

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FISIOTERAPIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FÍSICO-
FUNCIONAL

Thais Fraga Abduch

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM METALOPROTEINASES E SEU
REGULADOR NA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE CAMUNDONGOS**

Juiz de Fora

2019

Thais Fraga Abduch

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM METALOPROTEINASES E SEU
REGULADOR NA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia: Mestrado em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional, da Faculdade de Fisioterapia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito a obtenção do título de Mestre Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional.

Orientadora: PhD. Prof^a. Dra. Flávia de Paoli - UFJF

Juiz de Fora

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Abduch, Thais Fraga.

Efeitos da fotobiomodulação em metaloproteinases e seu regulador na articulação talocrural de camundongos / Thais Fraga Abduch. -- 2019.

51 f. : il.

Orientadora: Flávia de Paoli

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Fisioterapia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico Funcional, 2019.

1. Fotobiomodulação. 2. Laser de baixa potência. 3. Matriz extracelular. 4. Metaloproteinase. 5. TIMP. I. Paoli, Flávia de, orient.

II. Título.

Thais Fraga Abduch

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO EM METALOPROTEINASES E SEU
REGULADOR NA ARTICULAÇÃO TALOCRURAL DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia: Mestrado em Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional, da Faculdade de Fisioterapia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito a obtenção do título de Mestre Ciências da Reabilitação e Desempenho Físico-Funcional.

Aprovada em: () de () de ()

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. PhD. Flávia de Paoli - Orientadora

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Lúcia Mara dos Anjos Januário

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. PhD Rafael Pereira de Paula

UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Dedico este trabalho a todos aqueles que fizeram a diferença em todas as etapas da minha vida, em especial nesse momento:

À minha filha Luiza, por ser minha fonte de luz e força.

Ao meu esposo e amigo Marcelo, por me incentivar e mover mundos para que eu sempre consiga vencer.

À minha amada mãe e melhor amiga, Simone, pelo apoio, incentivo e exemplo.

Aos meus familiares, por me permitirem ser quem eu sou e me darem suporte a todo instante.

E a minha eterna avó, Lady, que com certeza absoluta está ao meu lado em todos os momentos, guiando meus passos.

Aos meus docentes, por serem a minha inspiração.

A Deus, por permitir que estejamos sempre no lugar certo na hora certa, por mais difícil que seja o caminho a ser percorrido!!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a pessoinha mais importante da minha vida, que mesmo sem fazer esforço algum renova minhas energias, me faz ter força para seguir em frente e aumenta os meus desejos de lutar e vencer, a você minha filha Luiza, agradeço por entender minhas ausências e às vezes minhas faltas de tempo, por me fazer um ser tão feliz e completa. Mamãe te ama infinitamente.

Ao meu esposo Marcelo, por sempre com tanta paciência entender minhas angústias e dificuldades, por me amparar e me fazer recomeçar sempre que necessário, por entender até os dias nublados decorrentes de problemas que não eram dele, pelas palavras de incentivo e pelo amor incondicional. Te amo.

À melhor mãe que alguém poderia ter, Simone. Agradeço por sempre ser tão forte e me ensinar a viver, por me apoiar em cada decisão, por mais maluca que ela fosse, por ser a minha base, minha estrutura, meu tudo. Por dispor de sua vida em função da minha, por nunca negar um pedido meu, por ficar horas a fio com a Luiza permitindo que eu estudasse. A você minha mãe, minha eterna gratidão.

Aos meus familiares, que sempre foram apoiadores e incentivadores das minhas conquistas, por serem “babás” quando as horas de estudo do dia já não eram suficientes.

Ao grande amigo e incentivador incondicional Plínio, que desde a graduação foi sempre companheiro, amigo e o mais importante, sempre acreditou que eu conseguiria. Por ser um dos grandes responsáveis por estar aqui hoje. Agradeço ao auxílio e participação na minha qualificação. A você meu amigo, eternamente meu muito obrigada.

A todas as amigas (em especial: Daniele, Fernanda, Priscila, Tatiana, Vívian) que estiveram “aturando” minhas loucuras e ausências de humor, nesse período. Por nem sempre entenderem minhas ausências, mas sempre apoiarem minhas decisões, por terem tantas palavras de incentivo e apoio. Sem vocês eu nada seria!

Ao amigo e dupla Pierre, a melhor dupla que alguém poderia ter, por sempre estar disposto a ajudar e compartilhar. Aos colegas de turma, por estarem comigo juntos nessa jornada, e aos grandes amigos que conquistei.

A minha orientadora Flávia, por na maioria das vezes acreditar mais em mim do que eu mesma, por ser tão participativa, por me orientar e ensinar tão bem, obrigada pela oportunidade e ensinamentos, minha histologia nunca mais será a mesma. Você é uma grande inspiração.

Aos colegas do ICB, Lúcia, Carlos, Álvaro e Luiza por me ensinarem e auxiliarem.

Aos amigos de trabalho da faculdade Suprema, pela ajuda e apoio. A instituição Suprema, por ser minha “casa” e acreditar no meu potencial.

Ao corpo docente do Mestrado, obrigada pelos ensinamentos e auxílios, em especial ao Professor Dr Carlos Alberto Mourão, que há muitos anos faz diferença na minha jornada acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta dissertação.

Ao professor e colega de profissão Dr. Maycon de Moura, por contribuir com o projeto no período da qualificação e aos membros da banca de defesa, professor Dr. Rafael Pereira, Dra Lúcia Mara Januário dos Anjos, Dra Isabelle Guedes e Dr. Felipe Alvim por aceitarem o convite e se disponibilizarem para a avaliação deste projeto.

A Ele, que nos permite ultrapassar todas as barreiras e obstáculos do momento, nos dando força para lutar e vontade para seguir.

Aos demais que de alguma maneira me ajudaram nessa trajetória e contribuíram com a minha conquista. O meu muito obrigada a todos!!!

RESUMO

Introdução: A fotobiomodulação (FBM) vem sendo amplamente descrita na literatura com excelentes resultados que envolvem resolução de processos inflamatórios, alívios álgicos e reparos teciduais. Por possuir atuação nos sistemas biológicos de maneira atérmica, indolor e de baixo custo tem sido alvo de diversas pesquisas experimentais e clínicas, visando um maior esclarecimento de seus efeitos e um aumento de sua aplicabilidade clínica. Entretanto, pouco se conhece sobre possíveis efeitos adversos e respostas celulares indesejadas. Assim como os medicamentos possuem descrições de seus efeitos adversos, torna-se importante também o conhecimento desses possíveis efeitos na fototerapia. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar os níveis de mRNA de metaloproteinases-2, -9 e -13, bem como seu regulador (TIMP-2) e expressão das proteínas MMP-13 e TIMP-2 em tecidos saudáveis presentes na articulação talocrural de camundongos após FBM. **Métodos:** Os animais foram distribuídos em 3 grupos (n=6): controle, 3J/cm⁻² e 30J/cm⁻². Os parâmetros do laser de baixa potência foram: 830 nm, 10 mW, 0,05 de área irradiada, doses de 3J/cm⁻² e 30J/cm⁻², tempo de irradiação de 15 e 150 segundos, respectivamente e emissão da luz em modo contínuo. As articulações foram irradiadas por 4 dias consecutivos, uma vez ao dia. Após a eutanásia, as articulações foram encaminhadas para dosagem dos níveis de mRNA de metaloproteinases (MMP-2, MMP-9, MMP-13) e seu regulador (TIMP-2), através de *real time* PCR e para imunocitoquímica de MMP-13 e TIMP-2. **Resultados:** Um aumento nos níveis relativos de mRNA para MMP-2 (p<0,05) foi observado no grupo 30Jcm⁻², enquanto que níveis relativos de mRNA para MMP-9, MMP-13 e TIMP-2 não apresentaram diferenças em nenhum grupo (p>0,05). Com relação à expressão proteica, a MMP-13 apresentou marcação positiva e apenas nos condrócitos nas cartilagens articulares, embora sem diferença estatística (p>0,05). Já TIMP-2 não obteve marcação positiva em nenhum dos tecidos avaliados. **Conclusão:** Com isso, nossos resultados indicam que a PBM foi capaz de regular os níveis relativos de mRNA para MMP-2, mas não regular a expressão protéica de MMP-13 e TIMP-2 e essa regulação foi diretamente dependente da dose testada.

Palavras chaves: Fotobiomodulação, Laser de baixa potência, Matriz extracelular, Metaloproteinases, TIMP.

ABSTRACT

Introduction: Photobiomodulation (PBM) has been widely described in the literature with excellent results involving resolution of inflammatory processes, pain relief and tissue repair. PBM has been applied in several experimental and clinical researches due to low cost, athermic effect and painless. However, it is not known about possible side-effects and unwanted cellular responses. Since anti-inflammatory drugs have elucidations about their side-effects, it is also important to know about these possible side-effects in phototherapy.

Objective: The aim of this study was to evaluate the metalloproteinase-2, -9 and -13 mRNA relative levels as well as its regulator (TIMP-2) and protein expressions of MMP-13 and TIMP-2 in healthy tissues present in mice talocrural joint after PBM. **Methods:** Animals were divided into 3 groups (n = 6): control, 3Jcm⁻² e 30Jcm⁻². Low -level laser parameters were: 830 nm, 10 mW, 0.05 irradiated area, doses of 3Jcm⁻² and 30Jcm⁻², 15 and 150 seconds of irradiation, respectively, and continuous mode. The joints were irradiated for 4 consecutive days once a day. After euthanasia, the left joints were dissected and RNA extracted to quantify metalloproteinases mRNA levels (MMP-2, MMP-9, MMP-13) and its regulator (TIMP-2) by real time PCR. Right joints were dissected to immunocytochemistry analysis for MMP-13 and TIMP-2. **Results:** An increase in MMP-2 mRNA relative levels was observed at 30Jcm⁻² group (p <0.05), while MMP-9, MMP-13 and TIMP-2 mRNA relative levels were not demonstrate statistical differences for any group (p> 0.05). Regarding protein expressions, MMP-13 demonstrated positive labeled cells, but only in chondrocytes from articular cartilages, although the cell quantification has not demonstrated statistical differences when compared with control group (p> 0.05). TIMP-2 did not present positive labeled cells for any tissues evaluated. **Conclusion:** Our results indicate that PBM was able to regulate mRNA levels for MMP-2, but it was not able to regulate MMP-13 and TIMP-2 proteins and this regulation was dose-dependent.

Keywords: Photobiomodulation, low-level laser therapy, extracellular matrix, metalloproteinases, TIMP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Esquema ilustrando a interação da luz com tecido biológico, demonstrando os efeitos da reflexão, absorção, espelhamento e transmissão da luz	15
Figura 02. Imagem ilustrativa demonstrando uma articulação sinovial, destacando seus componentes teciduais	18
Figura 03. Desenho esquemático adaptado da anatomia óssea articular pé e tornozelo humano (A) e da pata de rato (B)	19
Figura 04. Cronograma da irradiação	25
Figura 05. Plano de corte utilizado para remoção articular e microtomia. Imagem A: plano de corte para retirada das falanges, corte na porção média da tíbia e fíbula. Imagem 2: plano de corte utilizado na microtomia para obtenção das lâminas histológicas	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Sequência de <i>primes</i> utilizados	27
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LBP	----	Laser de baixa potência
FBM	----	Fotobiomodulação
ERRO	----	Espécie reativa de oxigênio
ATP	----	Trifosfato de Adenosina
MEC	----	Matriz extracelular
GAC	----	Glicosaminoglicanas
MMPs	----	Metaloproteinases
MMP-2	----	Metaloproteinase Tipo- II
MMP-9	----	Metaloproteinase Tipo- IX
MMP-13	----	Metaloproteinase Tipo- XIII
TIMP	----	Inibidores teciduais de Metaloproteinases
CEUA	----	Comitê de Ética em Uso Animais
CBR	----	Centro de Biologia da Reprodução
UFJF	----	Universidade Federal de Juiz de Fora
ICB	----	Instituto de Ciências Biológicas
AlGaAs	----	Arseneto de Gálio-Alumínio
c-DNA	----	DNA complementar
$\Delta\Delta Ct$	----	Delta-delta Ct
ΔCt	----	Delta Ct

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 LASER	14
1.1.2 Efeitos Biológicos do Laser	15
1.2 SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO	17
1.2.1 Matrix Extracelular	20
1.3 JUSTIFICATIVA	22
2.0 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	23
3.0 MÉTODOS	24
3.1 MODELO EXPERIMENTAL	24
3.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA	24
3.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS	25
3.4 IMUNOCITOQUÍMICA	26
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA E <i>REAL TIME</i> PCR	27
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4.0 REFERÊNCIAS	29
5.0 ARTIGO	34

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 LASER

O LASER (**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation) é uma forma de energia eletromagnética, com comprimento de onda e frequência que estão dentro do espectro eletromagnético de luz visível e infravermelha (GROSS *et al.*, 2013). Sua energia luminosa é transmitida através dos fótons que contém uma quantidade de energia definida e que é dependente do seu comprimento de onda (PREVENTICE, 2014; SÉRGIO *et al.*, 2017).

As principais características do laser são: monocromaticidade, coerência e colimação/direcionalidade. A monocromaticidade é caracterizada pela emissão de fótons com mesmo comprimento de onda, ou seja, fótons estimulam fótons da mesma frequência ou do mesmo comprimento de onda. Isso é o que diferencia as radiações emitidas por lasers das radiações emitidas por lâmpadas incandescentes, que são constituídas por radiações de vários comprimentos de onda. A coerência se manifesta simultaneamente pela monocromaticidade (coerência espacial) ou pela frente de onda unifásica (temporal). A radiação é coerente se as diversas porções sucessivas no tempo da mesma onda oscilam para cima e para baixo ao mesmo tempo. Já a colimação consiste das ondas que caminham na mesma direção, havendo o mínimo de espalhamento ou pouca divergência (BAGNATO, 2008; GARCEZ *et al.*, 2012).

A intensidade é outra característica da radiação laser em que átomos ou moléculas emitem radiação de forma controlada, contribuindo para que a energia da radiação esteja, num certo intervalo de tempo, em uma área muito pequena. A potência do feixe dos lasers pode variar de baixa a alta potência, o qual pode atingir a ordem de terawatts (10¹²W). No laser de baixa potência (LBP), é possível ter diferentes potências de saída do equipamento, sendo a variação entre 10mW a 100mW a mais utilizada nas práticas clínicas (BAGNATO, 2008; GARCEZ *et al.*, 2012).

O laser pode se comportar de formas distintas em função do tempo. Nos equipamentos de emissão contínua, sua emissão de potência de saída é constante durante todo o tempo; já no modo pulsado, a potência de saída é oscilante, variando entre um valor máximo (potência pico) e zero, durante um determinado período de tempo e que é denominado largura temporal (GARCEZ *et al.*, 2012).

Devido aos seus excelentes resultados, o LBP tem sido amplamente utilizado em diferentes práticas clínicas, como em: processos inflamatórios (DOS ANJOS *et al.*, 2017; CINAR *et al.*, 2017), na redução de edema e dor (SMOOT *et al.*, 2015), de distúrbios

articulares agudos e crônicos (GOPAL *et al.*, 2016), cicatrização de feridas (RUH *et al.*, 2018), reparos teciduais (ALVES *et al.*, 2014), aceleração na regeneração de fraturas (WANG *et al.*, 2019), lesões musculoesqueléticas (AWATIDEBE *et al.*, 2015) e regeneração nervosa (SANDERSON *et al.*, 2018), entre outros. Adicionalmente, esse tipo de terapia também é utilizado na odontologia, em tratamentos de lesões bucais (SINDICI *et al.*, 2017), analgesia (NABI *et al.*, 2018) e controle microbiano (OZBERK *et al.*, 2018).

1.1.2 Efeitos Biológicos

Quando um tecido é irradiado, essa luz pode ser refletida, absorvida, espalhada ou transmitida pelas células e moléculas presentes nesses locais (figura1).

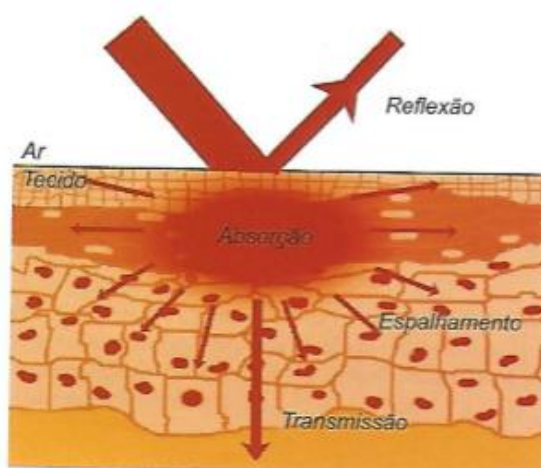


Figura 1. Esquema ilustrando a interação da luz com tecido biológico, demonstrando os efeitos de reflexão, absorção, espalhamento e transmissão da luz (GARCEZ, 2012).

Um laser é considerado de baixa potência ou terapêutico quando o mesmo possui pouco ou nenhum efeito térmico, agindo através de efeitos fotoquímicos e fotomecânicos (CHU *et al.*, 2017) e não gera nenhuma alteração tecidual visível (CARUSO *et al.*, 2011).

Os efeitos fotobiológicos podem ser divididos em: curto prazo, que representa o efeito observado em poucos segundos ou minutos após a irradiação e longo prazo, no qual ocorrem horas ou dias após a irradiação, envolvendo usualmente, biossíntese de componentes celulares (ANDRADE, 2014). Segundo Freitas e Hamblin (2016) e Hamblin (2018), para que os efeitos fotobiológicos ocorram, são necessárias doses corretas do laser para que sejam alcançados os

efeitos moleculares e celulares desejados. Esse efeito é conhecido como curva dose-resposta bifásica, no qual doses muito baixas ou muito altas podem levar a nenhum efeito significativo, ou às vezes, a efeitos inibitórios e/ou indesejados. Com isso, fazem-se necessários estudos mais detalhados sobre os efeitos das doses terapêuticas do LBP, com a finalidade de entender o comportamento das diferentes células e tecidos da área irradiada.

A capacidade celular para interagir com certos tipos de luz de acordo com seu comprimento de onda, densidade de energia e potência é conhecida como fotobiomodulação (FBM) (BARBOSA *et al.*, 2017). Para isso, os fótons da luz visível de baixa potência devem ser absorvidos por elétrons pertencentes a alguma molécula localizada na célula e, desta forma, agir como um cromóforo ou fotorreceptor (GARCEZ *et al.*, 2012). Karu (2008) descreve que esses fotorreceptores se encontram nas mitocôndrias, considerando o citocromo C-oxidase o fotorreceptor mais conhecido, esta uma enzima terminal da cadeia respiratória responsável por mediar a transferência de elétrons do citocromo C para o oxigênio molecular (KARU, 2010). A hipótese mais aceita nos dias atuais é que o laser intensifica o estágio de transferências de elétrons na cadeia respiratória, levando ao início de uma cascata de sinalização (KARU, 2010).

Essa cascata, conhecida como via de sinalização retrógrada, é constituída por vias de sinalizações intracelulares entre as mitocôndrias e o núcleo, que influenciam atividades celulares sob condições normais ou patológicas. Nesse processo, a mitocôndria envia informações ao núcleo sobre modificações no seu estado funcional através de alterações na sua permeabilidade da membrana, aumentando a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a concentração de Ca^{+2} , além de modificações em seu pH. Essas alterações levam a um aumento no consumo de oxigênio, maior síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e modificações nos precursores de DNA e RNA mitocondrial (KARU, 2008), estimulando e aumentando processos celulares, como motilidade, proliferação e deposições na matriz extracelular (MEC) (AYUK; ABRHAMASE; HOURELD, 2016). Além disso, há também uma comunicação entre as mitocôndrias e o núcleo, impulsiona pela mudança na estrutura mitocondrial (FREITAS; HAMBLIN, 2016; KARU, 2008). Este processo torna possível aplicar uma baixa dose de energia para produzir efeitos clinicamente significativos nos tecidos. Em suma, a absorção da radiação laser, dependendo do comprimento de onda, provoca reações primárias nas mitocôndrias, seguidas por uma cascata de reações (transdução de foto-sinal e amplificação) que ocorrem no citoplasma, membrana e núcleo (CHAVES *et al.*, 2014).

A terapia com laser de baixa potência altera o potencial redox total das células, aumentando o potencial oxidante, a geração de EROs e a atividade redox celular. Os EROs são considerados os segundos mensageiros, com função importante ao regular vias de sinalização celular que controlam a expressão gênica (KARU, 2008). A modulação do estado redox celular pode ativar ou inibir as vias de sinalização. Mudanças no estado redox ativam a síntese de ácido nucléico, síntese proteica, ativação enzimática e progressão do ciclo celular (FARIVAR *et al.*, 2014; MIGLIARIO *et al.*, 2014). Essas mudanças bioquímicas e moleculares causam efeitos macroscópicos, como proliferação celular e cicatrização de lesões (GAO; XING, 2009). Sob exposição ao estresse oxidativo excessivo ou prolongado, o aumento das EROs pode atingir um limiar que desencadeia abertura do canal mitocondrial, o que pode levar a um colapso simultâneo da membrana e uma elevação na concentração das espécies reativas, que ativam mitocôndrias vizinhas desencadeando uma retroalimentação prejudicial proporcionando um aumento no risco de dano celular (HAMBLIM, 2018). Em estudo experimental com bactérias, Fonseca e colaboradores (2010) observaram que a FBM não foi letal a célula, porém promoveu alterações sub-letais no DNA, o que poderia posteriormente conduzir a célula a morte. Isso evidencia, mais uma vez, a importância de se conhecer a dosagem correta de aplicação e suas consequências a nível molecular e celular.

1.2 SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO

O sistema musculoesquelético é formado pela junção do tecido muscular estriado esquelético aos ossos que constituem o esqueleto, juntamente com os tendões, ligamentos e articulações (ARESTRUP, 2015). As fibras musculares esqueléticas são formadas através da fusão dos mioblastos, produzindo células multinucleadas. As proporções do tipo de fibra muscular são responsáveis pela variedade de propriedades do músculo esquelético, dentre contrações lentas e rápidas, atividade metabólica (glicolítica, oxidativa, resistência à fadiga) e sensorial (MIZUNOYA *et al.*, 2015).

São descritos três tipos de articulações: as fibrosas, as cartilagíneas e as sinoviais. Nas articulações fibrosas, os ossos adjacentes são unidos por uma massa sólida de tecido conjuntivo denso não modelado, sendo divididas em três tipos: suturas, sindesmoses e membranas interósseas. Nas articulações cartilagíneas, existe um tecido conjuntivo sólido que permite pouco ou nenhum movimento e os ossos são conectados firmemente por cartilagem hialina ou fibrocartilagem (TORTORA; NIELSEN, 2012). Já a articulação sinovial (figura 2) diferencia-se das demais articulações pela presença de uma cavidade articular sendo formada

por tecidos envoltos em uma bainha (denominada cápsula), de maneira geral são constituídas por 2 camadas: fibrosa (camada externa), formada de tecido conjuntivo denso e, camada ou membrana sinovial (camada interna) composta por fibroblastos e macrófagos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015). Sua composição consiste de cartilagem articular, ossos, ligamentos, sinóvia e cápsula fibrosa (ARCHER; DOWTHWAITE; FRANCIS-WEST, 2003).

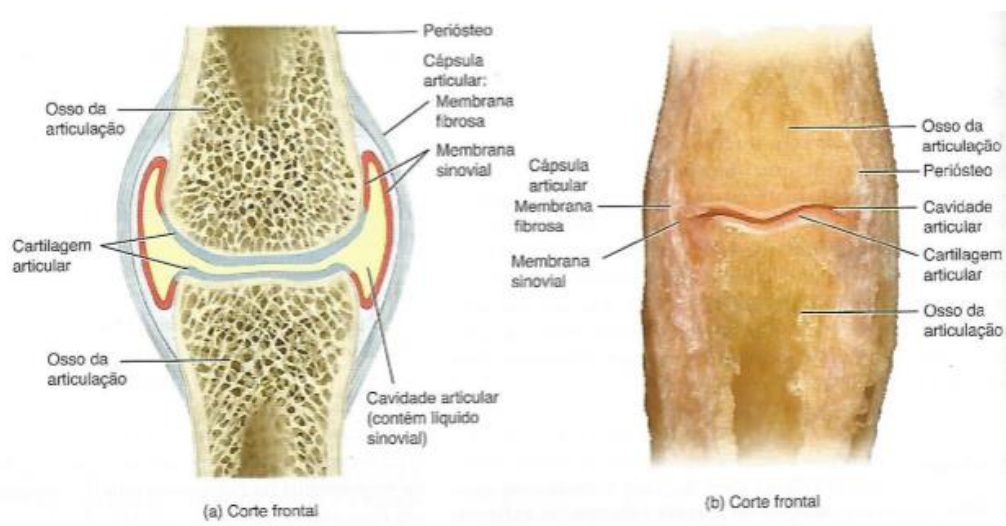


Figura 2. Imagem ilustrativa demonstrando uma articulação sinovial, destacando seus componentes teciduais (TORTORA; NIELSEN, 2012).

O pé é constituído de diversas articulações sinoviais, a articulação proximal do pé é a articulação talocrural (figura 3) ou articulação do tornozelo, formada pelos ossos da tíbia, fíbula e tálus, uma articulação muito encaixada que tem limitações importantes, visto que em situações de apoio monopodal suporta todo peso do corpo, naturalmente estável, porém torna-se instável se qualquer estrutura em torno da articulação vier a sofrer lesão, condiciona os movimentos da perna em relação ao pé no plano sagital, sendo indispensável para a marcha. A cama profunda da fáscia articular liga-se ao tendão de Aquiles, promovendo flexão plantar ao ser tracionada para trás e flexão dorsal para frente, tal ativação só fica completa mediante a movimentação articular adequada, no plano transversal promove movimentos de adução e abdução do pé, além de executar também pronação e supinação (BELEZAK *et al.*, 2007; HAMIL, 2016; KAPANGI). Inflamação sinovial nas articulações do pé e tornozelo gera enfraquecimento da capsula sinovial e destruição da cartilagem articular (JAAKNOLA; MANN, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2016).

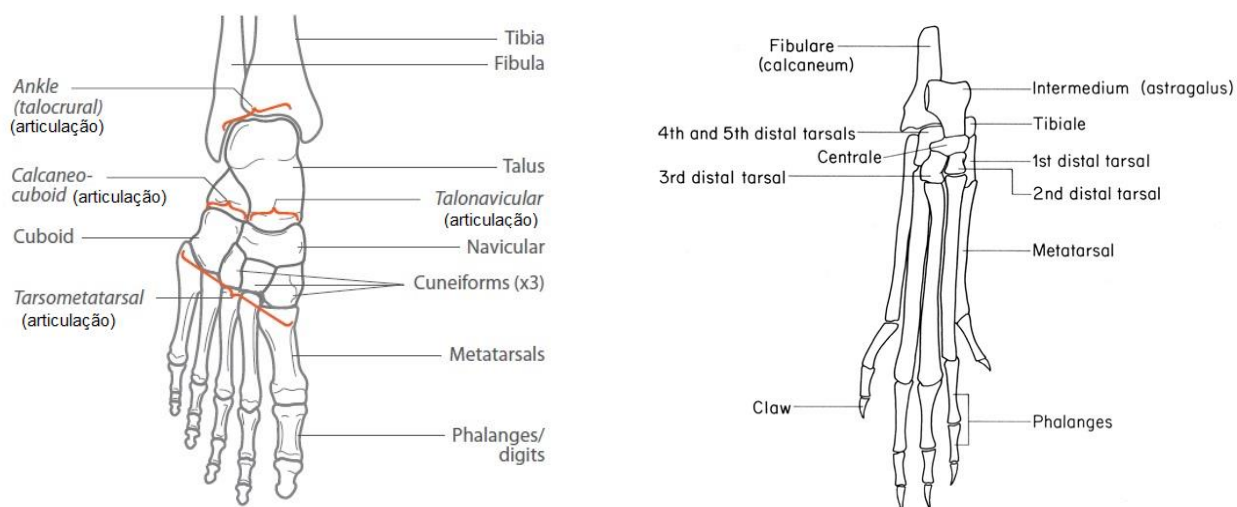


Figura 3. Desenho esquemático adaptado da anatomia óssea e articular do pé e tornozelo humano (A) e da pata de rato (B). A - HELLIWELL *et al.* 2011; B- <http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>

A cartilagem articular é formada por células longas e achatadas, as quais são mantidas unidas por uma matriz rica em colágeno tipo II, gerando suporte mecânico a articulação (DECKER *et al.*, 2014). Já os tendões, ligamentos e cápsulas são constituídos por tecido conjuntivo. Essas estruturas possuem a capacidade de reparo e respondem ao exercício ou imobilização, o que sugere que suas células sejam capazes de detectar mudanças na carga mecânica e coordenar respostas para alternar a composição da matriz extracelular (MEC) (BENJAMIN; RALPHS, 1998; LEUNG *et al.*, 2015).

O tecido conjuntivo é um dos mais abundantes e distribuídos no corpo. De origem mesenquimal, possui a função de preenchimento de espaços e sustentação aos demais tecidos e órgãos, devido ao conjunto de moléculas (matriz extracelular) que se conectam, promovendo assim, o suporte corporal. Adicionalmente, apresentam funções distintas como: nutrição, inervação e drenagem linfática; em músculos e nervos auxilia na organização estrutural. Participa ainda da defesa imunológica (é um meio comum para o desenvolvimento de reações imunológicas), além do processo de cicatrização pós-lesões (ARESTRUP, 2015).

O principal constituinte do tecido conjuntivo é a MEC, formada por distintas combinações de proteínas fibrosas (predominantemente compostas por colágenos) com substância fundamental. É através da matriz que existe a troca de nutrientes e catabólitos entre as células e o suprimento sanguíneo. Além de sua função estrutural, desempenha importante papel em processos biológicos como permitir o controle da proliferação e diferenciação celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015).

1.2.1 Matrix extracelular

A MEC é uma estrutura dinâmica presente em todos os tecidos e encontra-se continuamente em processo de remodelação controlada (BONNANS *et al.*, 2014). Suas proteínas e estruturas desempenham papéis vitais na diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração celular (HYNES, 2009). Qualquer defeito estrutural e/ou alteração metabólica na matriz pode causar danos celulares e teciduais, levando ao desenvolvimento ou progressão de doenças. É composta por componentes fibrilares (colágeno e fibras elásticas), não fibrilares (proteoglicanos e glicoproteínas) e microfibrila (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013) de tecidos conjuntivos composta de fibras colágenas e elásticas e pela substância fundamental (JARVELAINEN *et al.*, 2009)

O colágeno, proteína mais abundante nos mamíferos, tem a função de fornecer resistência estrutural e contribui para as propriedades mecânicas, organização e forma dos tecidos, formados por fibras fortes e resistentes a tração. Interagem com diversos receptores celulares, regulando a proliferação, diferenciação e migração celular (BLUM, 2012). A síntese do colágeno ocorre nos ribossomos associados ao retículo endoplasmático, alterações nesse processo podem desencadear processos patológicos diversos, nos vasos, pele, cartilagem, dentina (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL, 2013). Já as fibras elásticas, se ramificam e se unem para formar uma rede fibrosa no interior do tecido, compostas por elastina e glicoproteínas micro fibrilares, presente nos tecidos que necessitam de tensão e elasticidade. Sua organização espacial na matriz extracelular é altamente variável entre os diferentes tecidos. (TORTORA; NIELSEN, 2013; LANNOY *et al.*, 2014).

A substância fundamental é constituída por diversos componentes glicoproteicos, açúcares e água. Como função, ela sustenta as células mantendo-as unidas, armazenando água e permitindo troca de substâncias entre células e sangue (HIB, 2003; TORTORA; NIELSEN, 2013). Os proteoglicanos são glicoproteínas extracelulares que interagem com as fibras colágenas em diferentes matrizes e conferem propriedades adicionais de preenchimento de espaço vazio e lubrificação, devido sua grande afinidade pelas moléculas de água. As glicoproteínas presentes nas matrizes permitem interações, facilitando a organização da MEC e permitindo a sinalização em células (HYNES, 2012). Já as glicosaminoglicanas (GAG) são um tipo especial de polissacarídeos que ficam associadas aos proteoglicanos (TORTORA; NIELSEN, 2013).

O processo de remodelação da MEC é contínuo e controlado, sendo mediado por enzimas específicas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz, como as

metaloproteinases (MMPs) e ADAMTS (BONNANS, 2014). As MMPs compreendem uma família de enzimas que clivam os substratos protéicos através de um mecanismo que envolve a ativação de uma molécula de água ligada ao sítio ativo por um íon de zinco (ISIK, 2017; KLEIN; BISCHOFF, 2011). Por serem secretadas na forma latente, como pró-enzimas ou zimogênios é necessária uma ativação proteolítica que consiste na quebra da ligação entre o grupo tiol da cisteína no pró-peptídeo e o zinco no domínio catalítico (MEDEIROS *et al.*; 2012). Atualmente, são descritas 23 MMPs, com funções específicas a cada multidomínio e podem ser agrupadas em espécies solúveis e/ou ancoradas a membrana. A principal função dessas proteases foi originalmente atribuída à modulação e regulação da MEC, pela degradação direta de suas proteínas (por exemplo, colágeno, proteoglicanos). Porém, hoje em dia, outras funções importantes também são descritas como a estimulação a liberação de proteínas biologicamente ativas, como os fatores de crescimento e citocinas (ISIK, 2017; KLEIN; BISCHOFF, 2011). Adicionalmente, participam de importantes ações fisiológicas como: desenvolvimento embrionário, morfogêneses, remodelação tecidual, crescimento celular, apoptose celular e condições patológicas (inflamação, osteoartrite, doenças pulmonares e cardiovasculares, câncer, entre outras). Sua atividade enzimática é regulada por inúmeros mecanismos dentre hormônios, fator de crescimento, irradiações, citocinas inflamatórias e interações célula-célula e célula-matriz (YAMAMOTO *et al.*, 2015).

A metaloproteinase tipo II (MMP-2), também conhecida como Gelatinase A, atua no processo de remodelação da MEC. Sugere-se que sua ação esteja ligada a funções celulares de iniciação ou regulação como: proliferação, adesão e migração, tendo sua atividade extracelular controlada por vários tipos de ativadores dependendo do processo fisiológico ou patológico, em processos inflamatórios sua concentração pode estar elevada e tem como inibidor tecidual (TIMP) principal a TIMP-2, (GUERRA *et al.*, 2017; PARKS; MECHAM, 1998). Encontra-se envolvida também no processo de neovascularização, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos e participa da clivagem da elastina e dos colágenos (desnaturado) tipo I, VII e X (KLEIN; BISCHOFF, 2011).

A metaloproteinase tipo IX (MMP-9) ou Gelatinase B, está presente em todo processo inflamatório sendo expressa por vários tipos de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos), degradando a membrana basal substancialmente durante o processo de extravasamento celular inflamatório e participa do processo de recrutamento celular para o local da inflamação (PARKS; MECHAM, 1998) desempenhando um papel importante na degradação de elementos da MEC como colágeno (desnaturado) (GUERRA *et al.*, 2017). Sua expressão pode estar aumentada em tecidos

cardíacos inflamados, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, cicatrização normal de lesões, artrite e esclerose múltipla (PARKS; MECHAM, 1998). Esses grupos de gelatinases digerem a gelatina e desnaturam o colágeno IV (DE MEDEIROS *et al.*, 2012)

Metaloproteinase tipo XIII (MMP-13) ou collagenase-3 apresenta preferência pela clivagem do colágeno tipo II, encontrado em cartilagens. Esse tipo de MMP é um fator chave de ativação de várias outras MMPs. Adicionalmente, sua expressão elevada também tem sido descrita como indicativo de vários processos cancerígenos, ou seja, quanto maior sua concentração maior a agressividade do tumor (KLEIN; BISCHOFF, 2011).

O constante processo de remodelamento da matriz extracelular tem como função controlar a homeostase tecidual. Uma desregulação em sua composição ou estrutura favorece a instalação de processos patológicos, assim como um remodelamento desordenado está associado a condições patológicas e a exacerbação da doença (JARVELAINEN, 2009). Para isso a remodelagem da MEC requer uma regulação rigorosa, sendo necessária a existência de inibidores endógenos que inativam as MMPs, chamados de inibidores teciduais das MMP. Eles são divididos em quatro grupos (TIMP-1 a TIMP-4) com especificidade de ligação ao tipo de MMP, que ao se ligarem bloqueiam o sítio ativo, impedindo acesso ao substrato específico (BONNANS, 2014; DE MEDEIROS *et al.*, 2012).

Os modelos TIMP-1 e TIMP-2 exercem efeitos de crescimento sobre um grande número de células e associados com uma suscetibilidade reduzida a apoptose (BRUYN, 2016). Alterações na homeostasia entre MMPs e TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas à renovação descontrolada da MEC como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas e fibroses. Os TIMP-1 e TIMP-2 apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de todas as MMP, embora possuam suas ligantes preferencias: a TIMP-1 se liga mais facilmente a MMP-9, enquanto a TIMP-2 é ligante da MMP-2. (RIBEIRO *et al.*, 2008).

1.3 JUSTIFICATIVA

A utilização da FBM em lesões articulares é ampla e inclui diversos trabalhos experimentais de lesões articulares induzidas, como tendinite (ALVES *et al.*, 2014; HASLERUD, 2014; TUMILTY, 2010), rupturas tendíneas (GUERRA *et al.*, 2013) e artrite (DOS ANJOS *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2013; BÁLINT *et al.*, 2011), além de trabalhos clínicos (BÁLINT *et al.*, 2011; CLIJSEN, 2017). Todos esses estudos apontam para resultados positivos da FBM, desde que os parâmetros do equipamento e as respostas

celulares sejam bem conhecidos, estabelecendo assim tratamentos eficientes e seguros, como descrito por ANDO e colaboradores (2011), onde as respostas de recuperação neurocomportamental foram efetivas em lesões neurológicas pós-traumatismo crânio cefálico após testes com diferentes parâmetros do laser de baixa potência. A FBM também foi descrita na aceleração de processo cicatricial, através da alteração nas expressões relativas de MMPs e TIMPs (FIORO *et al.*, 2017), na oncologia e nos seus efeitos secundários, como redução de dor e edema no câncer de mama (BAXTER *et al.*, 2017; HAMBLIM; NELSON; STRAHAN, 2018).

Por se tratar de uma terapia não invasiva, de baixo custo e fácil administração, a FBM possui diversas vantagens e aplicabilidades, podendo auxiliar inclusive na redução do uso de medicamentos, os quais possuem efeitos colaterais bem conhecidos (ALVES *et al.*, 2014; BALTZER; STOSCH; OSTTOPCZER, 2017). Entretanto, os efeitos biológicos do laser necessitam ainda de estudos para que sejam melhores compreendidos e que suas aplicações clínicas possam ser mais eficazes e seguras. É fato que, muitas pesquisas experimentais e clínicas descrevem esses efeitos sempre como benéficos, em especial para tecidos com injúrias. Porém, pouco se conhece sobre possíveis efeitos adversos e respostas celulares indesejadas nos tecidos sadios adjacentes a lesão, os quais podem responder de forma distinta após um tratamento com laser. Assim como os medicamentos possuem descrições de seus efeitos adversos, torna-se importante também o conhecimento desses possíveis efeitos na fototerapia.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos em curto prazo do laser infravermelho (830nm), no modo de emissão da luz contínuo e comparando duas fluências (3Jcm^{-2} e 30Jcm^{-2}) em componentes da matriz extracelular de tecidos sadios presentes na articulação talocrural de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão relativa de mRNA das metaloproteinases-2, -9 e -13, através de *real time*-PCR.
- Quantificar a expressão relativa de mRNA do regulador de metaloproteinase (TIMP 2), através de *real time*-PCR.

- Avaliar a presença das metaloproteínases-13 e TIMP-2 nos tecidos, através de técnicas imunocitoquímicas.

3.0 METODOS

3.1 MODELO EXPERIMENTAL

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

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

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 para roedores.

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes em grupos (n=6)

- Grupo controle: sem aplicação do laser;
- Grupo 3Jcm^{-2} : aplicações com laser a 3Jcm^{-2} ;
- Grupo 30Jcm^{-2} : a aplicações com laser a 30Jcm^{-2} .

3.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Um laser infravermelho ($\lambda = 830\text{nm}$) de baixa potência (*AlGaAs* – *Aluminum Gallium Arsenide*, HTM Laser Compact, HTM Indústria de Equipamentos Eletro-eletrônicos Ltda/Brasil) foi utilizado nos procedimentos experimentais. Os seguintes parâmetros foram utilizados: potência fixa de 10mW, modo contínuo de emissão da luz, doses de 3Jcm^{-2} e 30Jcm^{-2} , com tempo de aplicação 15 segundos e 150 segundos respectivamente. A irradiação foi realizada pontual e perpendicularmente a articulação talocrural diretamente sobre a pele do animal, uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos, sempre no mesmo horário (figura 4). Para isso, os animais foram imobilizados utilizando um tubo tipo falcon adaptado.

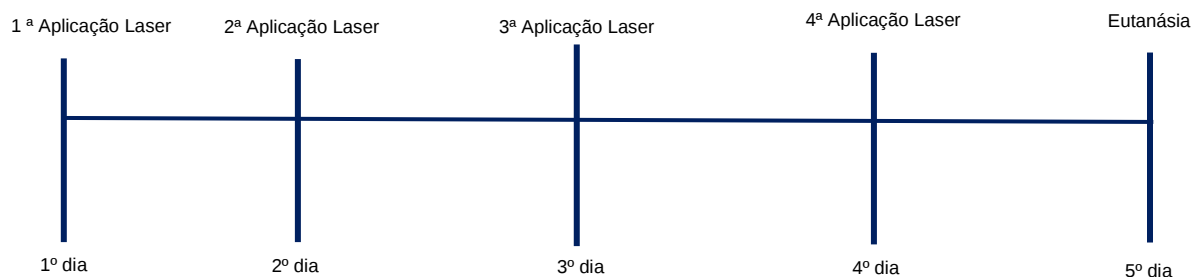


Figura 4. Cronograma de irradiação.

Vinte e quatro horas após a última aplicação, os animais foram eutanasiados por indução anestésica, utilizando uma solução de cloridrato de quetamina e cloridrato de xylazina, conforme previamente aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Imediatamente após a eutanásia, as articulações talocrural de ambos os membros posteriores foram removidas, lavadas em água destilada estéril para retirada do excesso de sangue e dissecadas. Durante a dissecação, a pele foi retirada, bem como as falanges (a figura 5 apresenta os planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia).

Para as análises morfológica e de imunocitoquímica, a região da articulação talocrural direita foi fixada em paraformaldeído tamponado 4%, pH 7,4, durante 24 horas, descalcificado 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). Foram obtidos cortes longitudinais com 3 µm de espessura, os quais foram desparafinizados e hidratados.

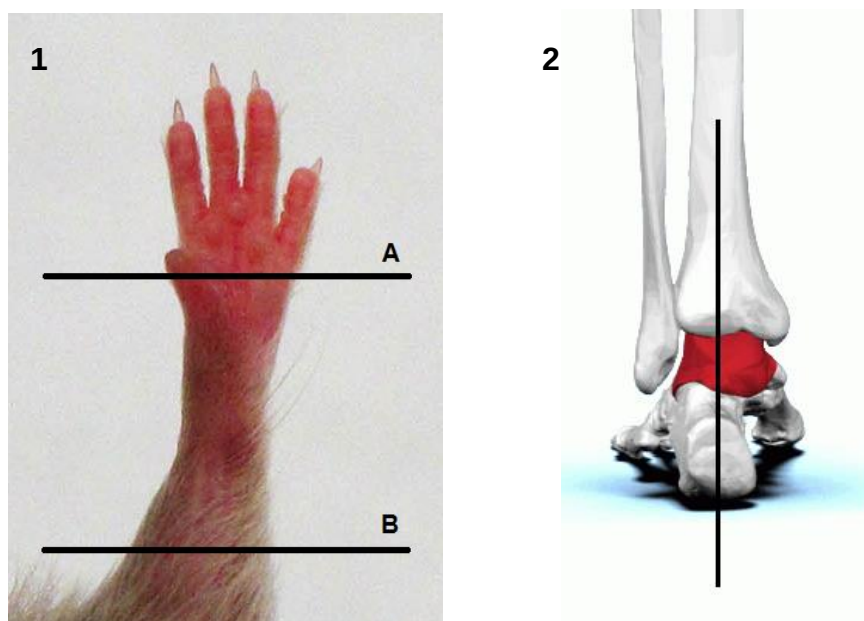


Figura 5- Planos de corte utilizados para remoção da região articular e na microtomia. Imagem 1: A - plano de corte para retirada das falanges; corte na porção média do metatarso. B - plano de corte na porção media da tíbia e fíbula. Adaptado de <http://hookelabs.com/services/cro/cia.html>. Imagem 2: 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/>.

As análises morfológicas e de imunocitoquímicas 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 do software CellSens Imaging (5.1 version, Olympus, EUA).

3.4 Imunocitoquímica

Primeiramente, os cortes foram submetidos à recuperação de epítomos por incubação em solução de citrato de sódio 0,01 M (pH 6,0), em forno de microondas em potência alta, por 20 min, seguidas por um resfriamento de também 20 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada usando uma solução de 3% de H₂O₂ diluído em metanol absoluto, seguido por 1,5% de solução bloqueadora (Santa Cruz Biotechnology, EUA). Um anticorpo policlonal primário anti-MMP-13 e TIMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi diluído conforme sugerido pelo fabricante (1:50) e incubado overnight a 4°C. Um anticorpo biotilado secundário (Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi usado durante 30 min em temperatura ambiente, seguido da solução de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) e peroxidase, por

10 min em temperatura ambiente . Os cortes foram contracorados usando verde de metila. Para o controle negativo, os cortes foram incubadas na ausência de anticorpo primário.

A quantificação do percentual de células marcadas foi realizada da seguinte forma: número de células marcadas/total de células no campo focalizado x 100.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA e *real time* PCR

Os fragmentos de tecidos provenientes das articulações esquerdas dos animais foram macerados em imersão de nitrogênio líquido. RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen, EUA) seguido pela separação de fases por clorofórmio e isopropanol. A concentração de RNA extraído foi obtida utilizando o NanoDrop™ 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 *real time* PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real) foram utilizados *primers* dos genes que codificam as metaloproteinases-2, -9 e -13, bem como seu regulador TIMP-2. Todos os primers foram desenhados em diferentes éxons, para evitar a possibilidade de contaminação com DNA genômico utilizando o programa Primer BLAST (NCBI, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados.

<i>Primers</i>	<i>Sequencias</i>	
	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
β-actina,	CATCCGTAAAGACCTCTATGC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC
MMP-2	CCGATCTACACCTACACCAA	ATGCTGATACTGACACTGGTA
MMP-9	CTCTGCCTGCACCACTAAAG	GGCAAGCAGTACTCTTCCTG
MMP-13	ATGGTCCAGGCGATGAAGAC	ACCCAGCCCTATCCCTTGAT
TIMP-2	TAGACTGGTCCAGCTTTGAC	GACCCACTACCATGTCTAG

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 10µL, contendo 2,6µL de água ultrapura, 1,4µL da mistura de um dos pares de *primers Foward* e *Reverse* de cada gene, 1 µL de cDNA diluído e 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

O ensaio de *real time* PCR foi realizado usando 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 PCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers, na ausência do template (cDNA). A análise das curvas de melting e de dissociação foi feita ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica.

Para análise da expressão gênica através de PCR foi utilizado o método Delta-Delta CT ($\Delta\Delta CT$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Calculou-se inicialmente o Delta-Ct (ΔCT) de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (β -actina) dos valores de CT do gene alvo. Após determinação do ΔCT da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA dos animais controle. Para o cálculo do $\Delta\Delta CT$ utilizou-se a fórmula seguinte: [ΔCT (amostra) – ΔCT (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta CT$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados paramétricos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, enquanto os não paramétricos foram expressões como mediana (intervalo interquartil). A comparação dos dados paramétricos foi realizada pelo teste de variância One-Way Anova seguido de Post hoc de Turkey. Para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn, com significância quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e foram realizadas utilizando GraphPad InStat software (versão 7 para Windows 8, GraphPad Software, EUA).

4.0 REFERÊNCIAS

- ALVES, A.C.A. *et al.* Low-level laser therapy in different stages of rheumatoid arthritis: a histological study. **Lasers Med Sci.** v.28, n. 2, p. 529-36, 2013.
- ALVES, A. N; FERNANDES, K.P.S; DEANA, A.M; BUSSA-DORI, S.K; MESQUITA-FERRARI, R.A. Modulation effects of low level-laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibials anterior muscle in rats. **Laser Med Sci.** v.29, n. 2, p. 813-21, 2014.
- ANDRADE, F.S.S.D; CLARK, R.M.O; FERREIRA, M.L. Efeitos da terapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Rev Col Bras.**v.41, n. 2, p.129-133, 2014.
- ANDO, T. *et al.* Comparison of therapeutic effects between pulsed and continuous wave 810-nm wavelength laser irradiation for traumatic brain injury in mice. **Plos One.** v.6, n.10, p.1-9, 2011.
- ARCHER, C.W; DOWTHWAITE, G.P; FRANCIS-WEST, P. Development of Synovial Joints. **Birth Defects Research.** v. 69, n.2, p. 144-155, 2003.
- ARESTRUP, B.J. **Histologia essencial.** 1º ed. Rio de Janeiro. Guanabara. 2015.
- AYUK, S.M; ABRAHAMSE, H; HOURELD, N.N. The role of matrix metalloproteinases in diabetic wound healing in relation to photobiomodulation. **J Diabets Research.** v. 2016, p. 1-9, 2016.
- AWATIBE, A.W; JASSIEM, G.I; YONG, T. Low level laser therapy and exercise for patients with shoulder disorders in physiotherapy practice (a systematic review protocol). **Bio Med Central.** v.4, n.60, p.1-6, 2015.
- BAGNATO, V.S. **Laser e suas aplicações e tecnologia.** São Paulo. Livraria Física. 2008.
- BARBOSA, R; MARCOLINO, A; SOUZA, V. BERTALINO, G; FONSECA, M; GUIRRO, R. Effects of low-level laser therapy and strength training protocol on hand grip by dynamometry. **Laser Med Sci.** v.8, p.112-117, 2017.
- BÁLINT, G. *et al.* Ex-vivo soft-laser treatment inhibits the synovial expression of vimentin and α -enolase, potential autoantigens in rheumatoid arthritis. **Phys Ther.** v.91,n.5, p.665-674, 2011.
- BALTZER, A.W.A; STOSCH, D; OSTOPCZEE, K.M.S; Low-level-lasertherapie. **Z Rheumatol.** n. 76, p. 806-812, 2017.
- BAXTER, G.D. *et al.* Low level lasertherapy (Photobiomodulation Therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. **BMC Cancer.** v. 17, n. 1, p.1-13, 2017.
- BELEZAK, C.E.Q; CAVALHERI Jr, G; de GODOY, J.M.P; CAFFARO, R.A; BELEZAK, S.Q. Relação entre a mobilidade da articulação talocrural e a úlcera venosa. **J Vasc Bras.** v.6, n.2, p. 149-155, 2007.
- BENJAMIN, M; RALPHS, J.R. Fibrocartilage in tendon and ligaments an adaptation compressive load. **J Anat.** v.193, p.481-94, 1998.
- BLUM, S.R. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol,** v.3, n.1, p.1-19, 2011.

BONNAS, C; CHOU, J; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.15, n.12, p.786-801, 2014.

CARVALHO, H.F; RECCO-PIMENTEL, S. **A célula.** 3º ed. Manole: São Paulo. p, 445-466, 2013.

CARUSO, M.K.D. *et al.* Efficacy of low-level laser therapy for body contouring and spot fat reduction. **Obes Surg.** v. 21, p.722-9, 2011.

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

CHU, Y.H; CHEN, S.Y; HSIEN, Y.L; TENG, Y.H. CHENG, Y.J. Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- α /cicloheximide-induced apoptosis. **Lasers Med Sci.** v. 33, n.2, p. 279-286, 2018.

CINAR, E; SAXENAS, S. UYGUR, F. Low-level laser therapy in the management plantar fasciitis: a randomized controlled trial. **Laser Med Sci.** v. 33, n. 5, p. 949-958, 2017.

CLIJSEN, R; BRUNNER, A; BARBEO, M; CLARYS, P; TALYMANS, J. Effects of low-level laser therapy on pain in patients with musculoskeletal disorders: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Phys Rehabil Med.** v.53, n.4, p. 603-610, 2017.

DECKER, R. S; KOYAMA, E; PACIFICI, M. Genesis and morphogenesis of limb synovial joints and articular cartilage. **Matrix Biol.** v.39, p. 5-10, 2014.

DE BRUYN, M. *et al.* The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** v.51, n.5, p.295-358, 2016.

DE MEDEIROS, M.L. *et al.* Effect of low-level laser therapy na angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. **Laser Med Sci.** v. 32, n. 1, p. 35-43, 2012.

DOS ANJOS, L.M.J, FONSECA, A.S, GAMEIRO J, DE PAOLI, F. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation comparative analysis of two energy densities. **Lasers Med Sci.** v. 32, n.5, p. 975-983, 2017.

FARIVAR, S. MALEKASHAHABIT, T; SHIARI, R. Biological effects of low-level laser therapy. **Lasers Med Sci.** v.5, n. 2, p.58-62, 2014.

FIORO, F.B. *et al.* Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. **Lasers Med Sci.** v. 32, n. 8, p. 1769-1782, 2017.

FREITAS, L.F; HAMBLIM, M.R. Proposed mechanism of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron.** v. 22, n. 3, p. 1-37, 2016.

FONSECA, A.S. *et al.* Effects of laser therapy on DNA damage. **Lasers Surg Med.** v. 42, n. 6, p.481-88, 2010.

GAO, X; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **Bio Med Sci.** v. 16, n. 4, p.1-16, 2009.

GARCEZ, A.A; RIBEIRO, M.S; NUNES, S.C. **Laser de baixa potência, princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. 1º ed. Rio de Janeiro. Elsevier. p. 1-39, 2012.

GOPAL, N.S; KAMAL, W; GEORGE, J. MANSSOR, E. Radiological and biomechanical effects (CTX-II, MMP-3, 8 E 13) of low level laser therapy (LLLT) in chronic osteoarthritis in Al-Khary, Saudi Arabia. **Lasers Med Sci**. v. 32, n. 2, p. 297-303, 2016.

GROSS, A.R; *et al*. Low-level laser therapy (LLLT) for neck pain: a systematic review and metaregression. **Open Orthop J**. v.7, n. (suppl 4: M3), p. 396-419, 2013.

GUERRA, F.R. *et al*. LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. **Lasers Med Sci**. v. 28, n. 5, p. 1281-8, 2013.

GUERRA, F; VIEIRA,C.P; MARQUES, P.P; OLIVEIRA, P.O; PIMENTAL, E.R. Low level laser therapy accelerates the extracellular matrix reorganization of inflamed tendon. **Tissue and Cell**. v. 49, n. 4, p. 483-488, 2017.

HAMBLIM, M.R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochem Photobiol**. v. 94, n. 2, p.199-21, 2018.

HAMBLIN, M.R; NELSON, S.T; STRAHAN, J.R. Photobiomodulation and cancer: what is the truth? **Photomed Laser Surg**. v.36, n. 5, p. 241-245, 2018.

HAMIL, J; KNUTZEN, K.M; DERICK, T.R. **Bases biomecânicas do movimento humano**. 4ªed. Barueri. Manole. p.179-250, 2016

HARSELUD, S; MAGNUSSEN, L.H. JOSEN, J; LOPES, R.A.B; BJORDAL, M. The efficacy of low-level laser therapy for shoulder tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial. **Physiother Res Int**. v. 20, n. 2, p. 108-125, 2015.

HELLIWELL, P. *et al*. Development of a foot impact scale for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. v.53, n. 3, p. 418-422, 2005.

HIB, J. **Di Fiore Histologia – texto e atlas**. 1º ed. Rio de Janeiro. Guanabara, 2003.

HYNES, R.O. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**. v.27, p.216-19, 2009.

ISIK, A; GURSUL,C; AYDIN, M; FIRAT, D; YILMAZ,J. Metalloproteinases and their inhibitors in patients with inguinal hernia. **World J Surg**. v. 41, n.5, p. 1259-1266, 2017.

JAAKKOLA, J.L; MANN, R.A. A review of rheumatoid arthritis affecting the foot and ankle. **Foot Ankle Int**.v.25, n. 12, p.866-74, 2004.

JARVELAINEN, H; SANNIO, A; KOULU, M; WIGHT, T.N; PENTTINEN, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacol Rev**. v. 61, n. 2, p. 198-223, 2009.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Básica – Texto e Atlas**. 13º ed. Guanabara. 2015.

KAPANDJI, A.I. **Fisiologia articular, volume 2: Membro inferior**. Tradução da 5ªed original. São Paulo. Médica Panamericana. 2000.

KARU, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol**.v.84, n.5, p.1091-99, 2008.

KARU, T.I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **Iubmb Life**. v.62, n.8, p.607-610, 2010.

KLEIN, T; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids**. v. 41, n. 2, p. 271-290, 2011

LANNOY, M; SLOVE, S; JACOB, M.P. The function of elastic fibers in the arteries: beyond elasticity. **Pathologic Biologie**. v. 62, n. 2, p.79-83, 2014.

LEUNG, K.S. *et al.* A comparative study on the biomechanical and histological properties of bone-to-bone, bone-to-tendon, and tendon-to-tendon healing: an achilles tendon-calcaneus model goats. **Am J Sports Med**. v. 43, n.6, p. 1413-1421, 2015.

LIVAK, K.J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**. v.25, n.4, p. 402-8, 2001.

MEDEIROS, N.I; GOMES, J.A.S; FARES, R.C.G. **Deteção e quantificação da atividade enzimática das metaloproteínas e de seus inibidores através da técnica de zimografia**. Pós em revista do centro universitário Newton Paiva. v.6, p. 195-198, 2012.

MIGLIARIO, M. PITTARELLA, P; FANULI, M; RIZZI, M. RENÓ, F. Laser induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. **Laser Med Sci**. v. 29, n. 4, p. 1463-1467, 2014.

MIZUNOYA, W. *et al.* Improvement of endurance based on muscle fiber-type composition by treatment with dietary apple polyphenols in rats. **Plos One**. v. 10, n. 7, p. 1-16, 2015.

NABI, S. *et al.* Effect of preoperative ibuprofen in controlling postendodontic pain with and without low-level laser therapy in single visit endodontics a randomized clinical study. **Indian J Den Res**. v. 29 (1), p. 46-50, 2018.

NAKAMURA, Y. *et al.* Bone alterations are associated with ankle osteoarthritis joint pain. **Sci Rep**.v. 6:18717, 2016.

OZBERZ, S.S; GUNDOGAR, H; SENYURT, S.Z; ERCIVAS, K. Adjunct use of low- level laser therapy on the treatment of necrotizing ulcerative gingivitis: a case report. **Laser Med Sci**. v. 9, n. 1, p.73-75, 2018.

PARKS, W.C; MECHAM, R.P. **Matrix metalloproteinases**. 1º ed. Academic Press. 1998.

PREVENTICE, W.E. **Modalidades Terapêuticas para fisioterapeutas**. 4º ed. Porto Alegre. Art med. p. 50-63, 2014.

RIBEIRO, R.I. M.A. *et al.* Expressão de metaloproteínas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **J Bras Patol Med Lab**. v. 44, n. 2, p. 155-121, 2008.

RUH, A.C. *et al.* Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory, biochemical markers. **Laser Med Sci**. v.33, n. 1, p. 165-171, 2018.

SANDERSON, T.H. *et al.* Inhibitory modulation of cytochrome C oxidase activity with specific near-infrared light wavelengths attenuates brain ischemia/reperfusion injury. **Scientific Reports**. n. 3481, 2018.

SERGIO, L.P.P. *et al.* Damage in blood cells exposed to low-level laser. **Laser in Surgery and Medicine**. v.47, n.4, p.361-368, 2015.

SINDICI, E. *et al.* Treatment of oral lesions in dystrophic epidermolysis bullosa: a case series of cord blood platelet gel and low-level laser therapy. **Acta Derm Venerol**. v. 97, p.383-384, 2017.

SMOOT, B; CHIAVOLA, L.L; LEE, J; MANIBUSAN, H; ALLEN, D.D. Effects of low-level laser therapy an pain and swelling in women with breast cancer-related lymphedema: a systematic review and meta-analysis. **J Cancer Survio**. v. 9; n.2, p. 287-304, 2015.

TORTORA, G.J; NIELSEN, M.T. **Princípios de anatomia humana**. 12^oed. Rio de Janeiro. Guanabara. 2013.

TUMILTY, S. *et al.* Low level laser treatment of tendinopathy: a systematic review with meta-analysis. **Photomed Laser Surg**. v. 28, n.1, p. 3-16, 2010.

YAMAMOTO, T; MURPHY, G; TROEBERG, L. Extracellular regulation of metalloproteinases. **Matrix Biol**. v.44-46, p. 255-263, 2015.

WANG, L. *et al.* Low level laser irradiation modulates the proliferation and the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under health and inflammatory condition. **Laser Med Sci**. v.34, n. 1, p. 169-178. 2019.

5.0 ARTIGO

Photobiomodulation influences the mRNA levels of metalloproteinases (MMPs) and its inhibitor in a dose-dependent manner.

Thais Abduch¹, Pierre Augusto Victor da Silva², Álvaro Carneiro de Souza³Lúcia Mara Januário dos Anjos³, Adenilson de Souza da Fonseca^{4,5,6}, Flávia de Paoli³.

¹Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA), Alameda Salvaterra, nº 200, Bairro Salvaterra, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36033003, Brasil.

²Departamento de Fisioterapia, Centro Universitário Redentor (UniRedentor), Itaperuna, Rio de Janeiro, 28300000, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n-Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036900, Brasil.

⁴Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida 28 de Setembro, 87, Vila Isabel, Rio de Janeiro, 20551-030, Brasil.

⁵Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca, 94, Rio de Janeiro, 20211040, Brazil.

⁶Centro de Ciências da Saúde, Centro Universitário Serra dos Órgãos, Avenida Alberto Torres, 111, Teresópolis, Rio de Janeiro, 25964004, Brazil.

Corresponding author: Thais Abduch. Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (SUPREMA), Alameda Salvaterra, nº 200, Bairro Salvaterra, Juiz de Fora, Minas Gerais, 36033003, Brasil.

Tel.: +55 (32) 2101-5000

E-mail: tatabduch@yahoo.com.br

Abstract

The extracellular matrix (ECM) is main constituent of connective tissue with structural and regulatory functions, as the stimulus to differentiate and proliferative cells. Moreover, ECM is a dynamic structure in constant remodeling process, which is controlled by balance between metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). Photobiomodulation (PBM), by low-level laser (LLL), is widely described in literature and applied in clinical practices, although its ECM effects have not been elucidated yet. Thus, the aim of this study was to evaluate PBM effects on ECM components from mice talocrural joints. Mice were divided into 3 groups (n = 6): control, FBM 3Jcm⁻² and FBM 30Jcm⁻². Low-level laser (830nm, 10mW, 0.05 irradiated area, doses 3Jcm⁻² and 30Jcm⁻² irradiation time of 15 and 150 sec, respectively, continuous mode) was applied on talocrural joint for 4 consecutive days, at the same time. mRNA levels of metalloproteinase genes (MMP-2, MMP-9, and MMP-13) and its regulator (TIMP-2) were quantified, as well as the protein expressions of MMP-13 and TIMP-2. PBM can alter only mRNA levels of MMP-2 at 30Jcm⁻² (p <0.05), while MMP-9, MMP-13 and TIMP-2 mRNA relative levels were not demonstrate statistical differences for any group (p > 0.05). Regarding protein expressions, MMP-13 demonstrated positive labeled cells, but only in chondrocytes from articular cartilages, although the cell quantification has not demonstrated statistical differences when compared with control group (p > 0.05). TIMP-2 did not present positive labeled cells for any tissues evaluated. Our results indicate that PBM was able to regulate mRNA levels for MMP-2, but it was not able to regulate MMP-13 and TIMP-2 proteins and this regulation was dose-dependent.

Keywords: Photobiomodulation, low-level laser therapy, extracellular matrix, metalloproteinases, TIMP.

1. INTRODUCTION

Extracellular matrix (ECM) is formed by combination of fibrous (collagen, elastin) and non-fibrous proteins (proteoglycan, glycosaminoglycan and other proteins non-collagenous), which is in constant process of controlled remodeling. Due to its organization of fibrous and non-fibrous components, ECM is able to resist forces applied in tendon, bone and cartilage [1,2].

Controlled remodeling is involved with metalloproteinases (MMPs), a family of endopeptidases Zn^{+2} or Ca^{+2} -dependent, able to degrade all components of ECM. MMPs comprise 24 members, 23 of which are found in mammals [3,4]. Initially, MMPs were described as participating in catabolism of ECM but recent findings have demonstrated that MMPs are also involved in the regulation of growth factor and cytokines release [5,6].

Collagen fragments produced by interstitial collagenases are susceptible to gelatinases (MMP-2 and MMP-9) a second MMP subfamily, which rapidly degrade denatured collagens and collagen fragments [7]. MMP-2 and MMP-9 are capable of cleaving native type IV and V collagens, and its expression has been correlated with metastatic state, since these modifications in ECM may influence the ability of cells to invade and metastasize (i.e., owing to its ability to degrade type IV collagen at the basement membrane). [7]. MMP-9 is also present in inflammatory processes, usually secreted by fibroblasts and inflammatory cells, which migrate to site of lesion [7]. Collagenase-3/MMP-13 is a member of collagenase subfamily, and it is usually found in articular cartilage, in bone and in chondrocytes [8]. Moreover, MMP-13 was found in synovial tissue and its action involved osteoarthritis [9] MMP-13 is able to degrade collagen types I, II and III and cartilage proteoglycan aggrecan [9,10]. It is tempting to speculate that MMP-13 is a critical component of cellular machinery, executing turnover of articular cartilage, being a potential therapeutic target for treatment of cartilage destruction [8].

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are one of endogenous inhibitors and comprise four family members (TIMP-1, -2, -3 and -4) [1,2,4,11]. In addition, other proteins and mechanisms can also inhibit metalloproteinase activity, including $\alpha 2$ -macroglobulin, and a primary inhibitor of metalloproteinases in synovial fluid and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK), the only known membrane-bound MMP inhibitor [4,11]. Also, modification by reactive oxygen species (ROS) and internalization have been demonstrated to silence MMP activity too [12].

Photobiomodulation (PBM) by low-level laser is used in several clinical practices, promoting inflammation resolution and producing analgesia in acute and chronic joint

disorders [13-16]. PBM does not cause evident temperature rise and significant changes in tissue structure, but it has been described as able to cause photochemical and photomechanical effects in cells [17]. This therapy can intensify electron transfer stage in respiratory chain, leading to cell signaling cascades. Mitochondria is able to send to nucleus, through changes in membrane permeability, information about its functional state increasing reactive oxygen species (ROS) release and Ca^{+2} concentration, modifications in pH and synthesis of ATP [18]. Changes in intracellular redox state can activate or inhibit signaling pathways triggering effects such as cell proliferation and wound healing [20].

PBM regulates MMPs and improves collagen production in different tissues such as cartilage, muscle and bones [21-23]. According to Freitas and Hamblin [24] and Hamblin [25], for therapeutic PBM effects occur, correct laser doses are necessary. In fact, biphasic dose-response occurs at low or high doses, which can lead to no significant effect or to inhibitory effects.

Since PBM is widely used in rheumatology and orthopedic treatments and more, ROS modifications can silence MMP activity, this study aimed to evaluate alterations of MMP-2, -9, -13 and TIMP-2 mRNA levels and MMP-13 and TIMP-2 protein expressions in talocrural joint of mice after photobiomodulation using low-level infrared laser.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 ANIMALS

All experimental procedures were previously approved by Animal Ethical Committee of Federal University of Juiz de Fora (protocol number 039/2014) and conducted in accordance with international ethical standards. Male C57BL/6 mice, 8-10 weeks old, weighting 24-28g each, were housed, six per cage with free access to feed and water. Animals were kept in a 12:12h light/dark cycle (lights on from 6:00 AM to 6:00 PM) in a temperature-controlled room ($25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$). Animals were randomly distributed into three groups (n=6): non-treated (control); PBM at 3Jcm^{-2} energy density and PBM at 30Jcm^{-2} energy density.

2.2 LASER

A therapeutic low-level infrared laser (AlGaAs laser; HTM Indústria de Equipamentos Eletrônicos Ltda, Brazil) was used for experimental procedures. Physical parameters of laser are described in table 1. Laser irradiation was applied at one point on ankle joint, perpendicularly to skin.

Table 1: Laser physical parameters.

Wavelength (nm)	830
Diode laser	AsGaAl
Power (mW)	10
Spot area (cm²)	0.05
Power density (Wcm⁻²)	0.2
Energy per point (mJ)	150 and 1500
Energy density (Jcm⁻²)	3 and 30
Time per point (s)	15 and 150
Number of points	1
Application technique	Punctual by skin contact
Number of treatment sessions	four

2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Low-level laser exposure (3 Jcm⁻² and 30 Jcm⁻² groups) were performed during 4 consecutive days on both mice talocrural joints. Twenty-four hours after the last laser treatment, the groups were euthanized with ketamine hydrochloride (80mg kg⁻¹, Syntec, Brazil) and xylazine hydrochloride (20mg kg⁻¹, Syntec, Brazil) solution intraperitoneally. The skin was removed; muscles and bones above and below were dissected and washed in distilled water. Right joints were distributed to morphological and immunohistochemical analysis, while left joints were used for real-time PCR.

2.4 TOTAL RNA EXTRACTION

Each left joint was separately macerated after immersion in liquid nitrogen and total RNA was extracted by TRIzol[®] (Invitrogen, USA) followed by phase separation by chloroform and isopropanol. Concentration of extracted RNA was measured by NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Then 2 µg of total RNA was transcribed into complementary DNA (cDNA) using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA), following the manufacturer's guidelines.

2.5 REAL TIME-PCR

For real time -PCR procedures, primers for metalloproteinases-2, -9 and -13, as well as their TIMP-2 genes were used (table 2). All primers were designed in different exons to avoid the possibility of contamination with genomic DNA using the Primer BLAST program [26].

After standard curves determination for detecting primers efficiency (acceptable efficiency above 90%), 1:5 dilution of cDNA was standardized for all samples. Reactions were carried out in final volumes of 10 μ L, containing 2.6 μ L of ultrapure water, 1.4 μ L of the mixture of one pair of Forward and Reverse primers of each gene, 1 μ L of diluted cDNA and 5 μ L of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA).

Real-time PCR assay was performed using StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) under following conditions: 40 cycles; in each cycle, initial denaturation at 95°C for 10 minutes, denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing of primers and extension at 60°C for 1 minute. Reactions for each sample were carried out in duplicated. As negative control, reactions containing reaction mix plus primers in absence of t cDNA. Analysis of melting and dissociation curves was done at the end of each real-time PCR procedure as quality control of t-DNA sequence amplification. Gene expressions were analyzed by Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) method [27]. Once the $\Delta\Delta$ CT was determined, formula $2^{-\Delta\Delta$ CT was applied, which resulted in the value of relative gene expression.

Table 2: Primes sequence used for real-time PCR.

<i>Primers</i>	<i>Sequencie</i>	
	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
β -actina,	CATCCGTAAAGACCTCTATGC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC
MMP-2	CCGATCTACACCTACACCAA	ATGCTGATACTGACACTGGTA
MMP-9	CTCTGCCTGCACCACTAAAG	GGCAAGCAGTACTCTTCCTG
MMP-13	ATGGTCCAGGCGATGAAGAC	ACCCAGCCCTATCCCTTGAT
TIMP-2	TAGACTGGTCCAGCTTTGAC	GACCCACTACCATGTCTAG

2.6 HISTOLOGICAL AND IMMUNOCITOCEMICAL PROCEDURES

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde/ PBS solution for 24 h, decalcified in 5% nitric acid for 48 h, dehydrated and embedded in histosec® paraffin (Merck, Germany). Sagittal sections (3 μ m thickness) were used for immunohistochemical analysis.

Previously, sections were submitted to heat-induced epitope retrieval by incubation in a 0.01 M sodium citrate solution (pH 6), at microwave oven for 20 min and followed by a 20 min cool-down. Endogenous peroxidase activity was blocked using 3% H₂O₂ diluted in absolute methanol, followed by 1.5% blocking serum of rabbit ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, USA). A primary polyclonal antibody anti-MMP-13 and TIMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) was diluted as suggested by manufacturer (1:50) and incubated overnight at 4°C. An appropriate secondary biotinylated antibody of rabbit ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology, USA) was used during 30 min, at room temperature, followed by ABC-Peroxidase solution, containing 3–3'-diaminobenzidine (Sigma Aldrich, USA) chromogen for 10 min at room temperature. Sections were counterstained using methyl green. As a negative control, sections were incubated in absence of primary antibody.

2.7 IMAGE ANALYSIS

Morphological analysis and quantitative assessments were performed using an Olympus microscope (BX53F), equipped with U-PlanFL N 4/0.13, 10/0.30, 40/0.75 and 100/0.85 objectives. Images captured with an Olympus DP73 camera using cellSens Image software (5.1 version, Olympus, EUA). For quantitative analysis, 40/0.75 objective was used, helping to identify positive labeled cells. Percentages of cells were calculated: (labeled cells/total cells) x 100.

2.8 STATISTICAL ANALYSIS

Normality of data was tested by Shapiro-Wilk test. Parametric data were expressed as mean $\pm$ standard deviation, while non-parametric data were expressed as median (interquartile range). The comparison of the parametric data was performed by One-Way Anova variance test followed by Turkey Post hoc. Non-parametric data was performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test, with significance $p < 0.05$. Statistical analyzes were performed using GraphPad InStat software (version 7 for Windows 8, GraphPad Software, USA).

3. RESULTS

3.1 MMP-2, -9,-13 mRNA LEVELS

For mRNA relative levels, all tissues present in talocrural joint were considered, since total RNA extraction was extracted from whole joint. Figure 1 shows data of MMP-2 (A), MMP-9 (B) and MMP-13 (C) mRNA relative levels from talocrural joints after PBM. MMP-9 and MMP-13 did not demonstrate statistical differences ($p > 0.05$), while MMP-2 mRNA relative level was increased after PBM at 30 Jcm^{-2} when compared with control ($p < 0.05$).

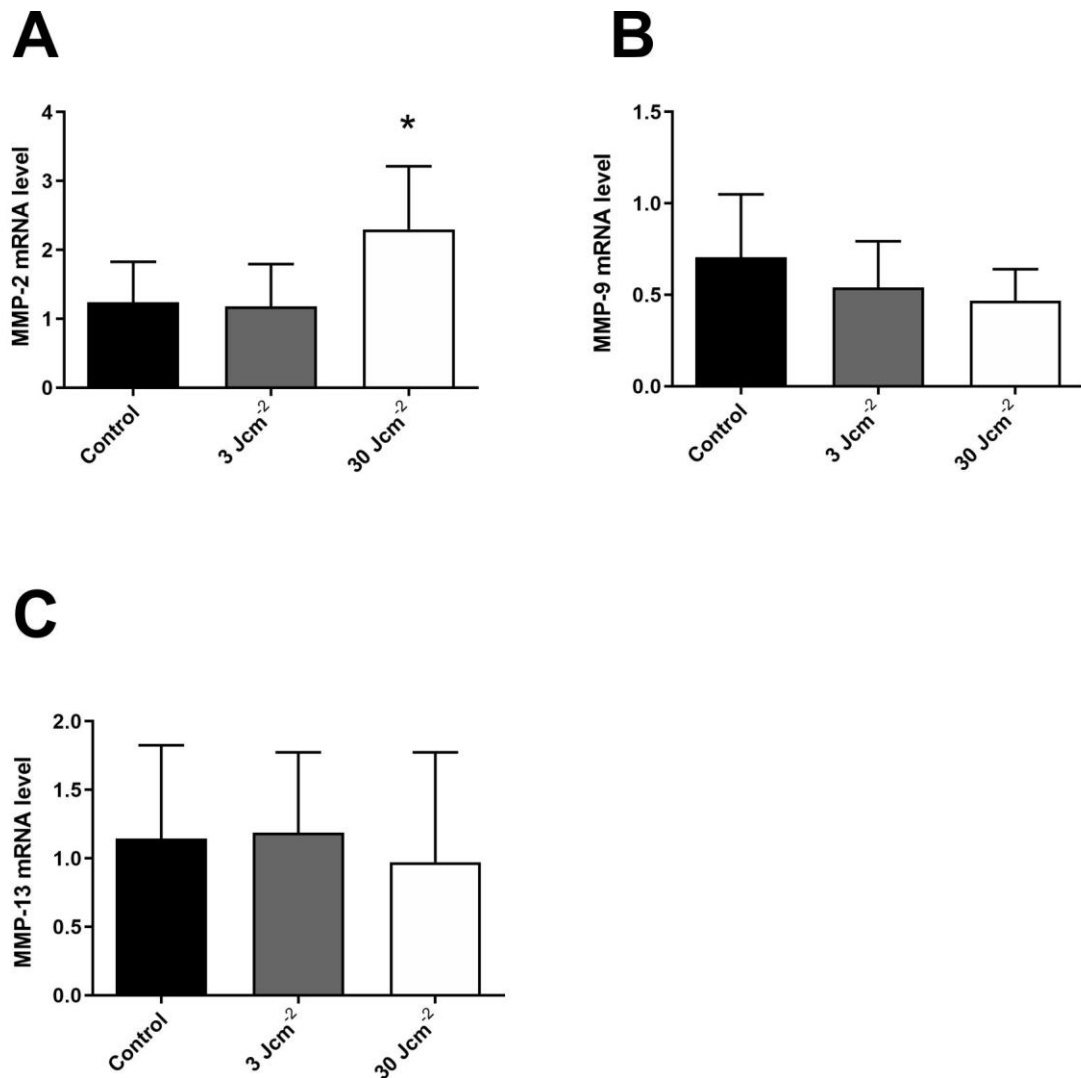


Figure 1. mRNA relative levels of MMP-2 (A), MMP-9 (B) and MMP-13 (C) from mice talocrural joints. *indicates statistical differences when compared with control group ($p < 0.05$).

3.2 TIMP-2 mRNA LEVEL

Figure 2 demonstrates that TIMP-2 mRNA did not alter its level after PBM when compared with control group ($p > 0.05$) for both doses tested.

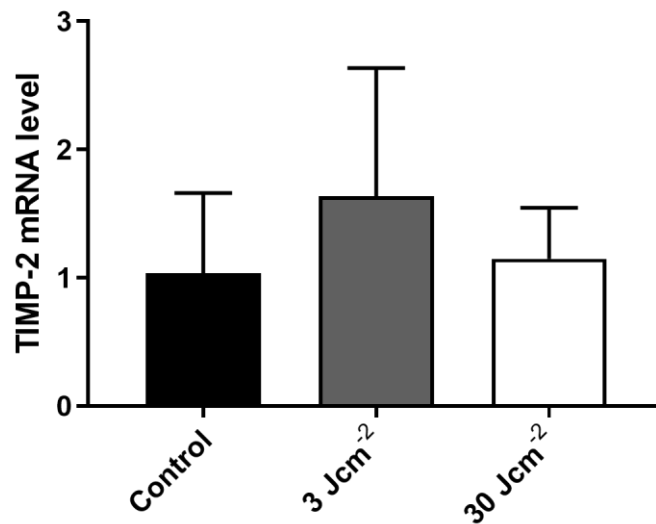


Figure 2. mRNA relative levels of TIMP-2 from mice talocrural joints after photobiomodulation. No statistical differences were observed for both doses tested ($p > 0.05$).

3.3 MMP-13 AND TIMP-2 IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Immunocytochemistry analyses were performed in order to confirm MMP-13 and TIMP-2 protein in talocrural tissues. Only cells from articular cartilage demonstrated positive labeled for MMP-13; however there was no significant differences ($p > 0.05$) in positive labeled cell quantification for both PBM groups (3Jcm⁻² and 30Jcm⁻²) when compared with control group (Figure 3).

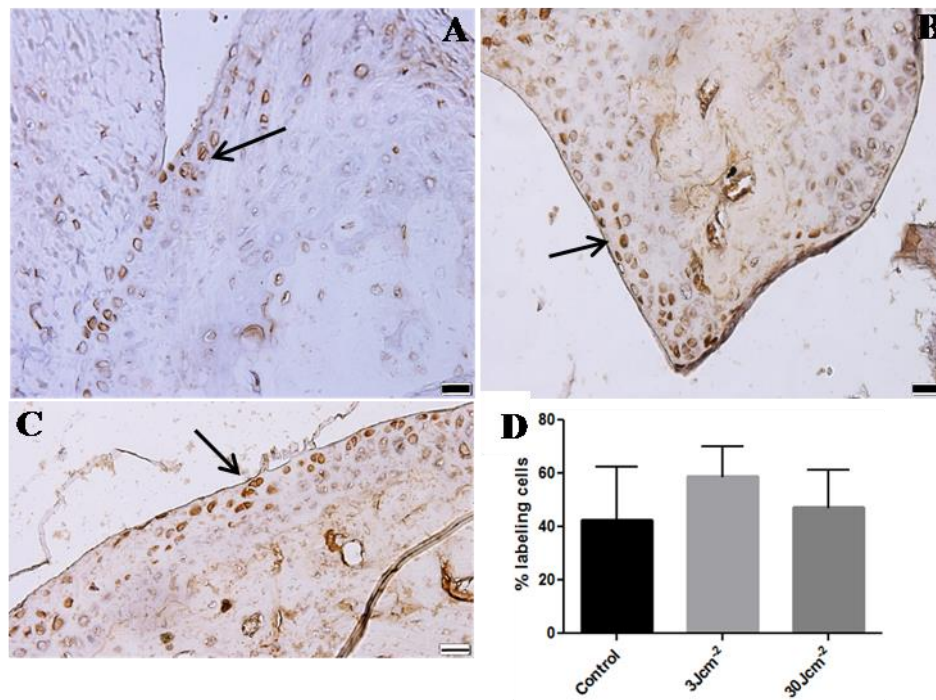


Figure 3. MMP-13 immunocytochemistry in tissues from talocrural joint after photobiomodulation. (a) control; (b) 3Jcm⁻²; (c) 30Jcm⁻² and (d) MMP-13 positive labeled cells quantification. Arrows indicate positive labeled cells in articular cartilage. Bar = 20 μ m.

Regarding TIMP-2, there was not observed positive labeled cells in all talocrural tissues from control and PBM groups, including articular cartilage (Figure 4).

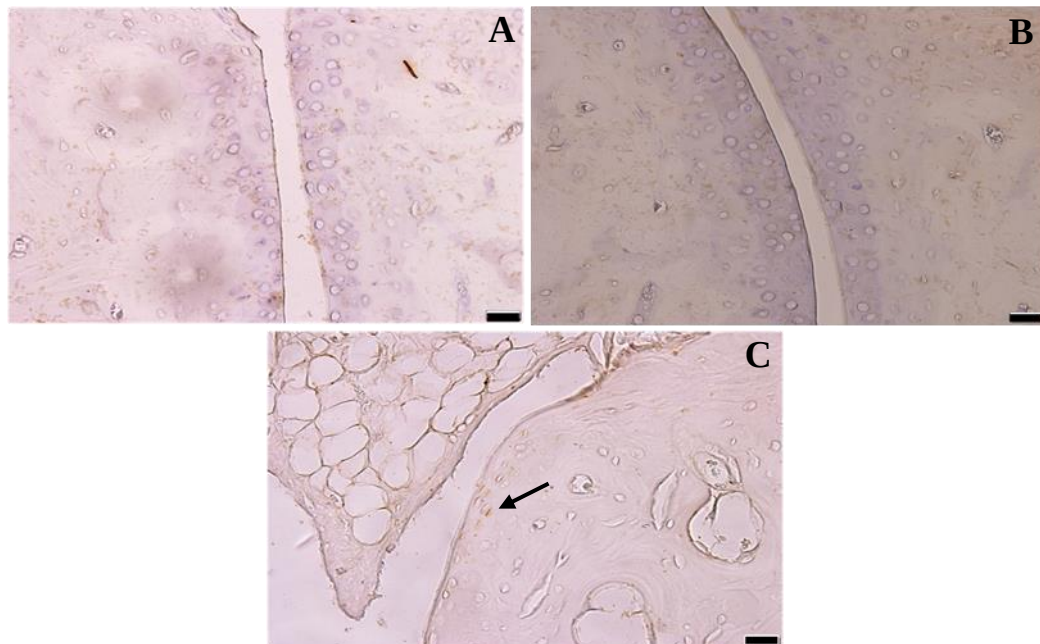


Figure 4. TIMP-2 immunocytochemistry in tissues from talocrural joint after photobiomodulation. (A) control; (B) 3Jcm⁻² and (C) 30Jcm⁻². Arrow indicates some labeled cells, but only at 30Jcm⁻² group. Bar = 20 μ m.

4.0 DISCUSSION

PBM is a therapeutic approach used in clinical applications for several disorders [14-16, 28], but experimental studies have demonstrated that PBM can lead to sub lethal DNA damage, can alter cell death-related mRNA levels, as well as the DNA fragmentation [29-31]. These studies would contribute for understanding of possible short, medium and long-term PBM side-effects.

MMPs, as well its inhibitors, have been involved in physiological processes such as embryonic development, morphogenesis, tissue remodeling, cell growth, migration and apoptosis [5]. Also, these MMPs have been described as having a key role in pathological conditions such as inflammation, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, cardiovascular diseases, fibrosis and cancer [4]. Since MMPs and TIMPs are involved in several processes and there is a consensus that PBM present a biphasic effect [24] the type of cell response is directly related with laser parameters [32]. Then, it would be relevant to evaluate the MMPs and TIMPs using two different doses of low-level laser.

MMP-2 mRNA levels increased only at 30Jcm^{-2} group, while MMP-9 and MMP-13 mRNA was not altered. These results corroborate with previous studies which describe the importance of laser parameters for cell response [33, 34]. Oliveira et al. [35] also described that only MMP-2 was stimulated and MMP-9 remained unchanged in bone after PBM in cells. While MMP-9 is specially related to inflammatory processes and it is synthesized by cells present in the infiltrate, acting as key mediator of tissue destruction in diseases marked by inflammatory damage [36], MMP-2 is responsible for tissue remodeling, plays a key role in cell proliferation and differentiation [37] as well as it is involved in inflammatory processes and in formation of scar tissue [38, 39].

The MMP-13 is an enzyme that preferentially degrades type II collagen and it is involved in cartilage degradation [40]. Additionally, this enzyme participates in fibrotic, atherosclerotic and carcinogenic processes, including chondrosarcoma and melanoma and skeletal diseases [6, 41]. Moreover, MMP-13 could be involved in pathways of MMP-9 activation [3]. Due to the importance of processes involved, immunocytochemical analyses were carried out in order to evaluate its protein expression in tissues from talocrural joints. Positive labeled cells were observed only in cells from articular cartilage after PBM (both 3Jcm^{-2} and 30Jcm^{-2}). However, it was not observed statistical differences when compared with control group likewise mRNA mRNA level, suggesting that PBM in these parameters used does not alter the expression of MMP-13. On the other hand, Casalechi et al [42] described an increase in the MMP-13 mRNA level after PBM in tendons during acute and

chronic process of lesion. Bublitz and colleagues [43] also corroborated, describing MMP-13 labeled cells after PBM in osteoarthritis cartilage model. Therefore, the PBM effects are directly related with laser doses and physiological and pathological conditions.

TIMP-2 mRNA level does not change after PBM at both doses. The presence of TIMP in tissue indicates that there is MMP regulation, since TIMP is able to inhibit MMP actions [3]. The presence of this protein was also investigated in talocrural joint tissues after PBM and it was observed few or non-labeled cells. A permanent balance between MMPs and TIMPs guarantees tissue functionality, since the level of TIMPs could result in fibrosis due to the accumulation of ECM, while the decrease could result in a proteolysis in the ECM [44]. Differently from our results, in a recent study the PBM modulated not only the expression of MMPs but also the TIMP, demonstrating that the activation or inhibition of MMP and TIMP has a temporary behavior compatible with the stage of the cellular process being studied [45].

5.0 CONCLUSION

Our results indicate that PBM can alter MMP-2 mRNA level, but cannot alter MMP-9, MMP-13 and TIMP mRNA levels. More, both MMP-13 and TIMP-2 proteins were also altered after PBM.

Funding: This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento-CNPq (process number APQ 474405/2013-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG (process number APQ 02123/15) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Conflict of interest

The authors wish to declare no conflict of interests

REFERENCES

- 1- Bonnas C, Chou J, Werb Z (2014) Remodeling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 786-801. <http://doi.org/10.1038/nrm3904>
- 2- Jarvelainen H, Sannio A, Koulou M, et al (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61: 198-223. <http://doi.org/10.1124/pr.109001289>
- 3- Alameddine HS, Morgan JE (2016) Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases in inflammation and fibrosis of skeletal muscles. *J Neuromuscul Dis* 3: 455-473. <http://doi.org/10.3233/JND-160183>
- 4- Yamamoto T, Murphy G, Troeberg L (2015) Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol* 44-46:255-263. <http://doi.org/10.1016/j.matbiol.2015.02.007>
- 5- Isik A, Gursul C, Aydin M, et al (2017) Metalloproteinases and their inhibitors in patients with inguinal hernia. *World J Surg* 41: 1259-66. <http://doi.org/10.1007/s00268-016-3858-6>
- 6- Klein T, Bischoff R (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids* 41: 271-290. <http://doi.org/10.1007/S100726-010-0689-x>
- 7- Da Ré Guerra F, Vieira GP, Marques PP, et al (2017) Low level laser therapy accelerates the extracellular matrix reorganization of inflamed tendon. *Tissue and Cell* 49: 483-488. <http://doi.org/doi10.1016/J.tice-2017.05.006>
- 8- Singh A, Rayasekaran N, Hartenstein B (2013) Collagenase-3 (MMP-13) deficiency protects C57BL/6 mice from antibody-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 15: R222 1-7. <http://doi.org/10.1186/ar4423>
- 9- Li H, Wong D, Yuan Y, et al (2017) New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 19:1-12. <http://doi.org/10.1186/s13075-017-1454-2>
- 10- Fosang AJ, Last K, Knauper V, et al (1996) Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FESB Lett* 12: 17-20. <http://doi.org/10.1016/0014-5793>
- 11- Baker AH, Edwards DR, Murphy G (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115:3719-3727. <http://doi.org/10.1242/jcs.00063>

- 12-Fu X, Parks WC, Heinecke JW (2008) Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* 19:2-13. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.06.005>
- 13-Dos Anjos LMJ, Fonseca AS, Gameiro J, et al (2017) Apoptoses induced by low-level laser un polymophonuclear cells of acute joint inflammation comparative analysis of two energy densities. *Laser Med Sci* 32: 975-983. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2196-8>
- 14-Cinar E, Saxenas S, Vygur F (2018) Low-level laser therapy in the management plantar fasciitis: a randomized controlled trial. *Laser Med Sci* 33:949-958. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2423-3>
- 15-Smoot B, Chiavola LL, Lee J, et al (2015) Effects of low-level laser therapy on pain and swelling in women with breast cancer-related lymphedema : a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Surviv* 9: 287-304. <http://doi.org/10.1007/s11764-0411-1>
- 16-Gopal NS, Kamal W, George J, et al (2016) Radiological and biomechanical effects (CTX-II, MMP-3,8 e 13) of low-level laser therapy (LLLT) in chronic osteoarthritis in Al-Klary, Saudi Arabia. *Laser Med Sci* 32: 297-303. <http://doi.org/s10103-016-2114-5>
- 17-Chu Y, Chen SY, Hsien YL, et al (2018) Low-level laser therapy prevents endothelial cells from TNF- α / cicloheximide- induced apoptosis. *Laser Med Sci* 33: 279-286. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2364-x>
- 18-Karu TI (2008) Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem and Photobiol* 84:1091-1099. <http://doi.org/10.1111/J.7151-1097.2008.00394.x>
- 19-Farivar S, Malekashabab T, Shiari R (2014) Biological effects of low-level laser therapy. *Laser Med Sci* 5: 58-62. PubMed PMID: 25653800/ PubMed Central PMCID PMC4291815.
- 20-Gao X, Xing D (2009) Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Bio Med Sci* 16:1-6. <http://doi.org/10.1186/1423-0127-16-4>
- 21-Assis L, Tim C, Magri A, et al (2018) Interleukin-10 and collagen type II immuno expression are modulated by photobiomodulation associated to aerobic and aquatic exercises in a experimental model of osteoarthritis. *Laser Med Sci* 33: 1875-1882. <http://doi.org/10.1007/s10103-018-2541-6>
- 22-De Brito A, Alves AN, Ribeiro BG (2017) Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. *Laser Med Sci* 33:513-521. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2392-6>

- 23-Brassolatti P, de Andrade ALM, Bossin PS, et al (2018) Photobiomodulation on critical bone effects of rat calvaria: a systematic review. *Laser Med Sci* 33:1841-1848. <http://doi.org/10.1007/s10103-018-2653-z>
- 24- Freitas LF, Hamblim MR (2016) Proposed mechanism of photobiomodulation or low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 22:1-37. <http://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.256/201>
- 25-Hamblim MR (2018) Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. *Photochem Photobiol* 94:199-212. <http://doi.org/10.1111/php.12864>
- 26-Untergrasser A, Cututache I, Korissar T, et al (2012) Primer 3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 10:1-12. <http://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- 27-Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $\Delta\Delta C_T$ (T). *Methods* 25:402-408. <http://doi.org/10.1016/meth.2011.1262>
- 28-Bakteir S, Razak Ozancler A, Mutle ER, et al (2018) The short-term effectiveness of low-level laser, phonophoresis, and iontophoresis in patients with lateral epicondylitis. *J Hand Ther* 0:1-8. <http://doi.org/10.1016/j.jht.2018.01.002>
- 29-Fonseca AS, Moreira TO, Paixal DL, et al (2010) Effects of laser therapy on DNA damage. *Laser in Surgery and Medicine* 42:481-488. <http://doi.org/10.1002/sm.20921>
- 30-de Paoli F, Cerqueira LR, Ramos MM, et al (2015) DNA fragmentation and nuclear phenotype in tendons exposed to low-level intensity infrared laser. *Spie Digital Library* 9321:1-12. <http://doi.org/10.1177/12.2075726.short>
- 31-da Silva PAV, dos Anjos LMJ, Abduch TF (2019) Photobiomodulation can alter mRNA levels cells death-related. *Laser Med Sci* :1-8. <http://doi.org/10.1007/s10103-019-02764-x>.
- 32-Alves AN, Fernandes KPS, Diana AM, et al (2014) Modulation effects of low-level laser therapy on fibrosis in the repair process of the tibialis anterior muscle in rats. *Laser Med Sci* 29:813-21. <http://doi.org/10.1007/s10103-1428.9>
- 33-Andreo L, Soldera CB, Ribeiro BG, et al (2017) Effects of photobiomodulation on experimental models of peripheral nerve injury. *Laser Med Sci* 32:2155-2165. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2359-7>
- 34-Santinoni CS, Oliveira HFF, Batista VES, et al (2017) Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: a systematic review. *Photocell Photobiol* 169: 83-89. <http://doi.org/10.1016/j.photobiol.2017.03.004>

- 35- Oliveira FA, et al (2017) Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblast. *Photochem Photobiol* 169:35-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.02.020>
- 36- Tauber S, Paulsen K, Wolf S, et al (2012) Regulation of MMP-9 by a WIN-Binding site in the monocytemacrophage, systems independent from cannabinoid receptors. *PLoS One* 7:1-19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048272>
- 37- Andraus RAC, Maia LP, Lino ADS, et al (2017) LLLT activates MMP-2 and increases muscle mechanical resistance after nerve sciatic regeneration. *Laser Med Sci* 32: 771-778. <http://doi.org/10.1007/s10103-017-2169-y>
- 38- Da Ré Guerra FR, Vieira CP, Almeida MS, et al (2013) LLLT improves tendon healing through increase of MMP activity and collagen synthesis. *Laser Med Sci* 28: 1281-1288. <http://doi.org/10.1007/s10103-012-1236-7>
- 39- Cury V, Moutti ALS, Assis L (2013) Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF- α and MMP-2. *Photochem Photobiol* 125:164-170. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.06.004>
- 40- Baragi V, Becher G, Bendele AM, et al (2009) A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: to evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum* 60: 2008-2018. <http://doi.org/10.1002/art.24629>
- 41- Nkymberg T, Ruppert C, Shiomi T, et al (2013) Pivotal role of matrix metalloproteinase 13 in extracellular matrix turnover in idiopathic pulmonary fibrosis. *Plos One* 8(9):e73279. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0073279>
- 42- Casalechi HL, Leal-Junior ECP, Xavier M (2012) Low-level laser therapy in experimental model of collagenase-induced tendinitis in rats: effects in acute and chronic inflammatory phases. *Laser Med Sci* 28: 989-995. <http://doi.org/10.1007/s10103-012-1189-x>
- 43- Bublitz C, Medalha C, Oliveira P (2014) Low-level laser therapy presents degenerative morphological changes in an experimental model of anterior cruciate ligament transection in rats. *Laser Med Sci* 29:1669-78. <http://doi.org/10.1007/s10103-014-1546-z>
- 44- Arpino V, Brock M, Gil SE (2015) The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* 44:247-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.005>

- 45-Stancker TG, Vieira SS, Serra AJ (2018) Can photobiomodulation associated with implantation of mesenchymal adipose-derived stem cells attenuated the expression of MMPs and decrease degradation of type II collagen in on experimental model of osteoarthritis? *Laser Med Sci* 33:1073-1084. <http://doi.org/10.1007/s10103-018-2466-0>