

UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO A LED
(DIODO EMISSOR DE LUZ) EM CONDRÓCITOS: Estudo *In vitro***

SORAIA SALMAN

São Paulo, 2019

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MESTRADO
EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

SORAIA SALMAN

**EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO A LED
(DIODO EMISSOR DE LUZ) EM CONDRÓCITOS: Estudo *In vitro***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Brasil, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Roberta Tim
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Livia Assis

São Paulo, 2019

S168e SALMAN, Soraia
Efeitos da terapia por fotobiomodulação a LED (Diodo Emissor de Luz) em condrócitos: estudo in vitro / Soraia Salman. -- São Paulo, 2019.

41 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Roberta Tim

Coorientadora: Livia Assis.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

1. Doença Degenerativa. 2. Condrócitos. 3. Osteoartrite. 4. LED. I.Título.

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

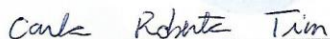


TERMO DE APROVAÇÃO

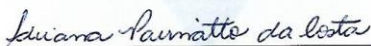
SORAIA SALMAN

“EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO A DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) EM CONDRÓCITOS: Estudo *In Vitro*”.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof.(a). Dr.(a) Carla Roberta Tim (presidente-orientador)



Prof.(a). Dr.(a) Adriana Pavinatto da Costa (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Cintia Cristina Santi Martignago (UFSCAR)

São Paulo, 11 de setembro de 2019
Presidente da Banca Prof(a). Dr(a)Carla Roberta Tim



TERMO DE AUTORIZAÇÃO



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

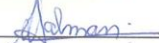
Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "EFEITOS DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO A DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) EM CONDRÓCITOS: Estudo *In Vitro*"

Autor(es):

Discente: **Soraia Salman**

Assinatura: 

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim

Assinatura: 

Coorientador(a):

Assinatura: 

Data: 11/09/2019



DEDICATÓRIA

Dedico este estudo ao meu esposo Juvenal Barreto Novaes, meu companheiro e parceiro de todos os momentos, que nunca me deixou ser dominada pelo desânimo, obrigada meu amor!

Ao meu filho Karim Salman Oliveira Barreto, dedico esta conquista acadêmica e agradeço, pelo amor, carinho, dedicação e paciência. Você é um ser humano maravilhoso filho e, me orgulho de ser sua mãe, especialmente, porque nos momentos que pensei em desistir, seu sorriso me deu forças para vencer meus limites. Te amo!

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão é o mais belo d'alma humana e, nos demonstra que nada somos ou seríamos se estivéssemos envolvidos somente pela solidão de nossas próprias forças, por isso, gostaria de agradecer àqueles que foram o alicerce para esta jornada acadêmica.

A Deus pelo dom da vida e as bênçãos infinitas, especialmente, porque me ofereceu o seu amor e o seu perdão como fontes de energia para minha jornada. Neste momento, volto meus olhos aos céus e rogo sua proteção.

Com a saudade envolvida no peito, agradeço ao meu pai Nemr Ali Salman (*in memoriam*), homem forte e determinado, que legou aos filhos a vontade de sempre iniciar uma nova jornada e vencer todos os percalços. Pai, como eu gostaria que estivesse ao meu lado nesse momento, mas, tenho certeza que estás vibrando com minha conquista e, percebendo que herdei a sua determinação. Pai, te amo!

Com sentimento de alegria e amor, agradeço minha mãe Bochra Chaaban Salman, por ser uma mulher simplesmente maravilhosa, com um coração nobre e uma leveza na alma, que nos faz acreditar que a vida é sempre perfeita. Mãe, seu incentivo e sua certeza de que alcançaria esta vitória acadêmica, foram os baluartes de minha luta. Te amo!

Agradeço com carinho e admiração minha professora orientadora Dra. Carla Roberta Tim, que foi mestre no sentido literal desta palavra, me dizendo sim ou não, quando eram exatamente essas palavras que precisava ouvir. Obrigada por ser minha direção na execução deste trabalho.

Relembrando todo o aprendizado do curso, resta-me agradecer aos Professores/Doutores, que me repassaram mais do que conteúdos, me ofereceram a ética e a valorização humana como legado.

*Aquilo que se faz por amor está
sempre além do bem e do mal.*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

As doenças degenerativas da cartilagem articular como a Osteoartrite (OA) tem elevada incidência, afetando quase todas as pessoas em algum grau por volta dos 80 anos. É uma doença progressiva caracterizada pela perda de cartilagem articular, remodelamento do osso subcondral, redução do espaço articular e formação de osteócitos, o que leva ao surgimento de quadros álgicos e perdas funcionais nos indivíduos acometidos. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem amenizar o dano articular e prevenir a evolução da doença. Neste contexto, a terapia por fotobiomodulação (TFBM) a Diodo Emissor de Luz (LED) vem sendo utilizado e estudado nos últimos anos, no entanto, pouco se sabe a respeito de seus efeitos na cartilagem articular. Assim, o estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da TFBM a LED em cultura de condrócitos derivados da cartilagem articular de ratos. Todos os procedimentos de cultura celular foram realizados sob condições assépticas rigorosas em um fluxo de segurança biológica. Para isso, os condrócitos foram extraídos da cartilagem articular femoral de ratos por meio do uso de colagenase Tipo I a 0,25%. Após as extrações, as células foram semeadas na concentração de 5×10^4 células e divididas em 4 grupos: controle (condrócitos que não receberam a TFBM); TFBM 70 mW (condrócitos que receberam a TFBM com potência de 70 mW); TFBM 150 mW (condrócitos que receberam a TFBM com potência de 150 mW); TFBM 300 mW (condrócitos que receberam a TFBM com potência de 300 mW). Após 12 horas das células serem semeadas iniciou-se a TFBM a LED (850 nm) e foi realizada a cada 24 horas, totalizando 3 sessões. Após este período foi analisado a viabilidade e proliferação celular. Os resultados demonstraram que todos os grupos experimentais foram capazes de manter a viabilidade celular. No entanto, quando foi avaliada a proliferação celular, apenas o TFBM 150 mW foi capaz de aumentar a proliferação dos condrócitos. Ainda, TFBM 70 mW e 300 mW apresentaram proliferação celular menor quando comparado ao grupo controle. Assim, pode-se sugerir que a TFBM induziu o efeito dose resposta, somente quando foi utilizada a potência de 150 mW, que foi capaz de manter a viabilidade e promover a proliferação celular.

Palavras-chaves: Doença Degenerativa; Condrócitos; Osteoartrite; LED.

ABSTRACT

Degenerative diseases of articular cartilage such as osteoarthritis (OA) have high incidence, affecting almost every person in some degree when about 80 years old. It is a progressive disease characterized by the loss of articular cartilage, remodeling of the subchondral bone, reduction of articular space and osteocytes formation, which leads to pain and functional losses in afflicted individuals. Thus, it is important the development of therapeutic strategies that aim to decrease the articular damage and prevent the evolution of the disease. In this context, the therapy through photobiomodulation therapy (PBMT) on a Light Emitting Diode (LED) have been used and studied in the last years, however, little is known regarding its effects on articular cartilage. Thus, the study has as its objective to evaluate the effects of LED-based PBMT in a culture of chondrocytes derived from articular cartilage of rats. All procedures of the cellular culture were performed under rigorous aseptic conditions in a biological security flow. Hence, the chondrocytes were extracted from the femoral articular cartilage of rats using collagenase Type I at 0,25%. After the extraction, the cells were seeded in concentration of 5×10^4 cells and divide in to 4 groups: control (chondrocytes that did not receive PBMT); PBMT 70 mW (chondrocytes that received a PBMT with a potency of 70 mW); PBMT 150 mW (chondrocytes that received a PBMT with a potency of 150 mW); PBMT 300 mW (chondrocytes that received a PBMT with a potency of 300 mW). After 12 hours of the cells seeding a LED-based PBMT (850 nm) was initiate and it was performed each 24h afterwards for 72 hours totalizing 3 sessions. After this period the viability and cell proliferation were analyzed. The results showed that all experimental groups were capable of maintaining the cell viability. However, when the cell proliferation was analyzed only the PBMT 150 mW was capable of enhancing the chondrocyte proliferation. Also, PBMT 70 mW and PBMT 300 mW showed a lower cell proliferation when compared to control groups. Thus, it is possible to suggest that the PBMT induced the dosage response answer and only the potency of 150 mW was capable of maintaining the viability and cell proliferation

Keywords: Degenerative Disease; Chondrocytes; Osteoarthritis; LED.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	–	Grau Celsius
AGG	–	Agregan
ANOVA	–	Análise de Variância
ATM	–	Articulação Temporomandibular
ATP	–	Trifosfato de Adenosina
CCO	–	Citocromo C Oxidase
cDNA	–	DNA Complementar
cm ²	–	Centímetro Quadrado
CO ₂	–	Dióxido de Carbono
Col 2	–	Colágeno 2
COX2	–	Ciclooxigenase 2
DMEM	–	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	–	Estados Unidos da América
FBM	–	Fotobiomodulação
HÁ	–	Ácido Hialurônico
IBRAMED	–	Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos
iNOS	–	Óxido Nítrico Sintase Induzida
J	–	Joule
LASER	–	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LBI	–	Laserterapia de Baixa Intensidade
LED	–	Light-Emitting Diode – Diodo Emissor de Luz
LLLTT	–	Low Level LASER Therapy
MA	–	Massachusetts
MEC	–	Matriz Extracelular
MI	–	Mililitros
MMPs	–	Metaloproteinases
mW	–	Mili Watts
nm	–	Nanômetro
OA	–	Osteoartrite
P	–	<0,05

PCR	–	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	–	Ácido Ribonucleico
SFB	–	Soro Fetal Bovino
SP	–	São Paulo
TFBM	–	Terapia por Fotobiomodulação
TGF- β	–	<i>Transforming Growth</i> Fator Beta/Fator de Transformação do Crescimento
μ l	–	Microlitros
W	–	Watt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Condrócitos alojados no interior da matriz de cartilagem hialina	16
Figura 2 – Esquema representativo da TFBM a LED.....	25
Figura 3 – Caracterização dos condrócitos por meio da PCR em tempo real..	28
Figura 4 – Resultados referente a atividade metabólica celular	29
Figura 5 – Resultados da proliferação de condrócitos tratados com TFBM a LED em diferentes potências	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Cartilagem Articular	15
1.2 Osteoartrite.....	18
1.3 Terapia por Fotobiomodulação.....	19
2 HIPÓTESE	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Cultura de Células.....	24
4.2 Terapia por Fotobiomodulação.....	24
4.3 Caracterização dos Condrócitos	25
4.4 Atividade Metabólica Celular	27
4.5 Proliferação Celular	27
4.6 Análise Estatística	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Caracterização dos Condrócitos	28
5.2 Atividade Metabólica Celular	28
5.3 Proliferação Celular.....	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

A cartilagem hialina é o tipo mais abundante de cartilagem no corpo, sendo a responsável pela formação óssea embrionária (ossificação endocondral). Em adultos, pode ser encontrada em cartilagens costais, no sistema respiratório (traqueia) e no revestimento da superfície articular (JOHNSTONE et al., 2013; CARBALLO et al., 2017).

A cartilagem articular é um tecido avascular, sem inervação e é composto por um único tipo celular, o condrócito (DEMOOR et al., 2014). Os condrócitos são células mesenquimais especializadas (AIGNER e STOVE 2003; ULRICH-VINTHER et al., 2003), que ocupam apenas 5% do volume total de tecido da cartilagem articular (DEMOOR et al., 2014). Eles são os responsáveis por sintetizar moléculas da matriz extracelular (MEC), mas, também, estão envolvidos na degradação da MEC, como Metaloproteinases (MMPs) (SHLOPOV et al., 1997; EL-SAYED et al., 2019), hialuronidases (FLANNERY et al., 1998; FENG et al., 2017) e agrecanases (KAPOOR et al., 2011; SADATSUKI et al., 2017). Como resultado, o condrócito regula a homeostase da cartilagem mantendo um equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo (IWAMOTO et al., 2013).

Em condições normais, os condrócitos estão incorporados na MEC e apresentam um metabolismo hipóxico, com os nutrientes e o oxigênio sendo fornecidos às células, principalmente, por difusão do líquido sinovial e osso subcondral. No entanto, qualquer mudança nesse microambiente celular, nas forças biomecânicas ou lesões, que perturbem este equilíbrio homeostático podem resultar no aumento da atividade metabólica dos condrócitos e afetar diretamente a sua funcionalidade (JIMÉNEZ et al., 2018). Consequentemente, eles sofrerão apoptose e a cartilagem será completamente degenerada. A apoptose dos condrócitos está associada ao início e a progressão da degeneração da cartilagem articular (THOMAS et al., 2011).

Diante do exposto, estratégias estão sendo investigadas na tentativa de manter a homeostase e prevenir à apoptose dos condrócitos e, subsequente, degradação da MEC (CARBALLO et al., 2017). Entre essas intervenções, pode-se destacar a Terapia por Fotobiomodulação (TFBM). A TFBM consiste no uso de luz não ionizante, como a Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de

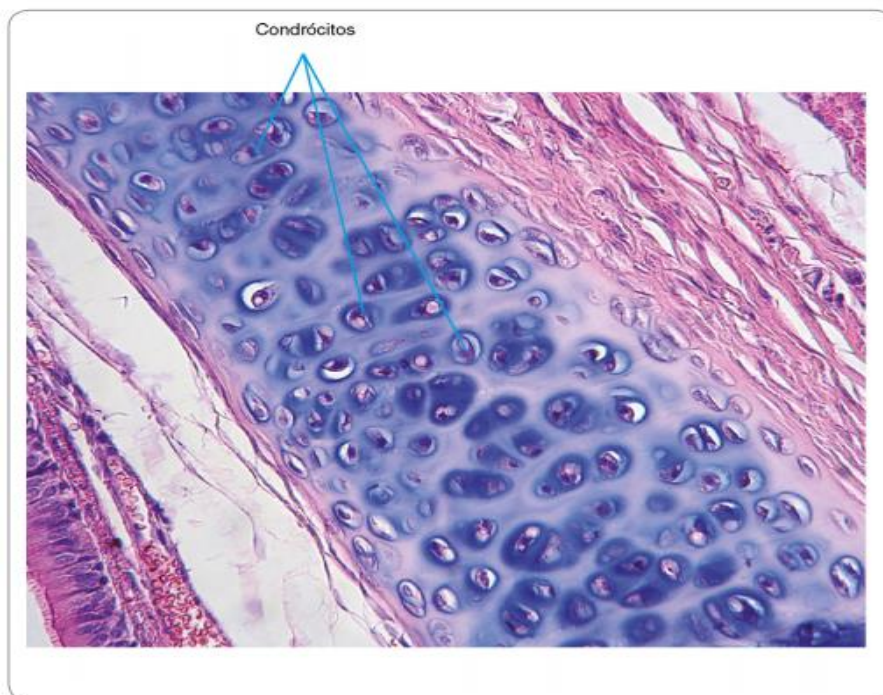
Radiação (LASER) e os Diodos Emissores de Luz (LED), para fins terapêuticos (YEH et al., 2010; ANDERS et al., 2015).

A TFBM estimula o metabolismo mitocondrial, que resulta no aumento de Trifosfato de Adenosina (ATP), de oxigênio molecular e fatores de transcrição que acarretam o aumento da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e proteínas reguladoras do ciclo celular. Essas alterações moleculares aceleram o processo de diferenciação e proliferação celular (KARU 2005; DE FREITA; HAMBLIN 2016). Estudo recente demonstrou que ambas as fontes de luz, LASER e LED, promovem efeitos biológicos semelhantes, no que se relacionam a redução de células inflamatórias; aumento da proliferação de fibroblastos; estímulo da angiogênese; formação de tecidos de granulação e o aumento da síntese de colágeno (CHAVES et al., 2014). Entretanto, o uso do LED tem demonstrado ser uma excelente alternativa de terapia, por diversos fatores, dentre os quais pode-se citar os dispositivos menores, a capacidade de irradiar uma grande área de tecido e, ao mesmo tempo, é um método que possui menor custo (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

1.1 Cartilagem Articular

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo denso e elástico, que recobre a superfície das articulações, constituído por 5% de células, os condrócitos são responsáveis por sintetizar a matriz extracelular (MEC) onde se encontram encapsulados, como demonstrado na figura 1 (DEMOOR et al., 2014). Os condrócitos mantêm a MEC por meio da modulação do equilíbrio entre a síntese e a degradação de seus componentes, pois, sintetizam suas moléculas, mas também, são fatores envolvidos na sua degradação. Como resultado, os condrócitos regulam a homeostase da cartilagem mantendo o equilíbrio entre anabolismo e catabolismo (AIGNER et al., 2006).

Figura 1 – Condrócitos alojados no interior da matriz de cartilagem hialina



Fonte: Arana e Bradaschia (2012, p. 210).

Uma das características estruturais da cartilagem articular é o fato de que ela é rica em matriz extracelular, em que são distribuídos os condrocitos, os quais podem se encontrar isolados ou em grupos clonais que se organizam em pequenas colônias celulares (AMORIN et al., 2012). São esses condrocitos responsáveis pela secreção dos componentes da matriz cartilaginosa (CRUZ et al., 2017).

A MEC é composta, principalmente por água, proteoglicanas e colágeno. Entre os diferentes tipos de colágeno, o Tipo II é a isoforma mais abundante na cartilagem articular, representando 80% de colágeno. As demais isoformas incluem os colágenos Tipos IX e XI (15%) e 5% de outros tipos de colágenos (tipos III, XII, VI, dentre outros) (AIGNER; STÖVE, 2003; ATAYDE, 2011).

Esses colágenos se encontram embebidos em um firme gel hidratado de proteoglicanas. As proteoglicanas são formadas por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanas (GAGs) sulfatadas ligadas a esse núcleo e podem ser encontradas como monômeros ou na forma agregada. O agregado de proteoglicanas é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatadas) com múltiplos monômeros de proteoglicanas ligadas a ele (MELROSE et al., 2008). Ainda, entre as citocinas e os fatores de crescimento

que estão envolvidos na homeostase da cartilagem articular, o fator de crescimento transformador-beta (TGF-beta) é uma molécula importante que desempenha um papel crítico no desenvolvimento, crescimento, manutenção e reparo da cartilagem articular (FINNISON et al., 2012).

A composição e a complexa organização estrutural entre o colágeno e os proteoglicanos garantem as propriedades inerentes à cartilagem articular, como resistência, elasticidade e compressibilidade, necessárias para dissipar e amortecer as forças, além de reduzir a fricção, a que as articulações estão sujeitas, com baixo gasto de energia (MENDES, 2012; DEMOOR et al., 2014).

As mudanças morfológicas na cartilagem articular são influenciadas pelas demandas funcionais do tecido relacionadas à absorção e redistribuição de cargas compressivas, assim, a estrutura da cartilagem articular muda conforme a profundidade a partir da superfície até o osso subcondral (ANGEL et al., 2003; MONTEIRO, 2017). Ainda, podem ocorrer mudanças morfológicas devido a localização da cartilagem.

As células mesenquimais originam a cartilagem, tais células passam por um processo de retração de seus prolongamentos passando a ter uma forma arredondada e, secretam os componentes líquidos e fibrosos da matriz extracelular, formando os primeiros centros de condificação ou centros que formam a cartilagem, ainda na vida embrionária (DI FIORI, 2017). As células se diferenciam e se tornam condroblastos, momento em que secretam matriz em torno de si, possibilitando o afastamento uma das outras. Desse modo, a diferenciação da cartilagem ocorre do centro para a periferia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Essas células apresentam dois tipos de crescimento, o intersticial em que os condrócitos presentes se dividem a partir da mitose e o crescimento aposicional por meio das células do pericôndrio, os condroblastos se tornam em novos condrócitos (MONTEIRO, 2017).

A presença de dois tipos de cartilagem, uma fibrocartilagem na superfície e uma cartilagem hialina abaixo, permitem que a cartilagem condilar se adapte melhor às forças do que as cartilagens primárias. No entanto, quando o tecido é submetido a cargas anormais além da sua capacidade de remodelamento, ocorre um favorecimento das atividades catalíticas, em que o condrócito altera seu estado metabólico e passa a sintetizar enzimas proteolíticas caracterizando

o início de um processo degenerativo, como a osteoartrite (LEROUX et al., 2001; FELICE et al., 2002; MONTEIRO, 2017).

1.2 Osteoartrite

A degeneração do tecido articular é um fator chave na osteoartrite (OA) e é caracterizada pelo remodelamento do osso subcondral, redução do espaço articular e formação de osteófitos e inflamação articular. A OA também acomete outros tecidos como o osso, músculo, sinóvia, e tecidos moles (ligamentos, tendões, e no joelho os meniscos) (GOLDRING, 2000; DA ROSA, 2012). Acometem, em particular, nas articulações do quadril e do joelho, estendendo-se, em menor escala, a outras articulações como ombro, tornozelo e a ATM (WOLFORD et al., 2014).

Independente da articulação acometida, uma vez iniciado o processo degenerativo, os condrócitos começam a proliferar-se e a sintetizar componentes da matriz, enzimas degradantes e citocinas catabólicas, ocasionando a degradação local de proteoglicanas e também a fragmentação do colágeno Tipo II (GOLDRING, 2000; MONTEIRO, 2017). A lesão da cartilagem articular que ocorre na OA parece estar relacionada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α , que atuam de forma conjunta e, são capazes de estimular os condrócitos a produzirem fatores inflamatórios, como a Ciclooxigenase 2 (COX2) (GOLDRING, 2000). Além disso, são capazes de suprimir a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II nos condrócitos, além de estimular os condrócitos a liberar várias enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (GOLDRING; OTERO, 2011).

Assim, além deste desequilíbrio entre o anabolismo e catabolismo dos componentes da MEC na cartilagem articular, ocorre uma alteração no metabolismo do condrócito e este perde sua capacidade de reparar a lesão por intermédio da síntese de colágeno e proteoglicanos. Além disso, o desequilíbrio entre as proteases contribui ainda mais para a progressão dessa doença (PORTH; MATFIN, 2010; KAPOOR, et al., 2011).

Doenças articulares degenerativas, como a OA, têm representado uma das principais causas de incapacidade nos EUA. Estas alterações atingem aproximadamente 6% da população acima dos 30 anos de idade, sendo que em

2030 essa porcentagem deverá atingir 25% da população, tornando-se um problema para a saúde pública (BIJLSMA et al., 2011; WANG et al., 2015). Ainda, a OA está relacionada a elevado custos socioeconômicos referente a gastos diretos com internações e medicações, além de gastos indiretos relacionados ao aumento da morbidade e de sintomas ligados a depressão entre os acometidos (BREEDEVELD, 2004; KOTLARZ et al., 2009).

Diante do exposto e do alto índice de pessoas acometidas com esta patologia, torna-se necessário a investigação de recursos não farmacológicos que atuem de forma não invasiva proporcionando uma melhor qualidade de vida ao paciente. Assim, um método de tratamento promissor é o uso da TFBM (TIMOFEYEV et al., 2001; CHO et al., 2004; CASTRO, 2014).

1.3 Terapia por Fotobiomodulação

Depois da invenção do LASER de rubi em 1960, uma nova terapia chamada Laserterapia de Baixa Intensidade (LLLT) ou “Bioestimulação a LASER” foi utilizado pela primeira vez pelo Médico Húngaro Endre Mester. Desde então, termos foram utilizados para designar a interação da luz com os tecidos biológicos, sendo os mais conhecidos: bioestimulação a LASER, terapia LASER de baixa potência, terapia LASER de baixa intensidade, LASER de baixa energia, fototerapia, fotobioestimulação, terapia a luz, terapia a LASER (KARU 2008).

Depois de décadas com o uso de diferentes nomenclaturas, ocorreram avanços na ciência na área do tratamento com o uso de luz, sendo que se viu a necessidade de utilizar um termo que fosse mais claro e abrangente. Assim, em consenso de pesquisadores da área, optou-se por utilizar fotobiomodulação (FBM), quando se está investigando os efeitos da luz em um processo biológico ou Terapia por Fotobiomodulação (TFBM), quando o estudo se refere ao uso da luz como terapia (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018; HAMBLIN, 2019).

As razões para esta escolha foram o fato de que não houve consenso na literatura a respeito da utilização do termo baixa potência. Ainda, constatou-se que não é necessário usar um LASER monocromático e coerente para obter efeitos biológicos benéficos, pois, diodos emissores de luz (LEDs) não coerentes, com parâmetros comparáveis aos LASERs teriam efeitos similares.

Por fim, que a utilização do LASER, em aplicações, envolvia a inibição de processos biológicos, ao invés da estimulação, assim o termo “modulação” é mais apropriado (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

Diferentes terapias vêm sendo utilizada no tratamento da OA, sendo que às que fazem uso LASER de baixa intensidade vem apresentando resultados positivos, quanto a ação analgésica e anti-inflamatória (OVANESSIAN et al., 2008). O uso desse tipo de terapia tenta reduzir ou evitar efeitos colaterais, que são comumente causados quando pela terapia medicamentosa (JONHSEN et al., 2005; SHEN et al., 2009). Além do LASER o LED enquanto terapia da OA também vem apresentando bons resultados, especialmente, no que se relaciona a redução da dor, angiogênese, efeitos anti-inflamatórios e a regeneração tecidual (CASTRO et al., 2015; LANGELLA et al., 2018), o que aponta para a importância em discutir os benefícios terapêuticos com esses tratamentos menos invasivos.

Pesquisas foram realizadas com o intuito de compreender melhor a interação da luz com os tecidos biológicos. Assim, acredita-se que os fótons emitidos pelo LASER e LED, fontes de luz não ionizante, são absorvidos por cromóforos mitocondriais, contido na cadeia respiratória, o citocromo c oxidase (CCO) que estimulam o transporte de elétrons na mitocondrial iniciando uma série de reações citoplasmáticas ou de membrana celular (AVCI et al., 2013; HEISKANEN; HAMBLIN, 2018), que levam a alterações no potencial da membrana, consumo de O₂ e síntese de DNA e RNA (PRINDEZE et al., 2012). Essas alterações moleculares aceleram o processo de diferenciação e proliferação celular (GUPTA et al., 2014), e aumentam a síntese de proteínas (VLADIMIROV et al., 2004), levando aos principais efeitos terapêuticos da TFBM: analgésico, modulador de processos inflamatórios e reparo tecidual (KARU; KOLYAKOV 2005; DE FREITAS; HAMBLIN 2016).

Com base nos efeitos da TFBM acima mencionados, esta modalidade terapêutica tem sido usada no tratamento de disfunções de diversos tecidos como nervos (ROSSO et al., 2018), músculos e ossos (TIM et al., 2016), cutâneo (MARTIGNAGO et al., 2019). Ainda, a TFBM vem ganhando espaço no tratamento de doenças do tecido cartilaginoso (ASSIS et al., 2018; SANCHES et al., 2018). Estudos realizados em culturas de condrócitos demonstraram que a TFBM a LASER é capaz de estimular a proliferação celular e a biossíntese de

matriz extracelular (TORRICELI et al., 2001; JIA; GUO, 2004). Além disso, utilizando um modelo experimental de OA induzida por injeção intra-articular de solução de papaína em joelho de coelhos (LIN et al., 2004), observaram que a TFBM a LASER promoveu o aumento da síntese de proteínas que previnem apoptose celular de condrócitos na cartilagem articular.

Ainda, outros autores evidenciaram que a TFBM a LASER promove uma série de modificações metabólicas e estruturais na cartilagem articular, tais como, aumento da síntese de proteoglicanas (GOTTLIEB et al., 2006) e mucopolissacarídeo (sulfato de condroitina) (LIN et al., 2006) e melhor organização de condrócitos e fibras de colágeno (CALATRAVA et al., 1997; GUERINO et al., 2000). Essas modificações são responsáveis por uma melhora na organização estrutural do tecido articular, o que poderia amenizar o processo degenerativo em curso (OLIVEIRA et al., 2013).

2 HIPÓTESE

Apesar dos efeitos positivos da TFBM a LASER evidenciados pelos estudos supracitados, existe uma grande lacuna na literatura em estudos que avaliem a eficácia da TFBM a LED no tecido cartilaginoso. Assim, foi levantada a hipótese de que a utilização da TFBM a LED poderia aumentar a viabilidade e proliferação dos condrócitos, e assim ser efetiva no tratamento do tecido articular em degeneração.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da TFBM a LED em cultura de condrócitos extraídos da cartilagem articular de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos da TFBM a LED na viabilidade de condrócitos;
- Avaliar a proliferação de condrócitos tratados com a TFBM a LED em diferentes potências.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de Células

Condrócitos foram obtidos a partir da cartilagem femoral de 4 ratos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*) da linhagem wistar, machos com 4 semanas de idade. Para o isolamento dos condrócitos, pedaços da cartilagem femoral foram incubados em colagenase tipo I a 0,25% em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Vitrocell), overnight a 37°C em 5% de CO₂. As células foram então semeadas em frascos de cultura de tecidos para expansão e mantidas como monocamadas subconfluentes em DMEM.

Para o experimento os condrócitos foram semeados a uma densidade de 5.10⁴ células/0,75 cm² com o meio de cultura de células trocado a cada 2 dias, e as células foram cultivadas durante 72 horas. Todos os procedimentos de cultura de tecidos foram realizados sob condições assépticas rigorosas em um fluxo de segurança biológica.

As células foram divididas em 4 grupos:

- Controle: as células foram cultivadas apenas com o meio DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB), sem nenhuma intervenção.
- TFBM 70 mW: as células foram cultivadas com o meio DMEM suplementado com SFB e tratadas utilizando um LED com potência de 70 mW;
- TFBM 150 mW: as células foram cultivadas com o meio DMEM suplementado com SFB e foram tratadas utilizando um LED com potência de 150 mW;
- TFBM 300 mW: as células foram cultivadas com o meio DMEM suplementado com SFB e tratadas utilizando um LED com potência de 300 mW.

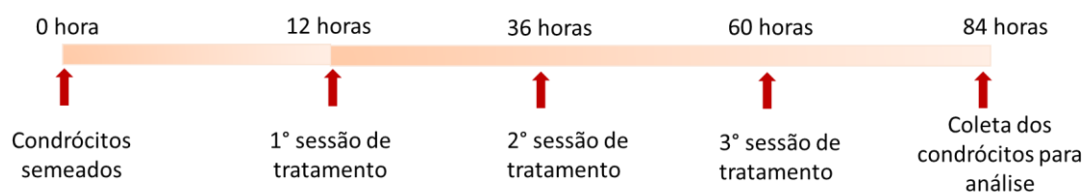
4.2 Terapia por Fotobiomodulação

A TFBM a LED foi realizada utilizando um aparelho de diodo emissor de luz Antares® (Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos (IBRAMED), Amparo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 850 nm, feixe contínuo, área do feixe 0,5 cm² de com uma potência de 70 mW com 86 segundos e potência de 150 mW com 40 segundos de aplicação, potência de 300 mW com 20

segundos de aplicação, todos os grupos tiveram a energia de 6 J, sendo que o tempo foi ajustado para manter essa densidade de energia.

As irradiações iniciaram 12 horas após as células serem semeadas e foram expostas à irradiação LED a cada 24 horas totalizando 3 sessões. A aplicação da TFBM a LED foi realizada dentro de fluxo de segurança biológica, a caneta LED em contato direto em cima da placa em um único ponto. Vinte e quatro horas após a última irradiação, as células foram avaliadas.

Figura 2 – Esquema representativo da TFBM a LED



Fonte: autor

4.3 Caracterização dos Condrocitos

Para garantir o fenótipo dos condrocitos extraídos da cartilagem femoral de ratos foi empregada a caracterização da célula por intermédio da técnica de PCR em tempo real.

Para isso o RNA total foi isolado a partir das células usando o reagente TRIzol (Invitrogen) (n = 5 por grupo) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, após a remoção do meio de cultura, 1 mL de reagente TRIzol foi adicionado a cada poço. Na sequência, foi realizada a centrifugação das amostras a 12000 x g por 1 minuto (4°C), transferência do sobrenadante para um novo microtubo e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) seguido de agitação vigorosa e incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi realizada a centrifugação por 15 minutos a 12000 x g (4°C) e transferência da fase aquosa superior (contendo a fração de RNA) para um novo microtubo. Por fim, foram adicionados 450 µL de isopropanol para precipitação do RNA total e o material foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g (4°C) e os precipitados foram

lavados com 1000 μL de etanol 75%. Para ressuspender o RNA total precipitado foi utilizado água livre de RNase e a concentração e a pureza determinadas utilizando o NanoDrop (ND-2000; Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras de RNA com razão A260 / A280 $<1,8$ foram excluídos.

O RNA total extraído foi purificado com o uso do Turbo DNase (Life Technologies, Carlsbad, USA) seguindo instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0 μg), utilizando High-capacityc DNA Reverse Transcription (Life Technologies, Carlsbad, USA), seguindo normas do fabricante. O cDNA foi submetido a PCR em tempo real quantitativo utilizando o termociclador Applied Biosystems Step One TM Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA). A reação de PCR em tempo real foi padronizada para os primers β actina, usado como controle interno; fator de transformação do crescimento beta (TGF β), Agregan (Agg), Colágeno 2 (Col 2) e ácido hialurônico (HA). A programação constituiu de uma desnaturação inicial 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 45 segundos. Controles negativos foram incluídos em cada corrida, foi amplificado simultaneamente em duplicata. A análise de expressão gênica relativa foi realizada utilizando o método 2- $\Delta\Delta\text{CT}$. O gene β actina foi utilizado como constitutivo para normalizar os dados de expressão.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica rotineira e amplamente utilizada nos laboratórios na atualidade, que permitiu a revolução do processo de detectar RNA e DNA (OLIVEIRA, 2010).

Tabela 1 – Sequências de primers utilizados na PCR em tempo real

Gene	Forward primer	Reverse primer
β actina	CCACCAACTGCTTAGCCC	GCCAAATTCGTTGTCATACC
Col2	GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA
TGF β	ATCCTTCGAGGAGCACTTGGAG	TAGCAGCAGATATAAGAAGGCGATT
HÁ	GCCATCTGCTACACAGGTGA	AAAGGCTCCTCAGGTTCTGG
Agg	GGAGACATCCTCAAGCGATGC	AGCACCTGGTAAATCGGATTG

4.4 Atividade Metabólica Celular

A atividade metabólica das células foi avaliada usando Alamar Blue® (Invitrogen, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 1 mL de meio de cultura contendo Alamar Blue® a 10% foi adicionada, então a placa foi incubada durante 4 horas a 37 °C em uma incubadora de cultura de células a 5% CO₂. Subsequentemente, 200 µl de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços (em duplicados). Finalmente, a placa foi lida em um espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments, Winooski, Estados Unidos da América) a 570 nm.

4.5 Proliferação Celular

A proliferação celular foi determinada por quantificação de DNA (kit de quantificação QuantiFluor® DNAcd; Promega, Leiden, Países Baixos). Após o período experimental, os condrócitos foram lavados com solução Phosphate Buffered Saline (PBS), homogeneizados em 1 mL de água Milli-Q, congelados e descongelados duas vezes antes da análise. Em seguida, 100 µl da amostra de DNA ou padrão foi incubado com 100 µl da solução de trabalho no escuro durante 10 minutos. Finalmente, as amostras foram lidas em um espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments) a 530 nm.

4.6 Análise Estatística

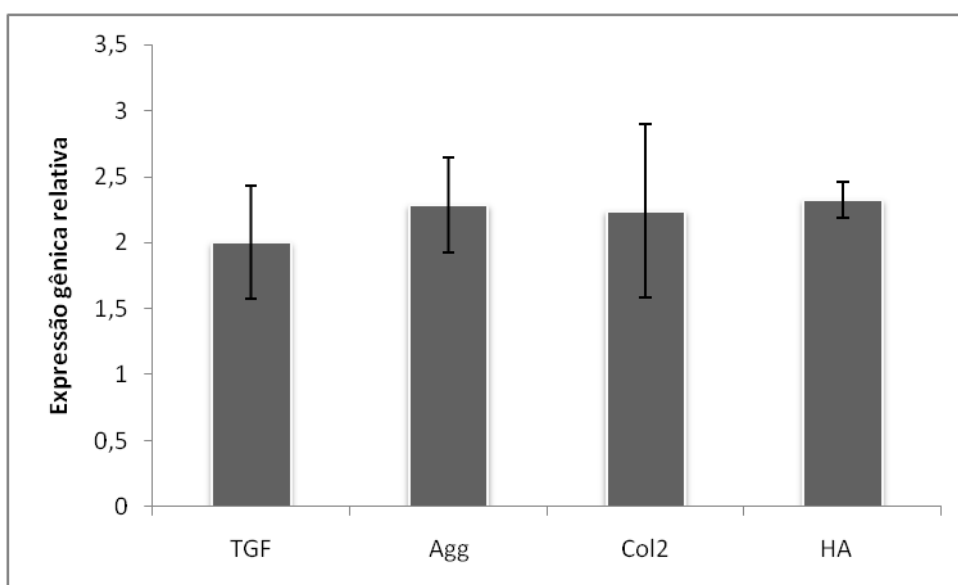
A normalidade de distribuição de todas as variáveis foi verificada por Teste W de Shapiro-Wilk. Comparações entre grupos com foram realizadas usando (ANOVA) One-Way com *pos hoc* de *tukey*, todos os dados foram paramétricos. GraphPrism software foi usado para realizar a análise estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos Condrócitos

Durante o experimento, a cultura celular foi controlada para confirmar o fenótipo dos condrócitos. A observação em microscópio de luz comum não demonstrou anormalidades na morfologia de condrócitos e nem sinais de dano celular. Ainda, os resultados da expressão gênica, das células obtidas a partir dos fragmentos de cartilagem femoral, demonstram que estas células foram capazes de expressar Col 2, TGF- β , Agg, e HA o que caracteriza as células utilizadas como condrócitos (figura 3).

Figura 3 – Caracterização dos condrócitos por meio da PCR em tempo real



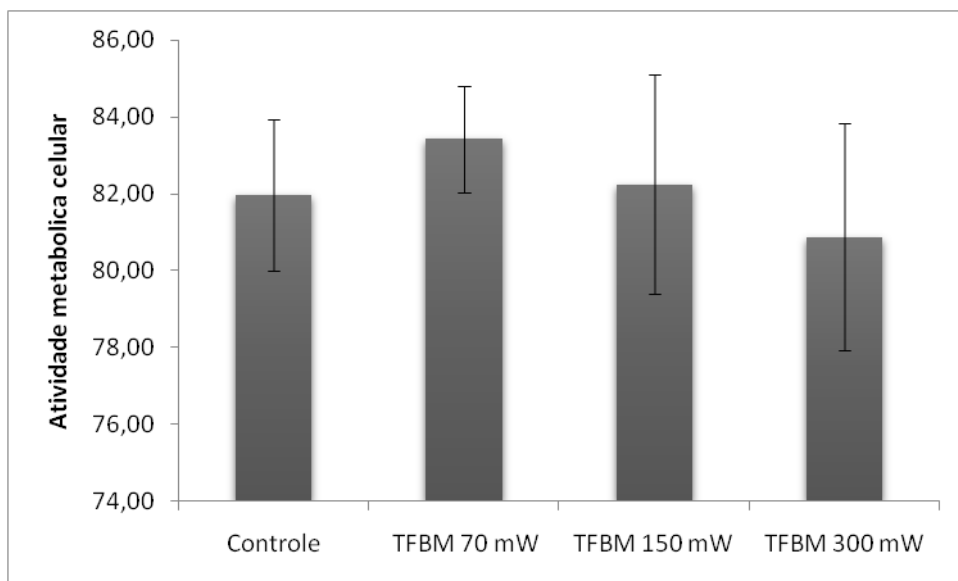
Fator de Transformação do Crescimento (TGF- β); Agregan (Agg); Colágeno 2 (Col 2); Ácido Hialurônico (HA).

Fonte: Autor

5.2 Atividade Metabólica Celular

A figura 4 demonstra a atividade metabólica dos condrócitos. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 4 – Resultados referente a atividade metabólica celular



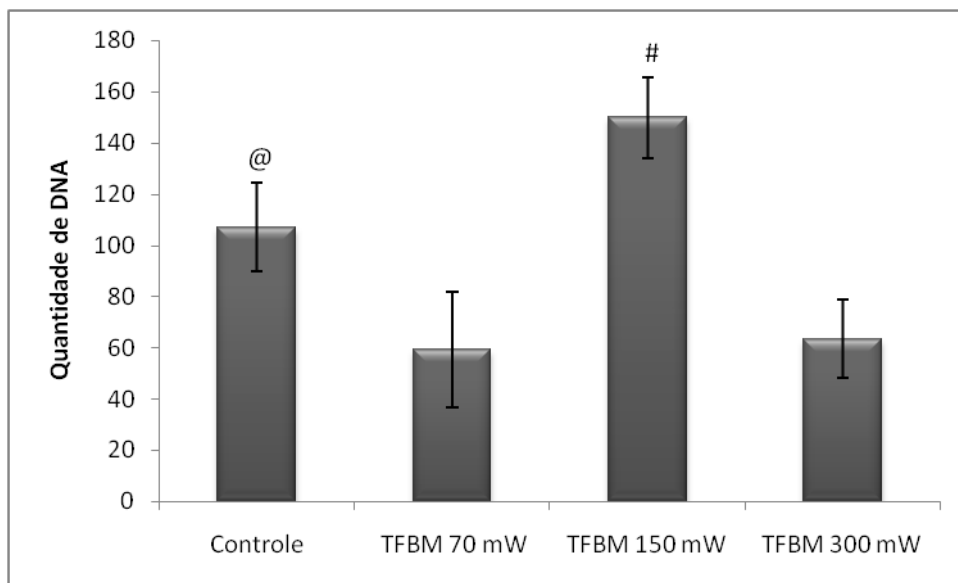
Controle (células que não receberam nenhum tratamento); TFBM 70 mW (células que foram tratadas com a TFBM a LED na potência de 70 mW); TFBM 150 mW (células que foram tratadas com a TFBM a LED na potência de 150 mW); TFBM 300 mW (células que foram tratadas com a TFBM a LED na potência de 300 mW).

Fonte: Autor

5.3 Proliferação Celular

A proliferação dos condrócitos demonstrou que o grupo TFBM 150 mW teve um aumento estatisticamente significativo quando comparados aos outros grupos (controle, TFBM 70 mW, TFBM 300 mW). Ainda, foi observado que os grupos TFBM 70 mW e 300 mW apresentaram proliferação celular estatisticamente menor quando comparado ao grupo controle (Figura 5).

Figura 5 – Resultados da proliferação de condrócitos tratados com TFBM a LED em diferentes potências



Controle (células que não receberam nenhum tratamento); TFBM 70 mW (células que foram tratadas com a TFBM a LED na potência de 70 mW); TFBM 150 mW (células que foram tratadas com a TFBM a LED na potência de 150 mW); TFBM 300 mW (células que foram tratadas com a TFBM a LED na potência de 300 mW). @ vs TFBM 70 mW e TFBM 300 mW; # vs controle, TFBM 70 mW e TFBM 300 mW.

Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

O tecido articular tem seu auto-reparo limitado devido a capacidade restrita dos condrócitos para produzir uma quantidade suficiente de MEC. Assim, a cicatrização do tecido cartilaginoso em degeneração é um propósito importante, sendo assim, terapias capazes de melhorar a regeneração da cartilagem despertam grande interesse, pois é de conhecimento que este tecido não cicatriza completamente e espontaneamente após lesões ou processos degenerativos. Diante do exposto, muitos autores têm investigado os efeitos da fotobiomodulação no tratamento da cartilagem articular em degeneração (ASSIS et al., 2018; SANCHES et al., 2018).

É sabido que os efeitos da TFBM dependem da absorção de fótons por cromóforos dentro das células. Estes efeitos podem ser influenciados por parâmetros de utilização da TFBM tais como comprimento de onda, potência, energia, densidade de energia, modo de irradiação, dentre outras. Sabe-se que a TFBM tem a capacidade de estimular ou inibir, ou seja, modular vários processos biológicos tais como a inflamação, expressão de genes e proteínas, fatores de crescimento e atividades metabólicas celulares (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; HAMBLIN 2019).

O presente estudo demonstrou que a TFBM a LED promoveu a viabilidade das células em todas as potências utilizadas. Ainda, pode-se observar o efeito dose resposta da TFBM a LED, na qual apenas a potência de 150 mW foi capaz de aumentar a proliferação dos condrócitos. Da mesma forma, Jia e Guo (2004) demonstraram efeito dose resposta utilizando a TFBM em diferentes potências na proliferação de condrócitos. Para o estudo foi aplicado a TFBM a LASER 632,8 nm, tempo de aplicação 6,5 minutos, potências de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 mW, densidade de energia 1, 2, 3, 4, 5 e 6 J/cm² e energias de 0,78 J, 1,56 J, 2,34 J, 3,12 J, 3,9 J, 4,68 J (calculada segundo dados do artigo). Os resultados demonstraram que a proliferação de condrócitos foi dependente da densidade de energia utilizada durante a TFBM a LASER. Assim, apenas quando foi usado 4, 5 ou 6 J/cm² a TFBM a LASER foi capaz de promover o aumento da proliferação de condrócitos. Ainda, quando os autores compararam apenas estes parâmetros observaram que 6 J/cm² apresentou crescimento celular menor quando comparado com a irradiação com 4 e 5 J/cm². No entanto, a

proliferação celular irradiada com 4 e 5 J/cm² demonstraram proliferação celular similar. Assim, os autores concluíram que a TFBM a LASER nestas duas doses (4 e 5 J/cm²) são as ideais para a utilização da TFBM a LASER na proliferação de condrócitos.

Similarmente, Torriceli et al. (2001) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar o efeito da TFBM em células da cartilagem. Os autores utilizaram LASER no comprimento de onda de 780 nm, pulsado 100 ou 300 Hz, 10 minutos de tratamento por 5 dias. Os resultados indicaram que a TFBM a LASER foi capaz de promover a viabilidade e proliferação dos condrócitos. Os efeitos específicos da TFBM a LED nos condrócitos ainda não foram investigados. No entanto, Oshima et al. (2011) investigaram os efeitos da associação da TFBM a LED nos comprimentos de onda de 630 nm e 870 nm, tempo de aplicação de 10 min por dia, 5 dias por semana, durante 5 semanas. O estudo demonstrou que nos animais que utilizaram a TFBM a LED, a superfície da cartilagem estava preservada macroscopicamente. Ainda, observaram que a terapia foi capaz em aumentar a expressão de mRNA de colágeno tipo II, principal constituinte da matriz extracelular no tecido cartilaginoso. Por outro lado, existe uma vasta literatura demonstrando os efeitos da TFBM a LASER no tratamento de osteoartrite tanto *in vivo* (DA ROSA et al., 2012; SANCHES et al., 2018; ABUBAKR et al., 2018) como estudo clínico (HUANG et al., 2015; RAYEGANI et al., 2017; VASSÃO et al., 2019).

Diante do exposto, um efeito de bioestimulação da TFBM sobre condrócitos articulares é claramente discernível e os resultados obtidos neste estudo são promissores, uma vez que a TFBM a LED utilizada neste estudo foi capaz de manter a viabilidade e estimular a proliferação de condrócitos. No entanto, esses achados são adquiridos apenas a partir de células animais e são necessárias mais pesquisas laboratoriais para entender os mecanismos que levam à a estimulação desta linha celular. Embora ainda seja necessário examinar os mecanismos de ação, bem como as condições ideais para aplicação da TFBM a LED na cartilagem articular, os resultados podem sugerir haver uma capacidade de estimular a regeneração da cartilagem articular com a TFBM a LED. Portanto, esse tratamento pode ser uma alternativa promissora de procedimento não invasivo para tratar o tecido articular em degeneração.

7 CONCLUSÃO

Assim, sobre a utilização da TFBM a LED concluiu-se que:

- A TFBM a LED nas potências de 70, 150 e 300 mW foram capazes de manter a viabilidade celular;
- Apenas a TFBM a LED na potência 150 mW conseguiu promover a proliferação de condrócitos;
- Pode-se sugerir que a TFBM a LED na potência de 150 mW é a dose ideal para estimular a proliferação de condrócitos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKR, N.; SALEM, Z.; ALI, Z.; ASSALY, M. E. Comparative evaluation of the early effects of the low-level LASER therapy versus intra-articular steroids on temporomandibular joint acute osteoarthritis in rats: A histochemical, molecular and imaging evaluation. **Dent Med Probl.** 55(4):359-366, 2018.

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

AIGNER, T.; STÖVE, J. Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 55:1569–1593, 2003.

AMORIN, B.; VALIM, V. S.; LEMOS, N. E.; MORAES JÚNIOR, L.; SILVA, A. M. P.; SILVA, M. A. L. Mesenchymal stem cells – Characterization, cultivation, immunological properties, and clinical applications. **Rev HCPA Fac Med Univ Fed Rio Gd do Sul.** 32(1):71-81, 2012.

ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/LASER therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomed. LASER Surg.** 33(4):183-184, 2015.

ANGEL, J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. Defining the challenge: the basic science of articular cartilage repairs and response injury. **Spo Me Arthrose Rev.** 11(3):168-18, 2003.

ARANA, V.; BRADASCHIA, V. **Biologia celular e tecidual para odontologia: moléculas, células e tecidos.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ASSIS, L.; TIM, C.; MAGRI, A.; FERNANDES, K. R.; VASSÃO, P. G.; RENNO, A. C. M. Interleukin-10 and collagen type II immunoexpression are modulated by photobiomodulation associated to aerobic and aquatic exercises in an experimental model of osteoarthritis. **LASERs Med Sci.** 33(9):1875-1882, Dec. 2018.

ATAYDE, S. A. **Estudo da histoarquitetura do colágeno da cartilagem, ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes *mellitus*.** (Tese de Doutorado em Ciências Médicas). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5164/tde-23022012-140632/publico/SandraAparecidaAtayde.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2019.

AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN M.R. Low-level LASER (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg.** 32(1):41-52, 2013.

BIJLSMA, J. W. J.; BERENBAUM, F.; LAFEBER, F. P. J. G. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. **Lancet**. 377:2115-26, 2011.

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

CALATRAVA, I. R.; VALENZUELA, J. M. S.; VILLAMANDOS, R. J. G. Histological and clinical responses of articular cartilage to low-level LASER therapy: Experimental study. **LASERs med sci**. 12:117-2, 1997.

CARBALLO, C. B.; NAKAGAWA, Y.; SEKIYA, I.; RODEO, S. A. Basic science of articular cartilage. **Clin Sports Med**. 36(3):413-425, 2017.

CASTRO, I. C. V. de. **Avaliação da utilização das fototerapias LASER (λ 780 nm) e LED (λ 850 \pm 10 nm) no processo inflamatório induzido por carragenina na articulação temporomandibular de rato**. (Tese de Doutorado em Odontologia). Salvador-Bahia: Universidade Federal da Bahia, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/20781/1/Tese_ODONTO_%20Isabele%20Cardoso%20Vieira%20de%20Castro.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2019.

CASTRO, I. C.; ROSA, C. B.; CARVALHO, C. M.; ARAGÃO, J. S.; CANGUSSU, M. C.; DOS SANTOS, J. N.; DOS SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. Assessment of different energy delivery settings in LASER and LED phototherapies in the inflammatory process of rat's TMJ induced by carrageenan. **Lasers Med Sci**. 30(8): 2105-13, 2015.

CHAVES, M. E. de A.; PIANCASTELLI, A. C. C.; ARAÚJO, A. R. de; PINOTTI, M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER X LED. **An Bras Dermatol**. 89(4):616-23, 2014.

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

CRUZ, I. B. M. da; SEVERO, A. L.; AZZOLIN, V. F.; GARCIA, L. F. M.; KUHN, A.; LECH, O. Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios. **Rev Bras Ortop**. 52(1):2-10, 2017.

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

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**. 22(3), 2016.

DEMOOR, M.; OLLITRAULT, D.; GOMEZ-LEDUC, T.; BOUYOUCHEF, M.; HERVIEU, M.; FABRE, H.; GALERA, P. Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1840(8): 2414-2440, 2014.

DI FIORE, J. H. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2017.

EL-SAYED, M. E.; ASMAA, K. F.; SAMAR, E. S. The role of matrix metalloproteinases in osteoarthritis pathogenesis: an updated review. **Life Sci.** 22 de ago. 2019. doi: 10.1016 / j.lfs.2019.116786.

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

FENG, Q., LIN, S.; ZHANG, K.; DONG, C.; WU, T.; HUANG, H.; YAN, X.; ZHANG, L.; LI, G.; BIAN, L. Sulfated hyaluronic acid hydrogels with retarded degradation and enhanced growth factor retention promote hMSC chondrogenesis and articular cartilage integrity with reduced hypertrophy. **Acta Biomater.** 2017 Apr 15;53:329-342, abr. 2017.

FINNISON, K. W.; CHI, Y.; BOU-GHARIOS, G.; LEASK, A.; PHILIP, A. TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. **Front Biosci (Schol Ed)**. 1;4:251-68, 2012.

FLANNERY, C.R.; LITTLE, C. B.; HUGHES, C. E.; CATERSON, B. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 251:824-829, 1998.

GOLDRING, M. B. The role of chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis Rheumatism**. 43(9):1916-26, 2000.

GOLDRING, M. B.; OTERO, M. Inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**. 23(5): 471-8, 2011.

GOTTLIEB, T.; JORGENSEN, B.; ROHDE, E. The influence of irradiation low-level diode LASER on the proteoglycan content in arthrotically cartilage in rabbits. **Medical LASER application**. 21:53-59, 2006.

GUERINO, M. R.; BARANAUSKAS, V.; GUERINO, A. C.; PARIZOTTO, N. LASER treatment of experimentally-induced chronic arthritis. **Appl Surf Sci**. 154:561-564, 2000.

GUPTA, A.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level LASER (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. **Lasers Med Sci**. 29(1):257-265, 2014.

HAMBLIN, M. R. How to write a good photobiomodulation article. **Photobiomodulation, Photomedicine, and LASER Surgery**. 37(6):325-326, 2019.

HEISKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: LASERs vs. light emitting diodes? **Photochemical & Photobiological Sciences**. 17(8):1003-1017, 2018.

HUANG, Z.; CHEN, J.; MA, J.; SHEN, B.; PEI, F.; KRAUS, V. B. Effectiveness of low-level LASER therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. **Osteoarthritis Cartilage**. 23(9):1437-1444, 2015.

IWAMOTO, M.; OHTA, Y.; LARMOUR, C.; ENOMOTO-IWAMOTO, M. Toward regeneration of articular cartilage. **Birth Defects Res C Embryo Today**. 99:192-202, 2013.

JIA, Y. L.; GUO, Z. Y. Effect of low-power He-Ne LASER irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. **LASERs Surg Med**. 34(4):323-8, 2004.

JIMÉNEZ, G.; COBO-MOLINOS, J.; ANTICH, C.; LÓPEZ-RUIZ, E. Osteoarthritis: Trauma vs Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 63-83, 2018.

JOHNSTONE, B.; ALINI, M.; CUCCHIARINI, M. et al. Tissue engineering for articular cartilage repair-the state of the art. **Eur Cell Mater**. 25:248-67, 2013.

JOHNSEN, S. P.; LARSSON, H.; TARRONE, R. E.; MCLAUGHLIN, J. K.; FRIIS, S.; SORENSEN, H. T. et al. Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs: a population-based case-control study. **Arch Intern Med**. 165(9):978-84, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**. 7(1):33-42, 2011.

KARU, T. I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **J. Photochem. Photobiol.** 81(2), 98-106, 2005.

KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol.** 84:1091-1099, 2008.

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed LASER Surg**. 23:355-361, 2005.

KOTLARZ, H.; GUNNARSSON, C. L.; FANG, H.; RIZZO, J. A. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: evidence from national survey data. **Arthritis Rheum.** 60(12):3546-53, 2009.

LANGELLA, L. G.; SILVA, P. F. C.; COSTA-SANTOS, L.; GONÇALVES, M. L. L.; MOTTA, L. J.; DEANA, A. M.; FERNANDES, K. P. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; BUSSADORI, S. K. Photobiomodulation versus light-emitting diode (LED) therapy in the treatment of temporomandibular disorder: study protocol for a randomized, controlled clinical trial. **Trials.** 19(1): 71, 2018.

LEROUX, M. A.; CHEUNG, H. S.; BAU, J. L.; et al. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. **Osteoarthritis Cartilage.** 9:633-40, 2001.

LIN, Y. S.; HUANG, M. H.; CHAI, C. Y.; YANG, R. C. Effects of Helium-neon LASER on Levels of Stress Protein and Arthritic Histopathology in Experimental Osteoarthritis. **Am J Phys Med Rehabil.** 83(10):758-65, 2004.

LIN, Y. S.; HUANG, M. H.; CHAI, C. Y. Effects of helium-neon LASER on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage.** 14(4):377-83, 2006.

MARTIGNAGO, C. C. S.; TIM, C. R.; ASSIS, L.; DA SILVA, V. R.; SANTOS, E. C. B. D.; VIEIRA, F. N.; PARIZOTTO, N. A.; LIEBANO, R. E. Effects of red and near-infrared LED light therapy on full-thickness skin graft in rats. **Lasers Med Sci.** 5 Jun. 2019.

MELROSE, J.; FULLER, E. S.; ROUGHLEY, P. J.; SMITH, M. M.; KERR, B.; HUGHES, C. E.; CATERSON, B.; LITTLE, C. B. Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. **Arthritis Res Ther.** 10(4):R79, 2008.

MENDES, A. G. **Abordagem terapêutica da patologia inflamatória da articulação temporomandibular.** (Dissertação de Mestrado em Medicina Dentária). Porto-Portugal: Universidade Fernando Pessoa, 2012. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3793/3/PPG_AndreiaMendes.pdf>. Acesso em: 02 maio 2018.

MONTEIRO, P. A. **Histologia e embriologia comparada.** Londrina-Paraná: Editora e Distribuidora Educacional, 2017.

OLIVEIRA, P.; SANTOS, A. A.; RODRIGUES, T.; TIM, C. R.; PINTO, K. Z.; MAGRI, A. M.; FERNANDES, K. R.; MATTIELLO, S. M.; PARIZOTTO, N. A.; ANIBAL, F. F.; RENNÓ, A. C. Effects of phototherapy on cartilage structure and inflammatory markers in an experimental model of osteoarthritis. **J. Biomed Opt.** 18(12): 128004, dec. 2013.

OLIVEIRA, T. M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

OSHIMA, Y.; COUTTS, R. D.; BADLANI, N. M.; HEALEY, R. M. KUBO, T.; AMIEL, D. Effect of light-emitting diode (LED) therapy on the development of osteoarthritis (OA) in a rabbit model. **Biomed Pharmacother.** 65(3):224-229, 2011.

OVANESSIAN, V.; CAZARINI JÚNIOR, C.; CUNHA, R. A.; CARVALHO, N. A. A.; FUKUDA, T. Y. Use of different doses of pulsed short waves in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee. **Rev Ciências Med (PUCCAMP).** 17:149-55, 2008.

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

PRINDEZE, N. J.; MOFFATT, L. T.; SHUPP, J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Exp Biol Med.** 237:1241-1248, 2012.

RAYEGANI, S. M.; RAEISSADAT, S. A.; HEIDARI, S.; MORADI-JOO, M. Safety and Effectiveness of Low-Level LASER Therapy in Patients With Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Lasers Med Sci.** 8(1):S12-S19 2017.

ROSSO, M. P. O.; BUCHAIM, D. V.; KAWANO, N.; FURLANETTE, G.; POMINI, K. T.; BUCHAIM, R. L. Photobiomodulation Therapy (PBMT) in Peripheral nerve regeneration: a systematic review. **Bioengineering (Basel).** 5(2), jun. 2018.

SADATSUKI, R.; KANEKO, H.; KINOSHITA, M.; FUTAMI, I.; NONAKA, R.; CULLEY, K. L.; OTERO, M.; HADA, S.; GOLDRING, M. B.; YAMADA, Y.; KANEKO, K.; ARIKAWA-HIRASAWA, E.; ISHIJIMA, M. Perlecan is required for the chondrogenic differentiation of synovial mesenchymal cells through regulation of Sox9 gene expression. **J Orthop Res.** 35(4):837-846, 2017.

SANCHES M.; ASSIS, L.; CRINITI, C.; FERNANDES, D.; TIM, C.; RENNO, A. C. M. Chondroitin sulfate and glucosamine sulfate associated to photobiomodulation prevents degenerative morphological changes in an experimental model of osteoarthritis in rats. **Lasers Med Sci.** 33(3):549-557, 2018.

SHEN, X.; ZHAO, L.; DING, G.; TAN, M.; GAO, J.; WANG, L.; et al. Effect of combined LASER acupuncture on knee osteoarthritis: a pilot study. **Lasers Med Sci.** 24(2):129-36, 2009.

SHLOPOV, B. V.; LIE, W. R.; MAINARDI, C. L.; COLE, A. A.; CHUBINSKAYA, S.; HASTY, K. A. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. **Arthritis Rheum.** 40: 2065–2074, 1997.

THOMAS, C. M.; FULLER, C. J.; WHITTLES, C. E.; SHARIF, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. **Int J. Rheum Dis.** 14(2): 191-8, 2011.

TIM, C. R.; BOSSINI, P. S.; KIDO, H. W.; MALAVAZI, I.; VON ZESKA KRESS M. R.; CARAZZOLLE, M. F.; RENNO, A. C.; PARIZOTTO, N. A. Effects of low level LASER therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. **J Biomed Opt.** 21(8):88001, 2016.

TIMOFEYEV, V.T.; PORYADIN, G.V.; GOLOVIZNIN, M.V. LASER irradiation as a potential pathogenetic method for immunocorrection in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology.** 8(1):35-40, 2001.

TORRICELLI, P.; GIAVARESI, M. F.; GUZZARDELLA, G. A.; MORRONE, G.; CARPI, A.; GIARDINO, R. LASER biostimulation of cartilage: in vitro evaluation. **Biomed Pharmacother.** 55(2):117-20, 2001.

ULRICH-VINTHER, M.; MALONEY, M. D.; SCHWARZ, E. M. et al. Articular cartilage biology. **J Am Acad Orthop Surg.** 11(6):421-30, 2003.

VASSÃO, P. G.; DE SOUZA, M. C.; SILVA, B. A.; JUNQUEIRA, R. G.; DE CAMARGO, M. R.; DOURADO, V. Z.; TUCCI, H. T.; RENNO, A. C.; Photobiomodulation via a cluster device associated with a physical exercise program in the level of pain and muscle strength in middle-aged and older women with knee osteoarthritis: a randomized placebo-controlled trial. **Lasers Med Sci.** 2019 May 29. doi: 10.1007/s10103-019-02807-3.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of LASER radiation. **Biochem.** 69:81-90, 2004.

WANG, S. Z.; CHANG, Q.; KONG, X. F.; WANG, C. The chondrogenic induction potential for bone marrow-derived stem cells between autologous platelet-rich plasma and common chondrogenic induction agents: a preliminary comparative study. **Stem Cells Int.** 2015:589124, 2015.

WOLFORD, L. M.; MOVAHED, R.; PEREZ, D. E. A classification system for conditions causing condylar hyperplasia. **J. Oral Maxillofac. Surg. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.** 72(3): 567-95, 2014.

YEH, N. G.; WU, C.; CHENG, T. C. Light-emitting diodes - their potential in biomedical applications. **Renew Sust Energ Rev.** 14:2161-6, 2010.