

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA

ALINE DA SILVA

Efeito do treinamento físico resistido associado ao laser de baixa intensidade em modelo experimental de osteoartrite de joelho: avaliação hemodinâmica e efeitos locais

SÃO PAULO

2017

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA

Efeito do treinamento físico resistido associado ao laser de baixa intensidade em modelo experimental de osteoartrite de joelho: avaliação hemodinâmica e efeitos locais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina da Universidade Nove de Julho, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Discente: Aline da Silva

Orientadora: Prof. Dra. Stella Regina Zamuner,

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo de Paula A. da Silva

SÃO PAULO

2017

Silva, Aline da.

Efeito do treinamento físico resistido associado ao laser de baixa intensidade em modelo experimental de osteoartrite de joelho: avaliação hemodinâmica e efeitos locais. / Aline da Silva. 2017.

62 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Stella Regina Zamuner.

- 1. Treinamento resistido. 2. Laser de baixa intensidade. 3. Osteoartrite. 4. Capacidade funcional. 5. Teste de esforço máximo.***

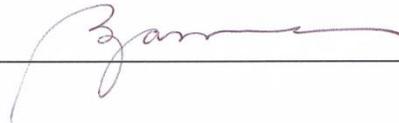
São Paulo, 22 de fevereiro de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): **ALINE DA SILVA**

Título da Dissertação: **AVALIAÇÃO DO TREINAMENTO RESISTIDO ASSOCIADO AO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

Presidente: PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER



Membro: PROFA. DRA. IRIS CALLADO SANCHES



Membro: PROFA. DRA. IVANI CREDIDIO TROMBETTA



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me dado a honra de concluir o mestrado.

Aos meus pais RIVADAL DA SIVA e MARIA DA PENHA DOS SANTOS SILVA pelo amor, educação. São os meus exemplos de vida, pois me ensinaram que a felicidade não depende de dinheiro ou posição social. Deram-me a maior e melhor herança que os pais podem deixar para os filhos: a ética e a graça de Deus.

Aos meus irmãos e cunhados WELIGTON e VIVIANE, PAULA e ALEX que são meus amigos e conselheiros.

Aos meus sobrinhos pelas arruaças, carinho e amor que todos eles têm GUSTAVO, ISABELE, ANA BEATRIZ, MARIANA e SAMUEL.

A todos da MINHA FAMÍLIA e AMIGOS, os quais sempre me apoiaram e incentivaram a progredir.

Amo todos eles!

Agradeço à professora Dr. STELLA REGINA ZAMUNER a quem admiro a habilidade de ensinar e me recebeu como aluna de iniciação científica em 2012. Agradeço pelo carinho, excelente orientação, paciência, conselhos e aprendizados de pesquisa in vitro e in vivo que me acompanharão pela minha vida. Tê-la como minha orientadora é um grande privilégio.

Agradeço ao professor Dr. MARCELO DE PAULA ALVES DA SILVA pela coorientação, paciência, amizade, aprendizado nos experimentos in vivo que realizei nesse projeto.

As informações que ambos me passaram já estão no meu conhecimento e conhecimento não se tira de ninguém!

Agradeço a todos os AMIGOS de iniciação científica, mestrado e doutorado, funcionários que estão ou que passaram pela Universidade durante esses anos. Agradeço pelas boas conversas, brincadeiras, aprendizados, ajudas e momentos felizes que tivemos juntos dentro e fora da universidade.

Agradeço à UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO pela graduação que me proporcionou e Mestrado em Medicina, ambos os cursos com experientes professores que ao longo do tempo se tornaram amigos, além do fornecimento dos materiais, aparelhos e animais utilizados para a realização deste e de outros projetos nos quais tive a oportunidade de participar.

Ao INSTITUTO DO CORAÇÃO pelas fotos tiradas.

A CAPES pelo apoio financeiro para a realização do curso.

A BANCA por aceitar participar da minha defesa e acrescentar ao projeto importantes informações que enriquecerão ainda mais o resultado de um excelente trabalho.

A todos meus eternos agradecimentos!

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença inflamatória degenerativa da articulação, sendo que dos principais sintomas são a diminuição da capacidade funcional, dor e conseqüentemente a piora da qualidade de vida do indivíduo afetado. Além disso, os tratamentos farmacológicos atuais para OA têm como um dos efeitos colaterais alterações gastrintestinais indesejadas. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de duas terapias não farmacológicas: o treinamento resistido (TR) associado ao laser de baixa intensidade (LBI) em modelo experimental de OA em ratos na avaliação hemodinâmica e no local da lesão. Para tal, foram utilizados 40 ratos machos *Wistar* com peso entre 200 e 280g e habilidade ao treinamento resistido, divididos em cinco grupos sendo os grupos sedentários: controle (C); osteoartrite (OA); osteoartrite + LBI (OL); e treinados: osteoartrite + TR (OR); e OA + TR +LBI (ORL). A OA foi induzida por injeção de 20 μ l (10 μ de 4% papaína e cisteína 0.03M) no espaço virtual intra-articular do joelho direito. Os grupos OR e ORL foram submetidos a um protocolo de treinamento resistido em escada associado ao LBI (660 nm, 5 mW, 2,5 J/cm², 20 s, A= 0,04 cm²) durante 8 semanas. Os resultados demonstraram que os grupos OR e ORL apresentaram menor peso corporal ao final do protocolo de tratamento e melhora na capacidade funcional avaliada através do Teste de esforço máximo em comparação aos grupos sedentários. A avaliação hemodinâmica mostrou que a pressão arterial não revelou diferença estatística significativa entre os grupos estudados e a frequência cardíaca também avaliada através de registro hemodinâmico apresentou-se diminuída no grupo ORL o que indica proteção cardiovascular. O influxo leucocitário demonstrou aumento de células no grupo OA o que não foi observado nos grupos OR e ORL. A análise histológica da membrana sinovial mostrou o efeito protetor do LBI associado ao TR em relação a fibrose, diminuição de intenso processo inflamatório e edema. Os resultados deste trabalho demonstraram que a associação do laser de baixa intensidade com o treinamento resistido revelam-se eficiente como tratamento não farmacológico da osteoartrite, diminuindo o comprometimento sistêmico e local da doença.

Palavras chaves: Treinamento resistido, laser de baixa intensidade, osteoartrite, capacidade funcional, Teste de esforço máximo, Hemodinâmica, Pressão arterial, influxo leucocitário.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative inflammatory disease of the joint, and the main symptoms are decreased functional capacity, pain and consequently worsening the quality of life of the affected individual. In addition, the current pharmacological treatments for OA have as one of the side effects unwanted gastrointestinal changes. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of two non-pharmacological therapies: resistance training (RT) associated with the low intensity laser (LBI) in an experimental model of OA in rats at hemodynamic and lesion site evaluation. For this purpose, 40 male Wistar rats weighing between 200 and 280 g and resistance training were divided into five groups: the control group (C); Osteoarthritis (OA); Osteo-arthritis + LBI (OL); And trained: osteoarthritis + TR (OR); And OA + TR + LBI (ORL). OA was induced by injection of 20 μ l (10 μ of 4% papain and 0.03M cysteine) into the virtual intra-articular space of the right knee. The OR and ORL groups were submitted to a LBI-associated ladder resistance training protocol (660 nm, 5 mW, 2.5 J / cm², 20 s, A = 0.04 cm²) for 8 weeks. The results showed that the OR and ORL groups presented lower body weight at the end of the treatment protocol and improved functional capacity assessed through the Maximum stress test in comparison to the sedentary groups. The hemodynamic evaluation showed that blood pressure did not reveal a statistically significant difference between the studied groups and the heart rate also evaluated by hemodynamic recording was decreased in the ORL group, which indicates cardiovascular protection. The leukocyte influence showed increased cells in the OA group, which was not observed in the OR and ORL groups. The histological analysis of the synovial membrane showed the protective effect of LBI associated with TR in relation to fibrosis, reduction of intense inflammatory process and edema. The results of this work demonstrated that the association of the low-intensity laser with resistance training proved to be efficient as a non-pharmacological treatment of osteoarthritis, reducing the systemic and local involvement of the disease.

Key words: Resistance training, low intensity laser, osteoarthritis, functional capacity, Maximum stress test, Hemodynamics, Blood pressure, leukocyte influx.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Fatores de risco biológicos e mecânicos para desenvolvimento da OA.	14
Fig. 2	Joelho saudável e joelho com osteoartrite (OA).	18
Fig. 3	Esquema da ação do LBI pela membrana celular.	18
Fig. 4	Comprimentos de onda do LBI terapêutico.	19
Fig. 5	Caixas para comportar os animais e medidor de temperatura da sala de animais.	25
Fig. 6	Sequência experimental do presente estudo.	26
Fig. 7	Composição dos grupos experimentais.	27
Fig. 8	Procedimento para Indução da OA.	29
Fig. 9	Equipamento de terapia LBI.	29
Fig. 10	Rato em treinamento.	31
Fig. 11	Localização da artéria carótida para cirurgia de canulação	32
Fig. 12	Processo de análise hemodinâmica e dos ratos.	32
Fig. 13	Esquema de retirada de lavado para quantificação do influxo leucocitário.	33
Fig. 14	Efeito do Laser de baixa intensidade (LBI) e Treinamento resistido (TR) no ganho de peso em modelo experimental de OA.	35
Fig. 15	Efeito do LBI e TR no teste de esforço máximo (TEM) em modelo experimental de OA.	36
Fig. 16	Efeito do LBI e TR no teste de esforço máximo (TEM) normalizado em modelo experimental de OA.	37
Fig. 17	Efeito do tratamento com LBI e TR sobre a avaliação hemodinâmica (Frequência cardíaca) em modelo experimental de OA.	38

Fig. 18	Efeito do tratamento com LBI E TR sobre a avaliação hemodinâmica (pressão arterial sistólica e diastólica) em modelo experimental de OA.	39
Fig. 19	Efeito do tratamento com LBI e TR sobre a Avaliação Hemodinâmica (Pressão arterial) em modelo experimental de OA.	40
Fig. 20	Efeito do LBI e TR na redução do influxo leucocitário totais na cavidade articular dos ratos em modelo experimental de OA.	41
Fig. 21	Efeito do tratamento com LBI e TR e seu efeito na análise das membranas sinoviais de cada grupo coradas com HE em modelo experimental de OA.	43
Fig. 22	Efeito do tratamento do LBI e TR em cortes histológicos de amostras de membrana sinovial dos grupos coradas com <i>Pricosirius red</i> sob luz polarizada.	45
Fig 23	Efeito do tratamento do LBI E TR em cortes histológicos de amostras de membrana sinovial de cada grupo coradas com <i>Pricosirius red</i> sob luz polarizada quanto a quantificação de colágeno.	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Parâmetros do Laser de Baixa Intensidade.	30
TABELA 2:	Protocolo do treinamento físico resistido.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AINES	Anti-inflamatório não esteroidais
ATP	Adenosina trifosfato
C	Controle
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
COBEA	Colégio Brasileiro de experimentação Animal
DNA	Sigla em inglês “deoxyribonucleic”- ácido desoxirribonucleico (ADN)
FC	Frequência Cardíaca
HE	Hematoxilina e Eosina
i.p.	Intraperitoneal
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
J	Joule
Kg	Quilograma
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission
LED	Diodo emissor de luz
LBI	Laser de baixa Intensidade
M	Média
mW	Mili watts
OA	Osteoartrite
OL	Osteoartrite + Laser
OR	Osteoartrite + Treinamento resistido
ORL	Osteoartrite + Treinamento resistido + Laser
OMS	Organização mundial da saúde
PA	Pressão Arterial
PGE2	Prostaglandina E2
RNA	Sigla em inglês “ribonucleic acid” - ácido ribonucleico (ARN)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TEM	Teste de Esforço Máximo
W	Watts

SUMÁRIO

1.	Introdução à osteoartrite (OA)	13
1.1	Caracterização da OA	13
1.2	Osteoartrite e dor	15
1.3	Osteoartrite e inflamação.....	16
1.4	Laser de Baixa Intensidade (LBI)	18
1.5	LBI na Osteoartrite (OA)	19
1.6	Treinamento resistido (TR)	20
1.7	LBI associado à atividade física.....	22
2.	Objetivos	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3.	Hipótese	24
4.	Material e métodos	25
4.1	Local.....	25
4.2	Animais	25
4.3	Sequência experimental.....	25
4.4	Randomização.....	25
4.5	Adaptação.....	28
4.6	Indução à Osteoartrite.....	28
4.7	Tratamento com LBI.....	29
4.8	Treinamento resistido (TR)	30
4.8.1	Teste de esforço máximo.....	30
4.8.2	Protocolo de TR.....	30
4.9	Canulação.....	31
4.10	Análise da Pressão arterial/ Registros.....	32
4.11	Influxo leucocitário.....	33
4.12	Análise Histológica.....	33
5.	Eutanásia	34
6.	Estatística	34
7.	Resultados quanto a ação sistêmica	35
7.1	Peso corporal.....	35
7.2	Capacidade funcional.....	36

7.3	Análise hemodinâmica.....	38
8	Resultados quanto a ação local.....	41
8.1	Influxo Leucocitário total articular.....	41
8.2	Análise histológica da membrana sinovial coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).....	42
8.3	Análise histológica da membrana sinovial coradas com <i>Pricosirius red</i>	44
9.	Discussão.....	47
10.	Interpretação dos resultados.....	50
11.	Conclusão.....	51
12.	Limitações e perspectivas.....	51
	Referências bibliográficas.....	52
	Anexo	

1. INTRODUÇÃO

Embora anteriormente tida como uma patologia degenerativa própria do envelhecimento, por desgaste da articulação, a osteoartrite (OA) está sendo considerada mais recentemente como uma doença inflamatória com risco de incapacidade funcional (1). A OA apresenta alta prevalência, sendo considerada a doença osteoarticular mais comum. É uma das principais causas de morbidade na população idosa, e está associada a elevado custo social (2). A prevalência e impacto como problema de saúde pública tendem a aumentar com o envelhecimento da população (3). Em geral quando sintomático, o paciente apresenta dor recorrente ou constante pelo resto de sua vida, e a incapacidade funcional tende a piorar lentamente ao longo dos anos (4, 5). Por esse motivo há um grande e importante interesse pela busca de tratamentos para osteoartrite. Atualmente não há cura para a OA, então busca-se estratégias terapêuticas são essencialmente destinadas para: educação do paciente, controle da dor e melhora da função articular, minimizando a incapacidade.

1.1 Caracterização da osteoartrite

A literatura já mostrou que a osteoartrite (OA) é caracterizada por processo inflamatório articular degenerativo, que envolve as estruturas da matriz cartilaginosa e conseqüentemente a cartilagem hialina das superfícies articulares; comprometendo a função (6). A utilização do sufixo “ite” ao invés do sufixo “ose” (osteartrose) ocorreu após a compreensão de que o processo inflamatório dessa doença é o que determina a degradação da cartilagem (6)

A OA resulta tanto de eventos mecânicos quanto biológicos que desequilibram a síntese das células na matriz extracelular da cartilagem e do osso subcondral. A doença pode ser iniciada por fatores tais como genéticos, metabólicos e traumáticos, levando a alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas tanto das células quanto da matriz extracelular, as quais resultam em fibrilação, ulceração e perda da cartilagem articular e remodelação e esclerose do osso subcondral, com formação de osteófitos (7).

Há evidências que a progressão da OA também ocorre pela inflamação da membrana sinovial, influenciando na produção de enzimas degenerativas. Ainda, as alterações da membrana sinóvia e do osso subcondral estão associados com os sintomas, e podem contribuir para lesões da cartilagem (8, 9).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de OA decorrem do estilo de vida, obesidade e o processo de envelhecimento fisiológico acompanhado da diminuição da força muscular, situações essas que predis põem ao organismo do indivíduo a vulnerabilidade para o surgimento e progressão da OA (10) (fig.1).

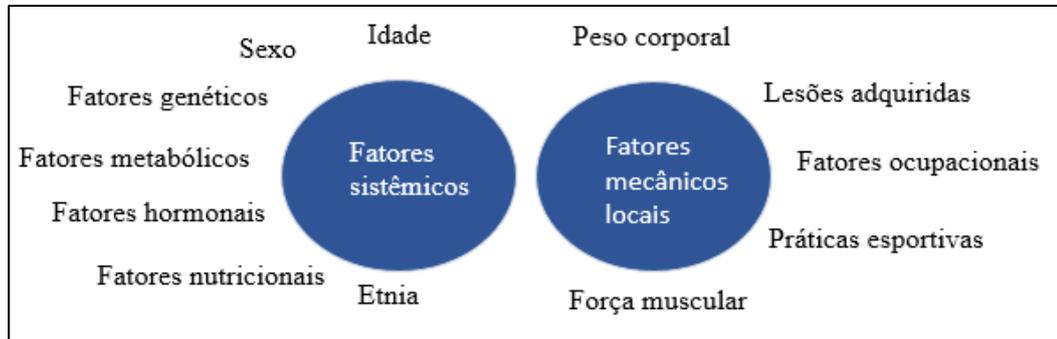


Fig.1 Fatores de risco biológicos e mecânicos para desenvolvimento da OA.

Devido a isto, a OA nos Estados Unidos é a segunda maior causa de incapacidade ocupacional em homens acima de 50 anos, superada apenas pela doença coronariana e ocorre em 10% do sexo masculino e 13% da população feminina com 60 anos de idade ou mais, com estimativa financeira de encargos de mais de US \$ 478.000,00 anualmente (11). No Brasil, a prevalência da doença é de 6% a 12% dos adultos, e em mais de um terço das pessoas com 65 anos ou mais. A OA respondeu por 18,6% dos 1.398.266 benefícios concedidos pelo Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) de janeiro a outubro de 2005 (12). Sua prevalência e impacto como problema de saúde pública tendem a aumentar com o envelhecimento da população, e é umas das doenças em foco relacionada a alteração da articulação. Na Europa, cerca de 20% de dor crônica está relacionada com a OA (12, 13, 14, 15, 16).

Essa prevalência é o resultado da OA apresentar lesões bem localizadas e focais, indicando na maioria das vezes, uma maior sobrecarga mecânica na superfície da articulação. Inicialmente ocorre a degradação das fibras de colágeno tipo II, localizadas na superfície articular. A medida que a doença progride, as lesões se estendem progressivamente (17). De acordo com a gravidade do processo, existe a perda de áreas mais profundas, resultando na exposição do osso subcondral (18, 19).

A degradação e remodelação da matriz extracelular da cartilagem (MEC) ocorrem quando existe desequilíbrio nas atividades de algumas proteases, em particular das metaloproteinasas de matriz (MMPs), que degradam os constituintes da MEC. A progressão lenta da OA

é explicada pela intensa atividade tanto pelos catabólicos (degradação condrócitos) como anabólicos (tentativa de reparo dos condrócitos) (20, 21, 22).

Ainda que a OA envolva a articulação como um todo, a cartilagem é considerada o tecido central na fisiopatologia da doença. A cartilagem é um tecido hipocelular, e os condrócitos representam apenas 1 a 2 % de seu volume total. Sua matriz extracelular abundante é altamente hidratada e especialmente diferenciada para adaptar-se às funções biomecânicas do tecido. Mais de 70% do peso da cartilagem é água, e mais de 90% do seu peso seco corresponde aos principais componentes de sua matriz extracelular (MEC) (23).

Diversas outras moléculas fazem parte da organização da MEC da cartilagem, e incluem colágenos e proteína de ligação, dentre outras (23). A MEC da cartilagem articular apresenta não apenas um papel estrutural, mas seus elementos interagem com receptores da superfície dos condrócitos, regulando a função dos mesmos.

A cartilagem não é inervada e, não pode ser a fonte da dor. Vários estudos têm demonstrado a presença de fibras nervosas aferentes na cápsula articular, sinóvia, periósteo, osso subcondral, ligamentos e tendões que podem detectar tanto estímulos mecânicos normais como nocivos e que podem promover a dor na Osteoartrite (24).

1.2 Osteoartrite e dor

Dor é a manifestação clínica central da OA e a principal razão pela qual os indivíduos afetados procuram por assistência médica. Sendo assim, o tratamento da OA é essencialmente o tratamento da dor. Contudo, os mecanismos envolvidos na dor articular no caso de OA precisam ser mais compreendidos. Uma das dificuldades na interpretação da dor na OA é a falta de correlação observada entre lesão estrutural e sintoma. Sabe-se que pessoas com alterações radiográficas compatíveis com OA apresentam dor quanto comparado com indivíduos sem esse tipo de alteração (25).

Numa situação de inflamação articular, as fibras nervosas apresentam alterações agudas e transitórias em resposta a inflamação resolvendo-se em poucas horas (24, 26). Sabe-se que o sistema nervoso atua não apenas como um despertador no processo de nocicepção, transmitindo um sinal do tecido lesionado ao centro de dor, mas participa na persistência da dor através do desenvolvimento de mudanças funcionais ou envolve o aumento na eficácia da condução sináptica, ou sensibilização, através de alterações na localização. Em

uma situação de dor, os eventos agudos podem desencadear mecanismos de sensibilização do sistema nervoso periférico, na medula espinhal levando a dor crônica. Essa condução sináptica pode ser de curta duração, persistir ou mesmo ser irreversível. (27, 28).

Os movimentos na OA pode ser considera um exemplo alodínia mecânica (29). Algumas observações em pacientes têm sugerido a participação do sistema nervoso na gênese da dor na OA, o que poderia explicar a frequente dissociação entre lesão estrutural e sintoma (30).

Dentre os diversos estudos que confirmam a presença de dor em osteoartrite estudos histológicos realizados em pacientes com edema ósseo na ressonância magnética mostraram alterações de remodelamento ósseo além de fibrose e áreas de osteonecrose (31). A presença de espessamento sinovial, sugerindo sinovite, bem como a presença de edema articular, também tem relação com dor em pacientes com OA de joelhos (24). Por isso a necessidade de tratar a dor e inflamação local sem causar outros efeitos colaterais é de grande importância.

1.3 Osteoartrite e inflamação

Atualmente a inflamação é considerada central na fisiopatologia da OA (32). O caráter multifatorial da doença já foi enfatizado, onde estresse mecânico em associação a alterações inflamatórias, agindo em um indivíduo levam a um estado de insuficiência da articulação. A caracterização de mediadores inflamatórios, tais como citocinas e metaloproteinases da matriz, oferece o desenvolvimento de fármacos específicos capazes de bloquear a evolução natural da doença (33).

Algum grau de sinovite está presente desde as fases iniciais da OA. Acredita-se que essa sinovite seja secundária a liberação de fragmentos da matriz extracelular da cartilagem no líquido sinovial, e que a inflamação da membrana sinovial, com a produção de mediadores inflamatórios leva a mais degradação da cartilagem. A sinovite na OA se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia, angiogênese, e infiltração por células inflamatórias que incluem macrófagos, linfócitos B e linfócitos T (34). A presença de leucócitos constitui importante fonte de citocinas. Ainda, no ambiente articular inflamado, existe uma população residente e de células migradas capazes de iniciar e progredir ainda mais a lesão tecidual.

A complexa resposta inflamatória na OA começou a ser entendida com a identificação de vários mediadores inflamatórios nas articulações afetadas (6, 16). Das citocinas envolvidas, liberadas por leucócitos, a IL- 1 β é uma das principais citocinas implicada na sua patogênese, seus efeitos patológicos incluem: inibição da proliferação de condrócitos e da síntese de colágeno tipo II da matriz extracelular (35).

Segundo a literatura, a inflamação da membrana sinovial pode estar associada ao progresso das lesões da cartilagem, onde possíveis fragmentos formados pela proteólise poderiam provocar a inflamação sinovial, aumentando a degradação da cartilagem (36).

As características inflamatórias que a membrana sinovial pode apresentar são: espessamento da camada interna, hipertrofia, formação de agregados linfóides e angiogênese (37, 38) (Fig. 2).

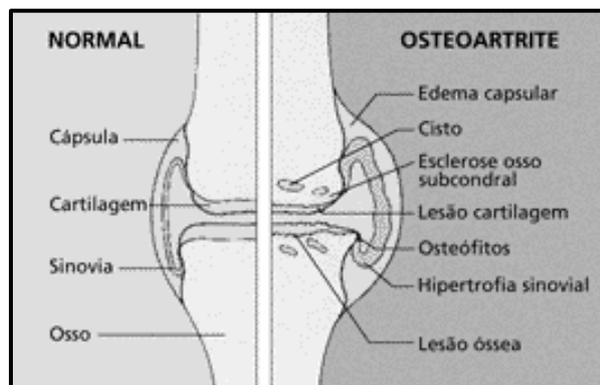


Fig. 2 Joelho saudável (esquerda) e joelho com OA (direita). Inflamação mediada por citocinas; degradação dos tecidos adjacentes à luz articular, que consistem em sinóvia, músculo, tendões, ligamentos, tecido adiposo e osso subcondral (38).

Uma indicação no tratamento convencional da OA é a utilização de medicamento anti-inflamatório não esteroidais (AINES), entretanto o uso contínuo desse medicamento, em médio e longo prazo surte efeitos colaterais indesejáveis, principalmente no trato gastrointestinal (39).

Sendo assim, a busca à prevenção e alternativa ao tratamento da OA é uma contínua preocupação na medicina e demais áreas de saúde, com o intuito de propor tratamentos efetivos e/ou complementares aos já existentes, minimizar efeitos colaterais o que trará importância para a melhoria de qualidade de vida dessa parcela da população acometida da OA (40, 41).

Dentre as opções de tratamento não farmacológico e não invasivo que está sendo estudada na OA destaca-se a atividade física e a fotobiomodulação utilizando o laser de baixa intensidade (LBI) ou o diodo emissor de luz (LED).

1.4 Laser de baixa intensidade (LBI)

A palavra laser é uma sigla do inglês “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, e significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação” (42). Podemos classificar o Laser em dois grupos: Laser de Alta Potência (cirúrgico) e o laser de baixa intensidade (LBI): O Laser de Alta Potência apresenta alta densidade de energia resultando em dano ao tecido que recebe a aplicação, promovendo o efeito cirúrgico, pois oferece precisão no corte tecidual, retirada de tumores entre outros. O laser de baixa intensidade (LBI) pode ser empregado como tratamento porque atua no metabolismo celular mitocondrial, pois esta tem características cromóforas, situação que influencia na função celular (43).

Karu *et al* (1988) afirma que o LBI não atua somente na mitocôndria, mas também na membrana celular regulando a bomba de sódio e potássio além dos canais de cálcio (44). Dessa maneira, a terapia com LBI é considerada um recurso bioestimulante em tecidos, por meio de seus efeitos fisiológicos no meio intracelular contribuindo ao aumento de produção de energia e regeneração a conseqüentemente cicatrização (45) (Fig. 3).

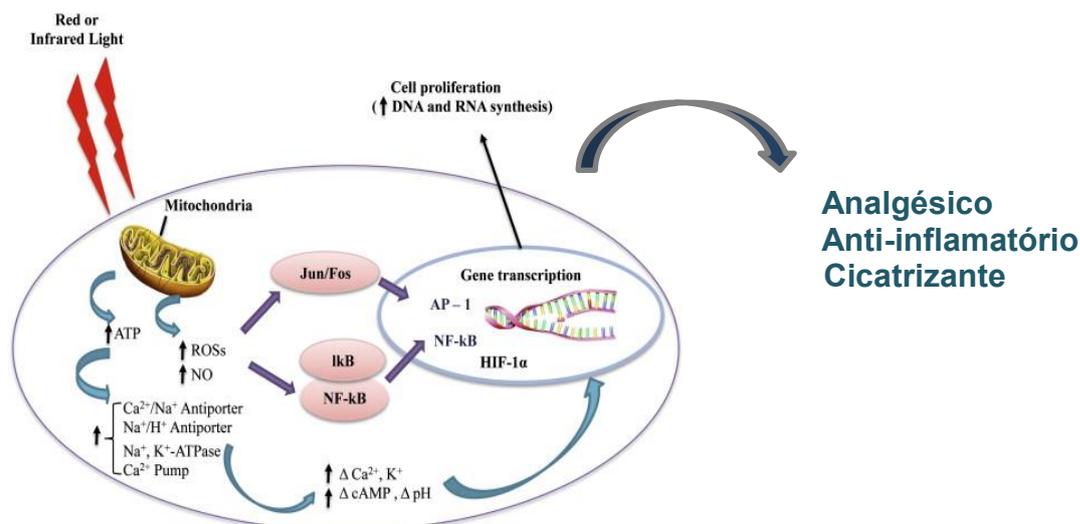


Fig. 3 Esquema da ação do LBI A luz é absorvida pela membrana celular, com ação na mitocôndria e liberação de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), espécie reativa de oxigênio (ROS) e sinalização no núcleo celular. A partir daí aumenta síntese de DNA e RNA gerando efeito analgésico, cicatrizante e anti-inflamatório (46).

Estudos indicam que o sucesso da terapia com LBI e seus respectivos efeitos é dependente do comprimento de onda, potência, dose e tempo aplicados (47). A aplicação em baixa potência (1 a 500 mW), comprimento de onda com espectro vermelho ou próximo ao infravermelho (600 – 1.000 nm) e irradiação entre 0.001 e 5 W/cm², contribui para a regeneração tecidual, redução de inflamação e efeito analgésico, sem apresentar efeitos térmicos (48, 49). Quanto maior o comprimento de onda, maior será a absorção da luz por estruturas mais profundas. (Fig. 4).

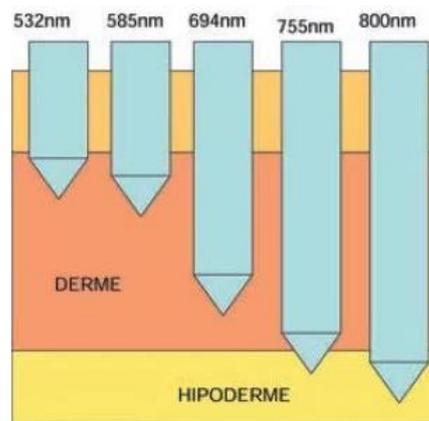


Fig. 4: Comprimentos de onda do LBI terapêutico. Imagem adaptada (49)

1.5 LBI na osteoartrite

Estudos em modelos experimentais mostram procedimentos que mimetizam a inflamação e que a aplicação do LBI leva a resultados significantes em ações anti-inflamatórias (50, 51). Os principais efeitos obtidos com terapia de LBI em doenças reumatológicas são:

- Efeito Analgésico: estimula a produção de endorfinas e serotoninas, que atuam como inibidores da sensação dolorosa;
- Efeito Cicatrizante: Aumenta a produção de fibroblastos e fibras de colágeno, acelerando a cicatrização;
- Efeito Anti-inflamatório: Diminui o influxo de células provenientes do sistema imunológico (leucócitos, macrófagos e linfócitos) e diminui rapidamente o edema melhorando a mobilidade (52).

A irradiação LBI produz efeitos como o estímulo da vasodilatação, produzindo uma microcirculação local a qual beneficia o aporte de oxigênio e eliminação dos catabólitos, e favorece também, o aporte de elementos defensivos, daí deduz-se sua capacidade anti-inflamatória (53).

Foi demonstrado em modelo de OA, no qual a enzima papaína foi injetada na articulação do joelho do rato, ocorreu a degradação da cartilagem e promoveu uma inflamação, e nos grupos irradiados com LBI ocorreu diminuição significativa no influxo leucocitário, aumento da angiogênese, quantidade de epitélio escamoso e diminuição da fibrose na articulação (54). Além dos efeitos anti-inflamatório, o LBI tem capacidade de atuar sobre os nervos, reduzindo a transmissão da dor e ativando os receptores opióides endógenos (55).

Em outro modelo experimental, o LBI foi utilizado em artrite inflamatória induzida por zymozan em joelho de ratos (56). Foram comparadas as doses de aplicação do LBI nos grupos tratados com LBI e comparado ao grupo controle tratado com dexametasona. Os resultados mostraram que maior tempo de tratamento com LBI, diminuiu o edema e prostaglandina E2 (PGE2) tendo apresentado um resultado similar ao tratamento convencional (dexametasona) (56). Ademais, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o LBI é eficaz em reduzir o edema, migração leucocitária, hiperalgesia e citocinas inflamatórias como o IL-1 e IL-6 em modelo de artrite induzida por zymosan (17).

Neste presente estudo o LBI foi usado com objetivo de efeitos analgésico e efeitos anti-inflamatórios locais, dentre outros. Como complemento ao tratamento buscou-se a atividade física moderada que, neste estudo é o treinamento físico resistido.

1.6 Treinamento físico resistido

O exercício físico pode ser utilizado como uma das ferramentas não farmacológica e eficiente para promoção e manutenção da saúde. Entre os benefícios de sua prática estão melhorias cardiorrespiratórias, osteomioarticulares, metabólicas as quais promovem melhoras funcionais ao organismo (57). Diversas adaptações fisiológicas são induzidas pelo treinamento físico (TF), as quais ocorrem desde os primeiros dias de treinamento (adaptações de curto prazo), como podem levar meses (médio prazo) e adaptações que normalmente podem levar até anos para que ocorram (longo prazo) (58).

Estas alterações não ocorrem exatamente da mesma forma em todos os indivíduos, pois deve-se atentar a individualidade de cada sujeito e do tipo de exercício realizado. Existem protocolos de TF que diferem entre si frente à intensidade, volume e modalidade de exercício.

Estudos apontam uma relação direta entre melhor qualidade de vida, prevenção de doenças e a prática regular de exercício físico, em contrapartida, mostram a forte relação entre o estilo de vida sedentário e doenças como a obesidade, diabetes, hipertensão entre outros (59). Os programas de TF podem promover adaptações em vários sistemas orgânicos, tais como o aparelho locomotor, cardíaco e imunológico pois as alterações do TF reforçam a comunicação entre esses sistemas (60). Neste sentido, o efeito positivo do TF em várias doenças já foi reconhecido, e um estilo de vida que inclui atividade física oferece proteção contra muitas doenças, além de atuar de forma terapêutica no tratamento de várias condições fisiopatológicas (59, 61, 62).

A atividade física em geral também pode ser utilizada como terapia não invasiva na OA. Sua prática pode otimizar a lubrificação articular, manter bom nível de força muscular, diminuir a dor, melhorar a amplitude de movimento articular e diminuir a resistência articular (63).

Dentre os diversos tipos de exercícios físicos, destaca-se o treinamento resistido (TR), realizado contra resistência, sendo esta promovida por equipamentos específicos, também implementos como elásticos e molas de diversas tensões e cargas variadas e ou próprio peso do corpo. O treinamento resistido, também chamado de treinamento de força, envolve a ativação voluntária de músculos esqueléticos específicos contra alguma resistência externa que é fornecida pela própria massa corporal, implementos, pesos livres ou máquinas específicas (64). Este treinamento também desenvolve um importante papel na reabilitação de muitas doenças, bem como diabetes, artrite reumatológicas, auxilia também para a melhoria da capacidade de marcha e de qualidade de vida de pacientes idosos, com parkinson, com doença arterial obstrutiva periférica e ainda pode promover a prevenção e diminuição da massa óssea e muscular em pacientes idosos e em mulheres no período da menopausa, entre outras (65, 66, 67, 68).

Atualmente, a atividade física é prescrita para pacientes com OA, situação oposta ao procedimento de imobilidade prescrita para este tipo de doença décadas atrás (69, 70). Em específico, o TR vem ganhando destaque nos últimos anos no tratamento de pacientes com OA, pois estes apresentam cerca de 15-18% de prejuízo de força muscular no início da doença, o TR é eficaz em diminuir a progressão da doença (71). Isso ocorre porque o TR tem como efeito a melhora da amplitude de movimento, da força muscular, melhora da função e contribui ao

bem-estar orgânico. Assim, o TR contribui na promoção da prevenção e/ou reabilitação da capacidade funcional e deambulação, contribuindo para a saúde geral (72, 73). Entre as ações que se agravam por falta de atividade física, a exemplo das doenças cardiovasculares (74), o exercício físico terapêutico é recomendado em diretrizes da Sociedade Americana do Coração, como intervenção não farmacológica para o tratamento da OA (75, 76).

Estudos com protocolos de treinamento de 8 semanas confirmam a melhoria nos sintomas de OA de joelho e aumento da capacidade muscular. Toma *et al* (2016) avaliaram a gravidade da dor do joelho dos pacientes em uma escala numérica durante o protocolo de treinamento de 8 semanas (exercícios aeróbicos de baixo impacto, fortalecimento muscular, mobilização articular entre outros) pacientes com treinamento apresentaram melhora da capacidade funcional comparado aos pacientes sedentários. No estudo de Miller *et al* (2013) foi observado que a dor diminuiu cerca de 59% nos pacientes com OA de joelho e melhora na capacidade funcional dos mesmos. (77, 78).

Ainda, esta ação terapêutica dos exercícios pode se estender à melhora da função física e redução de peso corporal, é evidenciado na literatura como um recurso essencial utilizado por 98% dos fisioterapeutas. Porém, anteriormente ou associado a atividade física, existe a necessidade de se realizar recursos com intuito de alívio da dor (79).

1.7 LBI associado à atividade física

Ferraresi *et al* (2011) estudaram o efeito do LBI sobre o desempenho muscular no treinamento de força em jovens voluntários do sexo masculino. Foi observado uma melhora na capacidade de carga máxima de pacientes e melhora do desempenho muscular (80). Ainda, o LBI aplicado no quadríceps de mulheres idosas foi capaz de aumentar o número de repetições de flexão do joelho após um protocolo de fadiga (81).

Segundo a literatura, o LBI promove melhor morfologia da fibra muscular, o que pode ter contribuído para a melhora do desempenho muscular nos ratos treinados e tratados com LBI em comparação com os animais somente treinados (82). Ademais, Youssef *et al* (2016) afirmaram, que associação do LBI com treinamento físico é mais eficaz do que o treinamento físico isolado no tratamento de pacientes mais velhos com OA de joelho (83). Conforme o

exposto acima, o LBI pode constituir um recurso terapêutico para melhorar o desempenho muscular associada ao exercício físico em atletas, idosos, pessoas de todas as idades. Estes benefícios promovem melhor desempenho, menor ocorrência de lesões e dores musculares.

Considerando que a OA de joelho é uma das principais doenças de articulação e a quarta doença a determinar aposentadoria na atualidade de acordo a previdência social além de ter como tratamento os anti-inflamatórios cujo efeitos colaterais causam alterações gastrintestinais sérias, as estratégias terapêuticas que visam à redução de inflamação local e alterações sistêmicas são consideradas de grande valia. Todavia, os efeitos do TR associado ao LBI ainda não foram estudados em modelo experimental de OA com o propósito de avaliar pressão arterial, frequência cardíaca, inflamação e degradação local com a certeza de ausência dos efeitos colaterais.

Sendo assim, esta pesquisa avaliou a associação do LBI e o TR em modelo experimental de OA. Visando testar a hipótese de um tratamento para a OA não invasivo e não farmacológico para melhora da função orgânica e prevenção da mesma.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do treinamento físico resistido associado ao laser de baixa intensidade em modelo experimental de osteoartrite em rato.

2.2 Específico

Avaliar alteração local da articulação do joelho do rato, sendo elas:

- Influxo leucocitário;
- Degradação articular;

Avaliar possíveis alterações sistêmicas do organismo do rato com OA, sendo elas:

- Capacidade funcional;
- Ganho de peso;
- Análise Hemodinâmica: Pressão arterial e frequência cardíaca

3. HIPÓTESE

Avaliamos a hipótese de que as associações de terapias não farmacológicas podem ser eficazes para a melhora da capacidade física e funcional dos ratos, diminuindo a dor através do efeito analgésico do LBI o que facilita a realização de atividade física.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia Translacional e no Laboratório Geral da Universidade Nove de julho. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à avaliação e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Nove de Julho – CEUA / UNINOVE n° AN 009/2014.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho, mantidos em condições controladas de luminosidade de 12 horas, alternados entre claro e escuro, numa temperatura adequada aos ratos com alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram alojados e colocados em caixas plásticas padrão (370×260×170 mm) com três a quatro ratos por caixa (fig.5).



Fig. 5. Caixas plásticas para comportar os animais e medidor de temperatura da sala de animais.

Fotos aline da silva

4.3 Sequência experimental

Os grupos do modelo experimental seguiram a sequência abaixo, consideramos o tempo de treinamento físico resistido durante 8 semanas (fig.6)

4.4 Randomização

Os ratos foram randomizados de forma aleatória em 5 grupos (N= 8 em cada grupo). Esses animais foram avaliados durante as 8 semanas, sendo realizado o Teste de esforço máximo na 1^o, 4^o e 8^o semana do protocolo experimental seguido da cirurgia de canulação, registros, coleta de materiais biológicos e eutanásia (fig.7).

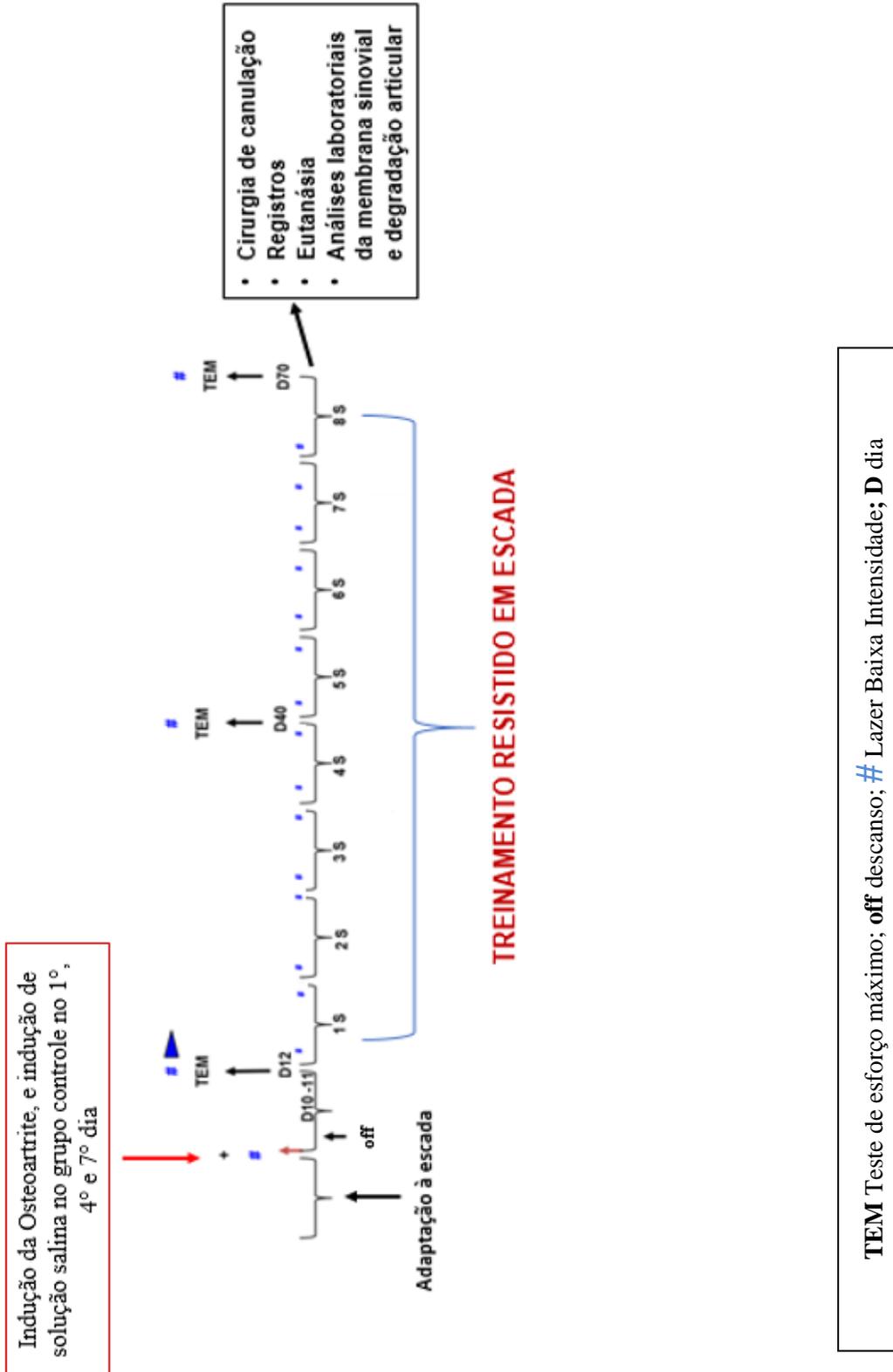


Fig 6. Sequência experimental do presente estudo

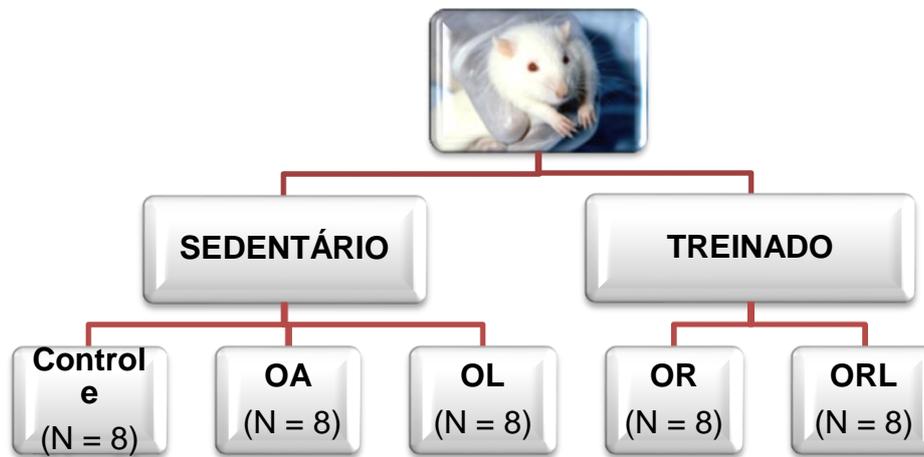


Fig. 7 Composição dos grupos experimentais

- **CONTROLE (C):** Ratos submetidos a indução de 20 μ L de solução salina estéril no joelho direito. O grupo C foi utilizado em normalidade para ajudar a comparar a gravidade da OA nas análises da membrana sinovial e joelho dos ratos.
- **OSTEOARTRITE (OA):** Ratos submetidos a indução de 20 μ L de papaína + cisteína no joelho direito. O grupo AO foi utilizado para avaliar a gravidade da osteoartrite (OA) para melhor compreensão das análises deste estudo.
- **OSTEOARTRITE E LBI (OL):** Ratos submetidos a indução de 20 μ L de papaína + cisteína no joelho direito. O grupo OL foi utilizado para avaliar a gravidade da osteoartrite (OA) tratada somente com LBI para melhor compreensão das análises deste estudo.
- **OSTEOARTRITE E TR (OR):** Ratos submetidos a indução de 20 μ L de papaína + cisteína no joelho direito. O grupo OR foi submetido ao treinamento físico resistido (TR). Esse grupo foi utilizado para avaliar a gravidade da osteoartrite (OA) tratada somente com o TR para melhor compreensão das análises deste estudo.
- **OSTEOARTRITE, LBI E TR (ORL):** Ratos submetidos a indução de 20 μ L de papaína + cisteína no joelho direito. O grupo ORL foi submetido ao treinamento físico resistido (TR) associado ao LBI. Esse grupo foi utilizado para avaliar a gravidade da osteoartrite (OA) tratada com as duas terapias (TR e LBI) para melhor compreensão das análises deste estudo.

4.5 Adaptação à escada

A adaptação à escada e ao TR foi realizada na sala de treinamentos físicos do biotério da Universidade Nove de Julho. A adaptação foi realizada em escada própria para ratos com 52 degraus e uma caixa na parte superior, coberta com um pano, pois os animais tem hábito noturno e o espaço escuro é confortável para os animais descansarem entre as subidas (84).

Durante o período de adaptação ao TR em escada, os ratos foram colocados nos degraus inferiores e adaptados ao ato de escalar, sem carga na cauda ou recompensa de alimento, água ou brinquedos. O único incentivo para a subida foi um toque com mão na da cauda do animal para que o mesmo escalasse a escada. Cada rato teve 2 minutos de descanso entre cada subida. Foi considerado adaptado após escalar 5 vezes consecutivas (84, 85).

4.6 Indução da osteoartrite

Os ratos dos grupos OA, OL, OR e OLR após a randomização receberam uma injeção intra-articular de 20 µL de uma solução de 4% papaína dissolvida em 10 mL de solução salina estéril, acrescido de 10 µl de cisteína a (0.03M) no joelho direito. Esse procedimento foi realizado no primeiro dia e repetido no 4º e 7º dia, logo, foram realizadas três aplicações de papaína e cisteína (10).

Esse procedimento foi realizado usando anestesia geral por via intraperitoneal com uma mistura de ketamina 80 mg/kg (hospira. Lake Forest, IL, USA) e xilazina 20 mg/kg (Lloid, Ic, Sherondoa, IA, USA).

Para realizar a indução de OA, a região anterior do joelho de cada animal foi tricotomizada, posicionada em flexão a 90°, localizando o espaço virtual intrarticular, posicionou-se a agulha perpendicular ao aplicador com o bisel voltado a frente, pressionou-se até transpassar o tendão patelar e injetou-se a mistura no espaço virtual intra-articular fêmur tibial. Os ratos do grupo controle receberam 20 µl de injeção de solução salina estéril no joelho direito (fig 8).



Fig. 8 Procedimento para indução da OA. Foto Aline da Silva

4.7 Terapia com laser de baixa intensidade

Foi utilizado o equipamento (MM Optics ®) de laser de baixa intensidade, semiconductor Aluminium Gallium Indium Phosphide – InGaAlP (fig. 5). Os parâmetros utilizados estão na tabela 1.

Para a aplicação do laser, os animais foram posicionados em uma mesa em decúbito ventral e a perna traseira foi imobilizada manualmente. O feixe do laser foi aplicado perpendicularmente (90°) encostando na pele do joelho direito de cada rato. O grupo controle e OA receberam o mesmo procedimento com o aparelho de laser desligado. A irradiação ocorreu no início e no fim da semana (duas vezes por semana) durante as 8 semanas, antes do TR. A mensuração da potência ótica do laser ocorreu usando-se um calibrador multifuncional (modelo 1835 C, Newport Corporation, Irvine, CA) (fig 9).



Fig. 9 Equipamento de terapia LBI

Tabela 1: Parâmetros do laser de baixa intensidade

Meio Ativo	InGaAlP
Comprimento de onda	660 nm
Potência de Saída	5 mW
Densidade de Potencia	0,125 W/cm ²
Densidade de Energia	2,5 J/cm ²
Área do feixe	0,04 cm ²
Tempo de irradiação	20 segundos

4.8 Treinamento resistido

Após 48 horas da indução de osteoartrite, todos os ratos passaram por nova adaptação à escada.

4.8.1 Teste de esforço máximo (TEM)

Para realizar o teste de esforço máximo (carga máxima), utilizou-se a mesma escada da adaptação. Os pesos utilizados como carga foram montadas com pesos de chumbo, conectados à base da cauda de rato. O teste foi iniciado com uma carga inicial de 75% do peso corporal, que foi progressivamente aumentada por um adicional de 15% do peso do corpo nas seguintes subidas até que o rato não conseguisse subir toda a escada, sendo assim foi determinado a carga máxima. A partir do teste de esforço máximo foi calculado um percentual de 40 – 60% para o animal treinar durante as próximas semanas (84, 85).

4.8.2 Protocolo de treinamento físico resistido

O protocolo de treinamento físico resistido foi realizado durante 2 meses, 5 dias por semana, com intensidade moderada (40-60% da carga máxima normalizada). Os ratos realizavam 15 subidas por sessão, 1 min de intervalo entre as subidas. Após o teste intermediário realizado na 4ª semana, a prescrição foi ajustada de acordo com os novos valores obtidos no teste de carga máxima (84,85) (fig.10).

Tabela 2: Protocolo do treinamento físico resistido

Semanas	Porcentagem da carga do TEM
1º	40%
2º	40-50%
3º	40-50%
4º	50%
5º	40-50%
6º	50%
7º	50-60%
8º	60%

**Fig. 10** Rato em treinamento

Foto Aline da Silva

4.9 Canulação

Após 48 horas do protocolo de teste de esforço máximo final (TEM), os ratos foram anestesiados com ketamina - xilazina (80:40 mg/kg, I.p) com introdução de cateter de polietileno com ponta de cânulas de Tygon (4 cm de PE-08 ligado a 2cm de PE-50) diretamente na artéria carótida direita, para analisar as medidas da pressão arterial e frequência cardíaca.

Após a implantação firme e correta da cânula, estas foram transpassadas subcutaneamente na região do dorso cervical do rato, fixando-as com fio de algodão (fig. 11). As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e fechadas com pinos de aço até o registro que aconteceu 24 horas após (85). Durante esse período de espera, os ratos permaneceram em caixas individuais com alimento a água *ad libitum* e a cânula não atrapalha os ratos se locomoverem na caixa.

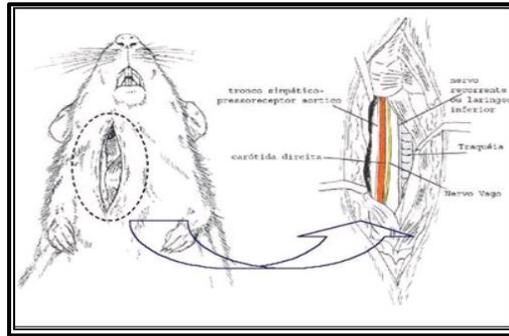


Fig. 11 Imagem adaptada (85). Pode se observar a localização da artéria carótida

4.10 Análise da pressão arterial – registros

Os registros hemodinâmicos foram realizados 24 horas após a cirurgia de implante de cateteres na artéria carótida com os ratos conscientes na sala de registros. Essa sala apresenta um ambiente silencioso o que foi propício para a tranquilidade dos ratos. Com o animal consciente e livre movimentação durante o registro, a cânula foi conectada a um transdutor de sinal (Kent Instrumental, EUA) e durante 30 minutos a pressão arterial e frequência cardíaca foram gravadas em computador equipado com conversor analógico digital (CODAS, 2 kHz frequência de amostragem, Dataq Instruments, EUA) (fig. 12).

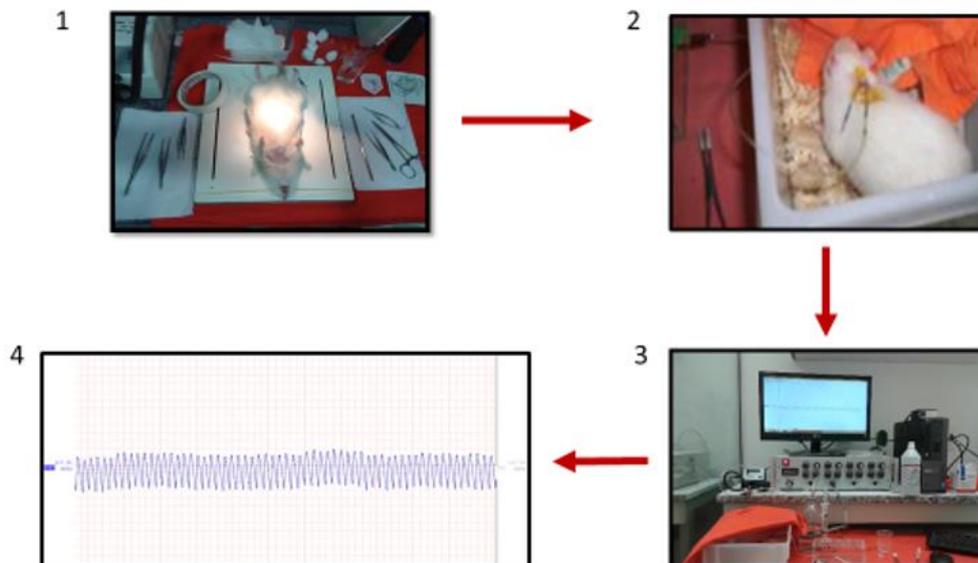


Fig. 12 Processo de análise hemodinâmica dos ratos **Imagem 1:** Preparo dos materiais para a realização da cirurgia de canulação em cada rato. **Imagem 2:** Conexão entre a cânula que está no dorso do rato e o transdutor de pressão arterial (85). **Imagem 3:** Computador de registro dos animais que apresenta o sistema de registro de pressão arterial; bem como o registro na tela do computador. **Imagem 4:** Início da análise do registro hemodinâmico realizado pelo programa Windaq. Fotos aline da silva

4.11 Influxo leucocitário articular

Após o registro de cada rato, os mesmos foram anestesiados e foi retirado o lavado articular, através de duas injeções, totalizando 400 μ L, de solução salina com objetivo de quantificar e classificar as células infiltradas no joelho. O lavado articular foi centrifugado a 800 rpm por 6 minutos. Depois disso, o precipitado celular foi ressuspensão em 300 μ l de PBS, uma fração de 20 μ l foi utilizada para determinação das células totais em câmara de Neubauer (fig.13).

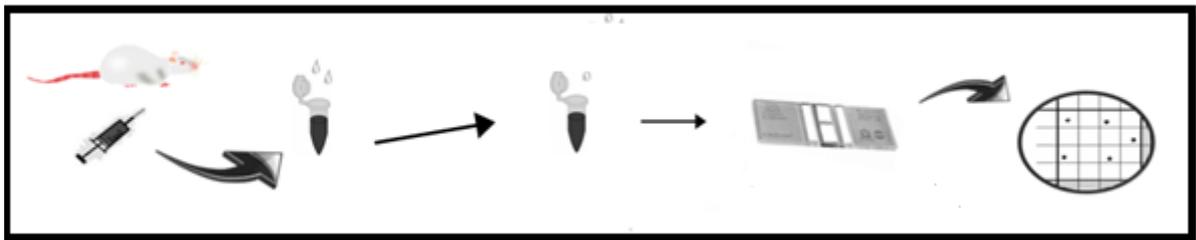


Fig. 13 Esquema de retirada de lavado para quantificação do influxo leucocitário

4.12 Análise histológica

Imediatamente após coleta do lavado articular, com os ratos ainda eutanasiados realizou-se retirada de amostra de sinóvias que foram acondicionadas para fixação em paraformaldeído 10% para a conservação das mesmas. Utilizando protocolo operacional padrão as amostras foram desidratadas com banhos sistemáticos de etanol a 70% a concentração crescente até absoluto, seguiu-se com banhos sistemáticos em xilol.

As inclusões das amostras macroscópicas foram realizadas em paraplast a 58°. Foram utilizados cortes histológicos de 5 μ m foram feitos em quadruplicatas. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (corantes específicos para evidenciar características estruturais do tecido em um microscópio de luz) (86). Esta técnica permite verificar a histoarquitetura da membrana sinovial da articulação do joelho, obtendo assim os dados morfológicos.

Outras, laminas em duplicatas foram coradas com Picosirius *red*, seguindo por xilóis, montagem com lamínulas, secagem e análise em microscópio de luz. A coloração por *Picosirius red* e análise sob luz polarizada foi realizada para avaliar a alteração de colágeno (86). Foi utilizado o Microscópio LEICA DMLS (lente 20x / 0.65 e filtro DFC) e programa LEICA QWIN PLUS V 3.5.1. (Switzerland Ltda). Para a quantificação de colágeno foi utilizado programa ImageJ. O *Picosirius Red* foi utilizado para acompanhar a distribuição de colágeno em cada grupo (23).

5. Eutanásia

Ao término da retirada de materiais biológicos dos ratos foram anestesiados com Ketamina e Xilazina, procedemos com a suplementação de duas vezes o volume utilizado para anestesia (dose elevada de anestésicos). Procedimentos e métodos de eutanásia se pautam no Guia de Brasileiro de Boas Práticas com Animais de Experimentação do Conselho Federal de Medicina Veterinária e da Resolução 1.000 de 11 de maio de 2012.

6. Estatística

Os dados obtidos foram tabulados em Software Microsoft Excel 2016. A normalidade foi verificada no GraphPad InStat software. Os dados então foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida do teste de Turkey foi usado para comparar os grupos e o nível de significância estabelecido foi de $p \leq 0,05$. Os programas estatísticos utilizados para análise dos dados deste estudo foram GraphPad InStat versão 3.01 e o software GraphPad Prisma 5.

7. RESULTADOS QUANTO A AÇÃO SISTÊMICA

7.1 Peso Corporal

Efeito do protocolo de tratamento com LBI e TR no ganho de peso dos ratos com osteoartrite.

A figura 14 apresenta a evolução do peso corporal dos ratos no início e ao final do experimento. No início do protocolo, quando os animais foram randomizados em seus respectivos grupos para posterior indução de OA, o peso corporal foi semelhante entre os grupos. Todos os grupos tiveram aumento de peso corporal no final do treinamento que foi significativamente maior que seu peso inicial. Os grupos C, OL, OR e ORL apresentaram peso corporal final menor comparado ao peso corporal final do grupo OA. O grupo OR e ORL final apresentou um peso menor comparado ao peso final do grupo OL (fig.14).

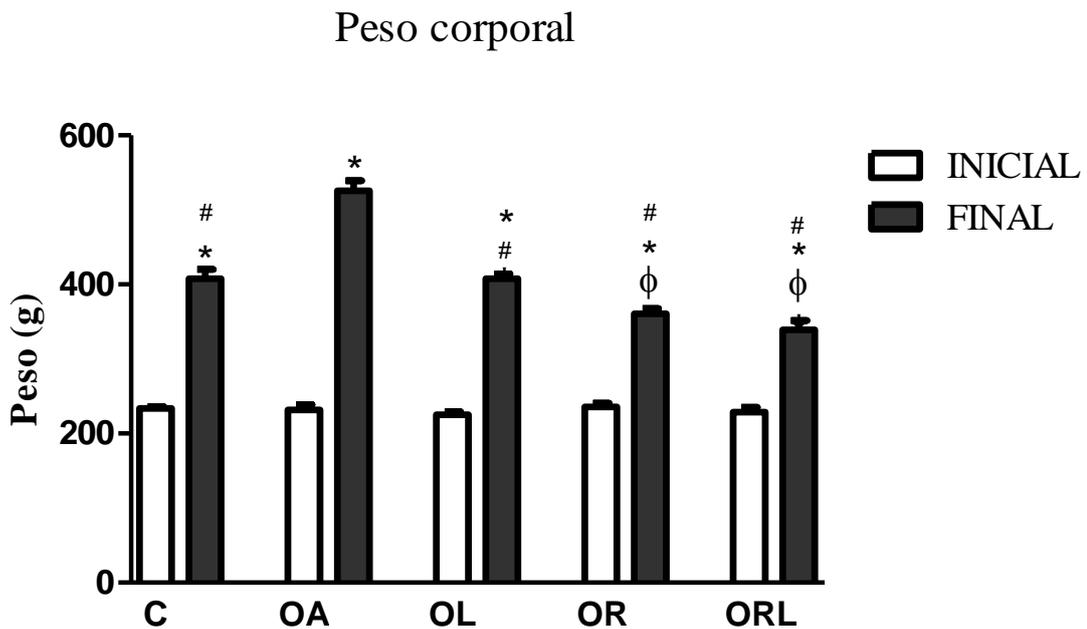


Fig. 14 Efeito do LBI e TR no ganho de peso em modelo experimental de OA. O peso de cada rato foi avaliado todas as semanas e estão representados graficamente os pesos iniciais e os pesos registrados ao final do período de tratamento. Os dados representam a média de 8 animais/grupo. * $p < 0.001$ comparado com o peso inicial de cada grupo; # $p < 0.001$ comparado com o peso final do grupo OA; $\phi p < 0.001$ comparado com o peso final do grupo OL (ANOVA).

7.2 Capacidade Funcional

Efeito do tratamento com LBI e TR sobre o Teste de Esforço Máximo (TEM), na OA experimental.

A figura 15 representa a capacidade funcional avaliada através do teste de esforço máximo inicial, intermediário e final. Todos os grupos apresentaram maior capacidade funcional ao final do protocolo em relação ao início do protocolo. Os grupos OR final e ORL final apresentaram maior capacidade funcional ao final em comparação ao grupo OA. Ratos do grupo OR e ORL tiveram aumento na capacidade funcional em comparação aos grupos sedentários (OA e OL) na 4ª semana de treinamento e ao final do exercício de resistência. (Fig. 15). Devido às variações no valor de peso corporal entre os animais estudados, foi realizada uma normalização da carga máxima inicial e final utilizando a seguinte fórmula (fig. 16):

$$\text{Carga máxima normalizada} = \text{carga da última subida completa} / \text{peso corporal} \times 100$$

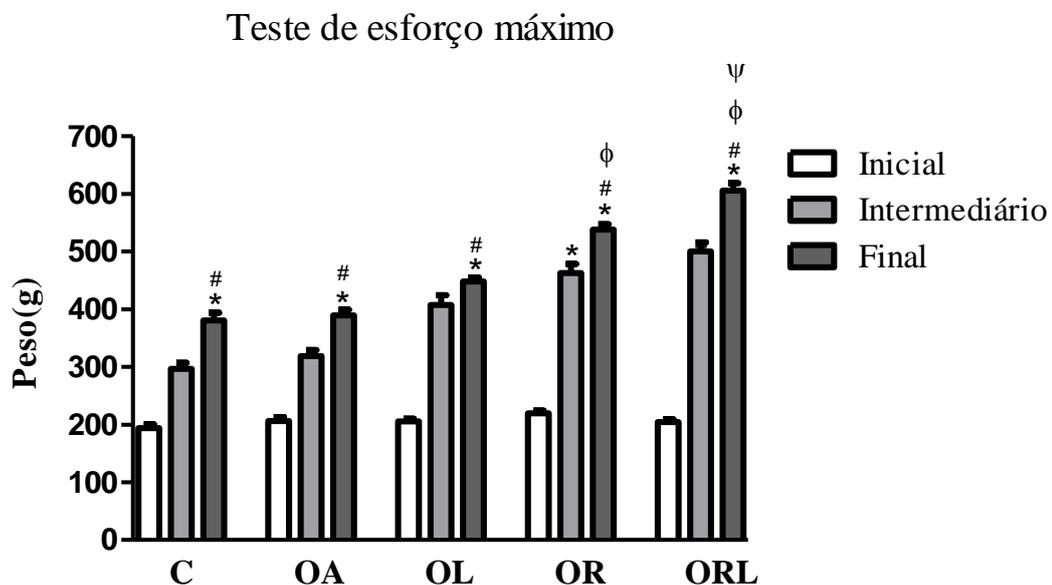


Fig.15 Efeito do LBI e TR no teste de esforço máximo (TEM) em modelo experimental de OA. O TEM de cada rato foi avaliado no início do treinamento, na quarta semana e na oitava semana do treinamento e estão representados graficamente como TEM inicial, intermediário e final. Os dados representam a média de 7-8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado com ao TEM inicial de cada grupo; # $p < 0,05$ comparado com o TEM intermediário de cada grupo $\phi p < 0,05$ comparado com ao TEM final do grupo OA. $\Psi p < 0,05$ comparado ao TEM final do grupo OL (ANOVA).

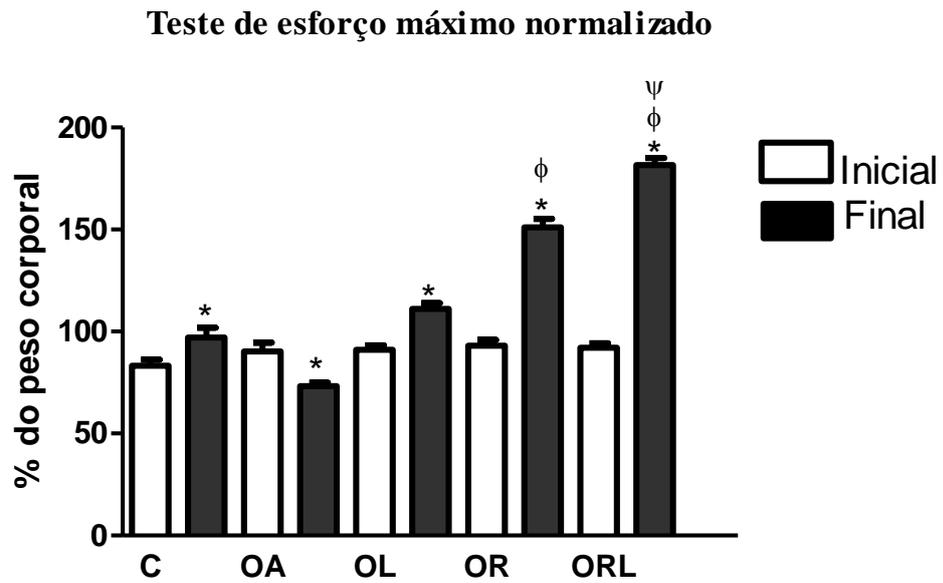


Fig.16 Efeito do LBI e TR no teste de esforço máximo (TEM) normalizado em modelo experimental de OA. O TEM de cada rato foi avaliado no início do treinamento, na quarta semana e na oitava semana do treinamento e estão representados graficamente como TEM inicial e final. Os dados representam a média de 7-8 animais/grupo * $p < 0,05$ comparado com ao TEM inicial de cada grupo; grupo ^φ $p < 0,05$ comparado com ao TEM final do grupo AO; ^Ψ $p < 0,05$ comparado ao TEM final do grupo OL (ANOVA).

7.3 Análise Hemodinâmica

Efeito do tratamento com LBI e TR sobre a Avaliação Hemodinâmica em modelo experimental de OA.

Através da análise dos registros hemodinâmico de 30 minutos que foram realizados nos ratos, com frequência de amostragem de 2000 Hz, pode-se obter os resultados referentes a frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA). A figura 17 apresenta resultados significantes e demonstrou redução na frequência cardíaca dos grupos OR e ORL em relação aos grupos sedentários. A figura 18 apresenta a análise da pressão arterial sistólica e diastólica e não mostra diferença estatística entre os grupos estudados. A figura 19 apresenta a pressão arterial dos grupos estudados neste presente estudo e não mostra diferença estatística entre os mesmos.

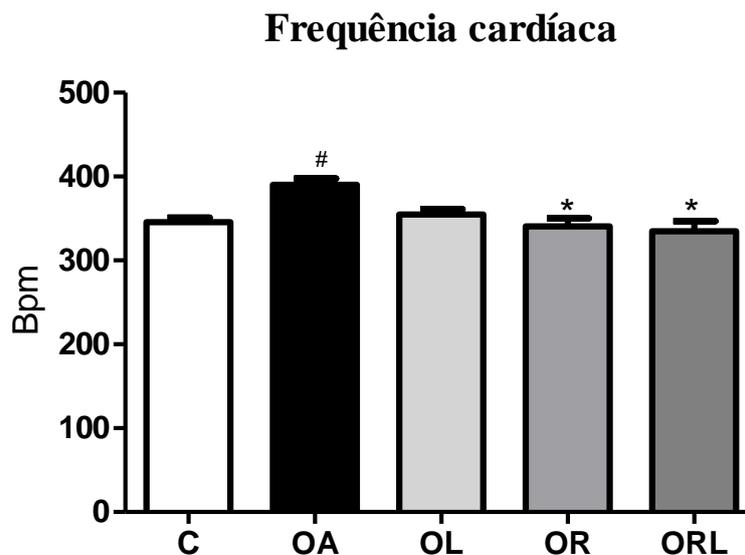


Fig. 17 Efeito do tratamento com LBI e TR sobre a Avaliação Hemodinâmica em modelo experimental de OA. A Frequência Cardíaca dos grupos do presente estudo. O grupo C, submetido a indução de solução salina; o grupo com OA induzida por papaína e cisteína e sedentário; o grupo OL com OA induzida tratada com LBI; o grupo OR com OA induzida tratada com TR; o grupo ORL com OA induzida e associação de TR e LBI; valores em média \pm SEM. # $p < 0,05$ em relação ao grupo C; * $p < 0,05$ em relação ao grupo OA. BPM (Batimentos por minuto), (n=7-8) Tukey.

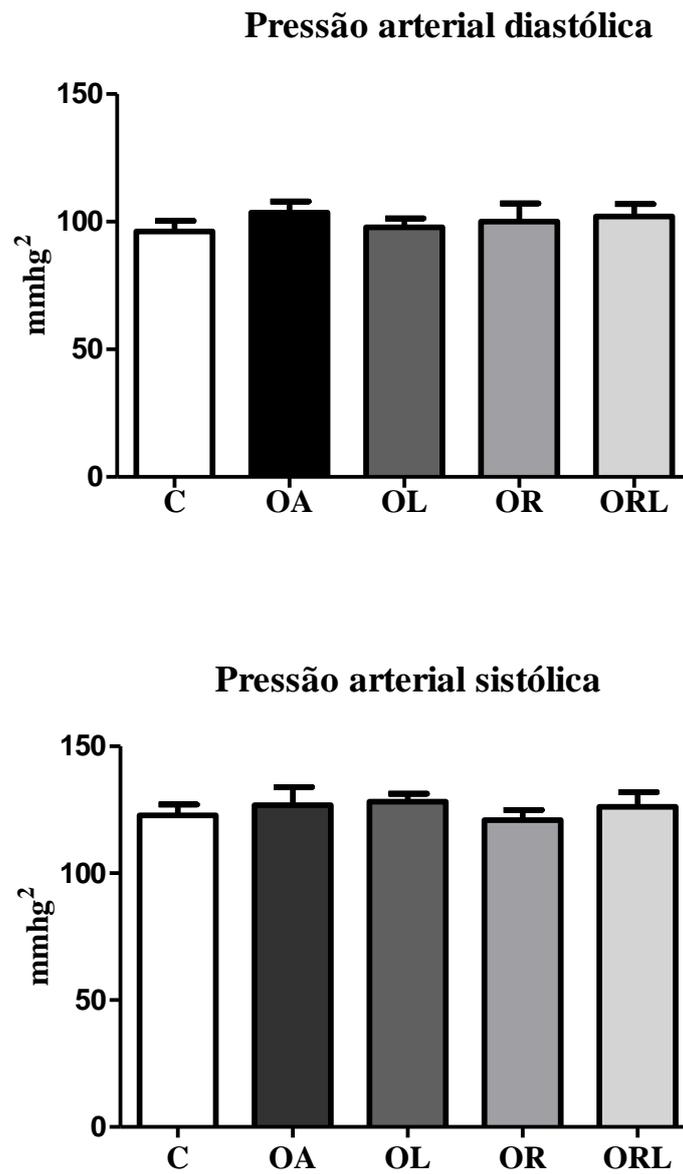


Fig. 18 Efeito do tratamento com LBI e TR sobre a Avaliação Hemodinâmica (Pressão arterial diastólica e sistólica) em modelo experimental de OA. Média da Pressão Arterial Sistólica e diastólica dos grupos estudados. O grupo C, submetido a indução de solução salina; o grupo com OA induzida por papaína e cisteína e sedentário; o grupo OL com OA induzida tratada com LBI; o grupo OR com OA induzida tratada com TR; o grupo ORL com OA induzida e associação de TR e LBI. Milímetros de mercúrio ao quadrado (mmg²), (n =7-8).

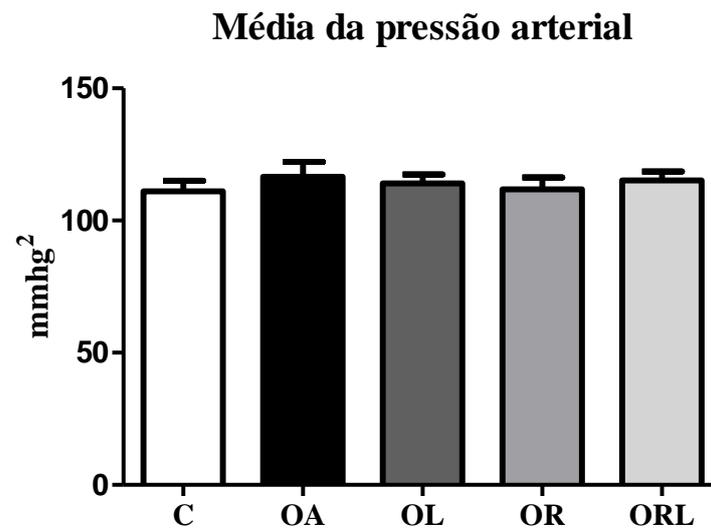


Fig. 19 Efeito do tratamento com LBI e TR sobre a Avaliação Hemodinâmica (Pressão arterial) em modelo experimental de OA. Média da Pressão Arterial dos grupos estudados. O grupo C, submetido a indução de solução salina; o grupo com OA induzida por papaína e cisteína e sedentário; o grupo OL com OA induzida tratada com LBI; o grupo OR com OA induzida tratada com TR; o grupo ORL com OA induzida e associação de TR e LBI. Milímetros de mercúrio ao quadrado (mmHg²), (n =7-8).

8. RESULTADOS QUANTO A AÇÃO LOCAL

8.1 Influxo Leucocitário

Efeito do tratamento com LBI e TR sobre o influxo de leucócitos totais na cavidade articular.

A figura 20 apresenta a análise do lavado articular, que teve objetivo de quantificar as células totais infiltradas no processo inflamatório. Com isso pode-se observar que o grupo OL ($186,6 \pm 39,9 \times 10^4$), bem como os grupos treinados OR ($127,5 \pm 7,7 \times 10^4$) e ORL ($79,2 \pm 19,2 \times 10^4$) apresentaram inibição significativa do influxo de leucócitos total para a cavidade articular em relação ao grupo OA ($565,5 \pm 32,8 \times 10^4$).

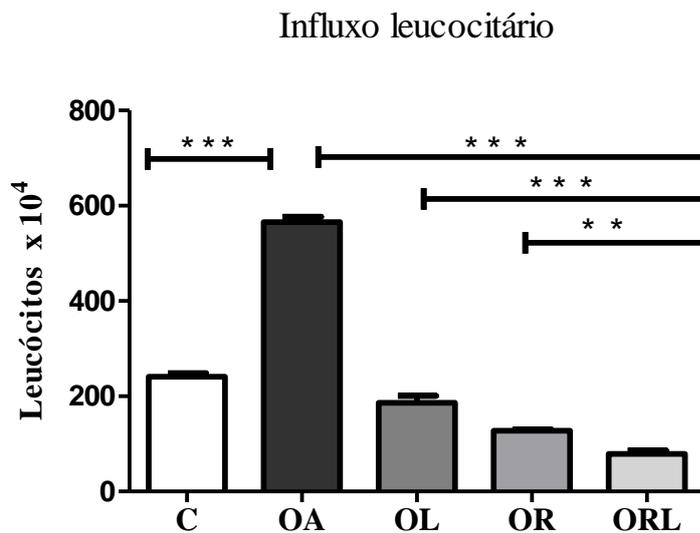


Fig. 20 Efeito do LBI e TR na redução do influxo leucocitário totais na cavidade articular dos ratos em modelo experimental de OA. Os ratos receberam a indução de OA ou solução salina. O TR foi realizado em escada durante 12 semanas. O tratamento com o LBI foi aplicado duas vezes por semana, sempre antes da sessão de TR, no início e fim do ciclo de 5 dias. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

8.2 Análise Histológica de Amostras da Membrana Sinovial.

Efeito do tratamento com LBI e TR e seu efeito na análise das membranas sinoviais de cada grupo coradas com HE em modelo experimental de OA.

A Figura 21 apresenta a membrana sinovial coradas em HE. O grupo C apresentou a membrana sinovial mais íntegra em relação ao grupo OA. Na imagem do grupo OA pode – se observar uma desorganização do tecido da membrana sinovial, formação de edemas (seta verde), áreas sem tecidos e células inflamadas em forma de nódulos (seta branca). A imagem do grupo OL demonstra melhor organização tecidual e com menos áreas sem a presença de tecido. A imagem do grupo OR, assim como a imagem do grupo ORL revela um avançado processo de organização. Essas imagens foram tiradas através de uma câmera acoplada ao microscópio em objetiva de 40 x.

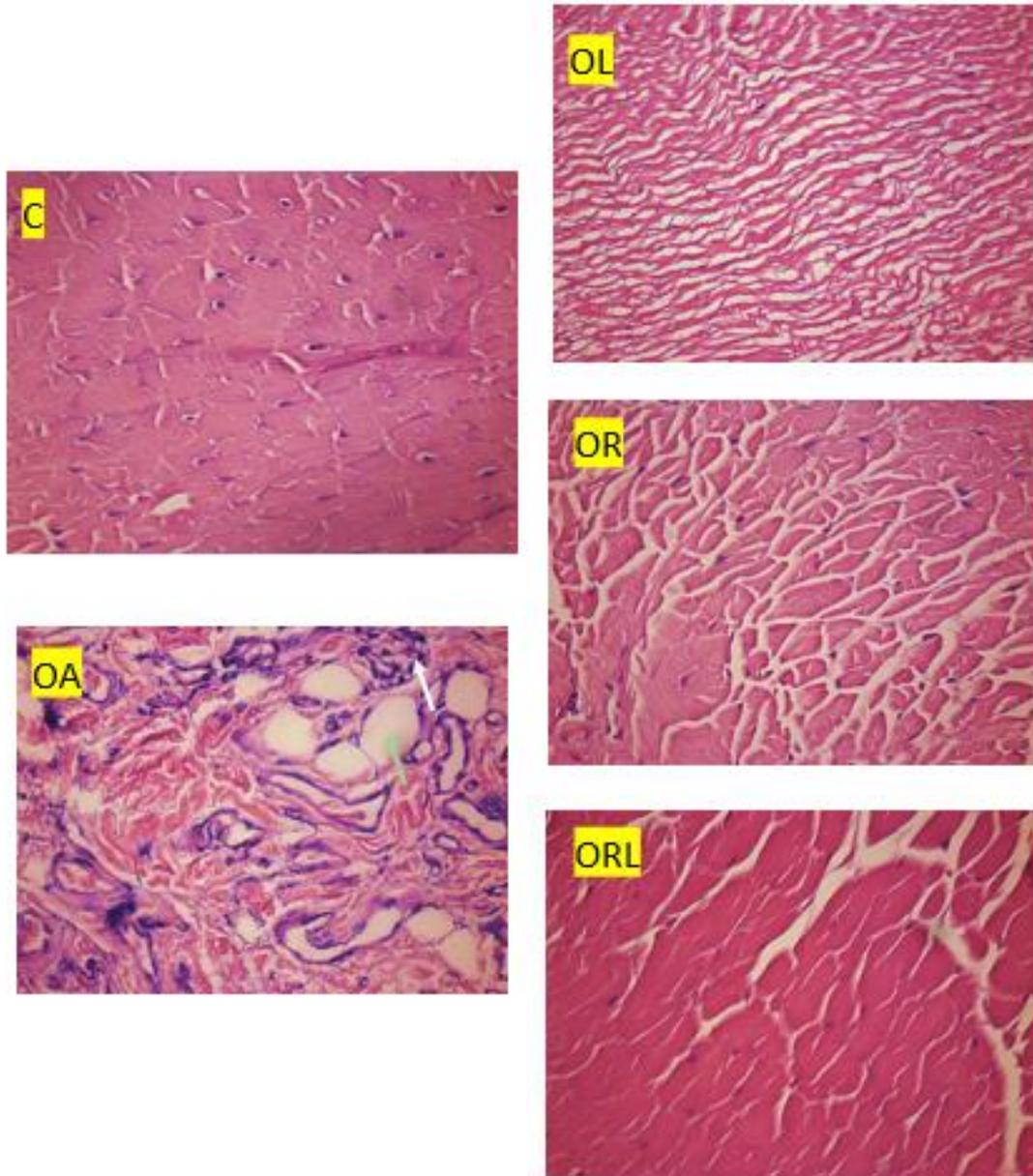


Fig. 21 Efeito do LBI associado ao TR e seu efeito na análise das membranas sinoviais de cada grupo coradas com HE. O grupo C apresentou a membrana sinovial íntegra. O grupo OA apresentou desorganização do tecido da membrana sinovial, intenso processo inflamatório em forma de nódulos (representado por seta branca), edema (representado por seta verde). O Grupo OL demonstrou diminuição de edema e processo inflamatório mostrando aparência melhor em relação ao grupo somente OA. Os grupos OR e ORL apresentaram uma organização do tecido da membrana sinovial, diminuição do intenso processo inflamatório em relação aos grupos sedentários. Todas as fotos foram tiradas em uma escala $50\ \mu\text{m}$ e objetiva de 40 x.

8.3 Análise e quantificação de colágeno

Efeito do Tratamento do LBI e TR em Cortes Histológicos de Amostras de Membrana Sinovial dos Grupos do Protocolo Coradas com *Pricosirius red*.

As figuras 22 e 23 apresentam a membrana sinovial corada com *Pricosirius red*. O grupo C apresentou uma organização tecidual da membrana sinovial com birrefringência em vermelho. O grupo OA mostrou grande presença de colágeno em fibras de cor amarelada (fibrose) que foi predominante em relação ao grupo C. O grupo OL apresentou uma quantidade menor de cor amarelada o que indica diminuição de fibrose. Os grupos OR e ORL foram os grupos que visualmente apresentaram características mais semelhantes ao grupo C (organização do tecido sinovial). Todas as fotos foram tiradas em uma escala $\{ 50 \mu\text{m} \}$ e objetiva de 40 x.

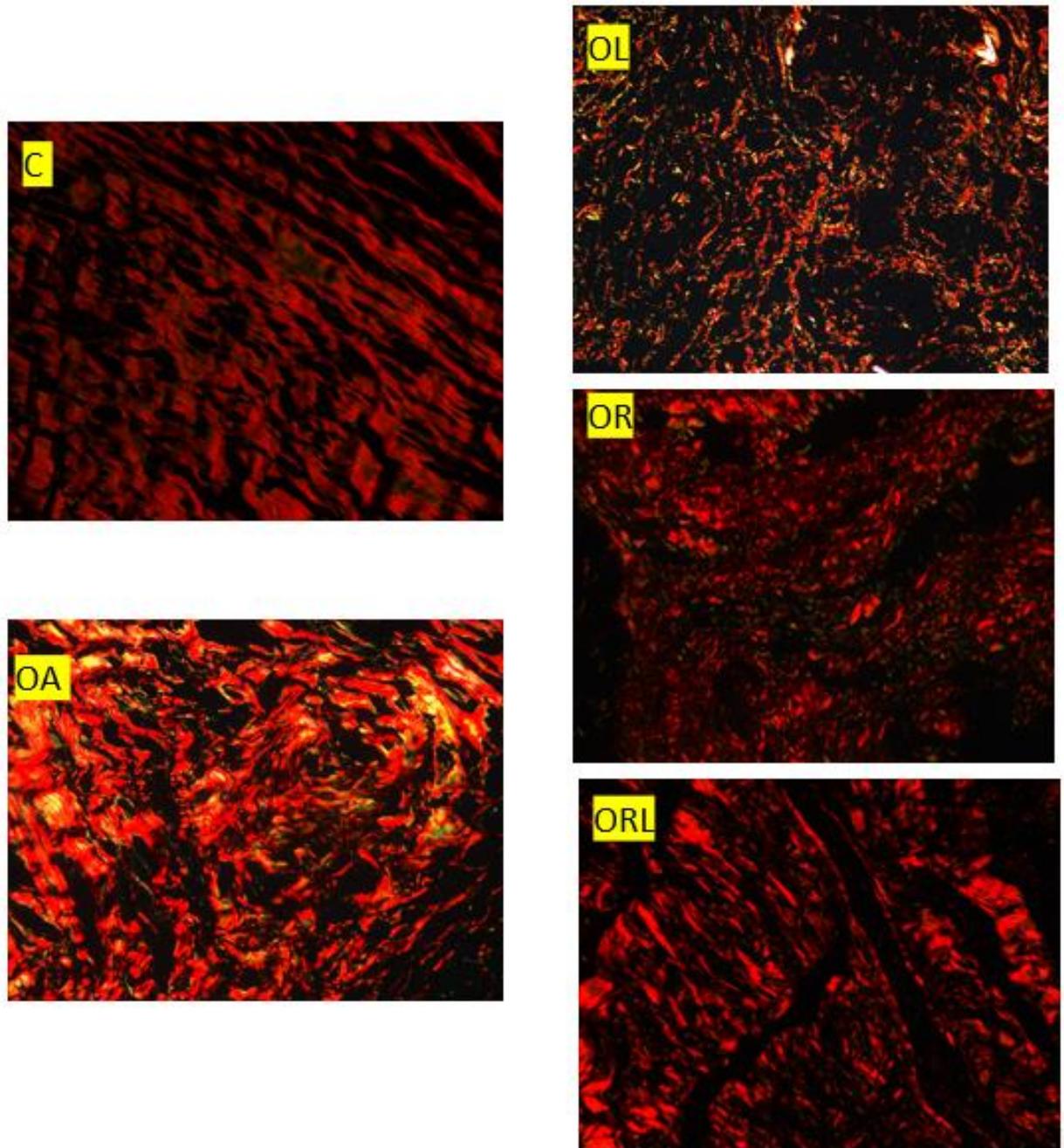


Fig. 22. Efeito do Tratamento do LBI e TR em Cortes Histológicos de Amostras de Membrana Sinovial dos Grupos do Protocolo Coradas com *Picosirius red* sob luz polarizada. O grupo C apresentou uma organização tecidual na membrana sinovial com cor em vermelho de tecido sinovial. O grupo OA mostrou a presença de muito colágeno em fibras grossas e cor amarelada (fibrose) predominante em relação ao grupo C. O grupo OL apresentou uma quantidade menor de cor amarelada o que indica diminuição de fibrose. Os grupos OR e ORL foram os grupos que visualmente apresentaram características mais semelhantes ao grupo C (organização do tecido sinovial). Todas as fotos foram tiradas em uma escala $\mid 50 \mu\text{m} \mid$ e objetiva de 40 x.

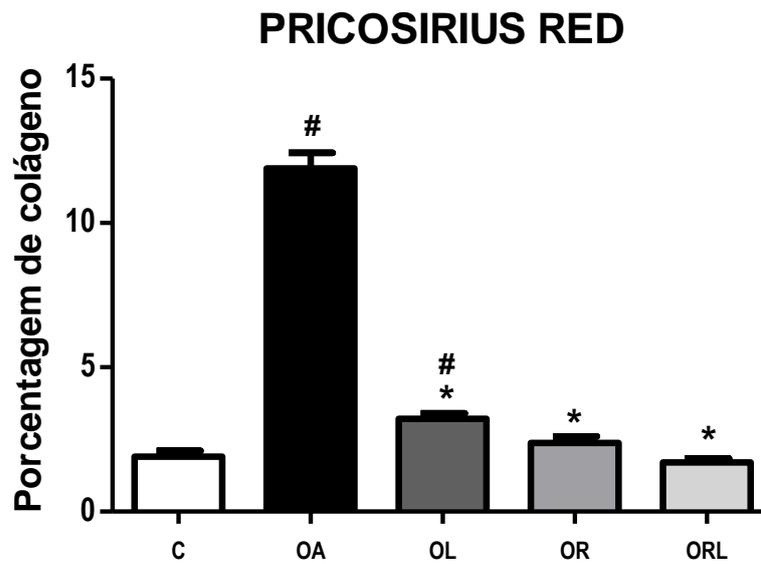


Fig 23. Efeito do Tratamento do LBI e TR em Cortes Histológicos de Amostras de Membrana Sinovial dos Grupos do Protocolo Coradas com *Pricosirius red* sob luz polarizada quanto a quantificação de colágeno. Resultados da quantificação de 13 imagens por rato, com medidas de perímetro padronizadas utilizando mensuração por pixels realizada em software Image J. Os valores em percentuais expressos como média \pm E.p.m de 8 animais C (controle), OA (Osteoartrite), OL (Osteoartrite + laser), OR (osteoartrite + treinamento resistido), ORL (osteoartrite + treinamento resistido + laser) * $p < 0,001$ em relação ao grupo OA, * $p < 0,05$ em relação ao grupo C. (ANOVA).

9. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a eficácia da associação do TR e LBI na ação sistêmica através da diminuição significativa de peso em comparação ao grupo sedentário OA, os grupos treinados também apresentaram melhora na capacidade funcional e diminuição da frequência cardíaca de repouso comparados aos grupos sedentários. Na ação local, o grupo ORL apresentou uma melhora significativa no processo inflamatório quando comparado com os grupos tratados com as terapias individuais. Os resultados histológicos também revelaram e confirmaram a eficácia da associação de TR e LBI diminuiu a degradação do tecido de colágeno neste modelo experimental quando comparado aos grupos tratados com as terapias individuais.

Avaliamos a hipótese de que as associações de terapias não farmacológicas, como o LBI e o TR podem ser eficazes para a melhora da capacidade funcional dos ratos e principalmente o efeito analgésico do LBI contribuindo ao sistêmica do treinamento resistido. Para esse fim, utilizamos OA induzida por uma solução de papaína 4% + cisteína 0,03 mol/L. A indução da OA por meio da papaína, uma enzima proteolítica, foi escolhido por ser uma técnica bem difundida em publicações científicas e mimetiza a patologia da OA (10). Neste sentido, o estudo de Han et al., (2012) na qual foi utilizado 2%, 5% e 10% de papaína com 0,03 mol/L de cisteína na região intra-articular de joelhos de coelhos foi observado inflamação sinovial, fibrilação e degeneração da cartilagem, avaliado pela análise histológica e lavado articular. Ainda, no estudo de Murat et al. (2007) utilizaram 4% de papaína com 0,03 mol/L de cisteína em ratos e verificaram que todos os joelhos induzidos apresentaram irregularidade e fibrilação na camada superficial pela análise histológica. O uso da bioestimulação por laser de baixa intensidade é um recurso terapêutico amplamente utilizado em condições clínicas, foi utilizado neste trabalho devido aos seus efeitos terapêuticos na OA experimental com foco na melhora do processo inflamatório, capacidade funcional, e análises hemodinâmicas na diminuição da frequência cardíaca de repouso e normotensão da pressão arterial dos grupos (87, 88).

Ao avaliarmos o ganho de peso dos animais, observamos que todos os animais tiveram aumento de peso no final do protocolo em relação ao início do protocolo experimental, no entanto os animais que treinaram tiveram ganho de peso menor que os grupos sedentários, esses resultados são semelhantes a estudos (89, 90) que apresentam perda de peso com atividade física, situação que contribui a menor sobrecarga articular. Além disso, já foi demonstrado que o aumento de peso causa descargas biomecânicas elevadas nas articulações bem como o aumento de tecido adiposo relacionado ao sedentarismo estão relacionadas com disfunções musculares, risco de doenças cardiovasculares, OA entre outras (89, 90).

Sendo assim, o treinamento físico é uma estratégia importante para a alteração deste quadro, contribuindo para a melhora da OA.

Com isso nossos resultados demonstraram que os grupos treinados tiveram uma maior capacidade funcional em relação aos grupos sedentários, esta observação se dá pelo fato do TR estimular a movimentação e promover ganho de força através do aumento das cargas no qual o animal é submetido. Esses resultados estão de acordo com a literatura pois mostra que a atividade física com TR aumenta a melhora da capacidade funcional dos indivíduos (84).

A dor é um sintoma comum em doenças osteoarticulares, especialmente na OA, muito mais prevalente do que a rigidez e incapacidade (91). NA literatura já foi demonstrado que o treinamento físico é um recurso importante para tratamento de OA por alcançar a redução da dor e melhora da capacidade funcional (92). Ademais, a LBI pode ser uma abordagem alternativa ao rápido alívio da dor na artrite (93). Sugere – se que neste estudo o LBI contribuiu na diminuição de dor local para que os animais treinados com LBI conseguissem subir a escada com uma elevada carga pois o mesmo promove analgesia (17). Ao realizar a atividade física, neste estudo os ratos apresentaram diminuição de peso corporal.

Nossos resultados apresentaram efeitos melhores no grupo com a associação do LBI e TR promovendo uma regulação fisiológica aumentada resultando na regulação do organismo quanto ao processo inflamatório local e melhora da capacidade funcional. A literatura também mostrou que em uma associação de LBI e treinamento físico o grupo com as duas terapias também teve um efeito melhor do que LBI sozinho (80). Nesse sentido, uma meta-análise de 22 ensaios clínicos randomizados a qual 668 pessoas estavam no grupo de terapia a laser e 565 pessoas no grupo de placebo mostraram a eficácia desta alternativa confirmando resultados de estudo clínico precedentes relatados que LBI pôde ser uma alternativa aos anti-inflamatórios não esteroidais (94).

Ao avaliarmos o efeito da OA no local de inflamação observamos aumento significativo de leucócitos na cavidade articular em relação ao grupo controle, o que confirma o processo inflamatório local. Além disso, verificamos redução significativa na contagem dos leucócitos totais no lavado articular dos grupos tratados com LBI, TR isolados e principalmente nos grupos tratados com a associação das terapias mostrando melhor eficácia do que as terapias tratadas individualmente. Nossos resultados demonstraram claramente que a radiação LBI diminui o influxo leucocitário retirado do lavado articular. Esse resultado confirma o que a literatura já descreveu em relação ao efeito anti-inflamatório do LBI (54). Neste sentido, vários estudos

demonstram a redução de leucócitos pela laserterapia em modelo experimental de artrite induzida por zymosan (17), carragenina (51) e osteoartrite induzida por papaína (54). O presente trabalho é a primeira demonstração de um protocolo de tratamento da OA de joelho com a associação de LBI e treinamento resistido.

A avaliação histológica da membrana sinovial mostrou uma melhor organização das fibras nos grupos treinados em relação ao grupo OA, mostrando o efeito protetor do LBI associado ao TR em relação a melhora da arquitetura da membrana sinovial. Ainda, observamos uma redução do processo inflamatório pela redução de edema e número de leucócitos, esses resultados estão de acordo com dados já demonstrado na literatura (39). Ainda, neste estudo houve uma melhor organização da estrutura do colágeno no grupo tratado com laser. Assim demonstrando o efeito da bioestimulação com LBI no processo de reparação da membrana sinovial.

A frequência cardíaca de repouso neste presente modelo experimental (LBI e TR) apresentou-se diminuída no grupo ORL o que indica uma proteção cardiovascular, uma vez que indivíduos com OA crônica pode ter alterações cardiovasculares ao longo dos anos (12)

Este estudo também demonstra que o TR tem um efeito positivo sobre a OA medido através da frequência cardíaca de repouso e da pressão arterial comparando os grupos treinados ao grupo OA. O grupo ORL mostrou menor frequência cardíaca de repouso e vai ao encontro dos resultados obtidos em estudos anteriores (77).

Devido ao crescimento da empregabilidade do LBI e relevante importância que tem tido nos tratamentos atualmente, procuramos estabelecer a dose do LBI para analisar os seus efeitos sobre o processo inflamatório no nosso estudo experimental, sendo que a escolha da dose mostrou atenuação do processo inflamatório geral com reduções significativas das células inflamatórias no protocolo experimental e podemos observar os efeitos na membrana sinovial.

Dessa maneira, nossos resultados sugerem que um programa de TR moderado associado ao LBI pode exercer resultados favoráveis no equilíbrio hemodinâmico cardiovascular, melhorar a capacidade funcional, e atuar na proteção da articulação acometida por osteoartrite.

10. INTERPRETAÇÃO E RESUMO DOS RESULTADOS

- Os grupos que tiveram tratamento com o laser de baixa intensidade ou treinamento resistido ou a associação das terapias apresentaram diminuição de peso corporal significativa em relação ao grupo OA. O grupo controle apresentou peso corporal similar ao grupo tratado com LBI.
- Os grupos com treinamento resistido apresentaram melhora na capacidade funcional comparado com grupos sedentários.
- O tratamento com LBI assim como o TR apresentou resultados comparativos significantes o que indica normotensão da pressão arterial neste modelo experimental.
- A frequência cardíaca de repouso neste modelo experimental apresentou-se diminuída no grupo OR e ORL o que indica uma proteção cardiovascular.
- Os grupos que tiveram tratamento com o laser de baixa intensidade ou treinamento resistido ou a associação das terapias apresentaram uma melhora no processo inflamatório significativo em comparação ao grupo OA.
- O presente estudo demonstrou a eficácia da associação do TR e LBI na degradação do tecido de colágeno neste modelo experimental.
- O treinamento físico resistido neste estudo revela efeitos fisiológicos positivos aos grupos que tiveram a terapia pois os mesmos foram submetidos a irradiação com LBI sem efeitos colaterais dos anti-inflamatórios atualmente utilizados. Sendo assim, essa associação é uma alternativa para o tratamento farmacológico existentes.

11. CONCLUSÕES

A associação do TR moderado associado ao LBI pode promover efeitos benéficos a capacidade funcional, ganho de peso, diminuição da frequência cardíaca, regulação do intenso processo inflamatório local, diminuição do depósito de colágeno e diminuição da alteração estrutural avaliada através da histologia da membrana sinovial.

12. LIMITAÇÕES PERSPECTIVAS

Com perspectivas futuras pretende-se associar em um próximo trabalho o treinamento combinado (treinamento aeróbio + treinamento resistido + LBI em ratas ooforectomizadas) uma vez que a OA de joelho acomete grande parte da população de mulheres em fase de menopausa.

Pensa – se inda associar o Diodo emissor de luz (LED) ao treinamento resistido ou associá-lo ao treinamento aeróbio com esteira ou natação.

Realizar a análise dos aspectos autonômicos realizados durante o registro de cada rato.

Analisar se a quantidade de ração influencia na diminuição e/ou ganho de peso dos grupos uma vez que o grupo OA apresenta diminuição de locomoção na caixa durante o período de protocolo do estudo, mas tem ganho de peso.

Classificar as células presentes no lavado articular proveniente do processo inflamatório local diferenciando-as em polimorfonucleares ou mononucleares com base em critérios de morfologia celular. Dosar citocinas presentes no lavado articular.

In vitro, cultivar as células presentes na cartilagem e capsula articular de joelho com OA e trata-las com fotobiomodulação em diferentes doses.

Em humanos associar treinamento resistido (molas, elásticos, escada, entre outros) com o LBI e/ou LED pois não apresentam efeitos colaterais e confirmado que a qualidade do tratamento é melhor do que as terapias individuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATTUR MG, **Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine.** *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10:1-4.
2. BROOKS PM. **Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications.** *Curr Opin Rheumatol.* 2002; 14:573-7.
3. **World Health Organization and the Bone and Joint Decade**, 2001. Disponível em: <http://www.boneandjointdecade.org>.
4. DIEPPE P, et al **The Bristol 'OA500 study': progression and impact of the disease after 8 years.** *Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8:63-8.
5. PETERS TJ, et al **Factors associated with change in pain and disability over time: a community-based prospective observational study of hip and knee osteoarthritis.** *Br J Gen Pract* 2005; 55:205-11.
6. BERENBAUM, F. **Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!).** Osteoarthritis Research Society International. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Jan;21(1):16-21.
7. SHARMA L, et al. **Epidemiology of osteoarthritis: an update.** *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18:147-56.
8. BONDENSON, J.et al. **The role of synovial macrofages and macrofage-produce cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory response in osteoarthritis.** *Arthritis Research & Therapy.* 2006; 8(6): R187.
9. GOBEZIE, R., KHO,et al . **High abundance sinovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis.** 2007. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2): R36.
10. da ROSA, AS et al **Effects of Low-level Laser Therapy at Wavelengths of 660 and 808 nm in Experimental Model of Osteoarthritis Photochemistry and Photobiology,** 2012, 88: 161–166.

11. OSHIMA, Y et al **Effect of light-emitting diode (LED) therapy on the development of osteoarthritis (OA) in a rabbit model.** 2011 fev; Published by Elsevier Masson SAS. doi: 10.1016/j.biopha.2011.02.011.
12. LUFT, F.C. **Osteoarthritis is what the people have.** J Mol Med (Berl). 2015 Aug;93(8):819-21.
13. IMAMURA, M et al. **Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia.** ClinInterv Aging. 2014 Jun 12; 9:939-44
14. WENHAM, C.Y. **New horizons in osteoarthritis.** Age Ageing. 2013 May;42(3):272-8.
15. PERROT, S. **Osteoarthritis pain.** Best Pract Res ClinRheumatol. 2015 Feb;29(1):90
16. GOLDRING, M.B., GOLDRING, S.R. **Osteoarthritis.** J Cell Physiol. 2007 Dec;213(3):626-34. Review.
17. CARLOS, F.P et al. **Protective effect low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis.** Lasers MedSci. 2014 Mar;29(2):757-63.
18. CASTRO RR, et al. **A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis – evidence for a role for nitric oxide.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 769-76.
19. PRITZKER KP, et al. **Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14(1):13-29.
20. KAMALI, F, et al. **The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee.** Journal of J Photo chem. Photobiol B. 2007 Jul 27;88(1):11-5.
21. LAFEBER, FP., VAN SPIL, W.E. **Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time.** *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Oct;21(10):1452-64.
22. BRESSAN, E., **Contribution of TNFalpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis.** Cytokine. 2006 Oct;36(1-2):83-9.
23. YASUKAWA, A, et al. **The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model.** J.Vet. Med. SCI. 69, 2007.

24. FELSON DT. **The sources of pain in knee osteoarthritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17:624-28.
25. DAVIS M, et al. **Correlates of knee pain among US adults with and without radiographic knee osteoarthritis.** *J Rheumatol.* 2002; 19:1943-49.
26. GRUBB BD. **Activation of sensory neurons in the arthritic joint.** *Novartis Found Symp* 2004; 260:28-36.
27. WOOLF CJ, SALTER MW. **Neuronal plasticity: increasing the gain in pain.** *Science* 2000; 288:1765-9.
28. Kraychette DC, et al. **Citocinas pró-inflamatórias e dor.** *Rev Bras Reumatol* 2006; 46:199-206.
29. KIDD BL, URBAN LA. **Mechanisms of inflammatory pain.** *Br J Anaesth* 2001; 87: 3-11.
30. MELTON L. **Osteoarthritis pain goes central.** *Lancet Neurol* 2003; 2:524.
31. CONAGHAN PG, FELSON DT. **Structural associations of osteoarthritis pain: lessons from magnetic resonance imaging.** *Novartis Found Symp* 2004; 260:191-105.
32. ATTUR MG, **Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine.** *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10:1-4.
33. PELLETIER P, et.al. **Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implications for the selection of new therapeutic targets.** *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1237-47.
34. MARTEL-PELLETIER J. **Pathophysiology of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: S31-33.
35. QIN, J., **H.TNF/TNFR signal transduction pathway-mediated anti-apoptosis and anti-inflammatory effects of sodium ferulate on IL-1b-induced rat osteoarthritis chondrocytes in vitro.** *Arthritis Res Ther.* 2012 Nov 7;14(6): R242.
36. GUR A, et al. **Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial.** *Lasers Surg Med* 2003; 33: 330–338.

37. COOPER C. **Osteoarthritis: epidemiology and classification.** In: Hochberg MC. Rheumatology. 3rd ed. Toronto: Mosby; 2003. p.1781-91.
38. NUKI G. **Osteoarthritis: a problem of joint failure.** Z Rheumatol 1999 58: 142-147
39. SCOTT A, et al. **What do we mean by the term “inflammation”?** A contemporary basic science update for sports medicine. Br J Sports Med 2004; 38:372-80.
40. YEOM, M, et al. **Therapeutic Effects of Hominis placenta Injection into an Acupuncture Point on the Inflammatory Responses in Subchondral Bone Region of Adjuvant-Induced Polyarthritic Rat.** Biol. Pharm. Bull. 26, 1472-1477, 2003.
41. BRANDT, K., et al. **Intraarticular injection of hyaluron an as treatment for knee osteoarthritis what is the evidence?** ARTHRITIS & RHEUMATISM vol. 43, n 6, 1192 - 1203, 2000.
42. UCHOA, et al. **Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo.** An. Bras. Dermatol. 85(6): 849-855, 2010.
43. CHAVANTES MC, et al. Capítulo 1-5. **In:Laser em Bio-medicina: Princípios e práticas.** Chavantes MC (ed), Atheneu São Paulo,2009; 1-70.
44. KARU T. **Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation.** Lasers in the Life Scienses. 1988; 2 (1): 53-74
45. LOPES L, BRUGNERA A. **Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico.** Laseres na odontologia moderna São Paulo: pancast. 2008:100- 20.
46. GUPTA A ET AL. **Shining Light on Nanotechnology to Help Repair and Regeneration** Biotechnol Adv. 2013; 31(5): 607–631.
47. PINTO, N.C et al **Laser de baixa intensidade em deiscência aguda safenectomia: proposta terapêutica.** Rev Bras Cir Cardiovasc. ;24(1), P. 88-91, 2009.
48. BALINT, G.et al **Ex Vivo Soft-Laser Treatment Inhibits the Synovial Expression of Vimentin and-Enolase, Potential Autoantigens in Rheumatoid Arthritis.** PHYS THER, 91, 2011.
49. GORETI C. **Laser: fundamentos e indicações em dermatologia.** Med Cutan Iber Lat Am 2009;37(1):5-27
50. ZHAO, L et al. **Effects of Laser Irradiation on Arthritic Histopatology And Heart Shock Protein 70 Expression In C 57 Black Mice With Osteoarthritis.** Journal of Chinese Integrative Medicine, vol 9, n 7, 2011.
51. PALLOTTA, R et al. **Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation.** Lasers Med Sci 27:71–78, 2012

52. MAGEE, D. J. **Avaliação Musculoesquelética**. 3. ed. São Paulo: Manole, 837, p. 525- 526, 2002.
53. GOULD, J. A. **Fisioterapia na Ortopedia e na Medicina do Esporte**. São Paulo: Manole, p. 691, 2003.
54. ALVES AC, et al. **Effect of low level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation**. *Arthritis Res Treat* 2013, 15: R116.
55. CIDRAL-FILHO FJ, et al. **Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the Larginine/nitric oxide pathway**. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar;29(2):695-702. Epub 2013 Jul 6.
56. CASTANO AP et al. **Low-Level Laser Therapy for Zymosan-Induced Arthritis in Rats: Importance of Illumination Time**. *Lasers Surg Med*. 2007 July; 39(6): 543–550.
57. BRUM, P. C. et al. **Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular**. *Revista Paulista de Educação Física*, São Paulo, v.18, n. 2, p.21-31, 2004
58. MIDGLEY, A. W et al. **Is there an optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners? Empirical research findings, current opinions, physiological rationale and practical recommendat**. *Sports Medicine*, Auckland, v. 36, n. 2, p. 117-132, 2006.
59. SILVA, J. E. F, et al. **Obesidade e sedentarismo como fatores de risco para doenças cardiovasculares em crianças e adolescentes de escolas públicas de Maringá, PR**. *Revista Saúde e Pesquisa*, Maringá, v. 2, n. 1, p. 41-51, 2009.
60. COSTA, R. L. F. **Exercise as a time-condition effector in chonic disease: a complementary treatment strategy**. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, Oxford, v. 1, n. 1, p. 63-70, 2004.
61. HASKELL, W. L. et al. **Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association**. *Medicine and science in sports and exercise*, Madison, v. 39, n.1, p. 1423-1434, 2007.
62. PETRELLA RJ. **Is exercise effective treatment for osteoarthritis of the knee?** *Br J Sports Med*. 2000;34(5):326-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bjsem.34.5.326>

63. ALVES, J.C.; BASSITT, D.P. **Quality of life and functional capacity of elderly women with knee osteoarthritis.** Einstein (São Paulo), São Paulo, v. 11, n. 2, p. 209-215, apr. /june 213.
64. WINETT, R. A.; CARPINELLI, R. N. **Potential health-related benefits of resistance training.** Preventive Medicine, New York, v. 33, n. 5, p. 503-513, 2001.
65. CAMARA, L. C. et al. **Exercícios resistidos terapêuticos para indivíduos com doença arterial obstrutiva periférica: evidências para a prescrição.** Jornal Vascular Brasileiro, Salvador, v. 6, n. 3, p. 247-257, 2007.
66. CAMBRI, L.T.; SANTOS, D.L. **Influência dos exercícios resistidos com pesos em diabéticos tipo 2.** Motriz, Rio Claro, v.12, n.1, p.33-41, 2006.
67. FALVO, M. J, et al, **Parkinson's disease and resistive exercise: Rationale, review, and recommendations.** Movement disorders, New York, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2008.
68. WOOTEN, J.S. et al. **Resistance exercise and lipoproteins in postmenopausal women.** International journal of sports medicine, Stuttgart, v. 32, n. 1, p. 7-13, 2011.
69. RODDY E, et al. **Evidence-based recommendations for the role of exercise in the management of osteoarthritis of the hip or knee--the MOVE consensus.** Rheumatology (Oxford). 2005;44(1):67-73
70. CIOLAC EG, GREVE JMD. **Muscle strength and exercise intensity adaptation to resistance training in older women with knee osteoarthritis and total knee arthroplasty.** Clinics. 2011;66(12):2079-84.
71. PETERSON SC, et al. **Mechanisms underlying quadriceps weakness in knee osteoarthritis.** Med Sci Sports Exerc 2008; 40(3): 422-7
72. DUARTE VS, et al. **Exercícios físicos e osteoartrose: uma revisão sistemática.** Fisioter Mov. 2013; 26(1): 193202.
73. FRANSEN M, et al. **Exercise for osteoarthritis of the knee: a Cochrane systematic review.** Br J Sports Med. 2015;49(24):1554-7.
74. WILLIAMS, M. A. et al. **Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism.** Circulation, v. 116, n. 5, p. 572-84, Jul 31 2007.

75. MCALINDON TE, et al. **OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(3):363-88.
76. LI Y, et al. **The effects of resistance exercise in patients with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis.** *Clin Rehabil.* 2015. pii: 0269215515610039.
77. MILLER LE, et al. **An 8-week multimodal treatment program improves symptoms of knee osteoarthritis: a real-world multicenter experience.** *Pragmatic and Observational Research* Oct 2013;4 39–44
78. TOMA RL. **Low level laser therapy associated with a strength training program on muscle performance in elderly women: a randomized double blind control study.** *Lasers Med Sci.* 2016 Aug;31(6):1219-29.
79. JAMTVED G, et al. **Measuring physiotherapy performance in patients with osteoarthritis of the knee: A prospective study.** *BMC Health Services Research* 2008; 8: 145-51. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6963/8/145>
80. FERRARESI, C, et al **Effects of low level laser therapy (808 nm) on physical strength training in humans.** *Lasers Med. Sci.* 26, 2011 - 349–358
81. TOMA, R.L. et al **Effect of 808 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in elderly women.** *Lasers Med. Sci.* 2013 Volume 28, 1375–1382
82. PATROCINIO, T et al **Effect of Low-Level Laser Therapy (808 nm) in Skeletal Muscle After Resistance Exercise Training in Rats** *Photomedicine and laser surgery.* October 2013 Volume 31, Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 492–498
83. YOUSSEF EF, et al. **Effect of Laser Therapy on Chronic Osteoarthritis of the Knee in Older Subjects.** *Lasers Med Sci.* 2016 Spring;7(2):112-9.
84. CALLADO, I.S. **Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabética: efeito do treinamento físico dinâmico aeróbico, resistido ou combinado.** USP/FM/DBD. Tese, São Paulo, 2012
85. SANCHES, et al. **Standardization of Resistance Exercise Training: Effects in Diabetic Ovariectomized Rats.** *International Journal of Sports Medicine*, DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1351254> Nov 10,20132014
86. GOODFELOW. A.M, et al. **Local therapy with soluble complement receptor 1 (sCR1) suppresses inflammation in rat mono-articular arthritis.** *Clin. Exp. Immunol.* 52, 1997.

87. HAN J, Miranda-Saavedra D, et al **Deep Evolutionary Conservation of an Intramolecular Protein Kinase Activation Mechanism.** PLoS ONE 2012 7(1): e29702. doi: 10.1371/journal.pone.0029702
88. MURAT, N, et al. **Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score.** Acta Orthop Traumatol Turc. 2007;41(3):233-7.
89. MILLER, G.D., et al **Influence of Weight Loss, Body Composition, and Lifestyle Behaviors on Plasma Adipokines: A Randomized**
90. AQUINO, A.E.J., **Low-level laser therapy (LLLT) combined with swimming training improved the lipid profile in rats fed with high-fat diet.** Laser Med, 14, 2012.
91. ARTHUR K, et al. **Efeitos da geoterapia e fitoterapia associadas à cinesioterapia na osteoartrite de joelho: estudo randomizado duplo cego.** Acta Fisiátr. 2012;19(1):11-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0104-7795.20120003>
92. SANCHEZ FF, et al. **Cinesioterapia como tratamento para osteoartrite no joelho.** Rev Omnia Saúde.2007;4(2):32-6.
93. DE MORAIS NC, et al **Anti -inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis.** Photomed Laser Surg. 2010 Apr;28(2):227-32
94. JANG H, LEE H. **Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas.** Photomed Laser Surg; 30, 2012.

ANEXO

Aprovação do comitê de ética em uso animais CEUA / UNINOVE n° AN 009/2014



UNINOVE
Universidade Nova de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto n° AN009/2014

Título do Projeto: Avaliação do Treinamento Aeróbico, Resistido e Combinado Associado ao Laser de Baixa Potência em Artrite.

Orientador: Marcelo de Paula Alves da Silva

Objetivos: Avaliar e comparar os efeitos do treinamento físico aeróbico, resistido e combinado associado ao laser de baixa potência em artrite. Específicos: 1 - Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico associado ao laser de baixa potência em artrite na degradação articular no que se refere ao influxo inflamatório, colágeno e metaloproteinases (MMP - 2 e 9); 2 - Avaliar o efeito do treinamento físico resistido associado ao laser de baixa potência em artrite na degradação articular no que se refere ao influxo inflamatório, colágeno e metaloproteinases (MMP - 2 e 9); 3 - Avaliar o efeito do treinamento físico combinado associado ao laser de baixa potência em artrite na degradação articular no que se refere ao influxo inflamatório, colágeno e metaloproteinases (MMP - 2 e 9); 4 - Avaliar os efeitos do treinamento físico associado ao laser de baixa potência em artrite nas alterações sistêmicas hemodinâmicas e autonômicas, alterações de mediadores inflamatórios (TNF, IL-1, IL-6 e IL-10) e capacidade funcional.

Métodos:

INDUÇÃO A ARTRITE

Ratos randomizados receberão uma injeção (agulha calibre 30 e seringa de 1 ml) intra-articular de 1 mg de Zymosan^{13,40} (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvida em 50 µl de solução salina estéril no joelho direito. O procedimento será realizado usando anestesia geral por via intramuscular com uma mistura de ketamima 30 mg/kg (hospira. Lake Forest, IL, USA) e xilazina 20 mg/kg (Lloid, Ic, Sherondoa, IA, USA). Ratos randomizados para controle receberão injeção de solução salina estéril. Para procedimento da injeção, a articulação do joelho receberá tricotomia, posicionada em flexão a 90°, localiza-se o tendão patelo-tibial, posiciona-se a agulha perpendicular ao aplicador com o bisel voltado a frente, pressiona-se até transpassar o tendão e injeta-se a mistura zimosan-salina ou salina no espaço virtual intra-articular fêmur tibial. Indução acompanhada por docentes e profissionais do biotério.

TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O protocolo de tratamento será conduzido usando-se um equipamento de laser de baixa potência, semicondutor GaAs, Theraiase DMC®. Os parâmetros a serem utilizados serão comprimento de 665 nm, 20 mW de potência, dose de 4 J/cm² e tempo de 15 segundos ⁴⁰.

TREINAMENTO FÍSICO

TF aeróbico de intensidade moderada será realizado usando equipamento esteira (Imbramed). Os animais, que realizarão o exercício receberão adaptação de cinco dias (10 m/dia a 0.3 km/h), seguido de protocolo de teste de esforço, 48 horas após a indução de artrite. Resultados serão utilizados para prescrição do exercício com periodização de cinco sessões por semana e duração de um mês. Ocorrerá a quantificação da melhora da capacidade física através da mensuração do VO₂. Para protocolo de TF resistido procederemos conforme descrito em publicação recente e ao TF combinado associaremos os protocolos. O TF terá acompanhamento de docente.

O material coletado será distribuído Para a realização dos seguintes procedimentos : histologia coloração de Hematoxilina e eosina e Picosirius Red red .Quantificação das citocinas IL-1 E IL-6 por meio do teste ELISA. Contagem diferencial de leucócitos. Zimografia de proteínas das MMP . Avaliação hemodinamica e autonômica.

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo): Ratos *norgergicus albinos* linhagem Wistar machos (N=66) com peso entre (250 – 280g) procedentes do biotério da UNINOVE

Condições de alojamento e nutrição:

Os ratos serão alocados em caixas plásticas padrão (370×260×170 mm) com três a quatro ratos, com alimento e água *ad libitum*. Provenientes e alojados no biotério da Universidade Nove de Julho, com controle de temperatura (26° C) e ciclos de 12 horas alternados entre claro e escuro.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais: não declaradas

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):

Injeção via intramuscular com uma mistura de ketamina 80 mg/kg (hospira. Lake Forest, IL, USA) e xilazina 20 mg/kg (Lloid, Ic, Sherondoa, IA, USA).

Eutanásia:

Os ratos receberam eutanásia utilizando-se doses elevadas de anestésicos, após período de protocolo de tratamento. Procedimentos e métodos de eutanásia se pautam no guia de brasileiro de boas práticas com animais de experimentação do conselho federal de medicina veterinária e da resolução 1.000 de 11 de maio de 2012. Sendo acompanhada por profissionais técnicos capacitados em centro de referências em biotério, supervisionados por veterinários. Dose de Ketamina e xilazina, 3 x mais, intra-peritoneal.

Pertinência e valor científico do estudo proposto: Este projeto de pesquisa tem como linha a Atividade Física e Saúde, em uma perspectiva de avaliação e intervenção terapêutica da fisiopatologia em artrite, através de modelo experimental de processo inflamatório, o qual já desenvolvemos ⁴⁰ e que tem tido atenção em pesquisas. Na atualidade participo de grupo de pesquisa com publicações relacionadas ao efeito anti-inflamatório do laser de baixa potencia e artrite aguda induzida por zimosan, no Jornal Oficial da sociedade Americana de Photobiologia e equipe

multidisciplinar com foco na transferência de conhecimentos e maior entendimento da associação entre treinamento físico e alterações biomoleculares e sistêmicas em artrite, propõe-se assim somar a pesquisa básica e produção de conhecimento.

Data de início: 06/2015

Data de término: 12/2016

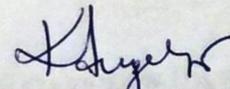
Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

- Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.**
- Com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
- Não-Aprovado

Comentários:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 14 de abril de 2015



Prof. Dra. Kátia De Angelis

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho