e colaboradores (WU et al., 2009). Esses pesquisadores relacionaram a apoptose celular pela via mitocondrial com os seguintes eventos celulares: (i) geração imediata de ROS mitocondrial, (ii) despolarização mitocondrial e, (iii) ativação de caspase-3, levando assim a morte celular. Porém, outros mecanismos para ativação da via mitocondrial e consequente permeabilização da membrana da mitocôndria, também podem estar envolvidos no processo apoptótico induzido por LLLT em fluências elevadas, como ativação de Bax e inibição de Akt pela proteína glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (HUANG et al., 2011).

#### **1.4.1 Lasers e processo inflamatório**

Terapias utilizando lasers de baixa potência têm demonstrado excelentes resultados no controle do processo inflamatório, através da redução da dor, do edema e promovendo o reparo dos tecidos lesionados (ALBERTINI et al., 2007; COTLER et al., 2015). Outra vantagem que vem sendo descrita é a ausência de efeitos adversos, observados em diversas terapias medicamentosas. A hipótese de redução da duração da fase aguda inflamatória e estimulação da reparação tecidual foi inicialmente elaborada para explicar o alívio da dor obtido com o tratamento com o laser (BASFORD, 1993). Embora a eficácia anti-inflamatória do tratamento com laser de baixa potência seja controversa para alguns autores, estudos têm

demonstrado efeitos no nível de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), importante marcador inflamatório, e na formação do edema articular, tanto *in vitro* (SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000; SHIMIZU et al., 1995) quanto *in vivo* (DE JESUS et al., 2014; MIZUTANI et al., 2004).

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

A utilização de LLLT é sugerida como alternativa em curto prazo para redução da dor e da rigidez matinal na AR (BROSSEAU et al., 2010). Entretanto estudos têm reportado resultados diversos sobre a AR. Meireles e colaboradores (2010) aplicaram LLLT ( $\lambda = 785$  nm, fluência de  $3 \text{ J/cm}^2$  e potência de 70 mW) na mão de pacientes com AR e não observaram efeitos positivos relacionados a diminuição da dor ou rigidez articular (MEIRELES et al., 2010). Em outro estudo, Castano e colaboradores (2007) aplicaram LLLT ( $\lambda = 810$  nm, fluência de  $3\text{-}30 \text{ J/cm}^2$  e potência de  $5\text{-}50$  mW) em joelho de ratos com AR induzida por zymosan e observaram diminuição do edema articular, relacionando com a diminuição do nível de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (CASTANO et al., 2007). Já Alves e colaboradores (2013), também utilizando articulação do joelho de ratos com AR induzida, aplicaram LLLT ( $\lambda = 780$  nm, fluência de  $7,7 \text{ J/cm}^2$  e potência de 22 mW) e observaram que o laser foi eficaz na modulação inflamatória, ao diminuir, entre outros, o número de células mononucleares inflamatórias, o exudato proteico, a hemorragia medular, a hiperemia e a necrose (ALVES et al., 2013).

Em trabalho anterior, utilizando o mesmo modelo de indução da artrite e os mesmos parâmetros do laser de baixa potência ( $\lambda = 830$  nm, fluência de  $3\text{-}30 \text{ J/cm}^2$  e potência de 10 mW) deste trabalho, nosso grupo de pesquisa observou importante efeito anti-inflamatório da LLLT na maior densidade de energia ( $30 \text{ J/cm}^2$ ), embora os resultados do grupo tratado com a menor densidade de energia ( $3$

J/ cm<sup>2</sup>) também sinalizassem para diminuição do processo inflamatório. Esse efeito foi então atribuído à indução de apoptose nas células polimorfonucleares, que infiltram a articulação, uma vez que a terapia foi capaz de alterar a expressão dos genes relacionados com as vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose nas células inflamatórias. Os diferentes resultados apresentados nas 2 densidades energéticas avaliadas seriam atribuídos apenas à uma questão temporal (DOS ANJOS et al., 2017).

Apesar de lasers de baixa potência serem utilizados em terapias alternativas para aceleração de cicatrização de feridas em tecidos moles (AMARILLAS-ESCOBAR et al., 2010; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006) ou de fraturas ósseas (KAZEM SHAKOURI et al., 2010), no tratamento de lesões na cavidade oral (ANTUNES et al., 2007) e para reduzir a sensação álgica (CRAWFORD; THOMSON, 2003; ORHAN et al., 2011), seus efeitos biológicos necessitam ainda de estudos para que sejam melhores compreendidos e que suas aplicações clínicas possam ser mais eficazes e seguras (BROSSEAU et al., 2010).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os mecanismos imunológicos e a participação das metaloproteinases de matriz (MMP) e seu inibidor (TIMP2) na inflamação articular em modelo experimental de AR, após a utilização da terapia com laser de baixa potência.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever os efeitos do laser infravermelho (830nm, 10mW, modo contínuo de emissão e nas fluências de  $3\text{J}/\text{cm}^2$  e  $30\text{J}/\text{cm}^2$ ) na artrite induzida, enfocando mecanismos imunológicos, tais como:

- Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (RT q-PCR e ELISA) no local da inflamação;
- Produção de quimiocinas (RT q-PCR e Imunohistoquímica) no local da inflamação;
- Caracterização e quantificação de células do sistema imune no linfonodo proximal à inflamação (linfonodo poplíteo) (citometria de fluxo);
- Produção de metaloproteinases de matriz e seu inibidor (RT q-PCR e Imunohistoquímica) no local da inflamação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

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

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

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

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos de 8 animais cada, conforme descrito abaixo (tabela 1).

**Tabela 1** – Distribuição dos animais nos grupos experimentais.

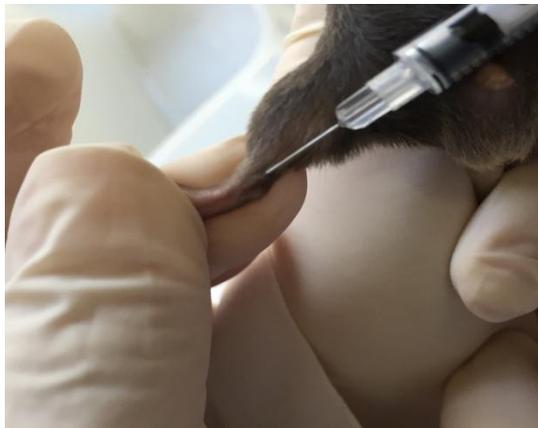
| <b>Grupos</b>  |
|--|
| 1. Artrite induzida com zymosan e sem tratamento (ZY)  |
| 2. Eutanasiado 5h após indução com zymosan (5h)  |
| 3. Zymosan + tratamento com dexametasona (ZY+DEXA)   |
| 4. Zymosan + tratamento com laser na densidade energética de $3 \text{ J/cm}^2$ (ZY+3J/cm <sup>2</sup> )   |
| 5. Zymosan + tratamento com laser na densidade energética de $30 \text{ J/cm}^2$ (ZY+30J/cm <sup>2</sup> ) |

Pensando no bem estar animal, somente as patas traseiras foram utilizadas para indução da artrite com zymosan. Devido ao elevado número de análises que demandaram a utilização de toda a estrutura removida da pata traseira dos animais, fez-se necessária a repetição do experimento. Em ambas repetições os animais foram subdivididos nos mesmos grupos citados acima e os mesmos

protocolos de indução da artrite e de tratamentos (laser e dexametasona) foram criteriosamente repetidos.

### 3.2 INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PELO ZYMOZAN

A artrite experimental foi induzida segundo a técnica utilizada por Dimitrova e colaboradores (2010), pela qual, um processo inflamatório articular desenvolve-se pela administração de 180 $\mu$ g de zymosan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvido em 10 $\mu$ L de solução salina estéril, na região da articulação talocrural e subtalar (direita e esquerda) dos membros posteriores (figura 6) de camundongos C57BL/6 (DIMITROVA et al., 2010). Cinco horas após a indução com zymosan, um grupo de animais (n=8) foi eutanasiado com a finalidade de confirmar a presença do processo inflamatório e os tipos celulares presentes na região articular.



**Figura 6** - Administração de Zymosan na região da articulação talocrural e subtalar.

### 3.3 EXPOSIÇÃO AO LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O laser infravermelho de baixa potência (AlGaAs - Aluminum Gallium Arsenide, HTM Laser Compact, HTM Indústria de Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda/Brasil) foi utilizado nos procedimentos experimentais com potência fixa de

10mW, no modo contínuo de emissão, comprimento de onda de 830nm, 0.05 cm<sup>2</sup> de área irradiada, fluências de 3 e 30J/cm<sup>2</sup> (energia total de 150 e 1500mJ administrada após 15 e 150s, respectivamente).

Assim como no trabalho de Castano e colaboradores (CASTANO et al., 2007), as fluências utilizadas foram de 3 e 30J/cm<sup>2</sup>, sendo a fluência de 3J/cm<sup>2</sup> escolhida por ser indicada, no manual do equipamento de laser, para tratamento de artrite visando efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, regenerativos e de melhora da circulação sanguínea. Já a fluência de 30J/cm<sup>2</sup>, foi escolhida por apresentar melhores efeitos anti-inflamatórios e de redução do edema se comparado a fluência de 3J/cm<sup>2</sup>, segundo Castano e colaboradores (CASTANO et al., 2007).

A irradiação seguiu a seguinte ordem cronológica representada na figura 7.



**Figura 7** - Cronograma experimental.

Após 5 horas da indução pelo zymosan, os animais pertencentes aos grupos 4 e 5 (tratados com laser - ZY+3 J/cm<sup>2</sup> e ZY+30 J/cm<sup>2</sup>) foram imobilizados e expostos aos lasers. No mesmo horário da irradiação, os animais do grupo 3 (ZY+DEXA) foram tratados com dexametasona intraperitonealmente. Esses procedimentos prosseguiram por 4 dias consecutivos, sempre no mesmo horário definido na primeira irradiação.

A escolha do momento para início do tratamento (5 horas após a indução com zymosan), assim como o período de tratamento (101 horas ou 4 dias após a indução com zymosan) foram estabelecidos visando utilizar o período de inflamação aguda induzida por zymosan nos animais. Segundo Rocha e colaboradores (1999) a inflamação induzida por zymosan inicia-se entre 3 e 6 horas após administração de zymosan com intensa infiltração neutrofílica, e segundo Frasnelli e colaboradores

(2005) atinge o pico da inflamação entre os dias 1 e 7 (FRASNELLI et al., 2005; ROCHA et al., 1999).

### **3.4 TRATAMENTO COM DEXAMETASONA**

Com o intuito de comparar os efeitos do laser com os efeitos do tratamento medicamentoso baseado em uso de corticosteróides, comumente utilizado na artrite, foi criado um grupo tratado com solução de dexametasona (Aché Laboratório Farmacêutico, Brasil) considerado como tratamento anti-inflamatório padrão ouro. A administração intraperitoneal da dexametasona seguiu a mesma dosagem (4mg/kg) e modo de aplicação (intraperitoneal) apresentado por Moraes e colaboradores (2010) (MORAIS et al., 2010). Assim como a irradiação com laser, a administração de dexametasona foi realizada 5h, 29h, 53h, e 77h após a indução da inflamação articular pelo zymosan.

### **3.5 EUTANASIA E PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS**

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

Imediatamente após a eutanásia, as articulações do tornozelo, juntamente com uma pequena porção de estruturas abaixo e acima do tornozelo, o que inclui músculos, tendão, ossos e tecido conjuntivo frouxo, de ambos os membros posteriores dos animais foram removidas, lavadas em água destilada para retirada do excesso de sangue e dissecadas. Durante a dissecação a pele foi retirada (a figura 8 apresenta os planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia). Logo em seguida as amostras foram encaminhadas para análises imunohistoquímicas e de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativo em

tempo real (RT q-PCR, do inglês, Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction) em uma das repetições experimentais. Já na segunda repetição, as mesmas foram encaminhadas para doseamento de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA, do inglês enzyme-linked immunosorbent assay).



**Figura 8** - Planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia. Figura 1: A - plano de corte para retirada das falanges; corte na porção média do metatarso. B - plano de corte na porção média da tíbia e fíbula. Figura 2: plano de corte utilizado na microtomia para obtenção das lâminas histológicas. Adaptado de <http://newsblog.drexel.edu/2014/09/16/drexel-engineers-discovery-turns-artificial-ankle-research-in-a-new-direction/>.

Para as análises morfológica e de imunohistoquímica, a região da articulação talocrural foi fixada em paraformaldeído tamponado 4%, pH 7,4, durante 24 horas, descalcificada em solução de ácido nítrico 5% por 48 horas e em seguida lavados em água corrente por 24h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas, diafanizados e incluídas em parafina (Histosec-Merck, Alemanha). Foram obtidos cortes longitudinais com 3  $\mu$ m de espessura, os quais foram desparafinizados e hidratados.

As lâminas obtidas através do processamento histológico de rotina foram coradas com Hematoxilina e Eosina, para análise da presença e extensão do infiltrado inflamatório, assim como as modificações estruturais nas articulações do tornozelo após a indução da artrite com e sem os tratamentos propostos. As análises morfológicas foram realizadas utilizando microscópio Olympus (BX53F) equipado com as objetivas U-PlanFL N 4/0.13, 10/0.30, 40/0.75 e 100/0.85. As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus DP73 e através de software Cell Sens Imaging (5.1 version, Olympus, EUA).

### **3.6 EXPRESSÃO DE MMPs E TIMP2 NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DA ARTICULAÇÃO**

A avaliação Imunohistoquímica (IHC) foi realizada em cortes histológicos sobre lâminas silanizadas, previamente desparafinizados. Inicialmente, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em microondas com incubação em solução de citrato de sódio 0,01 M (pH 6) durante 20 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada usando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% diluído em metanol PA, seguido do bloqueio dos potenciais epítomos cruzados, com soro bloqueador de coelho a 1,5% (ABC Staining System - Santa Cruz Biotechnology, EUA). Os anticorpos primários utilizados, MMP13 e TIMP2 (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluídos segundo orientação do fabricante, foram incubados com os cortes histológicos durante a noite à temperatura de 4°C. No dia seguinte, o anticorpo biotilado secundário apropriado (ABC Staining System - Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi incubado com os cortes durante 30 min, à temperatura ambiente, seguido pela solução ABC-Peroxidase, contendo o cromogéno DAB (3-3'-diaminobenzidina -Sigma Aldrich, EUA) durante 10 min, também à temperatura ambiente. Ao final, as lâminas foram contrastadas usando verde de metila. Como controle negativo, cortes histológicos foram incubados na ausência de anticorpo primário.

### **3.7 EXTRAÇÃO DE RNA E *real time* quantitative PCR (RT-qPCR) DO TORNOZELO INFLAMADO**

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

Para a reação de RT-qPCR foram utilizados *primers* dos genes que codificam citocinas, quimiocinas, MMPs e inibidor. Dentre as citocinas, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , quimiocinas, CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL2, CXCL10 e CXCR4, dentre as MMPs, MMP-2, -9, -13 e -14, e finalmente a TIMP-2 (Invitrogen, Brasil). A normalização das amostras foi realizada com o *primer* do gene  $\beta$ -actina (Invitrogen, Brasil). Todos os *primers*, desenhados em diferentes éxons para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico utilizando o programa Primer 3 (UNTERGASSER et al., 2012), são apresentados na Tabela 2.

Através dos resultados das curvas padrão para determinação da eficiência dos *primers* (eficiência aceitável superior a 90%), padronizou-se a utilização da diluição de 1:5 de cDNA para todas as amostras. As reações foram feitas no volume final de 10 $\mu$ L, contendo 2,6 $\mu$ L de água ultrapura, 1,4 $\mu$ L da mistura de cada um dos pares de *primers Forward* e *Reverse* de cada gene (0,7 $\mu$ L da cada primer na diluição de 10 $\mu$ molar), 1  $\mu$ L de cDNA diluído e 5  $\mu$ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

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

Para análise dos níveis relativos de mRNA através de RT-qPCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Calculou-se inicialmente o  $\Delta$ CT de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle ( $\beta$ -actina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do  $\Delta$ CT da amostra, escolheu-se como grupo normalizador os animais com indução da artrite e sem tratamento (grupo ZY). Para o cálculo do  $\Delta\Delta$ CT utilizou-se a fórmula seguinte: [ $\Delta$ CT (amostra) –  $\Delta$ CT (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o  $\Delta\Delta$ CT, aplicou-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta$ CT}, que resultou no valor dos níveis relativos de mRNA.

**Tabela 2** Primers utilizados no ensaio de RTq-PCR.

| Nome do gene   | NCBI Reference Sequence | Sequences   |
|--|-------------------------|---|
| Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )                        | NM_008361.4             | F:TTGACGGACCCCAAAAGAT<br>R:GAAGCTGGATGCTCTCATCTG          |
| Interleucina 6 (IL-6)                                      | NM_031168.2             | F:GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA<br>R:CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA |
| Interleucina 10 (IL-10)                                    | NM_010548.2             | F:GATGCCCCAGGCAGAGAA<br>R:CACCCAGGGAATTCAAATGC            |
| Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )                  | NM_013693.3             | F:CTACTTTGGAGTCATTGCTCTGTG<br>R:CCAGCATCTTGTGTTTCTGAGTAG  |
| Fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ )  | NM_011577.1             | F:GGGCTACCATGCCAACTTCT<br>R:GGTTGTAGAGGGCAAGGACC          |
| Quimiocina (C-C motif) ligante 2 (CCL2)                    | NM_011333.3             | F:GTCCCTGTCATGCTTCTGG<br>R:CAATGAGTAGGCTGGAGAGC           |
| Quimiocina (C-C motif) ligante 3 (CCL3)                    | NM_011337.2             | F:GTGTAGAGCAGGGGCTTGAG<br>R:AGCCACATCGAGGGACTCTT          |
| Quimiocina (C-X-C motif) ligante 1 (CXCL1)                 | NM_008176.3             | F:GTGAGGACATGTGTGGGAGG<br>R:TGTATGGTCAACACGCACGT          |
| Quimiocina (C-X-C motif) ligante 2 (CXCL2)                 | NM_009140.2             | F:GGCGGTCAAAAAGTTTGCCT<br>R:CTGTCCCTCAACGGAAGAA           |
| Quimiocina (C-X-C motif) ligante 10 (CXCL10)               | NM_021274.2             | F:AAGCTATGTGGAGGTGCGAC<br>R:CCTCCTTGTCCCTCCCTAGCT         |
| Quimiocina (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)                | NM_009911.3             | F:TTACCCCGATAGCCTGTGGA<br>R:GGCATCGTCATCCTCTCCTG          |
| Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2)                       | NM_008610.2             | F:CCGATCTACACCTACACCAA<br>R:ATGCTGATACTGACACTGGTA         |
| Metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9)                       | NM_013599.4             | F:CTCTGCCTGCACCACTAAAG<br>R:GGCAAGCAGTACTCTTCCTG          |
| Metaloproteinase de matriz 13 (MMP-13)                     | NM_008607.2             | F:ATGGTCCAGGCGATGAAGAC<br>R:ACCCAGCCCTATCCCTTGAT          |
| Metaloproteinase de matriz ancorada á membrana 14 (MMP-14) | NM_008608.4             | F:TTCAAGGAGCGATGGTTCTG<br>R:CCATCAATACTGCCTACGAGAG        |
| $\beta$ -actina  | NM_007393.4             | F:CATCCGTAAAGACCTCTATGCC<br>R:GGAGCCAGAGCAGTAATCTC        |

### 3.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO TORNOZELO INFLAMADO

Após a dissecação para retirada da pele o tornozelo foi submetido ao processo de extração de proteínas usando tampão PBS suplementado com 0,4M de NaCl, 0,05% de Tween 20 e inibidores de proteases (0,1mM de PMSF, 0,1mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 20 KI Aprotinina A / 100ml) em uma proporção de 100mg de tecido por mL da solução. As amostras foram então maceradas, homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos a 10.000RPM (4°C). Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 foram estimados utilizando-se kits comerciais para ELISA (BD Biosciences, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, em uma placa de 96 poços foi adicionado 100 $\mu$ L de anticorpo de captura (Capture Antibody) diluído em tampão de cobertura (Coating Buffer) com incubação overnight (durante a noite) a temperatura ambiente (RT, do inglês room temperature). Na manhã seguinte, foi realizado o bloqueio com a solução de ensaio diluente (Assay Diluent) por 1h RT. Após, foram adicionados às amostras teste, o controle de reação (branco/sem amostra somente Assay Diluent) e as diluições da curva padrão disponibilizada no kit, que permaneceram na placa por 2h RT. Em seguida foi adicionado aos poços 100 $\mu$ L de anticorpo de detecção (Detection Antibody) com incubação de 1h RT, seguido pela adição da enzima reagente (Enzyme Reagent) aos poços por 30 minutos RT. Entre todas as etapas citadas acima foram realizadas lavagens na placa com o tampão de lavagem (Wash Buffer/WB). Finalmente, a solução substrato (Substrato Solution) foi adicionada, e a reação para promoção da cor azulada nos poços positivos para a citocina dosada por cada kit, foi interrompida no momento em que o 5<sup>o</sup> poço da curva padrão tornou-se levemente azulada, com a utilização da solução de parada (Stop Solution). As placas foram lidas no leitor de ELISA (SpectraMax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 450nm de comprimento de onda, e a densidade óptica das amostras assim como dos padrões para construção da curva padrão, foram analisadas utilizando o software SoftMax® Pro (Molecular devices, USA).

### 3.9 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO LINFONODO PROXIMAL À INFLAMAÇÃO

Os linfonodos poplíteos drenantes da região inflamada foram coletados e mantidos em tampão fosfato 1X/0,01M (PBS, do inglês Phosphate Buffer Solution) com 5% de soro fetal bovino (SFB) até serem macerados em cerca de 5mL de RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) completo com auxílio de trama de tecido e êmbolo de seringa estéreis em placa de Petri em ambiente estéril. Após a maceração mecânica, o lisado celular foi coletado e transferido para tubos Falcons de 15mL para ser centrifugado a 1500RPM por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1mL de RPMI completo para a contagem de células em Câmara de Neubauer. Para obtenção do número suficiente de células ( $10^6$  células por mL) foi necessário juntar os linfonodos de dois animais, formando um *pool*. Todo o procedimento de coleta e maceração, até a centrifugação, além de todo o material utilizado nestes procedimentos, foram mantidos de forma estéril dentro da cabine de segurança biológica. Em diferentes placas com 96 poços foram plaqueadas  $10^6$  células por poço para realizar a compensação, marcação extracelular e marcação de FOXP3. Todos os anticorpos utilizados nesse ensaio foram fabricados pela BD Biosciences, USA.

Foi realizada a compensação de cinco fluorocromos diferentes: FITC, Alexa 647, PE, PECy7 e APCCy7, utilizando os seguintes anticorpos: CD4-FITC, CD8 Alexa 647, CD86-PE, CD25 PECy7 e CD3-APCCy7. Utilizamos uma placa de 96 poços separada para evitar contaminação dos poços, seguindo o mesmo protocolo da marcação extracelular.

Na placa de marcação extracelular foram usadas duas combinações de anticorpos: a primeira marcou macrófagos (CD11b- Alexa 488, células dendríticas (CD11c-APCCy7) e as moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80-APC) e B7-2 (CD86-PE); e a segunda marcou células NK (NK1.1-PE), NKT (NK1.1-PE, CD3 - APC-Cy7), células TCD4<sup>+</sup> (CD4-FITC) e células TCD8<sup>+</sup> (CD8- Alexa 647). Após plaqueadas a placa foi centrifugada, as células foram ressuscitadas e incubadas em solução bloqueio (PBS 1X + 2% de soro normal de camundongo/SNC) por 15 minutos à 4°C e após esse bloqueio todas as etapas foram feitas em ambiente com luz indireta. Foram utilizados 20 µL por poço da combinação de anticorpos previamente diluídos

em tampão FACS (Fluorescence activated cell sorting buffer) (PBS 1X + 1% SFB + 0,09% de azida sódica), durante 30 minutos à 4°C. Posteriormente a essa incubação a placa foi lavada com 150 µL de tampão FACS, centrifugada a 1500 RPM por 5min à 4°C e por último em cada poço foi colocado 150 µL de FACS para ressuspender as células que foram transferidas para os tubos de ensaio para a leitura imediata.

Na placa de marcação com FOXP3 foi usada uma combinação de anticorpos para marcar as células T regulatórias (Treg) auxiliares e citotóxicas (CD4-BV510, CD8-Alexa 647, FOXP3-PE e CD25-BB515). Após plaqueadas e centrifugadas, as células foram ressuspensas e incubadas em solução de bloqueio por 15 minutos a 4°C e posteriormente a esse bloqueio todas as etapas foram feitas em ambiente com luz indireta. Na primeira incubação com os anticorpos extracelulares (CD4, CD8 e CD25), foram utilizados 20 µL por poço da combinação de anticorpos previamente diluídos em tampão FACS, durante 20 minutos à temperatura ambiente, depois a placa foi lavada uma vez com tampão FACS e ressuspensa com 200 µL de tampão de fixação (1 parte de Fixation Buffer®BD em 19 partes de PBS 1X) por poço e incubada por 30 minutos à 4°C. Decorrido esse tempo a placa foi centrifugada a 1700 RPM por 5min para remover o tampão de fixação e incubada com 200 µL de tampão de permeabilização (1 parte de Permeabilization Buffer®BD em 4 partes de PBS 1X) por 30 minutos à 37°C. Em seguida, a placa foi lavada com tampão FACS e cada poço foi ressuspensa com 20 µL de anticorpo FOXP3 previamente diluído em tampão FACS, incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Por último, depois da placa ser lavada mais uma vez com tampão FACS, em cada poço foi colocado 150 µL de FACS para ressuspender as células que foram transferidas para os tubos de ensaio para a leitura imediata.

A compensação dos fluorocromos foi realizada antes do início das leituras, que então foram procedidas a fresco no citômetro BD FACSCanto™II, e os dados foram analisados usando o programa FlowJo versão 10. A intensidade de fluorescência (MFI, do inglês, Mean of Fluorescence Intensity), dada pela quantidade de fluorocromos por célula e diretamente proporcional a quantidade de marcadores na superfície da célula, foi determinada para os marcadores CD80, CD86 e CD25. A tabela 3 mostra os anticorpos usados para a marcação das diferentes populações e seus respectivos fluorocromos.

**Tabela 3** Anticorpos e fluorocromos utilizados na citometria de fluxo

| População  | Receptor | Fluorocromo |
|--|----------|-------------|
| Macrófago  | CD11b    | Alexa 488   |
|  | CD80     | APC         |
|  | CD86     | PE          |
| Células Dendríticas  | CD11c    | APCCy7      |
|  | CD80     | APC         |
|  | CD86     | PE          |
| Linfócitos T   | CD3      | APCCy7      |
| Linfócitos T Auxiliares (TCD4 <sup>+</sup> )                   | CD4      | FITC        |
| Linfócitos T Auxiliares Regulatorios (Treg CD4 <sup>+</sup> )  | CD4      | BV510       |
|  | CD25     | BB515       |
|  | FOXP3    | PE          |
| Linfócitos T Citotóxicos (TCD8 <sup>+</sup> )                  | CD8      | Alexa 647   |
| Linfócitos T Citotóxicos Regulatorios (Treg CD8 <sup>+</sup> ) | CD8      | Alexa 647   |
|  | CD25     | BB515       |
|  | FOXP3    | PE          |

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados, expressos em média e desvio padrão, foram primariamente avaliados quanto a distribuição, uma vez que One-way ANOVA e teste t só devem ser aplicados a amostras cuja população seguem uma distribuição normal ou Gaussiana, utilizando o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. A comparação entre os grupos foi realizada aplicando o teste de variância One-Way Anova seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. O programa GraphPad InStat software (versão 7.03, GraphPad Software, EUA) foi utilizado para obtenção de todas as análises estatísticas. A significância estatística foi considerada como  $p^* < 0,05$ , como menor nível de significância aceito e  $p^{**} < 0,01$  e  $p^{***} < 0,001$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR ZYMOZAN NA REGIÃO ARTICULAR

Sinais clínicos de um processo inflamatório, como edema, rubor e calor foram observados na região da articulação do tornozelo em todos os animais que receberam a administração de zymosan periarticular. A figura 9 ilustra o edema na região articular 5 horas após a administração do zymosan.

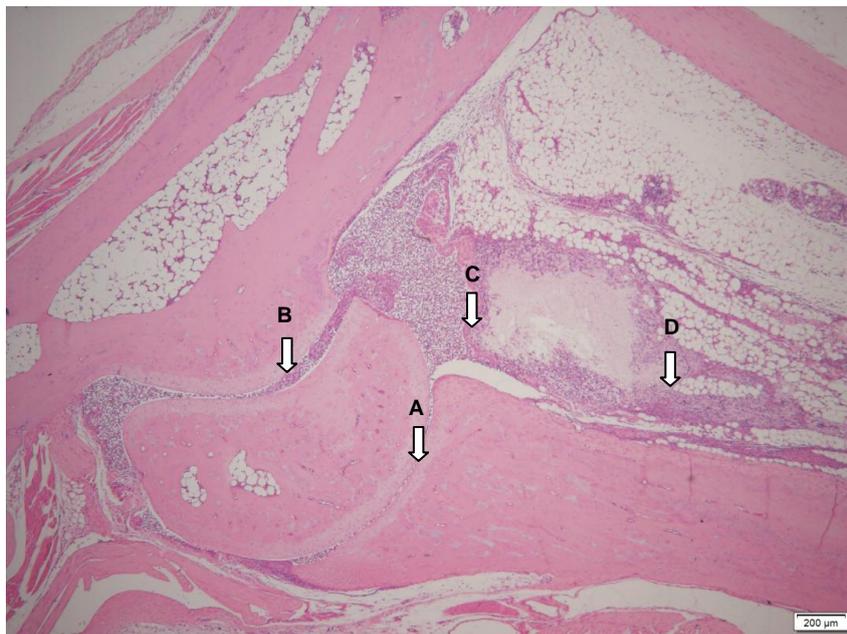


**Figura 9** – Imagem ilustrativa demonstrando a região da articulação talocrural e destacando o edema observado 5h após administração de Zymosan.

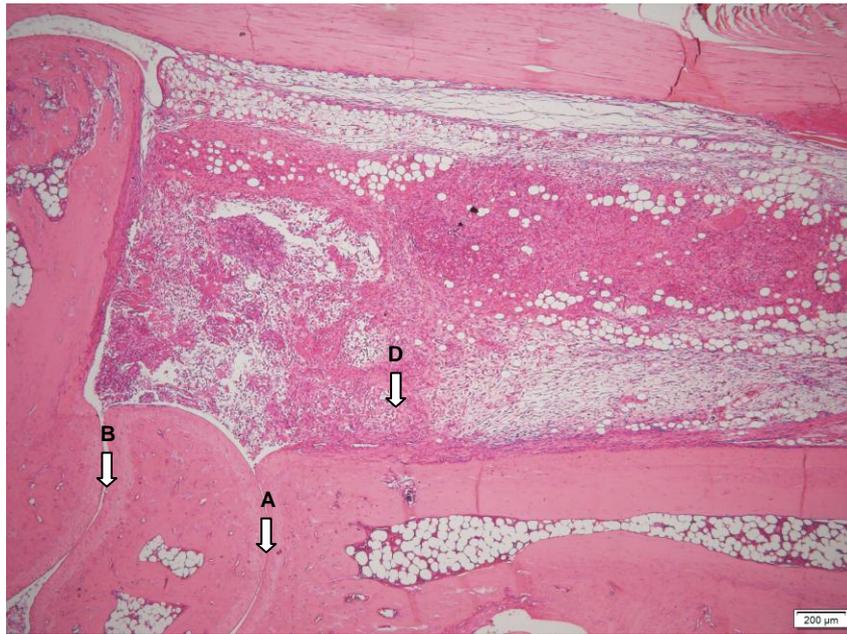
A análise morfológica revelou que 5h após a administração de zymosan foi possível evidenciar acúmulo de células infiltrando as estruturas sinoviais das articulações talocrural e subtalar, assim como no tecido conjuntivo adjacente (Figuras 10, 11 e 12). Esse infiltrado foi caracterizado pelo predomínio de neutrófilos 5 horas após a indução da inflamação, já 101 horas após a administração de zymosan, foi possível observar a presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e tecido fibroso na região do infiltrado inflamatório (Figuras 13A e B).



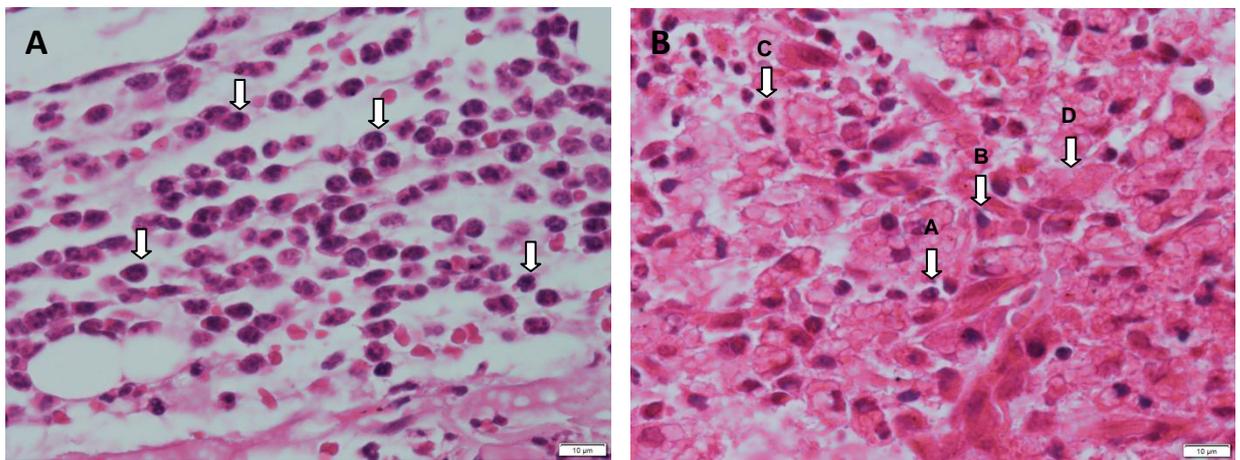
**Figura 10** – Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular de um animal normal (sem artrite). **A** indica a articulação talocrural; **B** indica a articulação subtalar; **C** indica a membrana sinovial. Coloração H&E. Barra=200μm.



**Figura 11** - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal eutanasiado 5h após administração com zymosan. **A** indica a articulação talocrural; **B** indica a articulação subtalar; **C** indica o infiltrado inflamatório. **D.** indica o infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente às articulações. Coloração H&E. Barra=200μm



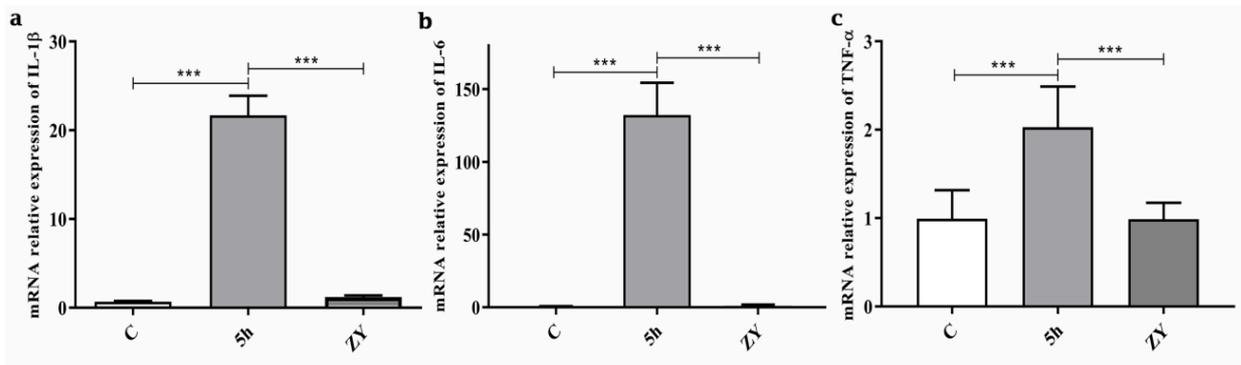
**Figura 12** - Fotomicrografia demonstrando a morfologia da região articular do animal eutanasiado 101h (4 dias) após administração com zymosan. **A** indica a articulação talocrural; **B** indica a articulação subtalar; **D**. indica o infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente às articulações. Neste animal não é possível distinguir as células que compõem a membrana sinovial. Coloração H&E. Barra=200µm.



**Figura 13** - Fotomicrografia do infiltrado inflamatório, demonstrando as células infiltrativas no animal eutanaziado 5h (**A**) e 101h (**B**) após administração com zymosan. **A**. as setas indicam neutrófilos. **B**. seta A - neutrófilo, seta B - macrófago, seta C - linfócito e seta D - tecido fibroso. Coloração H&E. Barra=10µm.

## 4.2 NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NA ARTICULAÇÃO INFLAMADA

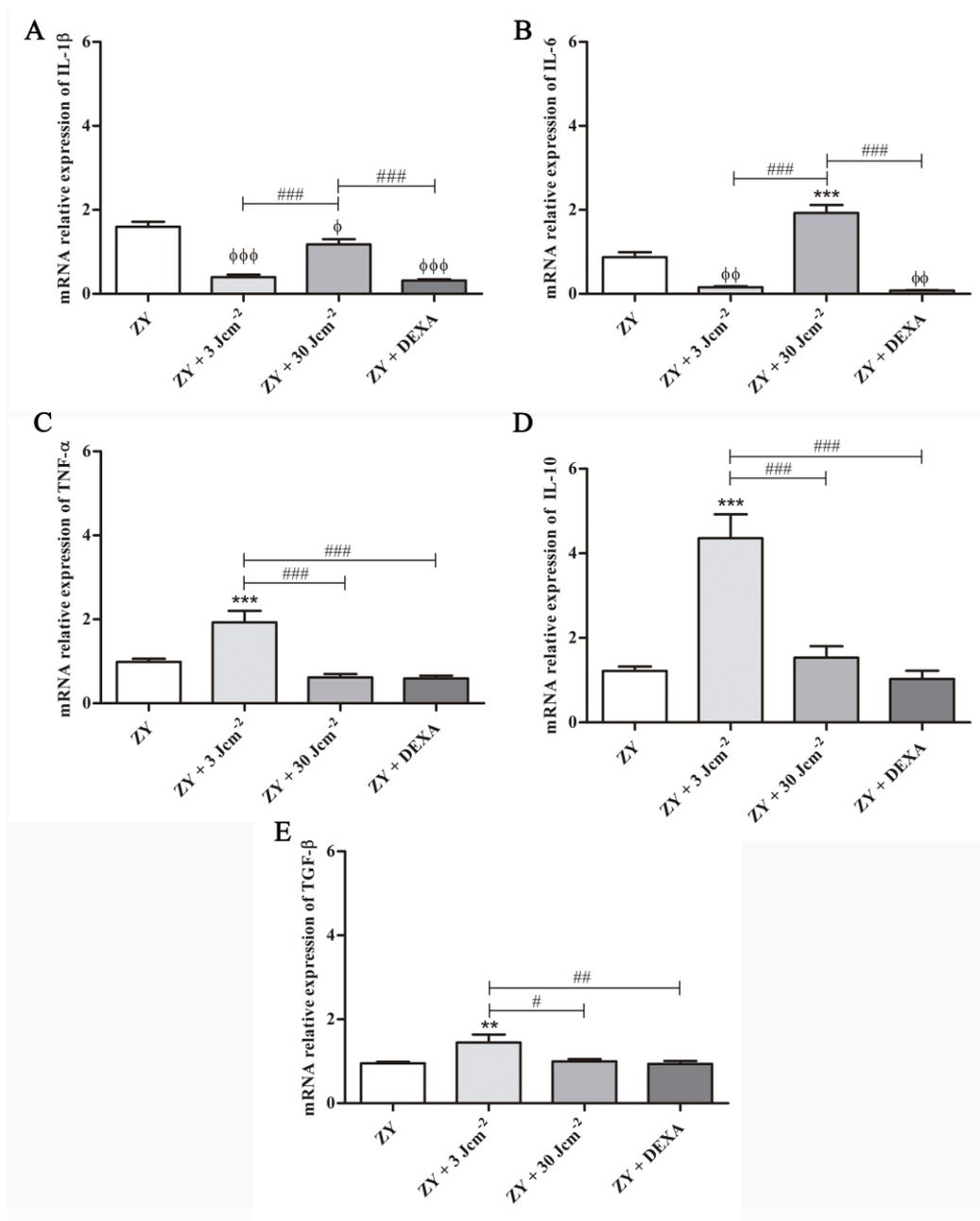
Níveis relativos de mRNA das citocinas dos grupo eutanaziado com 5 horas após a indução da inflamação com zymosan e os demais grupos são apresentados nas figuras 14 e 15, respectivamente.



**Figura 14** - Níveis relativos de mRNA de citocinas no tornozelo inflamado de camundongos. **a.** IL-1  $\beta$ ; **b.** IL-6; **c.** TNF- $\alpha$ .  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno. Grupo controle sem artrite - C; grupo eutanaziado 5 horas após a indução da inflamação com zymosan (5h); grupo com indução da inflamação com zymosan e não tratado (101 horas após a indução) - ZY; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Cinco horas após a indução da inflamação com zymosan há elevação nos níveis relativos de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-1  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , quando comparado aos grupos não inflamados (C) e não tratados (ZY) (Figura 14).

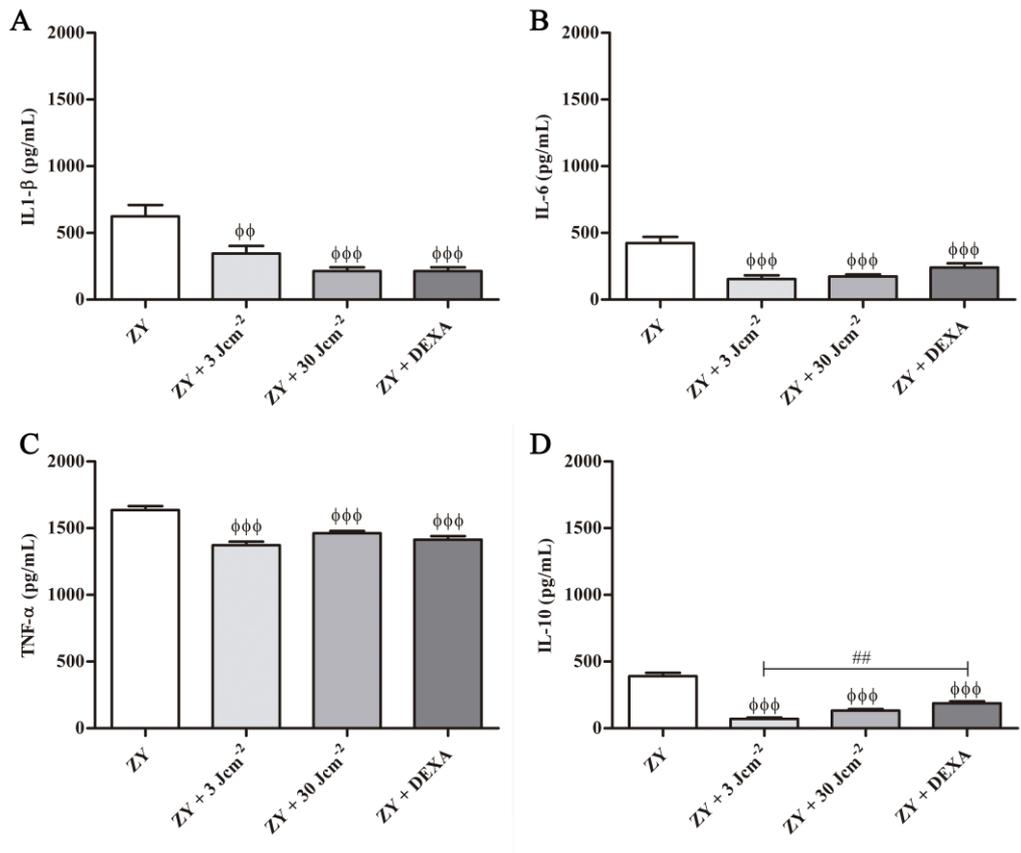
Os grupos tratados com o laser na menor (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>) e na maior densidade de energia (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e o grupo tratado com a dexametasona (ZY + DEXA) demonstraram menores níveis relativos de mRNA de IL-1 $\beta$  se comparados ao grupo sem tratamento (ZY), embora a redução observada no grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> tenha sido menor que as observadas nos outros dois grupos (Figura 15A). Da mesma forma, os níveis relativos de mRNA de IL-6 nos grupos ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> e ZY + DEXA apresentaram-se diminuídos se comparado ao grupo sem tratamento (ZY). Em contrapartida, o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> demonstrou maiores níveis relativos de IL-6 se comparado a todos os outros grupos (Figura 15B). Já os níveis relativos de mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  apresentaram-se elevadas somente no grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>, e estas demonstraram-se maiores do que as observadas em todos os outros grupos avaliados (Figuras 15C, D, E).



**Figura 15** - Níveis relativos de mRNA de citocinas no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de RTq-PCR. **A:** IL-1  $\beta$ ; **B:** IL-6; **C:** TNF- $\alpha$ ; **D:** IL-10; **E:** TGF: $\beta$ .  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno e o grupo não tratado (ZY) como normalizador. Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm $^{-2}$  (ZY + 3 Jcm $^{-2}$ ); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm $^{-2}$  (ZY + 30 Jcm $^{-2}$ ) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$  se maior que o grupo não tratado (ZY). (φ)  $p < 0,05$ , (φφ)  $p < 0,01$  e (φφφ)  $p < 0,001$  se menor que o grupo não tratado (ZY). (#)  $p < 0,05$ , (##)  $p < 0,01$  e (###)  $p < 0,001$ .

Após os tratamentos com LLLT, nas duas densidades de energias avaliadas, foi observada significativa redução nos níveis das citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) no tornozelo inflamado se comparado aos resultados do grupo sem tratamento (ZY) (Figura 16). O grupo

tratado com a dexametasona também demonstrou importante redução nos níveis de todas as citocinas avaliadas se comparado ao grupo sem tratamento, embora tenha apresentado maior nível de IL-10 do que o grupo LLLT com a menor densidade de energia (3 Jcm<sup>-2</sup>) (Figura 16).



**Figura 16** - Níveis de citocinas (pg/mL) no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de ELISA. **A:** IL-1β; **B:** IL-6; **C:** TNF-α; **D:** IL-10. Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (φφ) p < 0,01 e (φφφ) p < 0,001 quando menor que o grupo não tratado (ZY). (##) p < 0,01.

#### 4.3 EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS NA ARTICULAÇÃO INFLAMADA

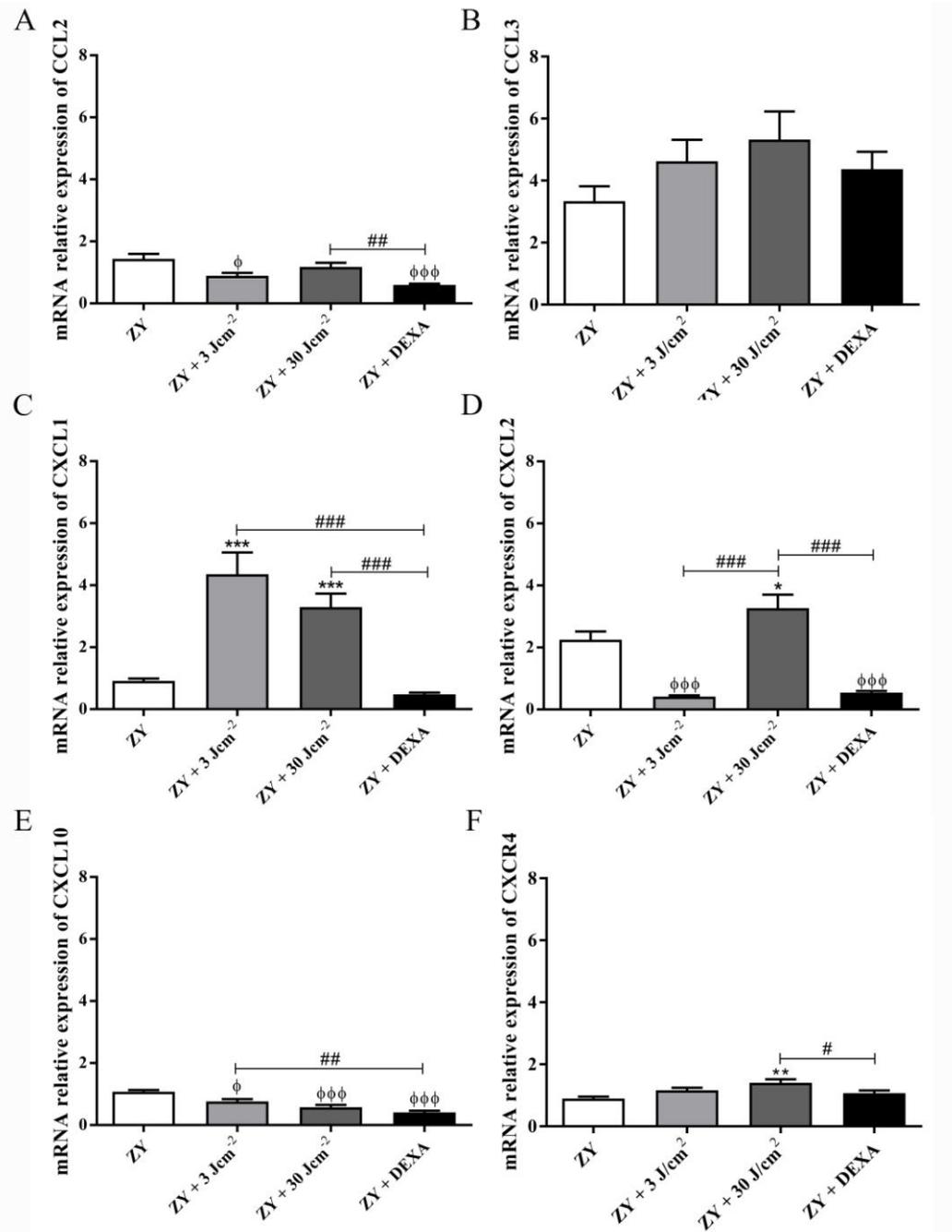
A figura 17 apresenta os níveis relativos de mRNA das quimiocinas avaliadas. Redução nos níveis relativos de mRNA de CCL2 foi observada no grupo tratado com LLLT na menor densidade de energia (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>) e no grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA), ambos comparados ao grupo não tratado. O

resultado do grupo ZY + DEXA para CCL2 também foi menor que o observado no grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> (Figura 17A).

Embora uma tendência para elevação nos níveis relativos de CCL3 nos grupos tratados (LLLT e dexametasona) tenha sido observada, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos tratados e com o grupo não tratado (Figura 17B). Já os níveis relativos de mRNA da CXCL1 demonstrou-se aumentada nos grupos tratados com LLLT, tanto em comparação ao grupo não tratado quanto ao grupo ZY + DEXA (Figura 17C).

Resultados contrários foram observadas nos níveis relativos de mRNA da CXCL2 entre os grupos tratados com LLLT: ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> apresentou redução, comparando-se ao grupo ZY; e o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> apresentou elevação, comparando-se a todos os outros grupos. Similarmente ao grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>, o grupo ZY + DEXA apresentou redução de CXCL2 se comparando ao grupo ZY (Figura 17D).

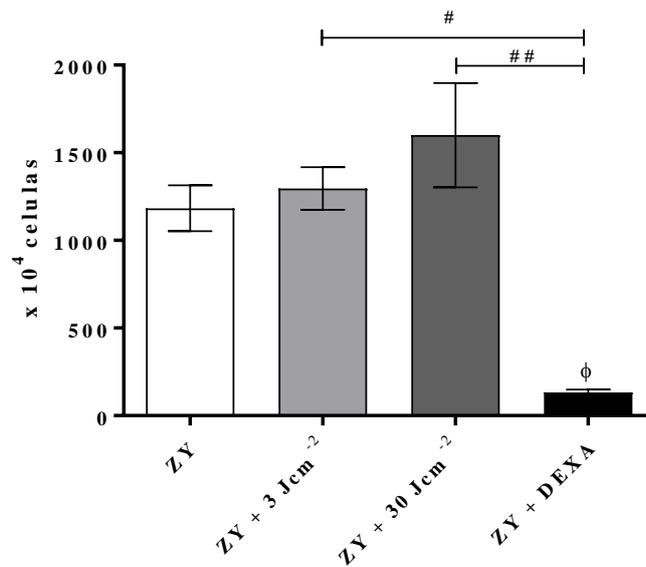
Em relação a CXCL10, todos os grupos tratados (LLLT e dexametasona) apresentaram redução, quando comparado ao grupo não tratado (ZY), embora a expressão de CXCL10 do grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> ainda permaneça maior que a do grupo ZY + DEXA (Figura 17E). Já a expressão relativa de mRNA do receptor de quimiocina CXCR4 foi maior no grupo LLLT tratado com a maior densidade de energia (ZY+ 30 Jcm<sup>-2</sup>), tanto em comparação ao grupo ZY quanto ao ZY + DEXA (Figura 17E).



**Figura 17** - Níveis relativos de mRNA de quimiocinas no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de RTq-PCR. **A:** CCL2; **B:** CCL3; **C:** CXCL1; **D:** CXCL2; **E:** CXCL10; **F:** CXCR4.  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno e o grupo não tratado (ZY) como normalizador. Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$  se maior que o grupo não tratado (ZY). (φ)  $p < 0,05$  e (φφφ)  $p < 0,001$  se menor que o grupo não tratado (ZY). (#)  $p < 0,05$ , (##)  $p < 0,01$  e (###)  $p < 0,001$ .

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS CD80 E CD86 NO LINFONODO PROXIMAL (POPLÍTEO) À INFLAMAÇÃO

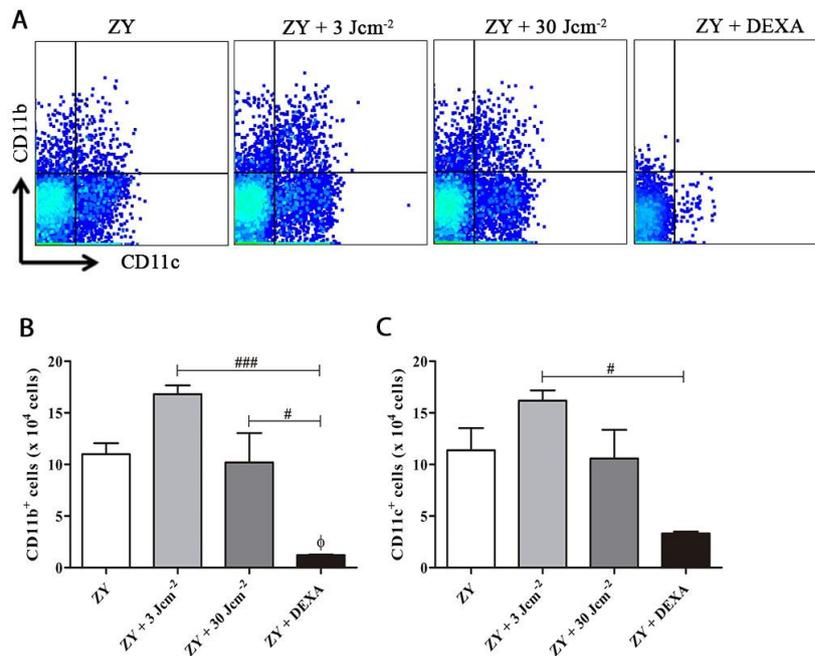
O tratamento com LLLT nas duas densidades de energia avaliadas promoveu aumento do número total de leucócitos no linfonodo proximal (poplíteo) a inflamação, quando comparados ao grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA) e uma aparente tendência de aumento, quando comparados ao grupo sem tratamento (ZY), embora não exista diferença estatística para o nosso espaço amostral. Como esperado, o grupo tratado com dexametasona apresentou importante redução da população de leucócitos no linfonodo (Figura 18).



**Figura 18** - Contagem total de leucócitos do linfonodo proximal à inflamação (pool de 2 animais) utilizando a Câmara de Neubauer (x 10<sup>4</sup> células). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (φ) p < 0,05 se menor que o grupo não tratado (ZY). (#) p < 0,05 e (##) p < 0,01.

Dentre as células hiperplásicas no linfonodo poplíteo do grupo tratado com LLLT na menor densidade de energia (3 Jcm<sup>-2</sup>) (Figura 18), estão macrófagos (Figuras 19A e B) e células dendríticas (Figuras 19A e C), que apresentaram-se em números mais elevados neste grupo do que no grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA), e uma tendência a aumento (sem diferença estatística para o nosso

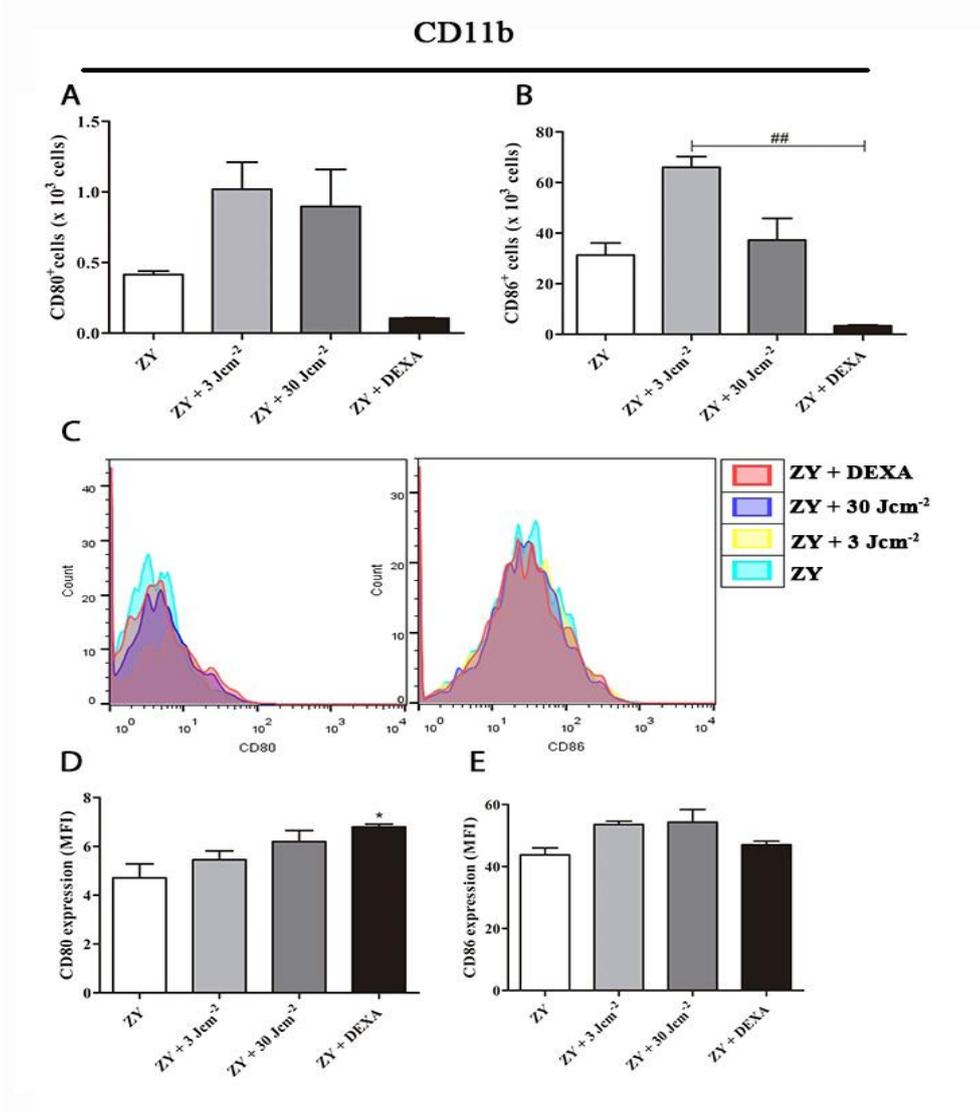
espaço amostral) se comparados ao grupo não tratado (ZY). Similarmente, o grupo tratado com LLLT na maior densidade de energia ( $30 \text{ Jcm}^{-2}$ ), apresentou maior número de macrófagos que o grupo ZY + DEXA, embora tenha apresentado quantidade similar de macrófagos e células dendríticas ao grupo sem tratamento (ZY) (Figuras 19A, B e C). Já no grupo ZY + DEXA foi observado menor número de macrófagos (Figuras 19A e B) dentre sua reduzida população de leucócitos do linfonodo poplíteo (Figura 18), quando comparado ao grupo não tratado (ZY).



**Figura 19** - Quantificação de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) e células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) no linfonodo proximal à inflamação por citometria de fluxo. **A.** Representação gráfica da dispersão das células quanto à presença do marcador CD11b ou CD11c para cada grupo (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **B.** Proporção de células CD11b<sup>+</sup> (macrófagos) (x 10<sup>4</sup> células); **C.** Proporção de células CD11c<sup>+</sup> (células dendríticas) (x 10<sup>4</sup> células). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de  $3 \text{ Jcm}^{-2}$  (ZY + 3  $\text{Jcm}^{-2}$ ); Tratado com LLLT na densidade de energia de  $30 \text{ Jcm}^{-2}$  (ZY + 30  $\text{Jcm}^{-2}$ ) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (ϕ) p < 0,05 se menor que o grupo não tratado (ZY). (#) p < 0,05 e (###) p < 0,001.

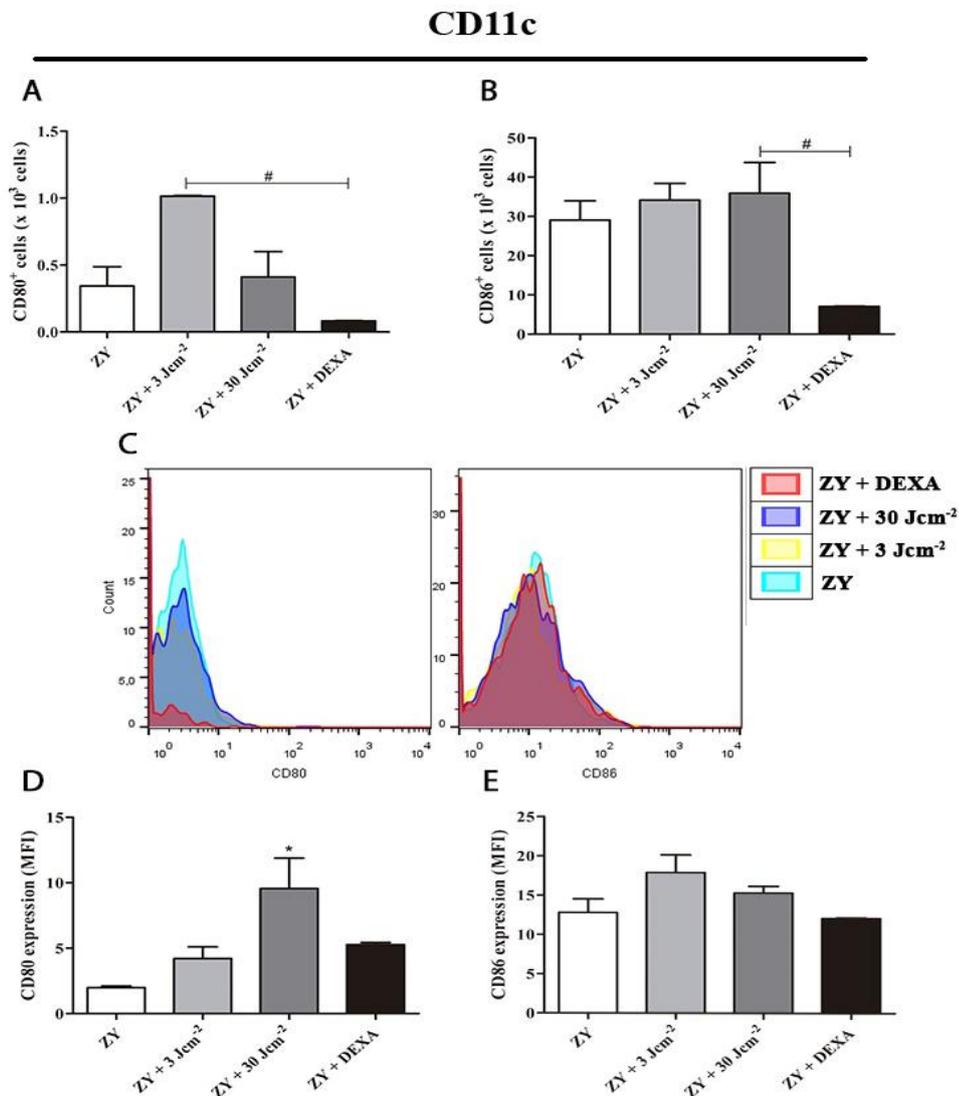
Embora fosse observada uma tendência de elevação do número de macrófagos linfonodais expressando CD80 em sua superfície nos grupos tratados com LLLT nas duas densidades de energia avaliadas, não houve diferença estatística quando comparado aos grupos ZY ou ZY + DEXA (Figura 20A). Por outro lado, o grupo ZY + 3  $\text{Jcm}^{-2}$  apresentou maior número de células que expressam a molécula coestimuladora CD86, quando comparado ao grupo ZY + DEXA (Figura 20B). Os resultados da análise do MFI demonstraram que a intensidade de fluorescência para o marcador CD80 e CD86 nos macrófagos positivos dos grupos

LLLT, foram semelhantes às observadas no grupo não tratado (ZY) (Figuras 20C, D e E), enquanto na reduzida população de macrófagos do grupo ZY + DEXA (Figura 19) houve maior MFI para CD80 se comparado ao grupo não tratado (ZY) (Figura 20D), o que pode indicar maior expressão da molécula coestimuladora CD80 nestas células.



**Figura 20** - Expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Quantificação de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) CD80<sup>+</sup> (x 10<sup>3</sup> células); **B.** Quantificação de macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) CD86<sup>+</sup> (x 10<sup>3</sup> células); **C.** Representação gráfica (histograma) da intensidade de fluorescência (MFI) do marcador CD80 e CD86 em macrófagos (CD11b<sup>+</sup>) para cada grupo (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **D.** Quantificação do MFI de CD80 em macrófagos (CD11b<sup>+</sup>); **E.** Quantificação do MFI de CD86 em macrófagos (CD11b<sup>+</sup>). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). (°) p < 0,05 se menor que o grupo não tratado (ZY). (°) p < 0,05 se maior que o grupo não tratado (ZY). (##) p < 0.,.

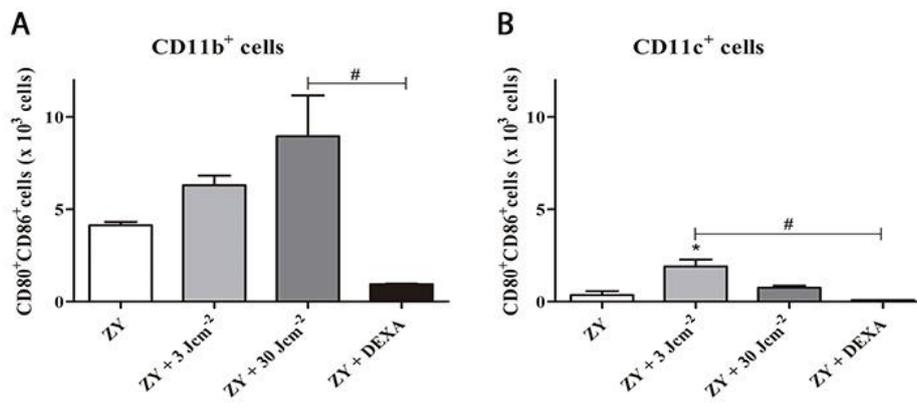
Dentre a população aumentada de células dendríticas do grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> (Figuras 19A e C) foram observadas mais células expressando CD80 (Figura 21A), se comparado ao grupo ZY + DEXA. Já no grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>, a população de células dendríticas quantitativamente similar ao grupo ZY + DEXA (Figuras 19A e C), apresentou maior número de células expressando CD86 (Figura 21B). Embora fosse observada tendência ao aumento da intensidade de fluorescência (MFI) de CD80 em todas as modalidades de tratamento (LLLT e dexametasona) (Figura 21C e D) e de CD86 nos dois grupos tratados com LLLT (Figura 21C e E), somente o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> apresentou elevação do MFI de CD80 nas células dendríticas positivas com magnitude estatisticamente significativa (Figuras 21C e D).



**Figura 21** - Expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Quantificação de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) CD80<sup>+</sup> (x 10<sup>3</sup> células); **B.** Quantificação de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) CD86<sup>+</sup> (x 10<sup>3</sup> células); **C.** Representação

gráfica (histograma) da intensidade de fluorescência (MFI) do marcador CD80 e CD86 em células dendríticas ( $CD11c^+$ ) para cada grupo (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **D.** Quantificação do MFI de CD80 em células dendríticas ( $CD11c^+$ ); **E.** Quantificação do MFI em CD86 células dendríticas ( $CD11c^+$ ). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de  $3 \text{ Jcm}^{-2}$  (ZY +  $3 \text{ Jcm}^{-2}$ ); Tratado com LLLT na densidade de energia de  $30 \text{ Jcm}^{-2}$  (ZY +  $30 \text{ Jcm}^{-2}$ ) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). ( $^{\phi}$ )  $p < 0,05$  se menor que o grupo não tratado (ZY). ( $^{\circ}$ )  $p < 0,05$  se maior que o grupo não tratado (ZY). ( $^{##}$ )  $p < 0,01$ .

Quanto à expressão concomitante das duas moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 na superfície de macrófagos e de células dendríticas, foi observado que o grupo ZY +  $3 \text{ Jcm}^{-2}$  apresentou maior número de células dendríticas com ambos marcadores em sua superfície, se comparado tanto ao grupo não tratado (ZY) quanto ao grupo tratado com dexamentasona (ZY + DEXA) (Figura 22B), enquanto o grupo ZY +  $30 \text{ Jcm}^{-2}$  apresentou maior número de macrófagos expressando concomitantemente CD80 e CD86 (Figura 22A).



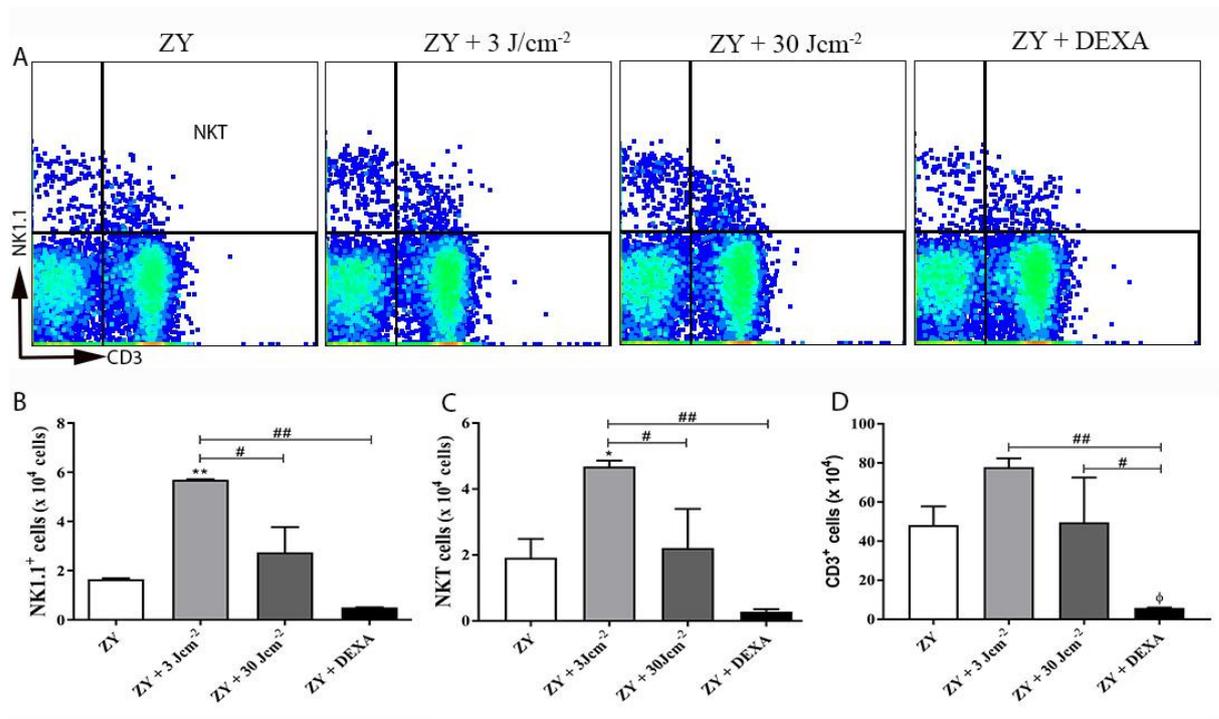
**Figura 22** - Expressão concomitante das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em macrófagos ( $CD11b^+$ ) e células dendríticas ( $CD11c^+$ ) do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Expressão de CD80 e CD86 em macrófagos ( $CD11b^+$ ) ( $\times 10^3$  células); **B.** Expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas ( $CD11c^+$ ) ( $\times 10^3$  células). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de  $3 \text{ Jcm}^{-2}$  (ZY +  $3 \text{ Jcm}^{-2}$ ); Tratado com LLLT na densidade de energia de  $30 \text{ Jcm}^{-2}$  (ZY +  $30 \text{ Jcm}^{-2}$ ) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). ( $^{\circ}$ )  $p < 0.05$  se maior que o grupo não tratado (ZY). ( $^{\#}$ )  $p < 0,05$ .

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE ADQUIRIDA NO LINFONODO PROXIMAL (POPLÍTEO) À INFLAMAÇÃO

A figura 23A apresenta a representação gráfica do resultado da citometria de fluxo, demonstrando a distribuição das células no linfonodo poplíteo quanto à

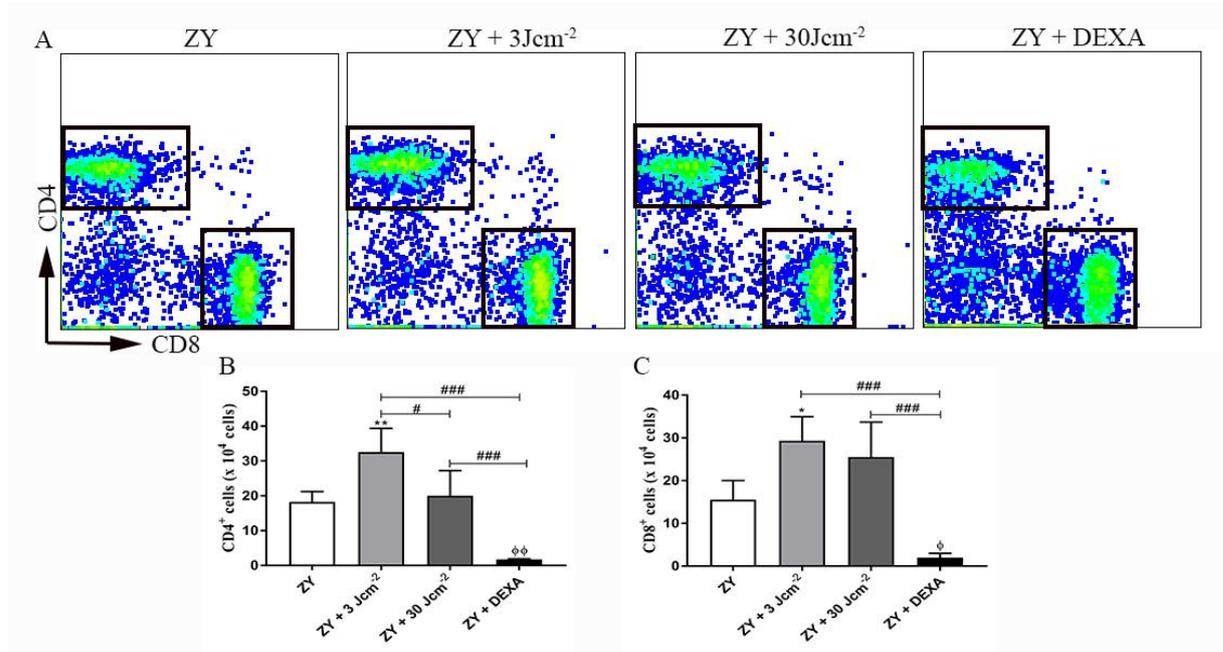
expressão de NK1.1 (marcador de células NK), de CD3 (marcador de linfócitos) e de ambos concomitantemente (marcadores de células NKT) nos grupos experimentais.

O grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> apresentou maior população de células NK (Figuras 23A e B) e NKT (Figuras 23A e C) se comparado a todos os outros grupos. A população de linfócitos CD3<sup>+</sup> também demonstrou-se aumentada neste grupo, assim como no ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>, se comparado ao grupo ZY + DEXA. Este último, por sua vez, apresentou população de linfócitos CD3<sup>+</sup> diminuída em relação ao grupo não tratado (ZY) (Figura 23D).



**Figura 23** - Quantificação de células NK, NKT e CD3<sup>+</sup> no linfonodo proximal à inflamação. **A.** Representação gráfica da dispersão das células quanto à presença do marcador NK1.1 e CD3 para cada grupo, demonstrando a população NKT duplo positiva (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **B.** Quantificação de células NK (NK1.1<sup>+</sup>) (x 10<sup>4</sup> células); **C.** Quantificação de células NKT (NK1.1<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>) (x 10<sup>4</sup> células); **D.** Quantificação de células CD3<sup>+</sup> (x 10<sup>4</sup> células); Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). (\*) p < 0,05 e (\*\*) p < 0,01 se maior que o grupo não tratado (ZY). (♠) p < 0,05 se menor que o grupo não tratado (ZY). (#) p < 0,05 e (##) p < 0,01.

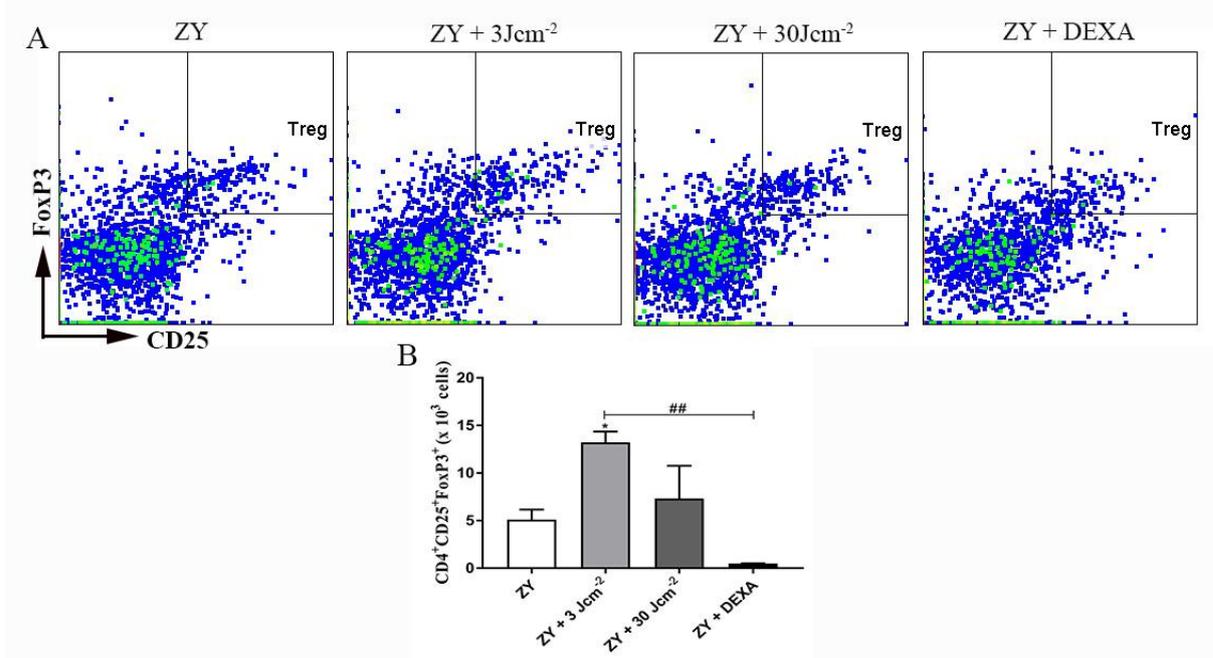
Dentre as células que compõem a população CD3<sup>+</sup> foram identificadas e quantificadas células TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> (Figura 24), linfócitos TCD4 helper e linfócitos TCD8 citotóxicos, respectivamente.



**Figura 24** - Quantificação de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> na população de CD3<sup>+</sup> do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Representação gráfica da dispersão das células quanto à presença do marcador CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **B.** Quantificação de células TCD4 helper (CD4<sup>+</sup>) (x 10<sup>4</sup> células); **C.** Quantificação de células TCD8 citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) (x 10<sup>4</sup> células); Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (\*) p < 0,05 e (\*\*) p < 0,01 se maior que o grupo não tratado (ZY). (φ) p < 0,05 e (φ) p < 0,01 se menor que o grupo não tratado (ZY). (#) p < 0,05 e (###) p < 0,001.

Embora não tenha apresentado aumento significativo da população de células CD3<sup>+</sup> (Figuras 23A e D), o grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> apresentou elevação nos índices de linfócitos TCD4 helper (Figuras 24A e B) e linfócitos TCD8 citotóxicos (Figuras 24A e C) quando comparado a todos os outros grupos avaliados. O grupo LLLT tratado com a maior densidade de energia (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) demonstrou tendência para elevação de ambas as populações celulares. No entanto, seus resultados apresentaram somente diferença significativa, quando comparado ao grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA). O grupo ZY + DEXA apresentou redução das duas populações celulares no linfonodo poplíteo (Figuras 24C e D).

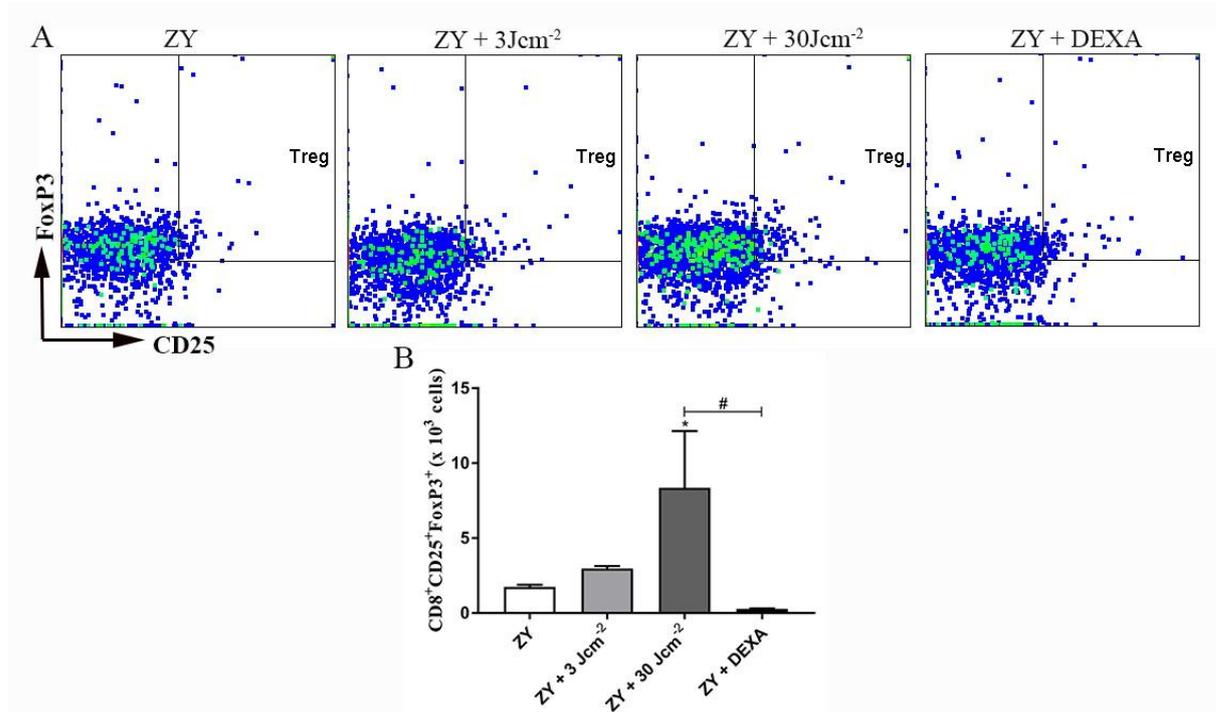
Ainda, dentre as células TCD4 helper e as células TCD8 citotóxicas, foram determinadas as células com perfil regulatório (Treg), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, respectivamente (Figuras 25 e 26).



**Figura 25** - Quantificação de células Treg dentre a população CD4<sup>+</sup> do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Representação gráfica da dispersão das células quanto à presença do marcador FoxP3 e CD25, demonstrando a população Treg duplo positiva (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **B.** Quantificação de células Treg CD4<sup>+</sup> (x 10<sup>3</sup> células); Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (\*) p < 0,05 se maior que o grupo não tratado (ZY). (##) p < 0,01.

Em consonância com o aumento da população de células TCD4 helper, o grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> apresentou maior população de células Treg dentre as células TCD4<sup>+</sup>, se comparado tanto ao grupo não tratado (ZY) quanto ao grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA). Ainda em relação à população Treg CD4, o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> apresentou índices similares ao grupo não tratado (ZY), enquanto o grupo ZY + DEXA apresentou tendência a diminuição (Figuras 25A e B).

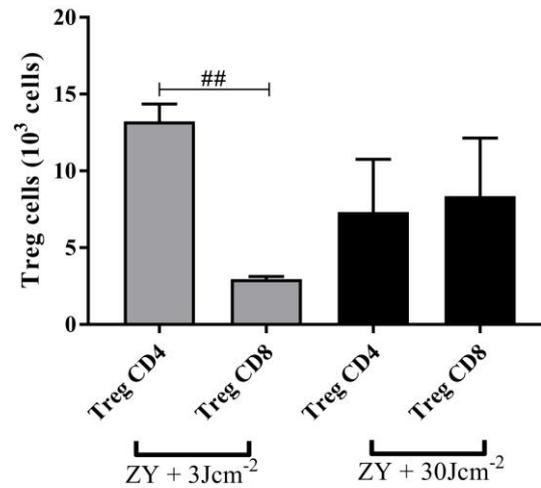
Por outro lado, não houve aumento da população Treg dentre as aumentadas células TCD8<sup>+</sup> do grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> (Figuras 24C e 26B). Já no grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>, foi observado um aumento da população Treg TCD8 quando comparado ao grupo não tratado (ZY) e o grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA) (Figuras 26A e B).



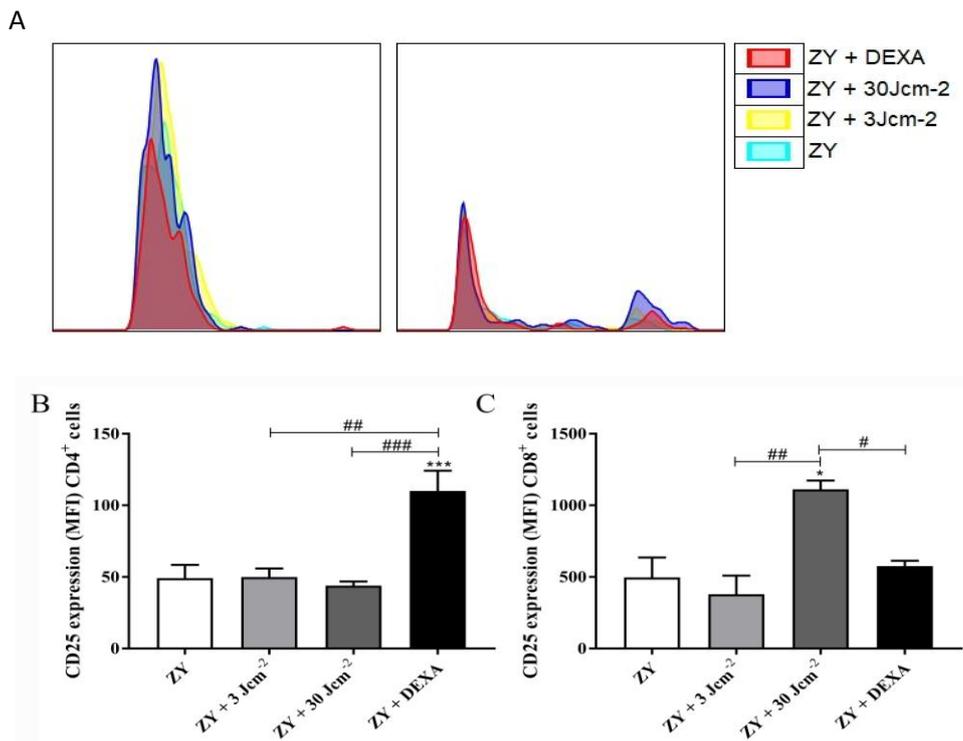
**Figura 26** - Quantificação de células Treg dentro à população CD8<sup>+</sup> do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Representação gráfica da dispersão das células quanto à presença do marcador FoxP3 e CD25, demonstrando a população Treg duplo positiva (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **B.** Quantificação de células Treg CD4<sup>+</sup> (x 10<sup>3</sup> células); Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (\*) p < 0,05 se maior que o grupo não tratado (ZY). (#) p < 0,05.

No grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> a quantidade de linfócitos com perfil regulatório TCD4 foi maior que os TCD8 (Figura 27). Para o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>, as quantidades de Treg TCD4 e TCD8 foram similares, embora a população Treg TCD8 tenha apresentado aumento significativo, quando comparado ao grupo não tratado (Figuras 26B e 27).

Nas células com perfil regulatório é possível avaliar ainda, a taxa de expressão do marcador CD25 por célula, através da média da intensidade de fluorescência (MFI) do fluorocromo FITC (ligado ao anticorpo anti-CD25). Nestas análises foi possível observar que o grupo tratado com dexametasona (ZY + DEXA) apresentou elevada taxa de expressão de CD25 (Figura 28) em suas poucas células Treg CD4 (figura 25), enquanto o grupo LLLT tratado com a maior densidade de energia (ZY + 30Jcm<sup>-2</sup>) apresentou alta expressão de CD25 (Figura 28) em suas muitas células Treg CD8 (Figura 25), ambos comparados a todos os outros grupos.



**Figura 27** - Comparação entre o número de células Treg CD4 e Treg CD8 dos grupos tratados com LLLT. Grupo tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>). (##)  $p < 0.01$ .



**Figura 28** - Intensidade de fluorescência média do marcador CD25 em células TCD4 e TCD8 do linfonodo proximal à inflamação. **A.** Representação gráfica (histograma) da intensidade de fluorescência (MFI) do marcador CD25 em células TCD4 e TCD8 para cada grupo (resultado de apenas 1 pool de linfonodos de cada grupo); **B.** Quantificação do MFI de CD25 em células TCD4; **C.** Quantificação do MFI de CD25 em células TCD8. Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). (\*)  $p < 0.05$  e (\*\*\*)  $p < 0.001$  se maior que o grupo não tratado (ZY). (#)  $p < 0,05$ , (##)  $p < 0,01$  e (###)  $p < 0,001$ .

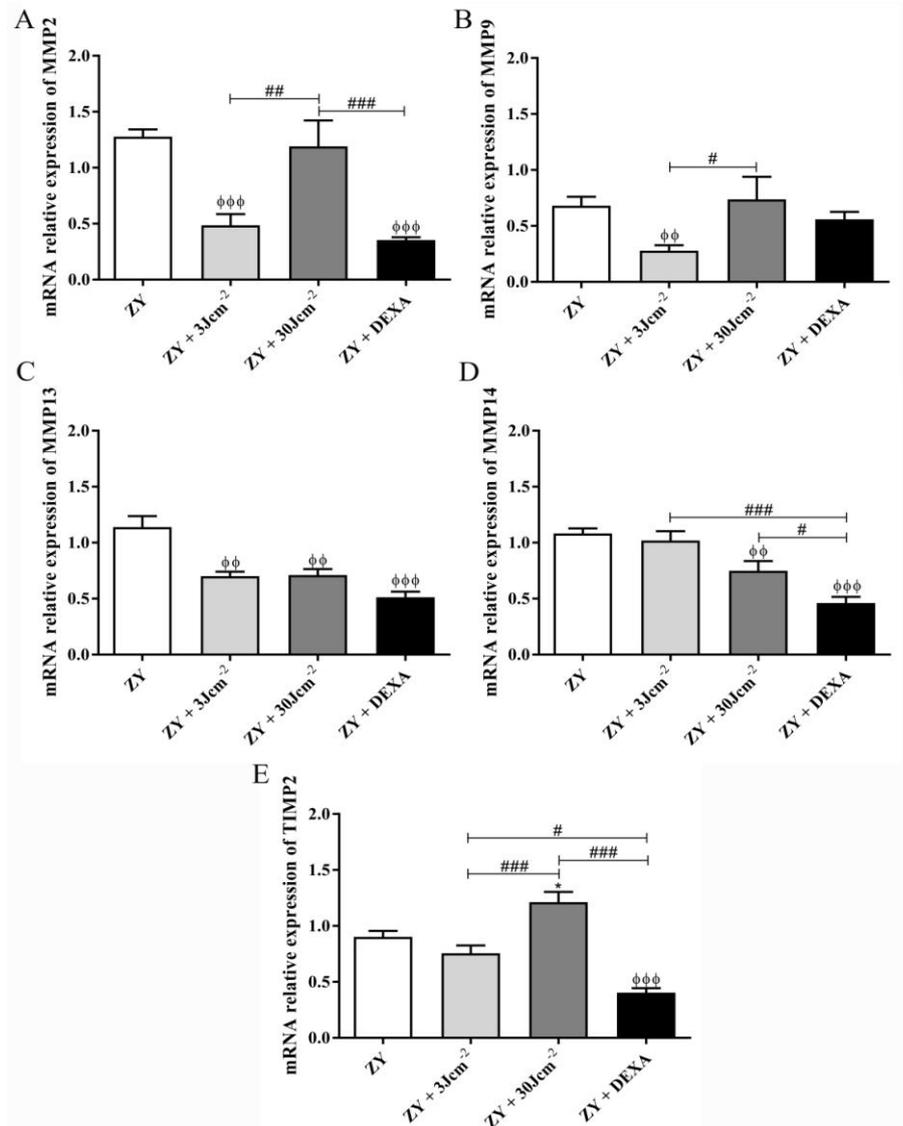
#### 4.6 NÍVEIS RELATIVOS DE mRNA DE MMPs E TIMP-2 NA ARTICULAÇÃO INFLAMADA

Os níveis relativos de mRNA das MMPs e TIMP avaliadas são apresentadas na figura 29. Uma redução na expressão de mRNA da MMP-2 foi observada tanto no grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> quanto no grupo ZY + DEXA, se comparado aos grupos ZY e ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> (Figura 29A). Da mesma forma, o grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> apresentou diminuição na expressão de MMP-9 quando comparado ao grupo não tratado (ZY) e a ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> (Figura 29B).

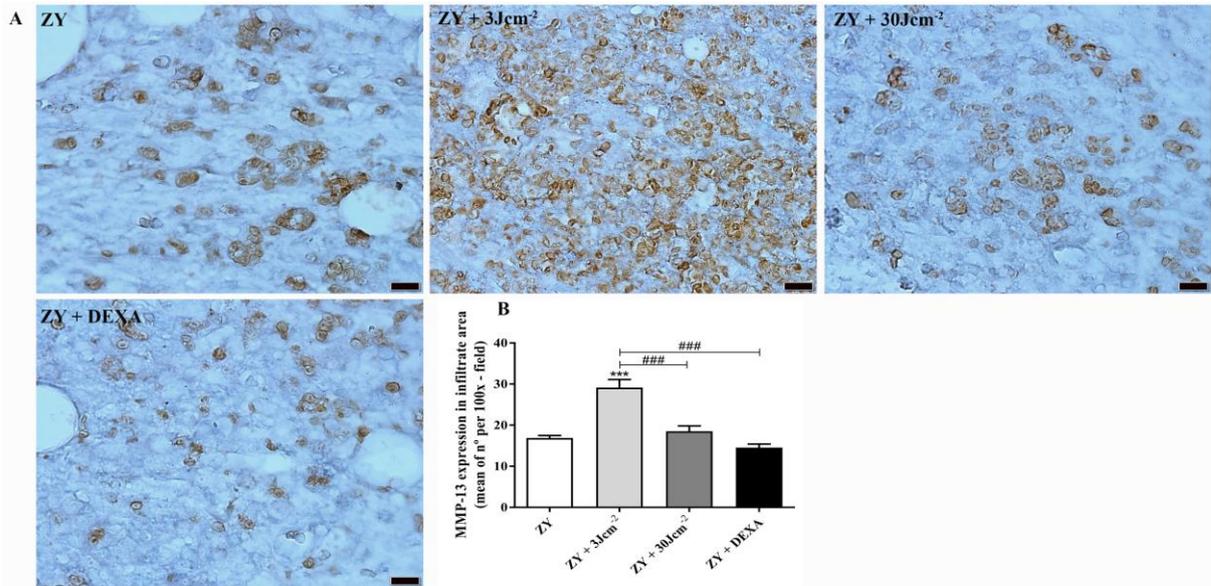
Os tratamentos (LLLT e dexametasona) promoveram redução dos níveis relativos de mRNA de MMP-13, se comparado ao grupo não tratado (ZY) (Figura 29C), enquanto somente os grupos ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> e ZY + DEXA apresentaram redução nos níveis relativos de MMP-14, quando comparados ao grupo não tratado. Adicionalmente, os níveis relativos de MMP-14 do grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> foi significativamente maior que o do grupo ZY + DEXA (Figura 29D).

Já os níveis relativos de mRNA de TIMP-2 demonstrou-se aumentado no grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>, quando comparado a todos os outros grupos. Apesar de ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> apresentar similar níveis relativos de mRNA de TIMP-2 ao grupo não tratado, esta foi maior do que o grupo ZY + DEXA (Figura 29E).

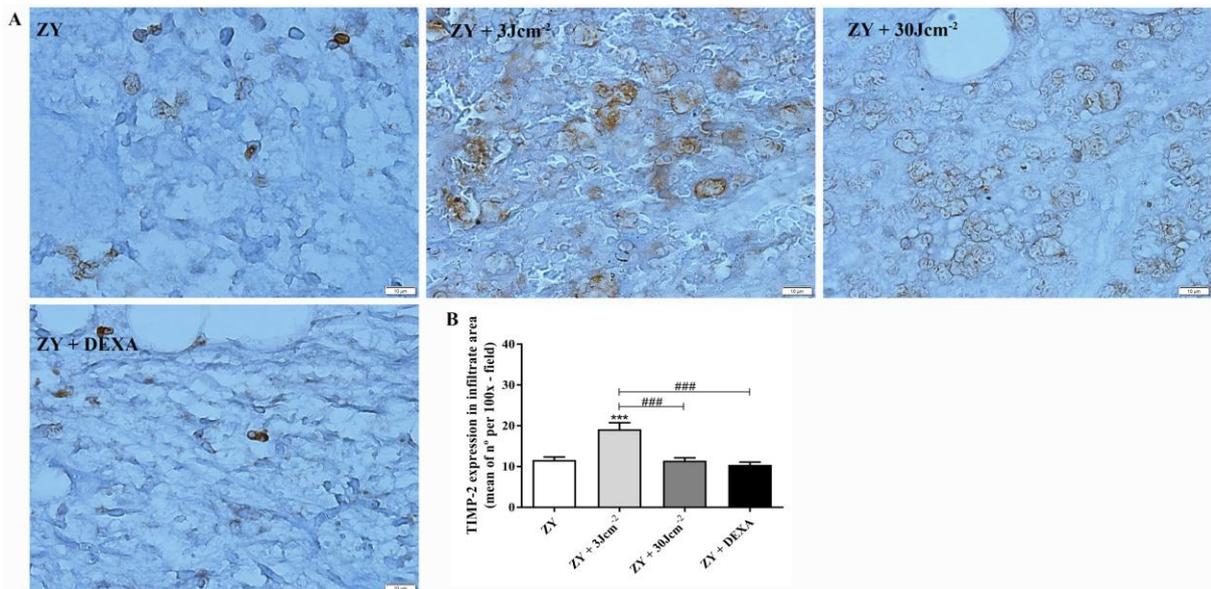
As análises imunohistoquímicas revelaram que as marcações positivas para a proteína MMP-13 concentraram-se no infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo adjacente às articulações talocrural e subtalar, sendo a maior expressão observada no grupo tratado com LLLT na menor densidade de energia (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>) se comparado a todos os outros grupos (Figura 30A e B). Da mesma forma, a expressão tecidual da proteína TIMP-2 concentrou-se no infiltrado inflamatório e foi mais elevada somente no grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> (Figura 31A e B).



**Figura 29** - Níveis relativos de mRNA de metaloproteinasas de matriz e seu inibidor no tornozelo inflamado de camundongos após LLLT e tratamento com dexametasona, obtidos pela técnica de RTq-PCR. **A:** MMP2; **B:** MMP9; **C:** MMP13; **D:** MMP14; **E:** TIMP2.  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno e o grupo não tratado (ZY) como normalizador. Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexametasona (ZY + DEXA). (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$  se maior que o grupo não tratado (ZY). (φ)  $p < 0,05$  e (φφφ)  $p < 0,001$  se menor que o grupo não tratado (ZY). (#)  $p < 0,05$ , (##)  $p < 0,01$  e (###)  $p < 0,001$ .



**Figura 30** - Expressão tecidual de MMP13 no tecido conjuntivo adjacente às articulações talocrural e subtalar. **A.** Fotomicrografia do infiltrado inflamatório demonstrando as regiões positivas para MMP13 em marrom (coloração de fundo com Verde de Metila); **B.** Quantificação da expressão de MMP13 no tecido conjuntivo (média de marcações positivas por campo no aumento de 100x). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). (\*\*\*) p < 0,001 se maior que o grupo não tratado (ZY). (###) p < 0,001.



**Figura 31** - Expressão tecidual de TIMP2 no tecido conjuntivo adjacente às articulações talocrural e subtalar. **A.** Fotomicrografia do infiltrado inflamatório demonstrando as regiões positivas para TIMP2 em marrom (coloração de fundo com Verde de Metila); **B.** Quantificação da expressão de TIMP2 no tecido conjuntivo (média de marcações positivas por campo no aumento de 100x). Grupo não tratado - ZY; Tratado com LLLT na densidade de energia de 3 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>); Tratado com LLLT na densidade de energia de 30 Jcm<sup>-2</sup> (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) e tratado com dexamentasona (ZY + DEXA). (\*\*\*) p < 0,001 se maior que o grupo não tratado (ZY). (###) p < 0,001.

## 5 DISCUSSÃO

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

Tendo em vista que o principal marcador da AR, também associado à progressão das lesões, é a presença de células inflamatórias, principalmente PMNs nos tecidos sinoviais (MCINNES; SCHETT, 2011b), foi escolhida a administração de zymosan como modelo para estudo da inflamação articular, uma vez que este é capaz de induzir reação inflamatória associada ao aumento da permeabilidade vascular e migração dessas células. Como consequência, uma sinovite erosiva grave assemelhando-se ao quadro inflamatório observado em pacientes com AR, é produzida (GEGOUT et al., 1994; PENIDO et al., 2006). No presente estudo, a administração de zymosan na região das articulações talocrural e subtalar induziu a inflamação nos tecidos sinoviais, com formação de extenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente, composto inicialmente e quase que exclusivamente de neutrófilos (observado após 5 horas da indução), conforme descrito por Rocha e colaboradores (Rocha et al., 1999). Já após 101 horas da indução à inflamação, observou-se a presença de PMNs, como neutrófilos e macrófagos, além de linfócitos e intensa produção de tecido fibroso (Figuras 9-13).

O efeito anti-inflamatório da LLLT em lesões inflamatórias músculo-esqueléticas tem sido amplamente descrito na literatura (BROSSEAU et al., 2010; GAM; THORSEN; LÖNNBERG, 1993; TORRES-SILVA et al., 2015). Em trabalho prévio, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a indução de morte por apoptose em PMN infiltrados nos tecidos que compõem a articulação pode estar envolvido em um dos mecanismos anti-inflamatórios da LLLT (DOS ANJOS et al., 2017). Baseado nesses achados anteriores, essa pesquisa teve como objetivo avaliar se LLLT também poderia modificar a resposta imune e o metabolismo da matriz extracelular dos tecidos articulares no mesmo modelo experimental de indução da artrite.

Efeitos anti-inflamatórios foram observados após LLLT, como alteração na expressão de mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias e redução dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no tornozelo inflamado. O grupo tratado com LLLT na menor densidade de energia (ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>) demonstrou tendência para manutenção de um microambiente anti-inflamatório na articulação, visto que os níveis relativos de mRNA de IL-10 e TGF- $\beta$  foram maiores do que nos demais grupos (Figuras 15 e 16). Embora a elevação nas expressões das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, tenham sido observadas nos grupos tratados com as densidades de energia 3 Jcm<sup>-2</sup> e 30 Jcm<sup>-2</sup>, respectivamente, estas não necessariamente representam potencial retorno a um microambiente inflamatório na articulação, uma vez que ambas citocinas, classicamente conhecidas como pró-inflamatórias, podem apresentar efeitos contrários durante o processo inflamatório (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002). TNF- $\alpha$  pode reduzir a população de linfócitos através de indução de apoptose nestas células e ainda pode diminuir a expansão clonal em decorrência da diminuição da apresentação de antígenos por células dendríticas, inibidas ou mortas pela intensa sinalização do TNF- $\alpha$  (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002). Estudos têm demonstrado que a IL-6 pode apresentar efeitos pleiotrópicos durante a fase aguda da inflamação, induzindo apoptose de neutrófilos e modificando o perfil quimiotático do microambiente inflamatório, de recrutamento de neutrófilos para recrutamento de monócitos (SCHELLER et al., 2011). Tendo em vista esse papel alternativo da IL-6, ela pode contribuir substancialmente para a resolução do processo inflamatório da artrite, pois conforme observado através das análises morfológicas, os neutrófilos são as células mais abundantes na fase aguda da inflamação.

Uma vez que a expressão de citocinas pró-inflamatórias está aumentada em nosso modelo de inflamação com zymosan, em particular IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, a redução dos níveis de citocinas observada nos grupos tratados com LLLT demonstra um positivo efeito anti-inflamatório do laser no tratamento da artrite (Figuras 14,16).

Já em relação aos níveis relativos de mRNA de quimiocinas com importância no processo patológico da AR, LLLT apresentou efeitos que poderiam contribuir tanto para o perfil anti-inflamatório, quanto para o pró-inflamatório na articulação (Figura 17). A redução nas expressões de mRNA de CCL2, recrutadora de células T, monócitos e células NK, e de CXCL10, recrutadora preferencial de linfócitos e monócitos, observadas após LLLT, podem resultar da diminuição tecidual de TNF- $\alpha$ , uma vez que este estimula a produção de ambas quimiocinas por

fibroblastos sinoviais e macrófagos (SZEKANECZ et al., 2010). A importância da redução de CCL2 e CXCL10 na fisiopatologia da AR vai além da diminuição da migração de leucócitos para os tecidos sinoviais, uma vez que CCL2 também induz a reabsorção óssea periarticular observada na artrite (AKAHOSHI et al., 1993) e CXCL10, por outro lado inibe a neoangiogênese sinovial (BOULDAY et al., 2006).

Os grupos tratados com LLLT também apresentaram tendência para elevação de CCL3, que assim como a CCL2, promove recrutamento de células T, monócitos e células NK e tem sua produção estimulada por TNF- $\alpha$  (KOCH et al., 1995), e aumento da expressão de CXCL1, recrutadora de neutrófilos, linfócitos e monócitos (SZEKANECZ et al., 2010). Esses resultados apresentam grande importância, visto que estas quimiocinas possuem papel central na patogênese da AR, sendo a CCL2 detectada já no início assintomático da doença e está relacionada a severidade da progressão degenerativa. Adicionalmente, o aumento de CXCL1 representa pior prognóstico para o quadro inflamatório, uma vez que estimula a neoangiogênese e a formação da fibrose sinovial (SZEKANECZ et al., 2010).

O aumento dos níveis relativos de mRNA de CXCL2 e de CXCR4 (receptor de CXCL12) no grupo tratado com a maior densidade de energia (ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup>) também representam fatores favorecedores da progressão degenerativa da AR. CXCL2 atua na ativação da osteoclastogênese e reabsorção óssea observada na AR (HA et al., 2010), enquanto CXCR4 está envolvido no ingresso de linfócitos nos tecidos sinoviais, que por sua vez são responsáveis pela cronicidade da sinovite (NANKI et al., 2000).

Embora as quimiocinas sejam classificadas funcionalmente em subgrupos homeostáticos ou inflamatórios, muitas vezes suas funções se sobrepõem (VERGUNST; TAK, 2005). Desta forma, quimiocinas constitutivamente produzidas em tecidos linfóides podem atuar na linfoneogênese observada na AR, com formação de agregados linfóides nos tecidos sinoviais inflamados, e outras, classicamente classificadas como inflamatórias, podem atuar na modulação da inflamação, como por exemplo a inibição da neoangiogênese promovida pela CXCL10 nos tecidos sinoviais (BOULDAY et al., 2006; SZEKANECZ et al., 2010).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos que reportam atividade anti-inflamatória da LLLT associada a modulação da expressão de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (ALVES et al., 2013; ASSIS et al., 2016;

CHEN et al., 2014; COSTA CARVALHO et al., 2016; DE LIMA et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2014; LUO et al., 2013; TAHMASBI et al., 2013; TORRES-SILVA et al., 2015). Entretanto, os mecanismos celulares envolvidos nestas respostas ainda são pouco compreendidos. Sabe-se que os efeitos biológicos induzidos por LLLT em células animais são em resposta à absorção de fótons e excitação de moléculas específicas, denominadas fotoceptores (EVANS; ABRAHAMSE, 2009), que induzem a produção intracelular de mensageiros secundários, como espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), linfocinas, citocinas e óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), capazes de iniciar as cascatas de sinalização intracelular, iniciando, inibindo ou acelerando processos biológicos, como a cicatrização e a resolução inflamatória (KARU, 1999, 2008). Uma vez que PMN apresentam mecanismos adicionais para produção de radicais livres, normalmente envolvidos nos processos de eliminação de patógenos, e uma curta meia vida, se comparado a outras células animais, os efeitos da LLLT poderiam ser mais proeminentes e específicos nestas células, promovendo a aceleração das funções celulares, como a produção de mediadores inflamatórios, e conseqüentemente reduzindo o tempo de vida destas células, que morrem então por apoptose (DOS ANJOS et al., 2017; KARU, 2008).

Tendo em vista a repetida bioestimulação das células inflamatórias infiltradas nos tecidos articulares em nossas sessões experimentais de tratamento (4 sessões de irradiação ao longo de 5 dias), é plausível supor que a aceleração das funções celulares promoveu uma mudança no quantitativo e no perfil das citocinas e quimiocinas produzidas por estas células se comparado ao grupo não tratado. De fato, o decaimento da produção de citocinas pró-inflamatórias corrobora com a teoria de dose-resposta bifásica da LLLT previamente reportada por Huang e colaboradores (2009), em que os efeitos da LLLT podem ser representados por uma parábola invertida: primariamente o laser seria capaz de induzir bioestimulação, mas esta cessa ao se atingir um limiar e a partir daí decresce, podendo até mesmo levar a morte celular (HUANG et al., 2011). O decaimento dos níveis de citocinas e quimiocinas concorda também com o microambiente anti-inflamatório observado nos estágios finais da resolução do processo inflamatório da artrite (PERRETTI et al., 2017).

No modelo de inflamação articular utilizado nesse estudo, a resposta inflamatória induzida por zymosan é associada a sua fagocitose pelas células

inflamatórias. Na fase de indução da resposta imune (fase de sensibilização ou aferente), os fagócitos (monócitos, macrófagos e células dendríticas) reconhecem o zymosan pela ligação ao receptor de superfície celular e o fagocita, desencadeando uma cascata de sinalização interna, que resulta na ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) e produção de citocinas inflamatórias, assim como a expressão da molécula coestimuladora CD80 na superfície celular dos fagócitos. Adicionalmente, o zymosan é capaz de produzir uma resposta imune adaptativa através da indução de maturação de células dendríticas e estimulação da produção de IL-2 por estas células, conduzindo à migração das células dendríticas para o linfonodo proximal e à ativação e proliferação de linfócitos T via apresentação de antígenos (zymosan). Nessa fase de elicitação (fase eferente), o contato repetido com o antígeno (zymosan) induz o recrutamento de linfócitos T, que por sua vez produzem uma ampla gama de citocinas e quimiocinas, amplificando a inflamação (FRASNELLI et al., 2005; GRANUCCI et al., 2003; KARUMUTHIL-MELETHIL et al., 2015; KEYSTONE et al., 1977). Este microambiente inflamatório, representado pela elevação na expressão de citocinas, foi observado no tornozelo inflamado dos animais do grupo não tratado (ZY).

Diferentemente, o tratamento com dexametasona apresentou importante redução nos níveis de citocinas, redução ou tendência de redução dos níveis relativos de mRNA das quimiocinas e menor número de leucócitos no linfonodo proximal à inflamação. Estes resultados já eram esperados, uma vez que corticosteróides, como a dexametasona regulam diversos genes inflamatórios (que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, receptores e proteínas), que tenham sido ativadas durante a inflamação, diminuindo conseqüentemente, os mediadores e células inflamatórias de forma indiscriminada (COUTINHO; CHAPMAN, 2011). Tendo em vista que a dexametasona é comumente utilizada no tratamento de artrite, os resultados do grupo ZY + DEXA, assim como do grupo não tratado (ZY), foram utilizados como padrão de referência para análises das populações celulares no linfonodo proximal à inflamação (poplíteo).

Uma vez que a ativação e diferenciação das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> ocorrem através da apresentação de antígenos via MHC (em humanos HLA) e coestimulação pelas proteínas de superfície CD80 e CD86, promovida pelas células dendríticas e macrófagos (MCINNES; SCHETT, 2011b), é sugerido que há maior apresentação antigênica no linfonodo dos animais tratados

com LLLT na densidade de energia de  $3 \text{ Jcm}^{-2}$ . Este grupo apresentou mais células dendríticas e macrófagos no linfonodo, assim como maior expressão das moléculas CD86 em macrófagos e CD80 ou CD80 e CD86 concomitantemente, nas células dendríticas. Maior população de células dendríticas e macrófagos também sugere aumento no milieuo de citocinas no estroma linfonodal. Em conjunto, tais efeitos promovem ativação e expansão clonal de linfócitos no linfonodo (MCINNES; SCHETT, 2007), fato também observado no grupo ZY +  $3 \text{ Jcm}^{-2}$ , que apresentou elevação do número populacional de células T,  $\text{CD4}^+$   $\text{CD8}^+$  e Treg.

O aumento da população de células T, particularmente subpopulações de células  $\text{CD4}^+$ , e sua produção de citocinas e quimiocinas promovem uma retroalimentação positiva da inflamação conduzindo a sinovite à cronicidade (CHOY, 2012). Da mesma forma, a maior apresentação antigênica, resultado do aumento do número de células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e proteínas coestimuladoras (CD80 e CD86), apresenta importante papel na patologia da AR, comprovado pela eficácia do medicamento Abatacept<sup>®</sup>, que atua impedindo a apresentação de antígenos às células T ao bloquear a coestimulação de CD80 e CD86 (CANTAERT et al., 2009).

Este estudo é o primeiro a reportar aumento na população de células Treg após o tratamento com LLLT (aumento de Treg  $\text{CD4}^+$  observado no grupo ZY +  $3 \text{ Jcm}^{-2}$  e Treg  $\text{CD8}^+$  no grupo ZY +  $30 \text{ Jcm}^{-2}$ ), além de demonstrarmos maior expressão da proteína de superfície CD25 em células Treg  $\text{CD8}^+$  no grupo ZY +  $30 \text{ Jcm}^{-2}$ . A atividade imunossupressora das células Treg é regulada pelo fator de transcrição FoxP3 e, a estabilidade de expressão deste por sua vez, depende diretamente da sinalização iniciada pela ligação de IL-2 ao seu receptor de superfície, o CD25, nas células Treg. Desta forma, a alta expressão de CD25 ( $\text{CD25}^{\text{high}}$ ) confere às células Treg fenótipo mais favorável a ativação se comparado às células Treg  $\text{CD25}^{\text{low}}$  (LI et al., 2016).

Assim, o aumento das populações de células Treg  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$ , especialmente aquelas apresentando fenótipo  $\text{CD25}^{\text{high}}$ , induzido por LLLT promove a modulação negativa da resposta imune, contribuindo para a resolução do processo inflamatório. De fato, o acúmulo de células Treg apresentando fenótipo ativado é um fator positivo no prognóstico de doenças reumáticas, uma vez que muitas dessas doenças, como a AR, estão associadas à função comprometida de Treg (MORADI et al., 2014; RAGHAVAN et al., 2009), sendo a reversão da função efetora das células

Treg associada ao sucesso de alguns tratamentos na AR (COOLES; ISAACS; ANDERSON, 2013).

Da mesma forma, o aumento de células NKT, no linfonodo proximal à inflamação observado no grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup>, pode estar associado a um efeito protetor na AR, uma vez que estas células produzem IFN- $\gamma$  e IL-4 e suprimem a produção de TGF- $\beta$  por células sinoviais (ELEWAUT, 2005; KIM et al., 2005). Contraditoriamente, o aumento da população de células NK neste grupo, estaria relacionado com a exacerbação da inflamação devido a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas após interação das células NK com os macrófagos infiltrados nos tecidos inflamados (DALBETH; CALLAN, 2002).

Em geral, o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> apresentou menor alteração nas populações de células imunológicas analisadas, quando comparado ao grupo não tratado, embora tenha apresentado maior contagem de leucócitos totais no linfonodo proximal à inflamação ao ser comparado ao grupo tratado com dexametasona. Os diferentes resultados observados nas duas densidades de energia podem ser relacionados às diferentes intensidades de bioestimulação promovidas por eles, sendo a irradiação com 30 Jcm<sup>-2</sup> mais intensa e, portanto, produtora de efeitos mais pronunciados nas células inflamatórias do que com 3 Jcm<sup>-2</sup>. Como já descrito, a bioestimulação é diretamente proporcional a intensidade energética da LLLT (HUANG et al., 2011). Sendo assim o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> poderia ter conduzido as células inflamatórias ao declínio das suas atividades de forma mais rápida. Em trabalho anterior, demonstramos que a LLLT em 30 Jcm<sup>-2</sup> apresentou importante efeito anti-inflamatório no mesmo modelo de artrite, ao diminuir a extensão do infiltrado inflamatório, acelerando a morte por apoptose de PMN (DOS ANJOS et al., 2017).

É esperado que com a redução do infiltrado inflamatório ocorra conseqüentemente uma diminuição de todos os processos relacionados à instalação e manutenção da inflamação, como sinalização para migração celular via quimiocinas e a conseqüente movimentação das células apresentadoras de antígenos e linfócitos do linfonodo regional para o sítio de inflamação ou vice-versa. Assim, o perfil de populações celulares no linfonodo do grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> representaria àquela descrita na fase de declínio da bioestimulação da LLLT, quando seria observada a diminuição da transmigração celular entre linfonodo e sítio inflamatório, a qual o grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> ainda não atingiu.

A redução das citocinas, quimiocinas e células imunológicas promovidas pela LLLT repercute na modulação da inflamação articular e, conseqüentemente, no metabolismo de matriz extracelular realizado pelas MMPs. De fato, os efeitos anti-inflamatório e cicatricial da LLLT têm sido associados à modulação da expressão de MMPs (ALVES et al., 2013; ANDRAUS et al., 2017; GUERRA et al., 2013).

Embora tenha apresentado redução dos níveis relativos de mRNA das MMPs -2, -9, e -13 (Figura 29), os níveis teciduais de MMP-13 e TIMP-2 foram aumentados no grupo ZY + 3 Jcm<sup>-2</sup> (Figuras 30 e 31). Isso sugere que a LLLT nesta densidade de energia estaria regulando a ação da MMP-13 (aumentada em consequência do processo inflamatório) (BREW & NAGASE, 2010) através do aumento do TIMP-2. Com isso, uma maior quantidade de inibidor de metaloproteinases, o qual consegue regular a ação das MMPs, sugere importante fator preditor positivo para o curso da AR. Ainda com a hipótese de declínio da bioestimulação e da questão temporal, o grupo ZY + 30 Jcm<sup>-2</sup> também apresentou resultados promissores ao tratamento da AR, visto que não ocasionou um aumento na expressão tecidual de MMP-13 e TIMP-2, além de diminuir os níveis relativos de mRNA das MMPs -13 e -14, aumentar da TIMP-2 e apresentar tendência para elevação dos níveis relativos de mRNA da MMP-2. Enquanto as MMPs -2 e -9 são comumente relacionadas à processo inflamatório (XUE et al., 2014), a MMP-13 está envolvida na degradação da matriz cartilaginosa das articulações, uma vez que cliva preferencialmente o colágeno mais abundante na cartilagem, o tipo II (BURRAGE et al., 2006 BREW & NAGASE, 2010). Além disso, a MMP-2, constitutivamente expressa por fibroblastos sinoviais, apresenta efeito supressivo sobre a inflamação, atuando na diminuição de anticorpos indutores da AR e mais recentemente, sabe-se que também é capaz de clivar e inativar a IL-17, importante citocina pró inflamatória na patogênese da AR (KIM et al., 2011; NAGASE, VISSE, & MURPHY, 2006; XUE et al., 2014).

Em resumo, de acordo com os resultados apresentados pela LLLT em ambas as densidades de energia, poderia ser atribuída a essa terapia efeitos anti-inflamatórios para o tratamento da AR, mesmo que a expressão de certas citocinas, quimiocinas e metaloproteinases pró-inflamatórias tenham sido aumentadas para esses grupos. Conforme é conhecido, modificações mitocondriais geradas pela excitação dos fotoceptores através da LLLT levam a alterações nos parâmetros homeostáticos celulares (pHi, [Ca<sup>2+</sup>], [cAMP], Eh, [ATP]), culminando com o aumento

na síntese de DNA e RNA (KARU, 2008). Entretanto, os níveis relativos de mRNA nem sempre resulta na síntese da proteína nem em sua ativação, havendo processos pós-transcricionais importantes e decisivos para a produção proteica (CORBETT, 2018).

Por outro lado, se os mRNAs forem traduzidos á proteínas ativas, modificações no perfil de mediadores inflamatórios seriam observados no sítio de inflamação dos grupos LLLT, mas que também não necessariamente levariam a mudança, pois estas resultam do balanço dinâmico entre funções pró-inflamatórias e imunossupressoras dos diferentes mediadores inflamatórios em distintas concentrações do microambiente articular (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

Os principais achados desta pesquisa são a modificação do quantitativo e do fenótipo dos leucócitos linfonodais após a LLLT. O desafio antigênico promovido pelo zymosan induz a ativação e migração de APCs para o linfonodo regional, onde promovem expansão clonal de linfócitos via apresentação de antígenos (FRASNELLI et al., 2005; GRANUCCI et al., 2003; KARUMUTHIL-MELETHIL et al., 2015). Nos grupos tratados com LLLT, a migração das células dendríticas e macrófago poderia estar aumentada devido a maior expressão de quimiocinas, como CXCL1, observada nestes grupos, ou ainda pelo aumento da linfoangiogênese e motilidade linfática estimulados pela LLLT (LAU; CHEING, 2009). Uma vez que há mais células APCs no linfonodo apresentando zymosan para os linfócitos T naive, maior a expansão clonal de células T, em especial as células TCD4 com perfil Th1 (KARUMUTHIL-MELETHIL et al., 2015). O aumento de células T efectoras, normalmente é acompanhado pela estimulação concomitante de células Treg, proporcionalmente em menores quantidades (HORI, 2003). A diferenciação das células T para o perfil Treg, tanto CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, ocorre quando as APCs apresentam o antígeno via MHC ao mesmo tempo que há sinalização de citocinas como IL-2 e TGF-β, e dos coestimuladores B7 (B7.1 CD80 e B7.2 CD86) (LUTZ, 2012). Assim, o aumento das populações Treg observadas nos grupos tratados com a LLLT pode estar associado a maior expressão de coestimuladores em células dendríticas e macrófagos induzidas pela irradiação.

## 6 CONCLUSÃO

O efeito antiinflamatório da LLLT, relatado em estudos experimentais e clínicos, tem sido atribuído principalmente à modulação de mediadores inflamatórios. Demonstramos que além de diminuir a concentração de citocinas no sítio de inflamação e alterar os níveis relativos de mRNA das citocinas, quimiocinas e metaloproteinases de matriz, a LLLT pode modificar o perfil das populações celulares no linfonodo proximal à inflamação, aumentando o número de células apresentadoras de antígenos, linfócitos, células NK, NKT e Treg expressando CD25 em níveis elevados.

Nossos resultados indicam que a LLLT nos parâmetros aqui testados é uma boa alternativa para o tratamento de desordens reumáticas, uma vez que é capaz de alterar o curso inflamatório da artrite, tendendo a acelerar sua resolução. Além disso, é uma terapia que apresenta efeitos locais, sem efeitos sistêmicos conhecidos, diminuindo assim a depressão do sistema imune como um todo, observada em muitas terapias medicamentosas atuais da AR, como a dexametasona.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIMBIRE, F. et al. Effect of LLLT Ga-Al-As (685 nm) on LPS-induced inflammation of the airway and lung in the rat. *Lasers in Medical Science*, v. 20, n. 1, p. 11–20, 2005.

ALBERTINI, R. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 89, n. 1, p. 50–55, 2007.

ALEXANDRATOU, E. et al. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 1, n. 8, p. 547–552, 2002.

ALVES, A. C. A. et al. Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: A histological study. *Lasers in Medical Science*, v. 28, n. 2, p. 529–536, 2013.

AMANO, T. et al. Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy. *Genes and Development*, v. 17, n. 19, p. 2436–2449, 2003.

AMARILLAS-ESCOBAR, E. D. et al. Use of Therapeutic Laser After Surgical Removal of Impacted Lower Third Molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 68, n. 2, p. 319–324, 2010.

ANGEL, M. J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. A. Defining the Challenge: The Basic Science of Articular Cartilage Repair and Response to Injury. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, v. 11, n. 3, p. 168–181, 2003.

ANTUNES, H. S. et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients : a randomized trial. *Transplantation. Blood*, v. 109, n. 5, p. 2250–2255, 2007.

AREF-ESHGHI, E. et al. Overexpression of MMP13 in human osteoarthritic cartilage is associated with the SMAD-independent TGF- $\beta$  signalling pathway. *Arthritis Research and Therapy*, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2015.

ASIF AMIN, M.; FOX, D. A.; RUTH, J. H. Synovial cellular and molecular markers in rheumatoid arthritis. *Seminars in Immunopathology*, v. 39, n. 4, p. 385–393, 2017.

ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, v. 39, n. 8, p. 2040–2044, 2009.

AUPPERLE, K. R. et al. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *The American journal of pathology*, v. 152, n. 4, p. 1091–8, 1998.

BARBOZA, L. L. et al. Low-intensity red and infrared laser effects at high fluences on *Escherichia coli* cultures. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 10, p. 945–952, 2015.

BASFORD, J. Laser therapy: scientific basis and clinical role. *Orthopedics*, v. 16, n. 5, p. 541–547, 1993.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, n. 1, p. 3–14, 1995.

BRADFIELD, P. F. et al. Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell migration within synovial tissue. *Arthritis and Rheumatism*, v. 48, n. 9, p. 2472–2482, 2003.

BRENNAN, F. M. et al. Evidence that rheumatoid arthritis synovial T cells are similar to cytokine-activated T cells: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor  $\kappa$ B pathways in tumor necrosis factor  $\alpha$  production in rheumatoid

arthritis. and Rheumatism, v. 46, n. 1, p. 31–41, 2002.

BRENTANO, F. et al. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cellular Immunology*, v. 233, n. 2, p. 90–96, 2005.

BREW, K., & NAGASE, H. NIH Public Access. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1803, n. 1, p. 55–71, 2010.

BROSSEAU, L. et al. Low level laser therapy ( Classes I , II and III ) for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v. 19, n. 4, 2005.

BURMESTER, G. R. et al. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and clinical features. In: PUBLICATIONS, B. (Ed.). *EULAR textbook on Rheumatic Diseases*. 1<sup>a</sup> ed ed. London: [s.n.]. p. 206–231.

BURMESTER, G. R.; FEIST, E.; DÖRNER, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 10, n. 2, p. 77–88, 2014.

BURRAGE, P. S.; MIX, K. S.; BRINCKERHOFF, C. E. Matrix Metalloproteinases: Role In Arthritis. *Frontiers in Bioscience*, v. 11, n. 1, p. 529, 2006.

CANTAERT, T. et al. Alterations of the synovial T cell repertoire in anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 60, n. 7, p. 1944–1956, 2009.

CANUTO, K. S. et al. Low-level red laser therapy alters effects of ultraviolet C radiation on *Escherichia coli* cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 10, p. 939–944, 2015.

CAPELLINO, S. et al. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: Modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 69, n. 10, p. 1853–1860, 2010.

CASCÃO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final

effectors. *Autoimmunity Reviews*, v. 9, n. 8, p. 531–535, 2010.

CASTANO, A. P. et al. Low-Level Laser Therapy for Zymosan-Induced Arthritis in Rats: Importance of Illumination Time. *Lasers in Medical Science*, v. 39, n. 6, p. 543–550, 2007.

CHEN, A. C.-H. et al. Low-Level Laser Therapy Activates NF- $\kappa$ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, p. e22453, 2011.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 51, n. suppl 5, p. v3–v11, 2012.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, n. 2, p. 105–111, 1998.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, v. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008.

COHEN, N. P.; FOSTER, R. J.; MOW, V. C. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure , Function , and Maintaining Healthy State. *Journal of Orthopadic and sports physical therapy*, v. 28, n. 4, p. 203–215, 1998.

CORNISH, A. L. et al. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, n. 10, p. 554–559, 2009.

COTLER, H. B. et al. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJ Orthop Rheumatol*, v. 2, n. 5, 2015.

CRAWFORD, F.; THOMSON, C. E. Interventions for treating plantar heel pain. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 3, n. 3, p. CD000416, 2003.

CROSS, M. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the

Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 73, n. 7, p. 1316–1322, 2014.

DANNING, C. L. et al. Macrophage-derived cytokine and nuclear factor kappaB p65 expression in synovial membrane and skin of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 43, n. 6, p. 1244–1256, 2000.

DAYER, J. M.; BRESNIHAN, B. Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 46, n. 3, p. 574–578, 2002.

DAYER, J. M.; BURGER, D. Cell-cell interactions and tissue damage in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*, v. 3, n. Suppl 1, p. S14-16, 2004.

DE ALMEIDA, D. E. et al. Immune Dysregulation by the Rheumatoid Arthritis Shared Epitope. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 3, p. 1927–1934, 2010.

DE JESUS, J. F. et al. Low-level laser therapy in IL-1 $\beta$ , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. *Lasers in Medical Science*, v. 30, n. 1, p. 153–158, 2014.

DE MARCHI, T. et al. Low-level laser therapy (LLLT) in human progressive-intensity running: Effects on exercise performance, skeletal muscle status, and oxidative stress. *Lasers in Medical Science*, v. 27, n. 1, p. 231–236, 2012.

DE SOUZA DA FONSECA, A. et al. Low-intensity infrared laser increases plasma proteins and induces oxidative stress in vitro. *Lasers in Medical Science*, v. 27, n. 1, p. 211–217, 2012.

DIMITROVA, P. et al. The role of properdin in murine zymosan-induced arthritis. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 7–8, p. 1458–1466, 2010.

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

EDWARDS, J. C. W. et al. Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 25, p. 2572–2581, 2004.

EDWARDS, S. W.; HALLETT, M. B. Seeing the wood for the trees: The forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology Today*, v. 18, n. 7, p. 320–324, 1997.

ESENSTEN, J. H.; WOFYSY, D.; BLUESTONE, J. A. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 5, n. 10, p. 560–565, 2009.

ESLAMIAN, F. et al. Effects of low-level laser therapy in combination with physiotherapy in the management of rotator cuff tendinitis. *Lasers in Medical Science*, v. 27, n. 5, p. 951–958, 2012.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annual Review of Immunology*, v. 14, n. 1, p. 397–440, 1996.

FILER, A. et al. Differential survival of leukocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: Site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis and Rheumatism*, v. 54, n. 7, p. 2096–2108, 2006.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 356–361, 2003.

FONSECA, A. S. et al. Effect of laser therapy on DNA damage. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 42, n. 6, p. 481–488, 2010.

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

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of Biomedical Science*, v. 16, n. 1, p. 31–37, 2009.

GENOVESE, M. C. et al. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis and Rheumatism*, v. 62, n. 4, p. 929–939, 2010.

GOLDRING, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 43, n. 9, p. 1916–1926, 2000.

GRANUCCI, F. et al. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *Journal of immunology*, v. 170, p. 5075–5081, 2003.

GRAVALLESE, E. M. et al. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology*, v. 152, n. 4, p. 943–51, 1998.

GUR, A. et al. Efficacy of 904 nm Gallium Arsenide low level laser therapy in the management of chronic myofascial pain in the neck: A double-blind and randomized-controlled trial. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 35, n. 3, p. 229–235, 2004.

HARA, B. P. O.; URBAN, J. P. G.; MAROUDAS, A. Influence of cyclic loading articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 49, p. 536–539, 1990.

HARINGMAN, J. J. Chemokine blockade and chronic inflammatory disease: proof of concept in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 62, n. 8, p. 715–721, 2003.

HAWKINS, D. H.; ABRAHAMSE, H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 38, n. 1, p. 74–83, 2006.

HEMVANI, N. et al. In vitro effect of nitrogen and He-Ne laser on the apoptosis of human polymorphonuclear cells from burn cases and healthy volunteers. *Photomed Laser Surg*, v. 23, n. 5, p. 476–479, 2005.

HOUARD, X.; GOLDRING, M. B.; BERENBAUM, F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports*, v. 15, n. 11, 2013.

HUANG, Y.-Y. et al. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy – an Update. *Dose-Response*, v. 9, n. 4, p. dose-response.1, 2011.

HUIZINGA, T. et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium: Commentary. *International Journal of Advances in Rheumatology*, v. 8, n. 3, p. 121, 2010.

HUMBY, F. et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Medicine*, v. 6, n. 1, p. 0059–0075, 2009.

IDE, M. R. et al. Functional capacity in rheumatoid arthritis patients: Comparison between Spanish and Brazilian sample. *Rheumatology International*, v. 31, n. 2, p. 221–226, 2011.

JAAKKOLA, J. I.; MANN, R. A. A review of rheumatoid arthritis affecting the foot and ankle. *Foot and Ankle International*, v. 25, n. 12, p. 866–874, 2004.

JIMENEZ-BOJ, E. et al. Interaction between Synovial Inflammatory Tissue and Bone Marrow in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 4, p. 2579–2588, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10<sup>a</sup> edição ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

KAMPHUIS, S. et al. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*, v. 366, n. 9479, p. 50–56, 2005.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation

on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 49, n. 1, p. 1–17, 1999.

KARU, T. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84, n. December, p. 1091–1099, 2008.

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n. 2, p. 159–160, 2010.

KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers in the life sciences*, v. 2, n. 1, p. 53–74, 1988.

KARU, T. I. Low-Power Laser Therapy. *Biomedical Photonics Handbook*, n. 48, p. 1–26, 2003.

KASAMA, T. et al. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, n. 6, p. 2868–2876, 1995.

KAZEM SHAKOURI, S. et al. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers in Medical Science*, v. 25, n. 1, p. 73–77, 2010.

KERRY, R. M.; HOLT, G. M.; STOCKLEY, I. The foot in chronic rheumatoid arthritis: a continuing problem. *The Foot*, v. 4, n. 4, p. 201–203, 1994.

KEYSTONE, E. et al. Zymosan-Induced Arthritis: A model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis & Rheumatism*, v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1977.

KIELY, P. D. W. et al. Contemporary treatment principles for early rheumatoid arthritis: a consensus statement. *Rheumatology*, v. 48, n. 7, p. 765–772, 2009.

KIM, K. S. et al. Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatology International*, v. 31, n. 4, p. 543–547, 2011.

KOCH, A. E. et al. Macrophage inflammatory protein-1 beta: a C-C chemokine in osteoarthritis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v.77, n. 3, p. 307-314, 1995.

KOCH, A. E. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: Future targets? *Arthritis and Rheumatism*, v. 52, n. 3, p. 710–721, 2005.

KOSHY, P. J. T. et al. Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1alpha and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism. *Arthritis and Rheumatism*, v. 44, n. 10, p. 2296–2310, 2001.

LEBRE, M. C. et al. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP-dendritic cells with distinct cytokine profiles. *American Journal of Pathology*, v. 172, n. 4, p. 940–950, 2008.

LIANZA, S. *Medicina de Reabilitação*. 3<sup>a</sup> ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LIEW, F. Y.; MCINNES, I. B. The role of innate mediators in inflammatory response. *Molecular Immunology*, v. 38, n. 12–13, p. 887–890, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOTZ, M.; HASHIMOTO, S.; KÜHN, K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 7, n. 4, p. 389–391, 1999.

LUBART, R.; BREITBART, H. Biostimulative effects of low-energy lasers and their

implications for medicine. *Drug Development Research*, v. 50, n. 3–4, p. 471–475, 2000.

MACGREGOR, A. J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis & Rheumatism*, v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.

MAHDI, H. et al. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated  $\alpha$ -enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*, v. 41, n. 12, p. 1319–1324, 2009.

MANTINEO, M.; PINHEIRO, J. P.; MORGADO, A. M. Low-level laser therapy on skeletal muscle inflammation: evaluation of irradiation parameters. *Journal of Biomedical Optics*, v. 19, n. 9, p. 98002, 2014.

MATTHYS, P. et al. AMD3100, a Potent and Specific Antagonist of the Stromal Cell-Derived Factor-1 Chemokine Receptor CXCR4, Inhibits Autoimmune Joint Inflammation in IFN- Receptor-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 8, p. 4686–4692, 2001.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p. 2328–2337, 2017.

MCINNES, I.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 8, p. 2205–19, 2011a.

MCINNES; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 6, p. 429–442, 2007.

MCINNES; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, v. 365, p. 2205–2219, 2011b.

MEIRELES, S. M. et al. Assessment of the effectiveness of low-level laser therapy on the hands of patients with rheumatoid arthritis: A randomized double-blind controlled

trial. *Clinical Rheumatology*, v. 29, n. 5, p. 501–509, 2010.

MICHAEL, J. W.; SCHLUTER-BRUST, K. U.; EYSEL, P. The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 107, n. 9, p. 152–162, 2010.

MICHELSON, J. et al. Foot and Ankle Problems in Rheumatoid Arthritis. *Foot & Ankle International*, v. 15, n. 11, p. 608–613, 1994.

MIOSSEC, P. Update on interleukin-17: A role in the pathogenesis of inflammatory arthritis and implication for clinical practice. *RMD Open*, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2017.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, n. 10, p. 763–776, 2012.

MIZUTANI, K. et al. A Clinical Study on Serum Prostaglandin E<sub>2</sub> with Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 22, n. 6, p. 537–539, 2004.

MORAIS, R. DE et al. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n. 2, p. 227–232, 2010.

MORGAN, M. C.; RASHID, R. M. The effect of phototherapy on neutrophils. *International Immunopharmacology*, v. 9, n. 4, p. 383–388, 2009.

MOTA, L. M. H. et al. Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide Guidelines for the drug treatment of rheumatoid arthritis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 53, n. 2, p. 158–183, 2013.

NADKARNI, S.; MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *The Journal of Experimental Medicine*, v. 204, n. 1, p. 33–39, 2007.

NAGASE, H.; KASHIWAGI, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation.

Arthritis Research & Therapy, v. 5, n. 2, p. 94–103, 2003.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovascular Research, v. 69, n. 3, p. 562–573, 2006.

NIEMZ, M. H. Laser-tissue interactions: fundamentals and applications. 2<sup>a</sup>ed ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.

O'SHEA, D. C. et al. No Title An Introduction to Lasers and Their Applications. American Journal of Physics, v. 46, n. 5, p. 592, 1978.

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and Autoimmunity. Nature Reviews Immunology, v. 2, n. 1, p. 37–45, 2002.

OHATA, J. et al. Fibroblast-Like Synoviocytes of Mesenchymal Origin Express Functional B Cell-Activating Factor of the TNF Family in Response to Proinflammatory Cytokines. The Journal of Immunology, v. 174, n. 2, p. 864–870, 2005.

ORHAN, K. et al. Low-level laser therapy of dentin hypersensitivity: A short-term clinical trial. Lasers in Medical Science, v. 26, n. 5, p. 591–598, 2011.

OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 25, p. 13766–13771, 2000.

PANAYI, G. S. Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism? Nature Clinical Practice Rheumatology, v. 2, n. 2, p. 58–59, 2006.

PARSONS, S. J.; PARSONS, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. Oncogene, v. 23, n. 48 REV. ISS. 7, p. 7906–7909, 2004.

REDDY, G. K. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 22, n. 2, p. 141–150, 2004.

RENGEL, Y.; OSPELT, C.; GAY, S. Proteinases in the joint: Clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Research and Therapy*, v. 9, n. 5, 2007.

RHEE, D. K. et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 3, p. 622–631, 2005.

ROCHA, F. A. C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation Research*, v. 48, n. 9, p. 485–490, 1999.

RÖNNBLM, L.; ELORANTA, M. L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 25, n. 2, p. 248–253, 2013.

SABEH, F.; FOX, D.; WEISS, S. J. Membrane-Type I Matrix Metalloproteinase-Dependent Regulation of Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Function. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 11, p. 6396–6406, 2010.

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

SALOMON, I. et al. Targeting the function of IFN-gamma-inducible protein 10 suppresses ongoing adjuvant arthritis. *Journal of Immunology*, v. 169, n. 5, p. 2685–93, 2002.

SALTER, R. *Distúrbios e Lesões do Sistema Músculoesquelético*. 3ªed ed. São Paulo: Medsi, 2001.

SCHETT, G. et al. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat

shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, s. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 102, n. 2, p. 302–11, 1998.

SCHETT, G.; TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts and arthritis. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 24, n. 7, p. 1142–1146, 2009.

SCHUERWEGH, A. J. M. et al. Retraction for Schuerwegh et al., Evidence for a functional role of IgE anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 50, p. 20345–20345, 2013.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.

SEIBL, R. et al. Expression and Regulation of Toll-Like Receptor 2 in Rheumatoid Arthritis Synovium. *The American Journal of Pathology*, v. 162, n. 4, p. 1221–1227, 2003.

SEYLER, T. M. et al. BlyS and APRIL in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 11, p. 3083–3092, 2005.

SHEFER, G. et al. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*, v. 115, n. Pt 7, p. 1461–1469, 2002.

SHI, F. D.; VAN KAER, L. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 10, p. 751–760, 2006.

SHIMIZU, N. et al. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research*, v. 74, n. 7, p. 1382–8, 1995.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J. E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*, v. 4 Suppl 3, p. S265-72, 2002.

SKAPENKO, A. et al. The IL-4 Receptor  $\alpha$ -Chain-Binding Cytokines, IL-4 and IL-13, Induce Forkhead Box P3-Expressing CD25+CD4+ Regulatory T Cells from CD25-CD4+ Precursors. *The Journal of Immunology*, v. 175, n.9, p. 6107-6116, 2005.

SMITH, L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *American Journal of Physiology*, v.263, n. 2 (Pt2) p. 181-191, 1992.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 6, p. 960-977, 2017.

SNIR, O. et al. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: Association with HLA-DRB1 alleles. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 68, n. 5, p. 736-743, 2009.

STANCZYK, J. et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 58, n. 4, p. 1001-1009, 2008.

STRÖBEL, S. et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Research and Therapy*, v. 12, n. 2, p. 1-15, 2010.

SVELTO, O.; HANNA, D. C. *Principles of Lasers*. Springer US, 2010.

SZEKANECZ, Z. et al. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Frontiers in bioscience*, v. 1, p. 44-51, 2009.

TAKEMURA, S. et al. Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 2, p. 1072-1080, 2001.

TRAJANO, L. A. S. N. et al. Low-level laser irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts. *Laser Physics Letters*, v. 13, n. 7, p. 1–7, 2016.

TURESSON, C. et al. Severe extra-articular disease manifestations are associated with an increased risk of first ever cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 66, n. 1, p. 70–75, 2007.

TYJNI, A; KARLSSON, J. Biological treatment of joint cartilage damage. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, v. 10, n. 5, p. 249–65, 2000.

UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, v. 401, n. 6755, p. 811–815, 1999.

UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. *Journal of Endotoxin Research*, v. 9, n. 3, p. 176–180, 2003.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: Current concepts and future directions. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 10, n. 5, p. 408–419, 2002.

VERSTAPPEN, S. M. M. et al. Productivity costs among patients with rheumatoid arthritis: The influence of methods and sources to value loss of productivity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 64, n. 12, p. 1754–1760, 2005.

VISSER, H. et al. How to diagnose rheumatoid arthritis early: A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 46, n. 2, p. 357–365, 2002.

VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease

Study 2010. *The Lancet*, v. 380, n. 9859, p. 2163–2196, 2012.

WEAVER, C. T. et al. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annual Review of Immunology*, v. 25, n. 1, p. 821–852, 2007.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 81, n. 9, p. 646–656, 2003.

WOOLLEY, D. E.; PH, D.; SC, D. clinical implications of basic research The Mast Cell in Inflammatory Arthritis. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 17, p. 1709–1711, 2003.

WU, S. et al. Mechanistic study of apoptosis induced by high-fluence low-power laser irradiation using fluorescence imaging techniques. *Journal of Biomedical Optics*, v. 12, n. 6, p. 64015, 2007.

WU, S. et al. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *Journal of Cellular Physiology*, v. 218, n. 3, p. 603–611, 2009.

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

XUE, M. et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology*, v. 53, n. 12, p. 2270–2279, 2014.

YAMANAKA, H. et al. Expression and Tissue Localization of Metalloproteinases in Rheumatoid Synovium. *Laboratory Investigation*, v. 80, n. 5, p. 677–687, 2000.

**Anexo 1 - ARTIGO SUBMETIDO Á REVISTA JOURNAL OF BIOPHOTONICS  
(IF:4,328) EM ABRIL DE 2018**

**Journal of Biophotonics**

**Modulation of immune response to induced-arthritis by low-level laser therapy  
--Manuscript Draft--**

|   |   |
|---|---|
| <b>Manuscript Number:</b>   |   |
| <b>Full Title:</b>  | Modulation of immune response to induced-arthritis by low-level laser therapy   |
| <b>Article Type:</b>  | Full Article  |
| <b>Section/Category:</b>  |   |
| <b>Keywords:</b>  | Low-level laser therapy; arthritis; cytokines; immune cells; Treg cells.  |
| <b>Corresponding Author:</b>  | Lúcia Mara Januário dos Anjos, M.D.<br>Federal University of Juiz de Fora<br>Juiz de Fora, Minas Gerais BRAZIL  |
| <b>Corresponding Author Secondary Information:</b>                            |   |
| <b>Corresponding Author's Institution:</b>                                    | Federal University of Juiz de Fora  |
| <b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>                          |   |
| <b>First Author:</b>  | Lúcia Mara Januário dos Anjos, M.D.   |
| <b>First Author Secondary Information:</b>                                    |   |
| <b>Order of Authors:</b>  | Lúcia Mara Januário dos Anjos, M.D.<br>Pollyanna Amaral Slavador, M.D.<br>Álvaro Carneiro de Souza, Undergraduate in Veterinary Medicine<br>Adenilson de Souza da Fonseca, P.h.D<br>Flávia de Paoli, P.h.D<br>Jacy Gameiro, P.h.D   |
| <b>Order of Authors Secondary Information:</b>                                |   |
| <b>Abstract:</b>  | Once the Low-level laser therapy immune cells response are not always clarified, this study aimed evaluate the profile of cytokines and immune cells after LLLT on arthritis-induced model. Arthritis was induced in the C57BL/6 mice divided into five groups: untreated; dexamethasone treated; LLLT at 3 Jcm <sup>-2</sup> ; LLLT at 30 Jcm <sup>-2</sup> ; euthanized 5 hours after inflammation induction. Cytokines measurements by ELISA and mRNA cytokine relative levels by qRT-PCR were performed with arthritic ankle (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$ ). Macrophages, dendritic cells, natural killer cells, lymphocytes CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , Treg and costimulatory proteins were quantified in the proximal lymph node by flow cytometry. Data showed a decrease in all cytokines levels after LLLT and alteration in its mRNA relative levels, differently depending on the energy density used. LLLT at 3 Jcm <sup>-2</sup> showed an increase for all cells populations analyzed in lymph node as well as the costimulatory proteins expression on macrophages and dendritic cells. Additionally, enrichment on Treg population expressing higher levels of CD25 was observed. LLLT at 30 Jcm <sup>-2</sup> showed increase of CD8 <sup>+</sup> cells population. Besides an anti-inflammatory cytokine profile at inflammation site LLLT induces changes on immune cells populations of proximal lymph node favoring the anti-inflammatory microenvironment through Treg enrichment. |
| <b>Additional Information:</b>  |   |
| <b>Question</b>   | <b>Response</b>   |
| Please submit a plain text version of your cover letter here.                 | We are submitting the manuscript "Modulation of immune response to induced-arthritis by low-level laser therapy" for possible publication in the Journal of Biophotonics. We declare that this work is unpublished. It strictly followed all ethical procedures and it has not been submitted to any other journal for publication. We declare not practiced scientific misconduct and we are aware that, if the manuscript is accepted for   |
| Please note, if you are submitting a revision of your manuscript, there is an |   |

|  |  |
|--|--|
| <p>opportunity for you to provide your responses to the reviewers later; please do not add them to the cover letter.</p> | <p>publication, copyright now belong to the Journal of Biophotonics.</p> <p>Yours faithfully,</p> <p>Lúcia Mara Januário dos Anjos</p> <p>April 05th, 2018</p> |
|--|--|