

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**Efeito da Fotobiomodulação Combinado com Treinamento
Aeróbico em Monoartrite: Avaliação Hemodinâmica e
Autônômica**

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

STRICTU SENSU EM MEDICINA

**Efeito da Fotobiomodulação Combinado com Treinamento
Aeróbico em Monoartrite: Avaliação Hemodinâmica e
Autonômica**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação Stricto Sensu em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, como cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre.

Aluno:

Luis Fernando Zamuner.

Orientação:

Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes, PhD.

Coorientação:

Prof. Dr. Marcelo de Paula.

São Paulo

2016

São Paulo, 13 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: Luiz Fernando Zamuner

Título da Dissertação: **“Efeito do laser de baixa intensidade combinado com treinamento aeróbico em monoartrite”**

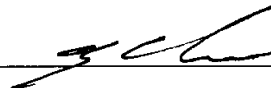
Presidente: Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes



Membro: Profa. Dra. Iris Calado Sanches



Membro: Prof. Dr. Rodrigo Marcos Labat



Estudo desenvolvido nos laboratórios de
Pesquisa e Fisiologia Translacional da
Universidade Nove de Julho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar saúde e determinação para completar meu caminho.

Minha esposa e filhos, que me impulsionam a continuar e passar pelos mais difíceis desafios;

As minhas irmãs, Stella e Silvia, sempre uma inspiração para mim, por sua determinação e excelência em tudo que fazem;

Minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes, por ter me aceito como aluno, pelos ensinamentos e pelo exemplo de competência;

Meu Co-Orientador, Professor Marcelo de Paula, pela amizade, pelos ensinamentos e disponibilidade de tempo e paciência, que nunca faltaram para comigo;

Todos os professores que contribuíram de alguma forma para que eu pudesse concluir mais essa etapa;

Todos os técnicos dos laboratórios, que ajudaram com experimentos e análises;

Aos alunos do programa de Mestrado e Doutorado, companheiros de estudos e pesquisas. Muitos amigos conquistei aqui.

INDICE

Lista de Abreviaturas e símbolos.....	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	01
1.1. Artrite Reumatóide	02
1.2. Monoartrite.....	03
1.3. Processo Inflamatório e o Sistema Nervoso Autônomo.....	04
1.4. Treinamento Aeróbico	06
1.5 Treinamento Aeróbico e Monoartrite.....	07
1.6. Laser de Baixa Intensidade	08
1.7 Laser de Baixa Intensidade e Monoartrite.....	11
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Animais	14
3.2. Delineamento Experimental	15
3.3. Adaptação ao Equipamento Esteira	16
3.4. Indução a Monoartrite.....	17
3.5. Terapia Laser de Baixa Intensidade	18

3.6. Re-adaptação a Mobilidade	19
3.7. Teste de Esforço Máximo	19
3.8. Treinamento Aeróbico	21
3.9. Ganho de Peso dos Animais	21
3.10. Avaliação Hemodinâmica e Autonômica.....	22
3.11. Avaliação do Influxo Leucocitario.....	24
3.12. Análises Histológicas.....	25
3.13. Procedimentos para Eutanásia	26
3.14. Estatística	26
4. Resultados	27
5. Discussão.....	47
Conclusões	54
Referências	55
Anexos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACSM	American College of Sports Medicine
AF	Banda de Alta frequência
ANOVA	Análise de variância
AR	Artrite Reumatóide
ATP	Adenosine trifosfato
BF	Banda de Baixa frequência
C	Controle
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Cm	Centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de experimentação Animal
Co ²	Dióxido de carbono
DCV	Doença Cardiovascular
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
FC	Frequência Cardíaca
HeNe	Helio Neônio
HE	Hematoxilina e Eosina
Hz	Hertz
IP	Intervalo de Pulso
i.p.	Intraperitoneal
J	Joule
Km/h	Quilômetros por hora
Kg	Quilograma
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LBI	Laser de baixa Intensidade
M	Média
MO	Monoartrite

MT	Monoartrite + Treinamento aeróbico
ML	Monoartrite + Laser de baixa intensidade
MTL	Monoartrite + Treinamento aeróbico + Laser de baixa intensidade
Mg	Miligrama
mmHg	Milímetro de mercurio
Mn	Morfonucleadas
MPA	Média da Pressão Arterial
Mw	Mili watts
Nm	Nanômetro
NO	Oxido nítrico
OA	Osteoartrite
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema nervoso Central
SNAPS	Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
TEM	Teste de Esforço Máximo
USA	United State of America
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VO ₂	Volume de Oxigênio
VPAS	Variabilidade da Pressão Arterial Sistólica
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inflamação mediada por citocquinas; degrada os tecidos adjacentes a luz articular, que consistem sinóvia, músculo, tendões, ligamentos, tecido adiposo e osso subcondral, consequentemente a OA.

Figura 2. Modelo de pirâmide que reflete a interação entre sistema nervoso, sistema imune e doenças cardiovasculares.

Figura 3. Benefícios do exercício físico para o corpo humano.

Figura 4. Esquema da ação do LBI na permeabilidade da membrana celular (*cell membrane*) com ação na cadeia respiratória (*respiratory chain*) da mitocôndria (*mitochondrial*), em específico no citocromo C oxidase (*cyt c oxidase*) e liberação de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização no núcleo celular. Sinalização redox (*redox sinaling*). Transcrição (*transcription*). Núcleo (*nucleus*). Quantum de energia ($h\nu$, 600~900nm).

Figura 5. Cronograma experimental. Teste de Esforço máximo (TEM), Off (Período de descanso), # (LBI). Números arábicos (semanas transcorridas).

Figura 6. Animais em adaptação ao equipamento esteira.

Figura 7. Procedimento para aplicação de zymosan e ou salina.

Figura 8. Equipamento laser.

Figura 9. Correlação entre o consumo máximo de oxigênio (VO₂) e a velocidade atingida no teste de esforço de ratos.

Figura 10. Esquema do local de canulação da artéria carótida

Figura 11. Sistema de registro de pressão arterial. Imagem mostrando conexão entre a cânula exteriorizada no dorso do rato WISTAR e o transdutor de pressão arterial; bem como tacograma da VFC (canto inferior direito).

Figura 12. Efeito do LBI e TA no teste de esforço máximo TEM nos ratos do experimento.

Figura 13. Efeito do LBI e TA no ganho de peso dos ratos do experimento.

Figura 14. Efeito do LBI e TA na média da frequência cardíaca dos ratos do experimento.

Figura 15. Efeito do LBI e TA na média da pressão arterial dos ratos do experimento.

Figura 16. Efeito do LBI e TA na média da pressão arterial sistólica e diastólica dos ratos do experimento.

- Figura 17.** Efeito do LBI e TA do IP dos ratos do experimento.
- Figura 18.** Efeito do LBI e TA na VAR IP dos ratos do experimento.
- Figura 19.** Efeito do LBI e TA na BF% dos ratos do experimento.
- Figura 20.** Efeito do LBI e TA na AF% dos ratos do experimento.
- Figura 21.** Efeito do LBI e TA na BF/AF dos ratos do experimento.
- Figura 22.** Efeito do LBI e TA na VAR PAS dos ratos do experimento.
- Figura 23.** Efeito do LBI e TA na BF PAS dos ratos do experimento.
- Figura 24.** Efeito do LBI e TA no Índice ALFA dos ratos do experimento.
- Figura 25.** Efeito do LBI e TA na redução do influxo de leucócitos totais para a cavidade articular dos ratos do experimento.
- Figura 26.** Efeito do LBI e TA na redução do influxo de leucócitos Mononucleares e Polimorfonucleares para cavidade articular de ratos do experimento.
- Figura 27.** Sessões de membrana sinovial coradas com HE.
- Figura 28.** Sessões de membrana sinovial coradas com *Pricosirius red*, analisadas sob luz polarizada e quantificadas.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros dosimétricos terapêuticos do LBI empregado.
- Tabela 2.** Procedimentos do teste de esforço máximo.
- Tabela 3.** Parâmetros autonômicos dos grupos do experimento.

RESUMO

Efeito da Fotobiomodulação Combinado com Treinamento Aeróbico em Monoartrite:
Avaliação Hemodinâmica e Autonômica

A artrite é uma doença autoimune e degenerativa, causada por inflamação da capsula articular. Esta patologia está associada a lesões musculoesqueléticas, fatores genéticos, obesidade e estresse mecânico, representando um grande problema de Saúde Pública em todo o mundo. Este estudo tem como objetivo analisar o efeito de terapias não invasivas, como o laser de baixa intensidade juntamente com treinamento aeróbico, em modelo experimental de indução de artrite no joelho direito de ratos Wistar machos. Foram empregados animais de forma randômica, com peso entre 235 a 285g e habilidade ao treinamento aeróbico em esteira, divididos em cinco grupos, a saber: quatro grupos com injeção intra-articular de 1 mg de zymosan no joelho direito e um grupo com injeção salina no joelho direito, sendo controle (C); monoartrite (MO); monoartrite + laser de baixa intensidade (ML); monoartrite + treinamento aeróbico (MT); e monoartrite + laser de baixa intensidade + treinamento aeróbico (MTL). Foi utilizado o laser de baixa intensidade no comprimento de onda 660 nm; potência de 5mW; densidade de energia de 2,5 J/cm², tempo de irradiação de 20s, e área de 0,04 cm². O treinamento aeróbico foi de intensidade moderada realizado em esteira (Imbramed). Após 48 horas da última sessão do tratamento foi obtido os dados hemodinâmicos e autonômicos, a contagem celular e avaliações histológicas do joelho, a capacidade funcional e ganho de peso dos ratos. Os resultados mostraram que os animais treinados tiveram uma elevação menor do peso, bem como uma melhora na capacidade funcional em comparação aos grupos sedentários. Também foi observada diminuição significativa nos leucócitos mononucleares e polimorfonucleares nos grupos ML, MT e MTL em comparação ao grupo MO. A média da frequência cardíaca também teve diminuição nos grupos MT e MTL em relação a MO. Foi verificada melhora no sistema autonômico dos grupos MT e MTL em relação ao grupo MO, quando analisado o IP, VAR IP, AF% e índice ALFA. Também foi observada diminuição na VAR PAS, BF PAS e BF%, o que indica menor atividade simpática para esses grupos. Na razão BF/AF somente o grupo MTL teve redução significativa. Como conclusão do estudo, a terapia de LBI combinada com o TA se mostra eficiente no tratamento da monoartrite, diminuindo o comprometimento sistêmico e local da doença.

Palavras chave: Monoartrite, laser de baixa intensidade e treinamento aeróbico.

ABSTRACT

Effect of photobiomodulation combined with aerobic training on monoarthritis:
Hemodynamic and Autonomic Assessment

Arthritis is an autoimmune degenerative disease, caused by inflammation of the articular capsule. It is associated with muscle skeletal injuries, genetic factors, obesity and mechanical stress and represents a major public health problem worldwide. This study aims to analyze the effect of non-invasive therapies, such as low level laser therapy (LLLT) along with aerobic training, in an experimental model of induction of arthritis in the right knee of male Wistar rats. Randomly weighed animals weighing between 235 and 285g and ability to aerobic training on treadmill were divided into five groups: four groups with intra-articular injection of 1 mg zymosan in the right knee and one group with saline injection In the right knee, being control (C); Monoarthritis (MO); Monoarthritis + low intensity laser (ML); Monoarthritis + aerobic training (MT); And monoarthritis + low intensity laser + aerobic training (MTL). It was using the low intensity laser at wavelength of 660 nm; Power of 5mW; Energy density of 2.5 J / cm², irradiation time of 20s, and area of 0.04 cm². The aerobic training was of moderate intensity performed on a treadmill (Imbramed). After 48 hours of the last treatment session, the hemodynamic and autonomic data, the cell count and histological evaluations of the knee, the functional capacity and the weight gain of the rats were obtained. The results showed that trained animals had a lower weight gain as well as an improvement in functional capacity compared to sedentary groups. Significant decrease in mononuclear and polymorphonuclear leukocytes in the ML, MT and MTL groups was also observed in comparison to the MO group. Mean heart rate also decreased in MT and MTL groups in relation to OM. Improvement in the autonomic system of the MT and MTL groups was verified in relation to the MO group, when IP, VAR IP, AF% and ALFA index were analyzed. There was also a decrease in VAR PAS, BF PAS and BF%, which indicates less sympathetic activity for these groups. In the BF / AF ratio only the MTL group had a significant reduction. As the study conclusion, the Laser therapy combined with TA, is effective in the treatment of monoarthritis,, decreasing systemic and local disease involvement.

Keywords: Monoarthritis, low level laser therapy (LLLT) and aerobic training.

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune progressiva crônica, sistêmica e inflamatória com o envolvimento das articulações periféricas [1], comprometendo a função da mesma e se tornando um grande problema de ordem mundial, afetando 1% da população. Estudos e pesquisas por meio do uso de terapias não invasivas, a fim de minimizar efeitos colaterais, são de suma importância para a melhoria de qualidade de vida dessa parcela da população.

No que concerne a ação terapêutica do tratamento da AR, o laser de baixa intensidade (LBI), sugere ações anti-inflamatórias e condroprotetoras [2], além de não ser invasivo. Ainda, foi demonstrado que a irradiação do laser de baixa intensidade (LBI) estimula a proliferação de células satélites musculares, a angiogênese e expressão de fatores de crescimento, desempenhando assim uma função relevante na regeneração muscular [3].

Pesquisas com LBI também mostram atenuação à dor crônica em articulação comprometida a partir de inflamação [4] através de analgesia, aumento da microcirculação [5], regeneração de colágeno, proliferação de fibroblastos [6], de células osteoprogenitoras, osteoblastos e regeneração óssea [7]. O treinamento aeróbico também pode ser utilizado como terapia não invasiva. Sua prática pode otimizar a lubrificação articular, manter bom nível de força muscular, diminuir a dor e a resistência articular, além de melhorar a amplitude de movimento articular [8]. Há evidências que contribui ao remodelamento cartilaginoso, entretanto a atenção com a intensidade é fator essencial para a prevenção e ou promoção da artrite [9,10]. Dessa maneira, estudos estão sendo desenvolvidos com o uso dessas terapias, a fim de diminuir o uso de fármacos e assim minimizar os efeitos colaterais que estes possam trazer.

1.1 ARTRITE REUMATÓIDE

Artrite Reumatóide (AR) é uma doença invariavelmente debilitante, a qual pode levar uma articulação a se deformar, e assim, comprometer esse sistema articular. Pode se manifestar de várias formas, mas inicialmente acomete as articulações de maneira simétrica vindo posteriormente a comprometer outras estruturas orgânicas, como coração, pulmão, rim e pele [11]. Devido a sua incapacitação progressiva, tarefas diárias consideradas simples, como levantar-se da cama ou vestir-se, podem se tornar difíceis acarretando dependência funcional de seus pacientes e, conseqüentemente, maiores gastos tanto para o próprio indivíduo acometido pela doença quanto para a sociedade [12]. O diagnóstico precoce e o tratamento da doença no seu início são muito importantes para que as limitações motoras do paciente sejam minimizadas.

A membrana sinovial envolve as principais articulações do corpo humano, e sua função é a de lubrificar essas articulações através do líquido sinovial, permitindo o movimento normal de articulações. Na AR, é comum o líquido apresentar características inflamatórias (tais como maior quantidade de infiltrado inflamatório) causando dano progressivamente das cartilagens, as quais revestem as articulações, prejudicando a função articular, limitando os movimentos e incorrendo em problemas algicos [13], vide Fig 1.

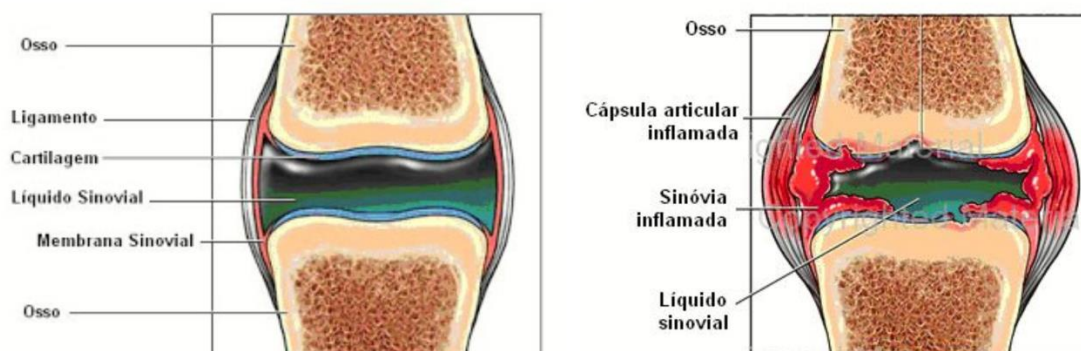


Figura 1. Inflamação mediada por citocinas; degrada os tecidos adjacentes à luz articular, que consistem em sinóvia, músculo, tendões, ligamentos, tecido adiposo e osso subcondral, Consequentemente a OA. Extraído de Fisiopatología I Artritis Séptica y Sinovitis, Sonia Torres Salinas, 2016.

A expectativa e qualidade de vida da população, que sofre de AR são dependentes de fatores genéticos e epigenéticos. A resposta à este processo será determinado pelo acesso a terapias executadas por equipes multiprofissionais, sendo prevalentes três vezes mais observadas nas mulheres do que no homem, outro sim de 30 a 50 % das mortes em enfermos com AR são decorrentes de doenças cardiovasculares (DCV). Evidências demonstram que os mecanismos patofisiológicos (inflamação local e sistêmica) estão presentes nestas patologias [14].

Em 1945, FLETCHER e LEWIS-FANNIG, encontraram hipertensão arterial sistêmica em 45% de portadores de AR, auxiliando a correlacionar desordens músculo esqueléticas com patologias reumáticas [15] e DCV.

1.2 MONOARTRITE

Toda artrite crônica passou em algum momento por uma fase em que foi aguda. No início, o diagnóstico é mais difícil, mas o conhecimento da evolução é determinante.

[16] Qualquer processo inflamatório agudo que se desenvolva em uma única articulação ao longo de alguns dias é considerada monoartrite aguda (também definida como monoartrite que esteve presente por menos de duas semanas). [17]

De acordo com artigos publicados por especialistas na área, a abordagem inicial para o diagnóstico de monoartrite aguda deve envolver a realização de uma anamnese e um exame físico. [18,19]

Embora um quadro de monoartrite aguda envolva uma variedade de diagnósticos diferenciais, sua manifestação inicial pode estar relacionada a uma doença poliarticular. [18]

Algumas doenças que podem manifestar-se como monoartrite são, a saber:

- Artrite reumatóide
- Artrite viral
- Artrite sarcoidótica
- Artrite reativa
- Artrite psoriásica
- Artrite enteropática

1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO E O SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

Em adição ao impacto na qualidade de vida, a AR está associada com aumento da mortalidade quando comparados a população geral [20,21]. A maior parte tem sido

atribuída à doença cardiovascular (DCV) pelo impacto da inflamação crônica e secundariamente a inatividade física e as drogas utilizadas, em especial os corticosteroides e/ou os antiinflamatórios não esteroides [22].

O sistema nervoso autônomo (SNA) exerce funções reguladoras sobre a resposta inflamatória, tendo papel fundamental na patogênese das doenças cardiovasculares. Informações relativas ao estado inflamatório sistêmico podem ser veiculadas ao sistema nervoso central (SNC), via nervo vago, gerando uma resposta reflexa através do SNA – “o reflexo inflamatório”. [23] A via eferente do SNA por este “reflexo inflamatório” passa pelos seus dois componentes: o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e o sistema nervoso autônomo parassimpático (SNAPS) (Fig. 2).

Ferramentas de observação da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) apontam a capacidade dos sistemas cardiovascular e sistema nervoso autônomo (SNA) em responder a estímulos fisiológicos múltiplos e ambientais como o estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono, ortotatismo, bem como respiração e treinamento físico podem compensar as desordens induzidas por estas patologias [24, 25]

Em linhas gerais a VFC descreve as oscilações das batidas do coração (intervalos RR) no decorrer do tempo, podendo aferir as influências do SNA sobre o nóculo sinusal e sua resposta neuro-cardíaca.

A análise espectral da VFC e da PA nos domínios do tempo e da frequência permitem a caracterização de frequências específicas, como oscilações rítmicas de alta frequência ou banda HF (*high frequency*, 0,15 a 0,4 Hz), correspondendo à modulação respiratória vagal (parassimpática) no coração e oscilações de baixa frequência ou banda LF (*low frequency*, 0,04 a 0,15 Hz) relacionada à modulação simpática cardíaca [26].

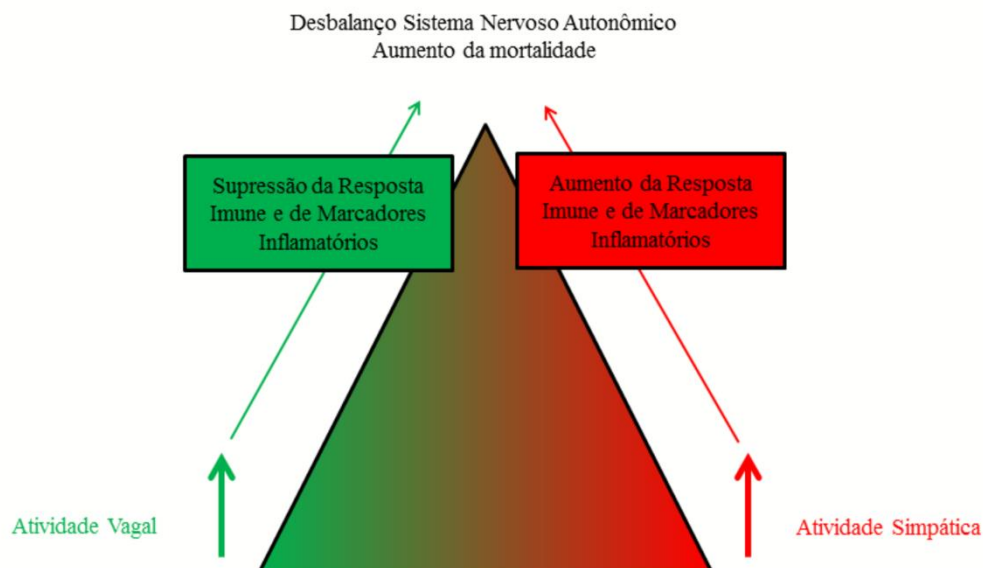


Figura 2. Modelo de pirâmide que reflete a interação entre sistema nervoso, sistema imune e doenças cardiovasculares. Em situações patológicas ocorre o aumento da atividade do sistema nervoso simpático induzindo exacerbação das respostas inflamatórias, enquanto a ação preponderante do parassimpático seria capaz de suprimir essa resposta. Modificada de Abboud, 1982.

1.4 TREINAMENTO AERÓBICO

Os efeitos agudos e crônicos do exercício físico sobre o funcionamento do corpo humano têm sido alvo de inúmeras pesquisas nas últimas décadas [27]. Com base em estudos com animais, com humanos saudáveis e em uma variedade de patologias, afigura-se que o exercício atua em várias áreas de modulação da dor e, portanto, pode influenciar vários mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Por exemplo, sabe-se que o exercício aeróbico eleva os níveis periféricos de beta-endorfinas [28], influencia o sistema serotoninérgico, aumenta a atividade simpática, melhora o sono e promove um sentimento de bem-estar sócio-psicológico [29]. A importância em determinar com precisão a intensidade de exercício não está resumida apenas a trabalhos nos quais seres humanos são objetos de estudo. Uma ferramenta que tem mostrado ser interessante para

a observação do organismo frente ao esforço é a utilização de modelos experimentais com animais, elaborados para simular situações, fisiopatológicas ou relacionadas ao treinamento, ocorridas com humanos, e solucionar os eventuais problemas decorrentes das alterações observadas [30]. A esteira rolante é um ergômetro bastante utilizado para o treinamento de ratos e, sendo assim, também é de extrema relevância a detecção da intensidade de esforço em exercício de corrida. Uma atividade física aeróbica deve apresentar um esforço de longa duração e com intensidade moderada [31].

1.5 TREINAMENTO AERÓBICO E MONOARTRITE

O treinamento aeróbico pode ser utilizado como terapia não invasiva no tratamento da monoartrite, já que este pode modular a atuação das células do sistema imunológico de forma dependente do planejamento do exercício [32]. Assim, quando o volume e a intensidade do treinamento forem estabelecidos corretamente e o exercício considerado moderado, há incremento dos mecanismos de defesa do organismo. Por outro lado, exercícios intensos e prolongados estão associados a diminuição das respostas imunológicas e alterações na atuação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos [33].

O treinamento aeróbico contribui para a redução da rigidez articular, dor e peso corporal. Aumenta a força muscular, flexibilidade e melhora a resposta cardíaca (Fig. 3).



Figura 3. Benefícios do exercício físico para o corpo humano. Extraído de CESAR SANTOS, 2012.

As recomendações ao tratamento de pacientes acometidos de inflamação articular incluem terapias multimodais, indicando combinação de ações terapêuticas aliadas à educação dos pacientes, treinamento físico, dieta e estilo de vida saudável [34,35]. Neste sentido, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC- USA) e o *American College of Sports Medicine* (ACSM), tem associado à diminuição da dor, habilidade funcional e ao tratamento de inflamação articular a prática regular de treinamento físico com intensidade moderada de esforço percebida e ou monitorada em unidades metabólicas [36].

1.6 LASER DE BAIXA INTENSIDADE

A sigla **LASER** tem sua origem na língua inglesa, que significa “**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation”. O uso do laser como

instrumento terapêutico tem sido acompanhado na área da medicina desde o início da década de 60, através de publicações do prof. Leon Goldman. Poucos anos antes Theodore Maiman desenvolveu o primeiro laser de rubi no laboratório da A&T. Já o uso do laser de baixa intensidade em pacientes, pelo médico húngaro professor Endre Mester, desde o fim dos anos 60. Um dos primeiros experimentos publicados sobre os efeitos do laser de baixa intensidade data de 1969, através da irradiação de laser de HeNe (Hélio-Neônio), sobre feridas de ratos durante 14 dias consecutivos [37].

As propriedades terapêuticas dos lasers vêm sendo estudadas desde a sua criação, sendo a sua ação analgésica observada, particularmente, sobre as formas da dor crônica de diversas etiopatogenias, desde os receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso central. [38]

A terapia a laser, quando utilizada nos tecidos e nas células, não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas em efeitos fotofísicos, fotoquímicos e/ou fotobiológicos. [38,39]

Os efeitos do laser de baixa intensidade podem ser observados no comportamento dos linfócitos incrementando sua proliferação e ativação; sobre os macrófagos, aumentando a fagocitose; elevando a secreção de fatores de crescimento de fibroblasto e intensificando a reabsorção tanto de fibrina quanto de colágeno. Além disso, contribuem para elevar a motilidade de células epiteliais, a quantidade de tecido de granulação e, podem reduzir a síntese de mediadores inflamatórios [40,41].

Em nível vascular, o laser de baixa potência estimula a proliferação das células endoteliais, resultando na formação de numerosos vasos sanguíneos, na produção aumentada do tecido de granulação, estimulando o relaxamento da musculatura vascular lisa e contribuindo, assim, para os efeitos analgésicos da terapia a laser. [42]

Sabe-se, no entanto, que o sucesso da terapia com LBI e seus respectivos efeitos denota ser dependente do comprimento de onda, potência, dose e tempo aplicados [43]. A aplicação em baixa potência (1 a 500 mW), comprimento de onda 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 alívio a dor, através dos mecanismos fotofísicoquímicos, sem apresentar efeitos térmicos [44].

A literatura, sobre um dos mecanismo de ação do LBI a nível celular, menciona que o citocromo C oxidase é o fotoacceptor principal com resposta a nível biológico, devido a grande afinidade a luz monocromática no vermelho, como é observado na Fig. 4 [45].

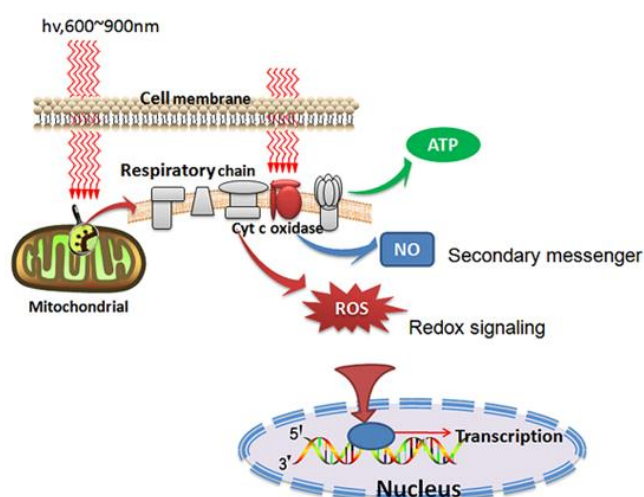


Figura 4. Esquema da ação do LBI na permeabilidade da membrana celular (*cell membrane*) com ação na cadeia respiratória (*respiratory chain*) da mitocôndria (*mitochondrial*), em específico no citocromo C oxidase (*cyt c oxidase*) e liberação de adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e sinalização no núcleo celular. Sinalização redox (*redox sinaling*). Transcrição (*transcription*). Núcleo (*nucleus*). *Quantum de energia* ($h\nu, 600\sim 900\text{nm}$), extraído de YNG-YNG HUANG, 2011.

1.7 LASER DE BAIXA INTENSIDADE E MONOARTRITE

Muitos tratamentos são utilizados na dor associada à artrite. Drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs), drogas anti-reumatóides entre outros, revelam efeitos adversos, quando usadas por períodos prolongados em vários pacientes. [46, 47]

Estudos demonstraram uma resposta do LBI no caso da monoartrite experimental que foi capaz de inibir a formação do edema e analgesia [48]. A irradiação com LBI produz ainda efeitos indiretos, como o estímulo à microcirculação, que beneficia a troficidade local pelo aumento do aporte de oxigênio e eliminação dos catabólitos, favorece também a ação anti-inflamatória. [49]

Entre os efeitos bioestimulantes mediados pelo laser de baixa potência no processo de reparo tecidual, destacam-se: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos; o incentivo à produção de colágeno por estas últimas células; a inibição secretória de alguns mediadores químicos (citocinas); a modificação da densidade capilar e o estímulo à angiogenese local. [50,51]

O laser de baixa intensidade incrementa a atividade quimiotática e fagocitária dos leucócitos humanos *in vitro*. No processo de reparo das feridas, a ativação dos linfócitos pela radiação laser pode torná-los mais responsivos aos mediadores presentes nos tecidos injuriados. [42]

A maturação dos fibroblastos e a sua locomoção através da matriz também são influenciadas pelo referido laser. [42] Diversos tipos de lasers afetam a proliferação fibroblástica, bem como a síntese de pro colágeno e colágeno *in vitro*. A maioria dos resultados positivos é encontrada com o uso do laser de baixa intensidade de He-Ne [51] e atualmente o emprego do laser de Diodo.

Um estudo *in vivo*, usando modelo de artrite em ratos, mostrou que usando a radiação de 810 nm reduziu o níveis de PGE2 e, por conseguinte o edema local [49].

Ademais, foi demonstrado que a LBI diminui os níveis de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β em inflamação aguda. [52]

Os principais efeitos obtidos com terapia de LBI em doenças reumatologias são:

Efeito Anti-edematoso: Reduziu rapidamente o inchaço melhorando a mobilidade [53].

Efeito Antiinflamatório: Diminui o influxo de células provenientes do sistema imunológico (leucócitos, macrófagos e linfócitos).

Efeito Cicatrizante: Aumenta a produção de fibroblastos e fibras de colágeno, acelerando, assim a cicatrização.

Efeito Analgésico: Reduz a dor, estimulando a produção de endorfinas e serotoninas, que atuam como inibidores da sensação dolorosa, atuando também sobre as fibras nervosas grossas (táteis), que estimuladas pelo raio laser provocam um bloqueio das fibras finas (dolorosas).

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados na área de inflamação, os mecanismos de ação do LBI nos diversos tecidos e nas diversas patologias, bem como na inflamação articular, ainda não estão totalmente esclarecidos [54], justificando estudos adicionais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender e avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade combinado com treinamento aeróbico em monoartrite experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Específicos:

1) Estudar o efeito do laser de baixa intensidade combinado com treinamento aeróbico, na ação sistêmica, após a indução da artrite de joelho, no que se refere:

- A capacidade funcional;
- Alteração de peso corporal;
- A Variabilidade da Frequência Cardíaca;
- Efeitos Hemodinâmicos;
- Efeitos Autonômicos.

2) Estudar o efeito do laser de baixa intensidade combinado com treinamento aeróbico, na ação local, após indução da artrite de joelho, no que se refere:

- A degradação da cavidade articular;
- Ao recrutamento Leucocitário;
- Avaliação histológica da articulação do joelho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos machos Wistar (n=38; 235 – 285g), alocados em caixas plásticas padrão (370×260×170 mm) com quatro ratos em cada, com alimento e água *ad libitum*, alojados em biotério, com controle de temperatura (26° C) e ciclos de 12 horas alternados entre claro e escuro.

Os ratos foram randomizados em cinco grupos denominados:

- Controle (C) (n=6);
- Monoartrite (MO) (n=8);
- Monoartrite e laser de baixa intensidade (ML) (n=8);
- Monoartrite e treinamento aeróbico (MT) (n=8);
- Monoartrite, treinamento aeróbico e laser de baixa intensidade (MTL) (n=8).

O experimento seguiu as diretrizes e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) [55] e aprovado pelo comitê de bioética da Universidade Nove de Julho, protocolo nº AN009/2014.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os grupos do modelo experimental seguiram o cronograma abaixo, consideramos o tempo de treinamento físico na esteira com duração de 10 semanas (Fig. 5).

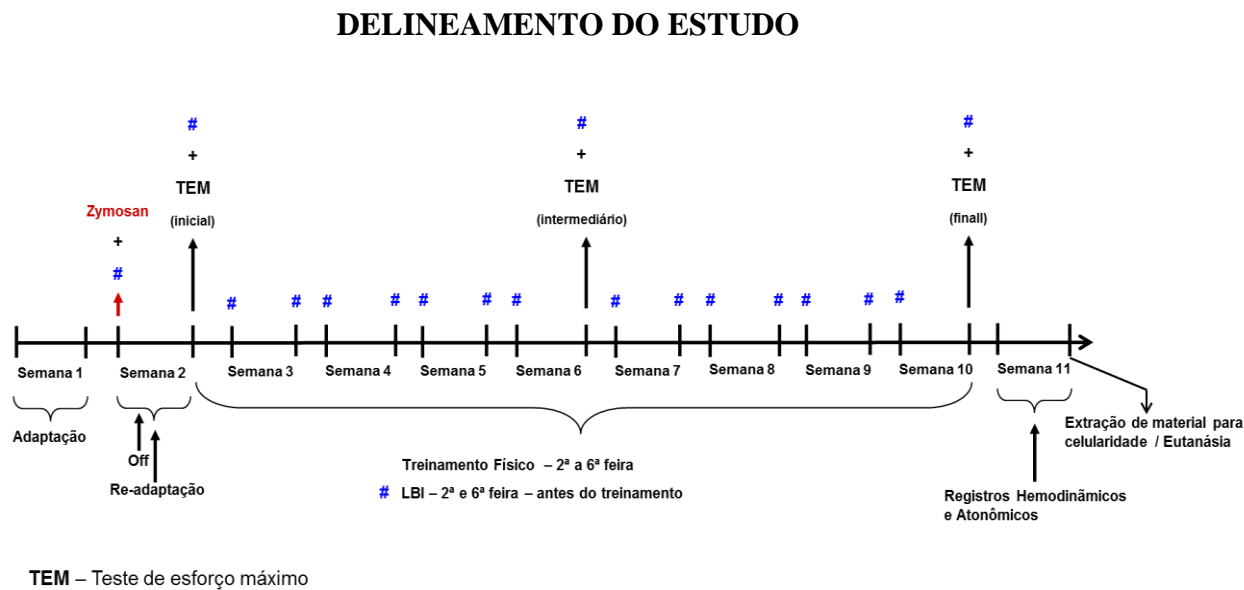


Figura 5. Cronograma experimental: **TEM** (Teste de Esforço Máximo), **Off** (descanso), **LBI**

(Laser Baixa Intensidade).

3.3 ADAPTAÇÃO AO EQUIPAMENTO ESTEIRA

Seguindo os critérios de inclusão peso, gênero, raça e habilidades para correr na esteira os ratos seguiram ao teste e adaptação de 5 dias ao equipamento sendo velocidade 0,3 km/h, duração de 10 minutos. Neste período buscou-se não interferir na deambulação dos ratos os quais tiveram 100% de inclusão (Fig. 6).

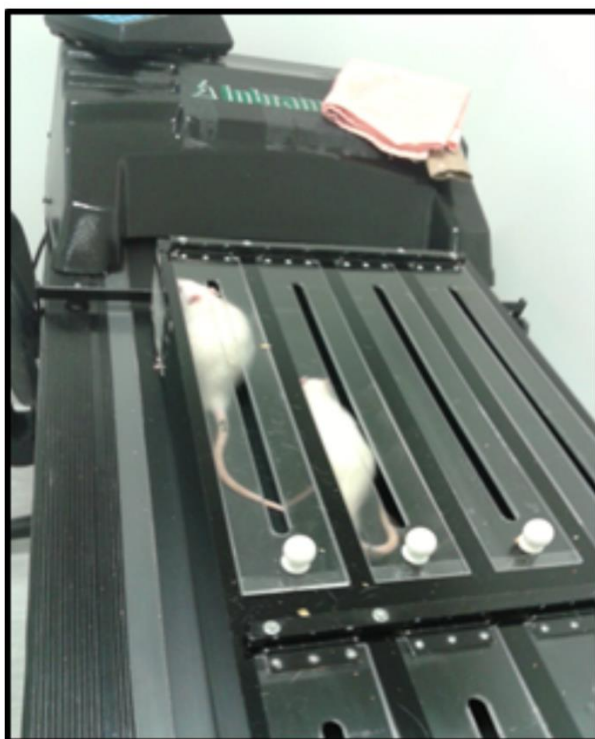


Figura 6. Animais em adaptação ao equipamento esteira. (Foto: Aline da Silva)

3.4 INDUÇÃO A MONOARTRITE

O procedimento de indução ocorreu após 5 dias de adaptação em esteira (10 min/dia a 0,3 km/h). Os ratos receberam anestesia via intramuscular com ketamima 80 mg/kg (Hospira. Lake Forest, IL, USA) e xilazina 20 mg/kg (Lloid, Ic, Sherondoa, IA, USA). Após a anestesia, os ratos receberam injeção (agulha calibre 30 e seringa de 1 ml) intra-articular de 1 mg de Zymosan (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolvida em 50 µl de solução salina estéril no joelho direito. Os ratos para controle receberam injeção de solução salina estéril [48].

O joelho do rato recebeu tricotomia e foi posicionado a 90°, a agulha foi colocada sob o tendão patelar perpendicular ao aplicador com o bisel voltado a frente, pressionando-se até transpassar o tendão e injetou-se a mistura zymosan-salina ou salina no espaço virtual intra-articular fêmur tibial (Fig. 7).



Figura 7. Procedimento para aplicação de zymosan e ou salina. (Foto: Luis Fernando Zamuner)

3.5 TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE

O protocolo terapêutico LBI com semicondutor InGaAIP, TWIN-Laser (MM Optics) (Fig. 6) foi utilizado com os seguintes parâmetros (Tab.1).

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos terapêuticos do LBI empregado.

Meio Ativo	InGaAIP
λ (nm)	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 seg

Para a aplicação do laser, os ratos foram imobilizados manualmente em decúbito ventral e o feixe do laser foi aplicado perpendicularmente (90°) de forma pontual e anteromedial na articulação do joelho, com contato com a pele do joelho do animal. O grupo controle passou pelo mesmo procedimento, porém com o aparelho de laser desligado (*off*). A periodicidade da aplicação do laser foi imediatamente após a indução da artrite e duas vezes por semana, sempre antes da sessão de treinamento físico, no início e fim de cada semana [4]. A mensuração da potência ótica do laser ocorreu

usando-se um calibrador multifuncional (modelo 1835 C, Newport Corporation, Irvine, CA).



Figura 8. Equipamento laser.

3.6 RE-ADAPTAÇÃO À MOBILIDADE

Para retomo a condição de treinamento físico, 48 horas após a indução de artrite, todos os ratos passaram por nova adaptação a mobilidade com duração de 2 dias (10 min/dia a 0,3 km/h).

3.7 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO

Após a re-adaptação, os ratos foram submetidos ao Teste de Esforço Máximo (TEM) inicial em esteira com protocolo de incremento em cargas de velocidade (0,3 km/h a cada 3 min), identificado na Tab. 2, seguindo etapas crescentes até que fosse

atingida a velocidade máxima suportada pelo rato. O critério para finalização do teste foi o momento em que o rato interrompeu a deambulação. Referenda-se este teste com a correlação da velocidade atingida pelo rato durante o teste e a medida direta do consumo máximo de oxigênio em ratos (Fig. 8) [56, 57].

Tabela 2. Procedimentos do teste de esforço máximo.

Variável	Velocidade	Tempo
Teste De Esforço Máximo	0,3 km/h	3 minutos
	0,6 km/h	3 minutos
	0,9 km/h	3 minutos
Limiar de Esforço		
Prescrição treinamento		

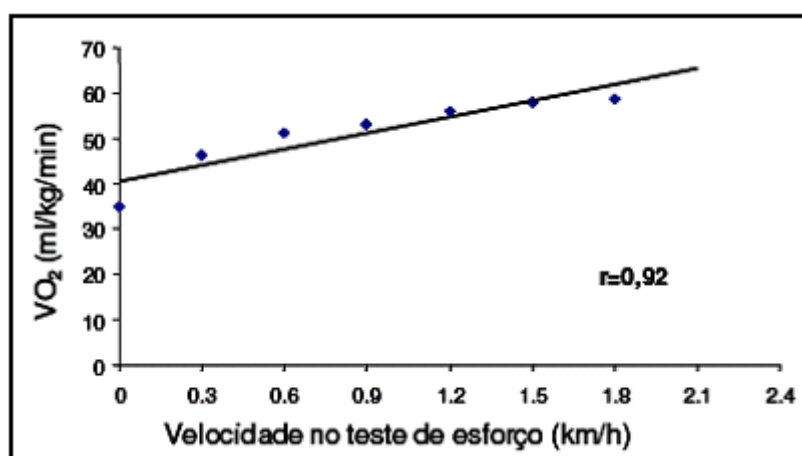


Figura 9. Correlação entre o consumo máximo de oxigênio (VO₂) e a velocidade atingida no teste de esforço de ratos. Erro padrão estimado (r). Extraído de BRUNO RODRIGUES, 2007.

3.8 TREINAMENTO AERÓBICO

O treinamento físico aeróbico com intensidade moderada [58] foi realizado usando equipamento esteira (Imbramed). O cronograma de treinamento foi feito respeitando os princípios da periodização do treinamento físico, onde a intensidade oscilou de 50% a 70% do resultado do teste de esforço máximo, o volume e intensidades progressivos. A continuidade, com 48 sessões de treinamento físico configurando 5 dias de estímulo para 2 dias de descanso, foi realizado dentro de um período de 10 semanas. As sessões de treinamento físico aeróbico respeitaram um pré-aquecimento de 5 minutos com intensidade de 40% e volta a calma de 5 minutos com a mesma intensidade. O TEM final no final da 10ª semana, foi realizado para avaliação da capacidade funcional correlacionando com volume máximo de oxigênio (VO_2) descrito em publicação referida acima [56], sendo o VO_2 considerado padrão ouro em avaliação da pesquisa clínica em humanos.

3.9 GANHO DE PESO DOS ANIMAIS

Ao início e ao final do protocolo experimental ocorreu pesagem individual de cada rato da amostra. O resultado do peso inicial subtraído pelo peso final foi considerado alteração de peso ocorrido durante o protocolo.

3.10 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA E AUTONÔMICA

Após 48 horas do TEM final os ratos foram anestesiados (ketamina - xilazina 80:40 mg/kg, I.p.), para procedimentos cirúrgicos com introdução de cateteres de polietileno com ponta de cânulas de Tygon (4 cm de PE-08 ligado a 2cm de PE-50) na artéria carótida comum para medidas diretas da pressão arterial e frequência cardíaca. Após a implantação das cânulas, estas foram transpassadas subcultaneamente e exteriorizadas na região do dorso cervical do rato, fixando-as com fio de algodão. As cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e ocluídas com pinos de aço inoxidável até o registro (Fig. 10) [57].

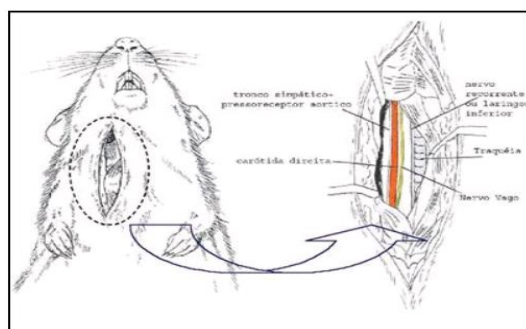


Figura 10. Esquema do local de canulação da artéria carótida. Extraído de IRIS CALLADO SANCHES, 2012.

Os registros hemodinâmicos foram realizados com os ratos conscientes e ativos em ambiente silencioso 24 horas após o implante de cateteres na artéria carótida o qual foi ligada 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), permitindo análises dos pulsos de pressão, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal. Os valores da frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial [57,58].

A partir do registro basal dos ratos, foi possível utilizar a ferramenta de análise tempo-frequência da Variabilidade da Pressão Arterial Sistólica (VPAS) e da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC). Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios da Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC), sendo as suas variabilidades quantificadas pela média dos desvios padrão. A análise no domínio da frequência constituiu da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier. Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas da banda de baixa frequência (BF, 0,20-0,75 Hz). A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, onde a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz (Fig. 10). Além do componente de baixa frequência, outro componente foi obtido na análise espectral: alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz). O componente BF é usado como um índice da atividade simpática. O componente AF é usado como um índice da atividade parassimpática. A relação BF/AF indica o balanço simpato-vagal [57].



Figura 11. Sistema de registro de pressão arterial. Imagem mostrando conexão entre a cânulaxteriorizada no dorso do rato WISTAR e o transdutor de pressão arterial; bem como registro da VFC (canto inferior direito). Extraído e adaptado de SANCHES, 2012.

3.11 AVALIAÇÃO DO INFLUXO LEUCOCITÁRIO

Após 24 horas da avaliação hemodinâmica, os ratos foram anestesiados via intramuscular com ketamima 80 mg/kg (Hospira. Lake Forest, IL, USA) e xilazina 20 mg/kg (Lloid, Ic, Sherondoa, IA, USA) para procedimentos de retirada de lavado articula da articulação do joelho, através de duas injeções totalizando 400 μ L de tampão fosfato-salina, pH 7,2 (PBS) e acondicionadas em gelo para etapas posteriores. A seguir, o lavado articular foi centrifugado a 800 rpm por 6 minutos. Depois disso, o precipitado celular foi ressuspense em 300 μ l de PBS, uma fração de 20 μ l foi utilizada para determinação das células totais em hemocítômetro de Neubauer, em microscópio de luz, após diluição em líquido de Turk (1:20). Uma fração de 280 μ l foi utilizada para contagem diferencial de leucócitos, em lâminas feitas em cito centrífuga FANEM 3400, coradas com Instant-Prov. A contagem foi realizada em microscópio de luz, onde pelo

menos 100 células foram identificadas e classificadas como polimorfonucleares ou mononucleares, com base em critérios de morfologia convencional [59]. Foi utilizado o Microscópio LEICA DMLS (lente 100x / 1.25 em óleo de imersão) e programa LEICA QWIN PLUS V 3.5.1. (Switzerland Ltda), mais Microsoft Excel.

3.12 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Imediatamente após coleta do lavado articular, com os ratos ainda anestesiados ketamina 80 mg/kg (hospira. Lake Forest, IL, USA) e xilazina 20 mg/kg (Lloid, Ic, Sherondoa, IA, USA), realizou-se cirurgia e retirada de sinóvias que foram acondicionadas para fixação em paraformaldeído 10%, para etapas seguintes. Utilizando protocolos 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, substância miscível com o meio de inclusão. A inclusão das amostras macroscópica foram realizadas em paraplast a 58°. Utilizando micrótomo com cortes histológicos de 5 µm foram feitos em quadruplicatas. As laminas foram coradas com hematoxilina e eosina [60], montadas em laminas e analisadas em microscópio de luz. Outras, laminas em duplicatas passaram por novos banhos de álcoois até coloração com *Picrosirius red*, seguindo por xilol e posterior montagem com lamínulas até secagem e análise em microscópio de luz. A coloração por hematoxilina e eosina (HE), foi realizada para analisar as alterações estruturais da membrana sinovial da articulação do joelho, obtendo assim ter dados morfológicos. A coloração por *Picrosirius red* e análise sob luz polarizada foi realizada para avaliar a alteração de colágeno [61]. 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.

3.14 PROCEDIMENTOS PARA EUTÂNASIA

Ao término da retirada de materiais biológicos dos ratos anestesiados (ketamima 80 mg/kg (hospira. Lake Forest, IL, USA) procedemos com a suplementação de duas vezes o volume utilizado para anestesia e posterior colocação dos mesmos na câmara de CO₂. 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.

3.15 ESTATÍSTICA

Dados foram submetidos ao teste de normalidade Komolgorov e Sminorv, seguida de Análise de Variância (ANOVA). Quando a Análise de Variância mostrou significância, aplicou-se o teste de contraste entre médias de Tukey nas comparações múltiplas e teste T em comparações pareadas. Em todos os cálculos fixou-se o nível crítico menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do LBI e TA sobre o Teste de Esforço Máximo (TEM), na Monoartrite Experimental induzida por Zymosan.

Todos os ratos dos grupos experimentais, após adaptados a esteira, realizaram no final da 2ª semana o TEM inicial, no final da 6ª semana o TEM intermediário e no final da 10ª semana do protocolo experimental realizou-se o TEM final. A Figura 12 demonstra que não houve diferença significativa no TEM inicial entre todos os grupos estudados (C= $8,51 \pm 1,2$ min; MO= $9,21 \pm 1,8$ min; ML= $9,45 \pm 2,2$ min; MT= $8,09 \pm 1,6$ e MTL= $8,02 \pm 0,9$ min). O resultado do TEM intermediário mostra que houve melhora significativa dos grupos treinados (MT= $13,41 \pm 2,4$ e MTL= $12,57 \pm 2,2$ min) em relação ao TEM inicial dos mesmos (MT= $8,09 \pm 1,6$ e MTL= $8,02 \pm 0,9$ min). No resultado do TEM final, oito semanas após o TEM inicial, houve aumento da capacidade funcional no grupo ML ($10,27 \pm 0,9$) em comparação aos grupos C ($7,45 \pm 0,8$) e MO ($8,24 \pm 1,4$). Também houve diferença estatística significativa entre TEM final do grupo MT ($15,45 \pm 1,9$ min) e MTL ($17,05 \pm 2,0$ min) comparado ao grupo MO ($8,24 \pm 1,4$ min), $p < 0.001$. O resultado demonstra melhora na capacidade funcional dos grupos que receberam as terapias isoladas, quanto ao serem associadas. Entretanto ocorreu uma melhor eficiência no tempo de permanência do grupo MTL no TEM final. O grupo MO não apresentou evolução significativa de capacidade funcional, no decorrer do tempo.

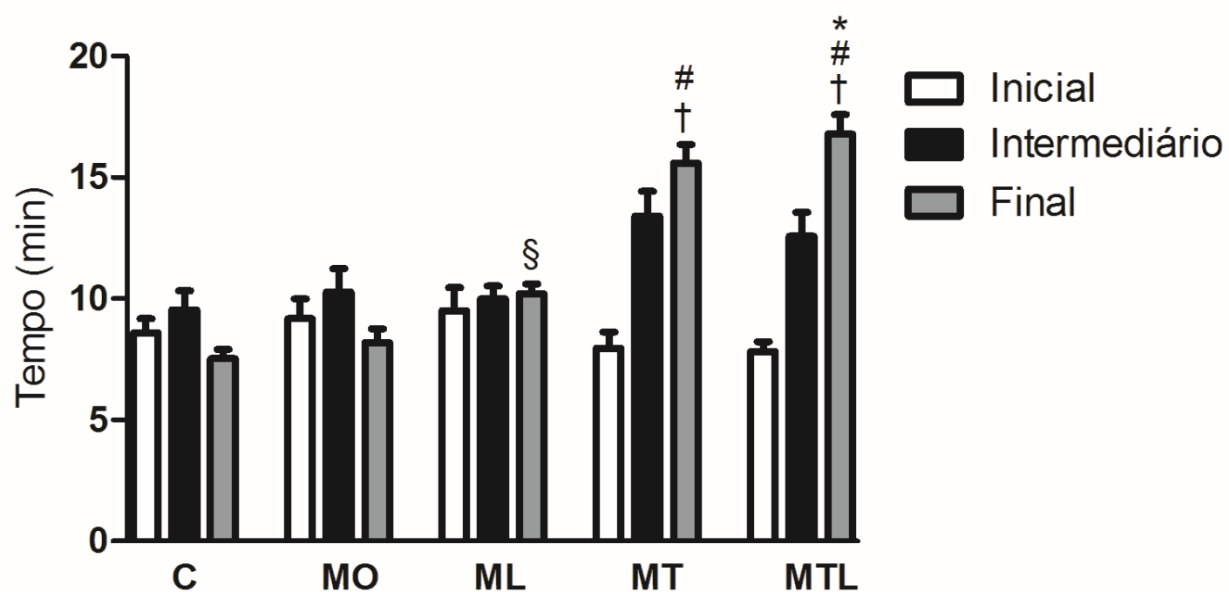


Figura 12. Efeito do LBI e TA no teste de esforço máximo (TEM) em ratos com artrite

C – controle, MO – monoartrite, ML – monoartrite + LBI, MT– monoartrite + TA e MTL – monoartrite + LBI + TA. Os dados representam a média \pm SEM. † $p < 0,05$ vs TEM final C, MO, ML. § $p < 0,05$ vs TEM final C e MO. # $p < 0,05$ vs TEM inicial C, MO, ML, MT, MTL. * $p < 0,05$ vs TEM intermediário MTL. (n=5-6) Tukey.

4.2 Efeito do Protocolo de Tratamento com LBI e TA no Ganho de Peso dos Ratos com Monoartrite.

Quando avaliado o ganho de peso, ao final do protocolo, verificou-se que os ratos que participaram do TA tiveram um menor ganho de peso MT ($160.0\text{g} \pm 14.1\text{g}$) e MTL ($166.7\text{g} \pm 18.8\text{g}$) comparado com aos ratos sedentários C ($227.0\text{g} \pm 5.1\text{g}$) e MO ($261.2\text{g} \pm 5.2\text{g}$), sendo o grupo monoartrite apresentando maior ganho de peso. Os ratos tiveram dieta livre e sem restrições (Fig. 13).

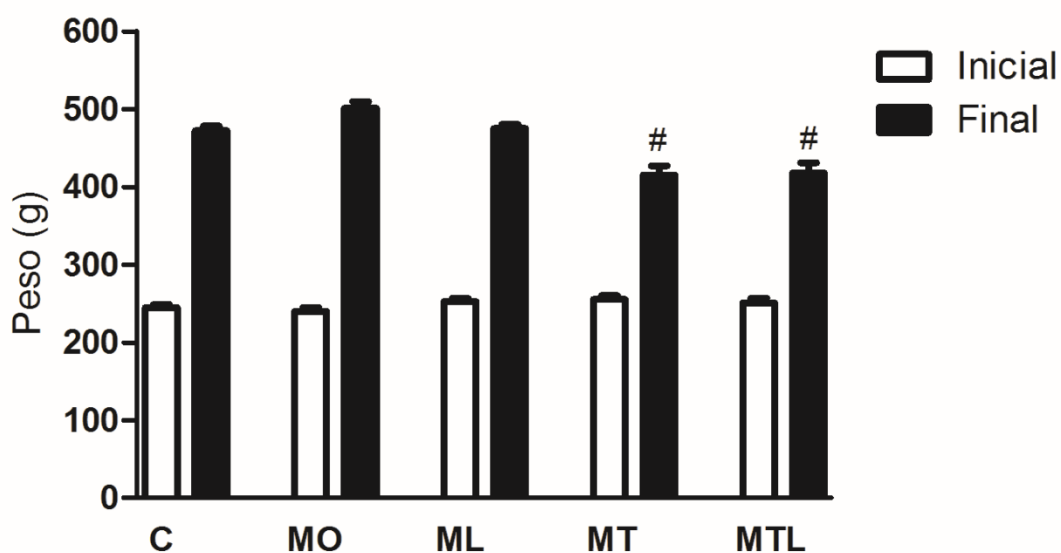


Figura 13. Efeito do LBI e TA no ganho de peso dos ratos do experimento. O peso dos animais foi aferido no início, durante e ao final do protocolo. C – controle, MO – monoartrite, ML – monoartrite + LBI, MT– monoartrite + TA e MTL – monoartrite + LBI + TA. Os dados representam a média \pm E.p.m. de 5-6 animais/grupo. # $p < 0.05$ vs peso final do grupo MO. (Tukey).

4.3 Efeito do Tratamento do LBI e TA sobre a Avaliação Hemodinâmica em Ratos com Monoartrite.

4.3.1 Efeito do Tratamento do LBI e TA na FCM em Ratos do Experimento.

A figura 14 apresenta os resultados referentes à média da frequência cardíaca (FCM). Para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados demonstraram redução na frequência cardíaca dos grupos MT e MTL estatisticamente significante comparado ao grupo MO.

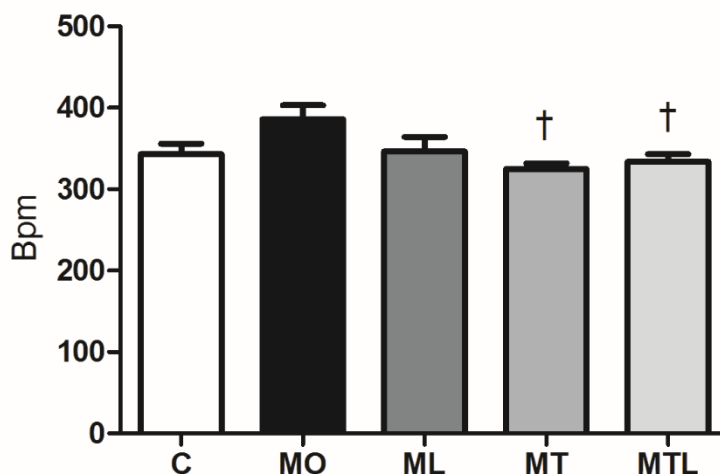


Figura 14. Efeito do LBI e TA na média da frequência cardíaca dos ratos do experimento. Média da Frequência Cardíaca dos grupos estudados, C sedentário e injetado com salina; MO sedentário e com monoartrite induzida; ML com monoartrite induzida e intervenção de LBI; MT com monoartrite induzida e intervenção de TA; MTL com artrite induzida e intervenção de TA e LBI; valores em média \pm SEM. † $p < 0,05$ vs MO. Bpm (batimentos por minuto), (n=5-6) Tukey.

4.3.2 Efeito do Tratamento do LBI e TA na MPA em Ratos do Experimento.

A Figura 15 demonstra os resultados referentes à média da pressão arterial (MPA). Para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

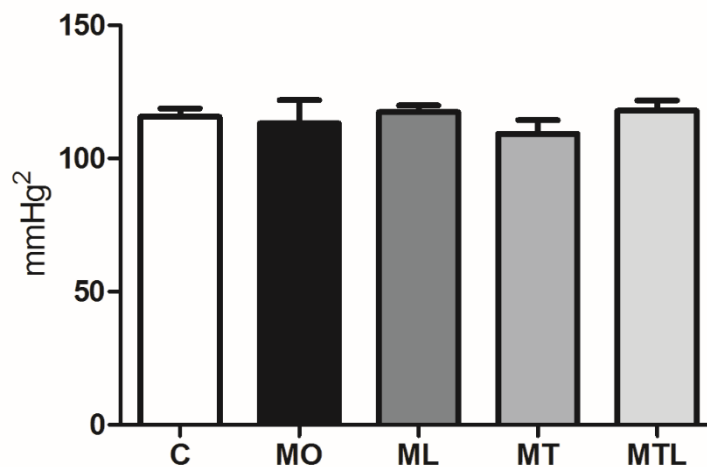


Figura 15. Efeito do LBI e TA na média da pressão arterial dos ratos do experimento. Média da Pressão Arterial dos grupos estudados, C sedentário e injetado com salina; MO sedentário e com monoartrite induzida; ML com monoartrite induzida e intervenção de LBI; MT com monoartrite induzida e intervenção de TA; MTL com artrite induzida e intervenção de TA e LBI, milímetros de mercúrio ao quadrado (HmHg²), (n=5-6).

4.3.3 Efeito do Tratamento do LBI e TA na MPA Sistólica e Diastólica em Ratos do Experimento.

A figura 16 A e B apresentam os resultados referentes à média da pressão arterial sistólica e diastólica. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

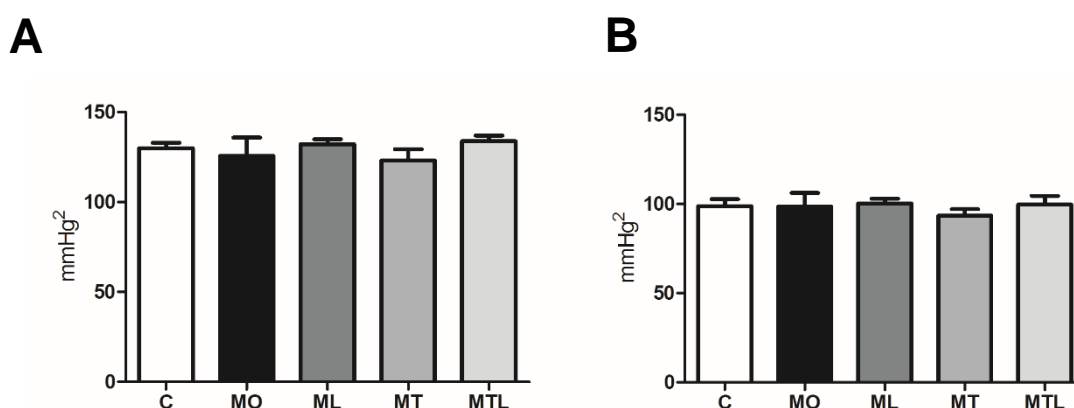


Figura 16 A e B. Efeito do LBI e TA na média da pressão arterial sistólica e diastólica dos ratos do experimento. Média da Pressão Arterial Sistólica e diastólica dos grupos estudados, C sedentário e injetado com salina; MO sedentário e com monoartrite induzida; ML com monoartrite induzida e intervenção de LBI; MT com monoartrite induzida e intervenção de TA; MTL com artrite induzida e intervenção de TA e LBI, milímetros de mercúrio ao quadrado (HmHg²), (n=5-6).

4.4 Efeito do Tratamento do LBI e TA sobre a Avaliação Autonômica em Ratos com Monoartrite.

Para essa análise foram utilizados três registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. A Tabela 3 revela os resultados referentes à avaliação espectral.

Tabela 3. Parâmetros autonômicos dos grupos do experimento:

	C	MO	ML	MT	MTL
IP (ms)	196,79±20,93	167,99±18,10*	169,59±15,44*	197,53±16,62 [#] §	193,49±24,44 [#] §
VAR IP (ms ²)	67,84±22,70	29,89±5,66*	32,00±7,30*	97,14±22,03 [#] §	94,25±32,49 [#] §
BF %	14,04±4,84	21,05±6,36	21,68±4,49*	14,24±1,21 [#] §	11,22±3,29 [#] §
AF %	54,44±6,99	39,47±3,53*	35,13±9,89*	49,45±7,81 [#] §	49,25±3,95 [#] §
BF/AF	0,24±0,07	0,28±0,06	0,26±0,03	0,23±0,05	0,20±0,04 [#]
VAR PAS (mmHg ²)	12,50±2,40	18,72±3,70*	21,10±2,28*	14,29±3,72 [#] §	12,30±0,73 [#] §
BF PAS (mmHg ²)	1,67±0,37	2,71±0,52*	3,03±0,47*	1,29±0,32 [#] §	1,43±0,27 [#] §
ALFA (ms/mmHg)	2,39±0,39	0,90±0,23*	0,97±0,25*	1,97±0,45 [#] §	1,67±0,40 [#] §

Dados representam médias ± Desvio Padrão. Intervalo de Pulso (IP), Variância do Intervalo de Pulso (VAR IP), Banda de baixa frequência (BF), Banda de Alta Frequência (AF), Razão Banda de baixa frequência / banda de alta frequência (BF/AF), Variância da Pressão Arterial Sistólica (VAR PAS), Banda de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica (BF PAS), índice Alfa (ALFA). Unidades: metro por segundo (ms), milímetros de mercúrio ao quadrado (mmhg²). * p < 0,05 vs C, # p<0,05 vs MO e § p<0,05 vs ML.

4.4.1 Efeito do LBI e TA do IP em Ratos do Experimento.

A Figura 17 evidencia os resultados referentes ao intervalo de pulso (IP). Para essa análise foram usados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados demonstraram que houve diminuição significativa dos grupos MO ($167,99 \pm 18,10$) e ML ($169,59 \pm 15,44$) em relação ao grupo C ($196,79 \pm 20,93$). Os resultados mostraram também aumento significativo dos grupos MT ($197,53 \pm 16,62$) e MTL ($193,49 \pm 24,44$) em relação aos grupos MO e ML.

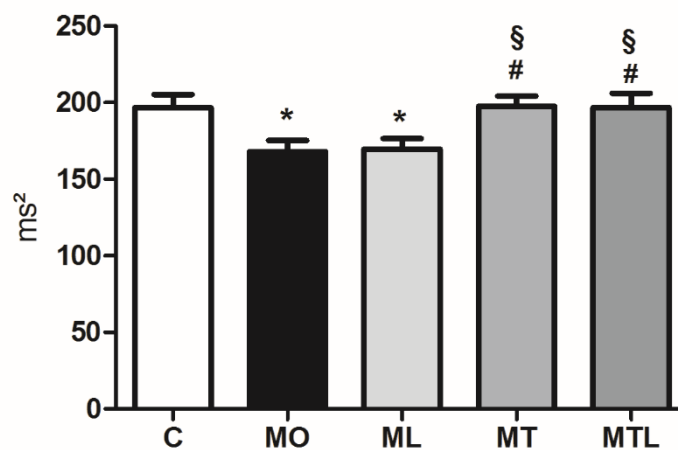


Figura 17. Efeito do LBI e TA do IP em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Intervalo de Pulso (IP), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.4.2 Efeito do LBI e TA na Variância de IP em Ratos do Experimento.

A Figura 18 apresenta os resultados referentes à variância de IP. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados mostram que houve diminuição significativa dos grupos MO ($29,89 \pm 5,66$) e ML ($32,00 \pm 7,30$) em relação ao grupo C ($67,84 \pm 22,70$). Também foi notado incremento significativo dos grupos MT ($97,14 \pm 22,03$) e MTL ($94,25 \pm 32,49$) em relação aos grupos MO e ML.

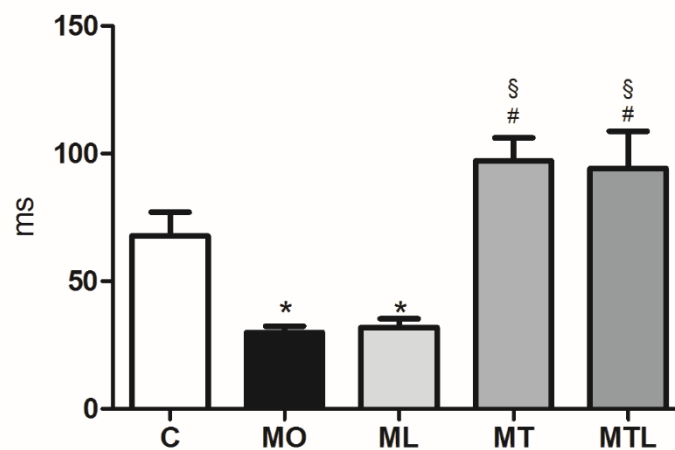


Figura 18. Efeito do LBI e TA na VAR IP em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Variância do Intervalo de Pulso (VAR IP), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.4.3 Efeito do LBI e TA na BF% em Ratos do Experimento.

A Figura 19 mostra os resultados da BF% e para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados demonstram que houve incremento significativo do grupo ML ($21,68 \pm 4,49$) em relação ao grupo C ($14,04 \pm 4,84$). Foi notado também diminuição significativa dos grupos MT ($14,24 \pm 1,21$) e MTL ($11,22 \pm 3,29$) em relação aos grupos MO ($21,05 \pm 6,36$) e ML.

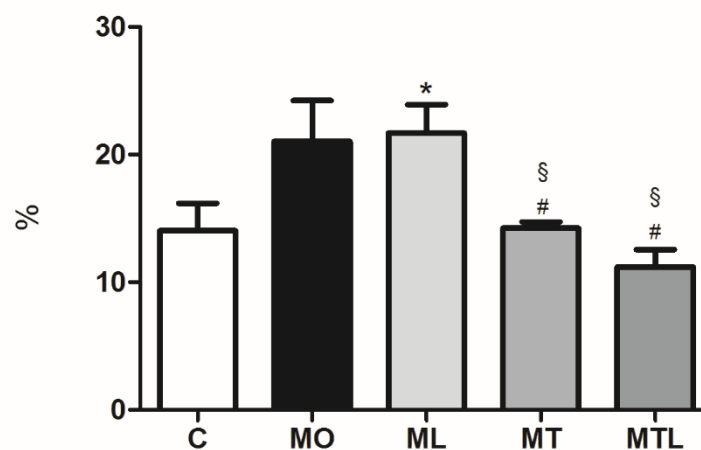


Figura 19. Efeito do LBI e TA na BF% em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Percentual da Banda de Baixa Frequência (BF%), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.4.4 Efeito do LBI e TA na AF% em Ratos do Experimento.

A Figura 20 revela os resultados da AF%, sendo que para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados mostram que houve diminuição significativa dos grupos MO ($39,47 \pm 3,53$) e ML ($35,13 \pm 9,89$) em relação ao grupo C ($54,44 \pm 6,99$). Estes resultados demonstraram também incremento significativo dos grupos MT ($49,45 \pm 7,81$) e MTL ($49,25 \pm 3,95$) em relação aos grupos MO e ML.

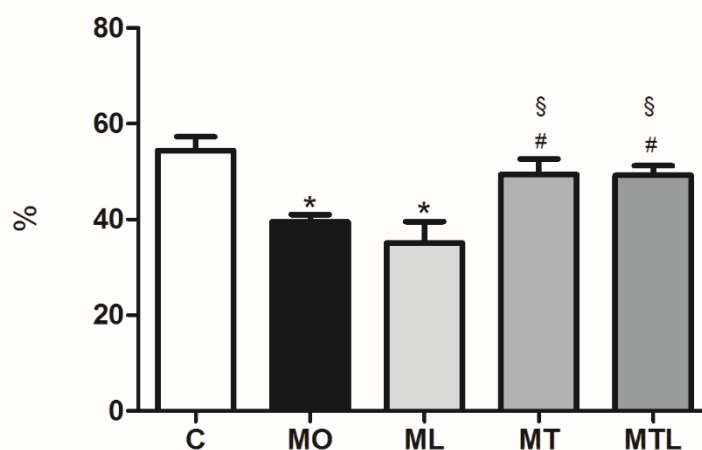


Figura 20. Efeito do LBI e TA na AF% em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Percentual da Banda de Alta Frequência (AF%), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.4.5 Efeito do LBI e TA na BF/AF em Ratos do Experimento.

A Figura 21 mostra os resultados da BF/AF, nessa análise foram usados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os quais demonstram que houve redução significativa do grupo MTL ($0,20 \pm 0,04$) em relação ao grupo MO ($0,28 \pm 0,06$).

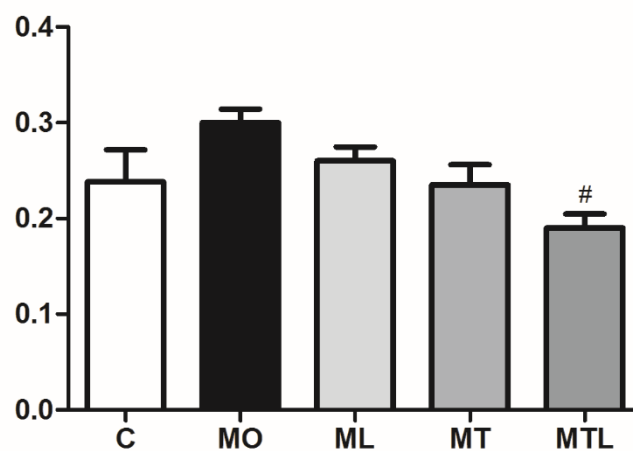


Figura 21. Efeito do LBI e TA na BF/AF em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Razão da Banda de Baixa Frequência sobre a Banda de Alta Frequência (BF/AF), # $p < 0.05$ vs MO, (n=5-6).

4.4.6 Efeito do LBI e TA na VAR PAS em Ratos do Experimento.

Na Figura 22 denota a VAR PAS, nessa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados demonstram uma elevação significativa dos grupos MO ($18,72 \pm 3,70$) e ML ($21,10 \pm 2,28$) em relação ao grupo C ($12,50 \pm 2,40$). Também foi notada redução significativa dos grupos MT ($14,29 \pm 3,72$) e MTL ($12,30 \pm 0,73$) em relação aos grupos MO e ML.

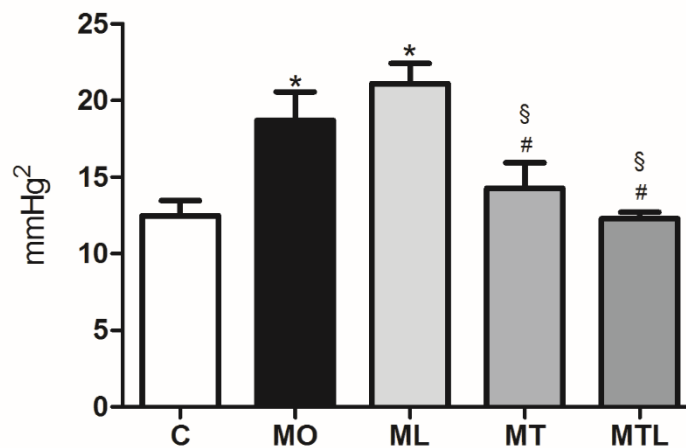


Figura 22. Efeito do LBI e TA na VAR PAS em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Variância da Pressão Arterial Sistólica (VAR PAS), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.4.7 Efeito do LBI e TA na BF PAS em Ratos do Experimento.

Os resultados da BF PAS são vistos na Figura 23, sendo que os registros foram estáveis no período de 30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz. Os resultados demonstram incremento significativo dos grupos MO ($2,71 \pm 0,52$) e ML ($3,03 \pm 0,47$) em relação ao grupo C ($1,67 \pm 0,37$). Estes também mostraram decréscimo significativo dos grupos MT ($1,29 \pm 0,32$) e MTL ($1,43 \pm 0,27$) em relação aos grupos MO e ML.

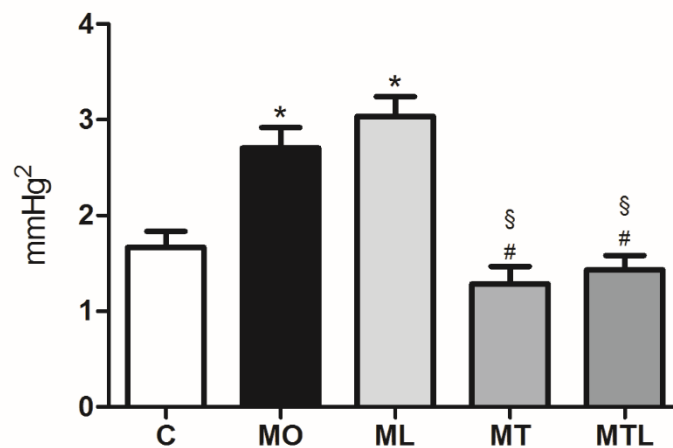


Figura 23. Efeito do LBI e TA na BF PAS em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Banda de Baixa Frequência da Pressão Arterial Sistólica (BF PAS), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.4.8 Efeito do LBI e TA no Índice ALFA em Ratos do Experimento.

A Figura 24 mostra os resultados do índice ALFA empregando os mesmos parâmetros descritos anteriormente, sendo que estes demonstram redução significativa dos grupos MO ($0,90 \pm 0,23$) e ML ($0,97 \pm 0,25$) em relação ao grupo C ($2,39 \pm 0,39$). Tais resultados também mostram aumento significativo dos grupos MT ($1,97 \pm 0,45$) e MTL ($1,67 \pm 0,40$) em relação aos grupos MO e ML.

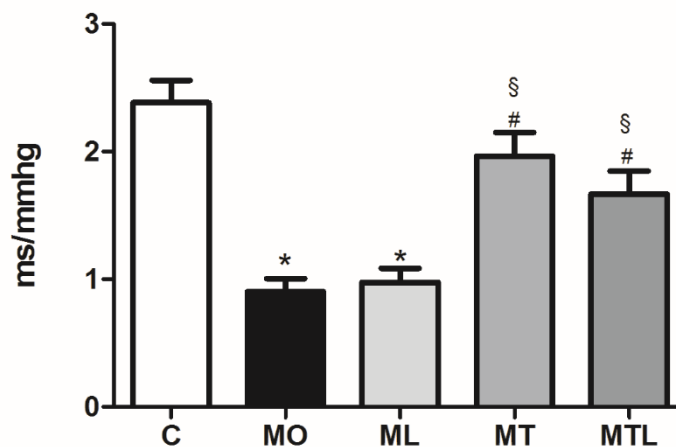


Figura 24. Efeito do LBI e TA no Índice ALFA em ratos do experimento. Para essa análise foram utilizados registros estáveis de, no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Índice ALFA (ALFA), * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs ML, (n=5-6).

4.5 Efeito do Tratamento do LBI e TA sobre o Influxo de Leucócitos na Monoartrite Experimental induzida por Zymosan.

4.5.1 Leucócitos Totais

A Figura 25 mostra que os ratos que tiveram TA, receberam o tratamento com o LBI e também LBI combinado com TA revelaram inibição significativa ($p < 0,05$) do influxo de leucócitos para a cavidade articular, sendo que o influxo leucocitário total é observado a seguir (C: $270 \pm 75,8 \times 10^4/\text{mL}$; MO: $725 \pm 155,4 \times 10^4/\text{mL}$; ML: $190 \pm 41,8 \times 10^4/\text{mL}$; MT: $275 \pm 50,0 \times 10^4/\text{mL}$; MTL $112,5 \pm 47,8 \times 10^4/\text{mL}$).

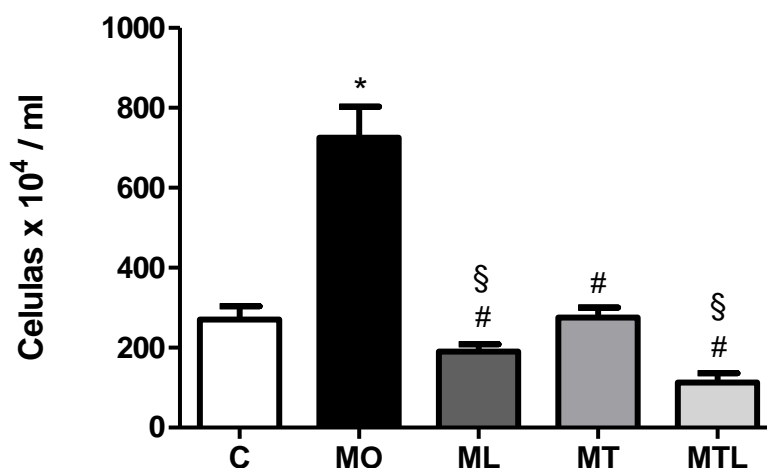


Figura 25. Efeito do LBI e TA na redução do influxo de leucócitos totais para a cavidade articular dos ratos do experimento. Ratos receberam injeção no joelho direito de 1 mg/kg de Zymosan em 50 µl de salina e somente salina. O TA foi realizado em esteira durante 10 semanas. O tratamento com o LBP foi iniciado imediatamente após a indução a artrite e duas vezes por semana, sempre antes da sessão de TA, no início e fim de ciclo de 5 dias. C – salina, MO monoartrite, ML – monoartrite + LBI, MT – monoartrite + TA e MTL – monoartrite + TA + LBI. Cada valor representa a média ± EPM de 5-6 animais, Anova Tukey; * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs MT, (n=5-6).

4.5.2 Leucócitos Diferenciais

A contagem diferencial dos leucócitos, presentes na cavidade articular, demonstrou um influxo importante de células mononucleares (Mn), sendo que os grupos MO e MT causaram uma elevação de células MN na cavidade articular, entretanto nos grupos ML e MTL observamos um declínio dessas células (C: $215,2 \pm 43,3 \times 10^4/\text{mL}$; MO: $471,7 \pm 91,5 \times 10^4/\text{mL}$; ML: $109,0 \pm 22,2 \times 10^4/\text{mL}$; MT: $165,5 \pm 43,6 \times 10^4/\text{mL}$, MTL: $81,2 \pm 30,7 \times 10^4/\text{mL}$) (Fig. 26 A).

Quanto à contagem de células polimorfonucleares (Pmn) encontramos um aumento no grupo MO em relação ao controle, nos grupos ML e MTL houve uma redução significativa em relação ao grupo MO (C: $143,0 \pm 43,1 \times 10^4/\text{mL}$; MO: $253,2 \pm 59,1 \times 10^4/\text{mL}$; ML: $41,0 \pm 25,5 \times 10^4/\text{mL}$; MT: $109,5 \pm 44,0 \times 10^4/\text{mL}$, MTL: $31,2 \pm 19,4 \times 10^4/\text{mL}$) (Fig. 26 B).

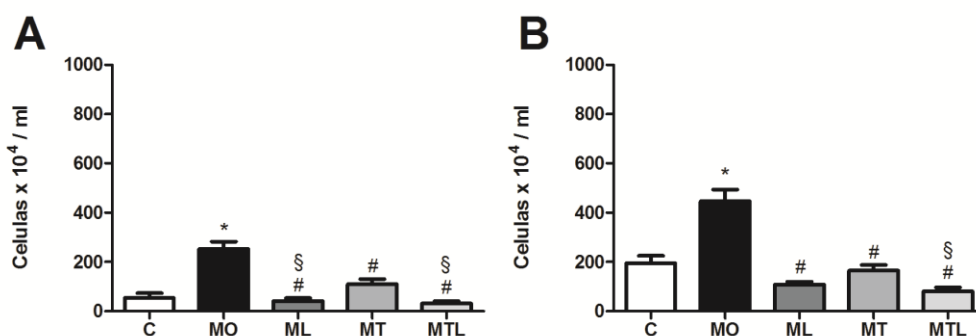


Figura 26 A e B. Efeito do LBI e TA na redução do influxo de leucócitos Mononucleares e Polimorfonucleares para cavidade articular de ratos do experimento. Os ratos receberam injeção no joelho direito de 1 mg/kg de Zymosan. O TA foi realizado em esteira durante 10 semanas. O tratamento com o LBI foi iniciado imediatamente após a indução a artrite e duas vezes por semana, sempre antes da sessão de TA, no início e fim de ciclo de 5 dias. C – salina, MO – monoartrite, ML – monoartrite + LBI, MT – monoartrite + TA e MTL – monoartrite + TA + LBI. Cada valor representa a média \pm EPM de 5-6 animais, Anova Tukey; * $p < 0,05$ vs C, # $p < 0,05$ vs MO e § $p < 0,05$ vs MT, (n=5-6).

4.6 Análise Histológica de Amostras da Membrana Sinovial.

A Figura 27 demonstra imagens de sessões de membrana sinovial coradas em HE. A imagem do grupo C evidencia a membrana sinovial íntegra. A imagem do grupo MO revela intensa desorganização do tecido da membrana sinovial com formação de edemas, áreas sem tecidos e células inflamadas em forma de nódulos. A imagem do grupo ML denota melhor organização tecidual e com menos áreas sem a presença de tecido. A imagem do grupo MT revela um avançado processo de organização e presença de capilares, ademais a imagem do grupo MTL demonstra uma melhor organização tecidual em relação a todos grupos estudados.

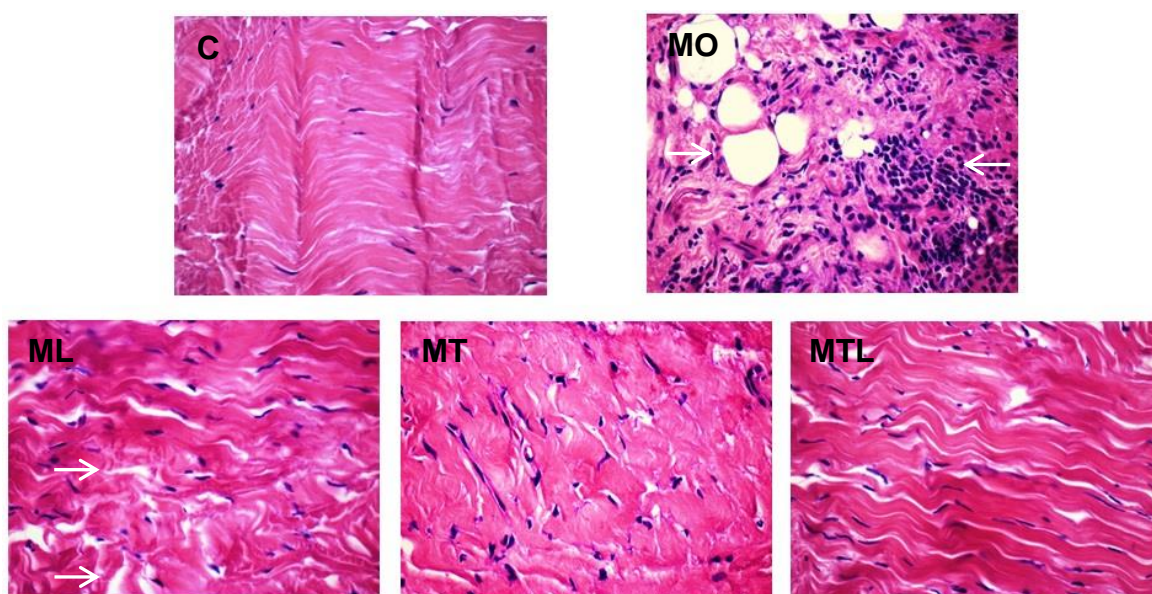
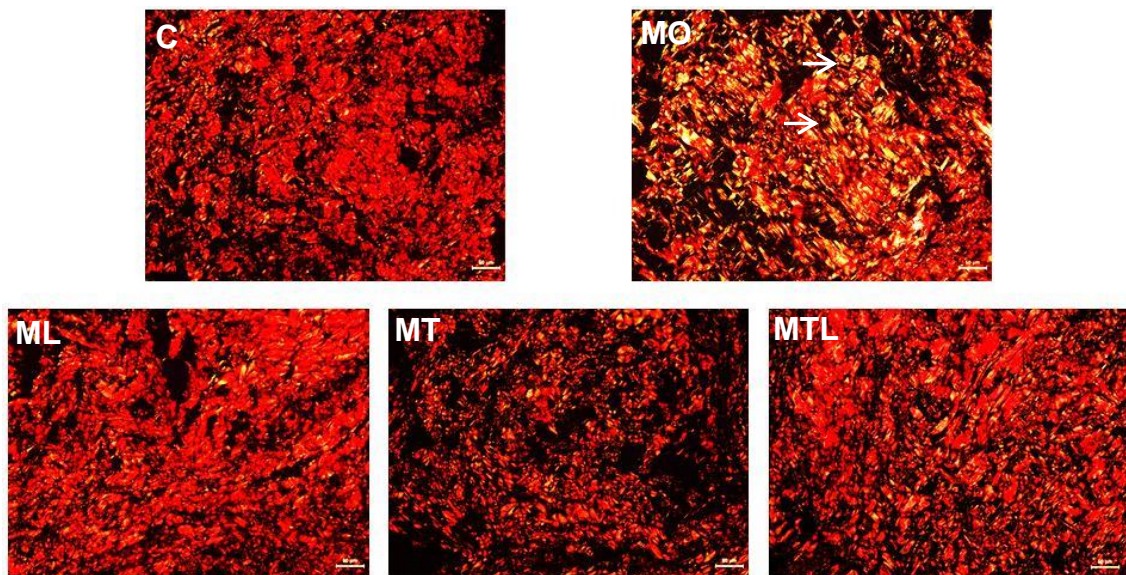


Figura 27. Sessões de membrana sinovial coradas com HE. Membrana íntegra grupo C. Grupo MO, desorganização da membrana decorrente de dano tecidual, edema (seta branca - esquerda) e infiltrado inflamatório em forma de nódulos (seta branca-direita). Grupo ML, diminuição de edema (seta branca) no limiar entre tecido fibroso e membrana sinovial. Grupo MT e Grupo MTL, avançada reorganização tecidual e diminuição do infiltrado inflamatório. Barra de escala $\mid 50 \mu\text{m} \mid$ e objetiva de 40 x.

4.7 Efeito do Tratamento do LBI e TA na Monoartrite Experimental induzida por Zymosan em Cortes Histológicos de Amostras de Membrana Sinovial dos Grupos do Protocolo Coradas com *Pricosirius red*.

A Figura 28 A demonstra imagens de sessões de membrana sinovial coradas com pricosirius red. O grupo C mostra organização tecidual na membrana sinovial com birrefringência em vermelho. O grupo MO revelou colágeno arranjado em fibras grossas; birrefringência em amarelo (seta branca) que é indicação de fibrose. Os grupos ML, MT e MTL, respectivamente demonstram maior organização da histoarquitetura tecidual. A Figura 28 B revela a quantificação de colágeno entremos grupos estudados.

A



B

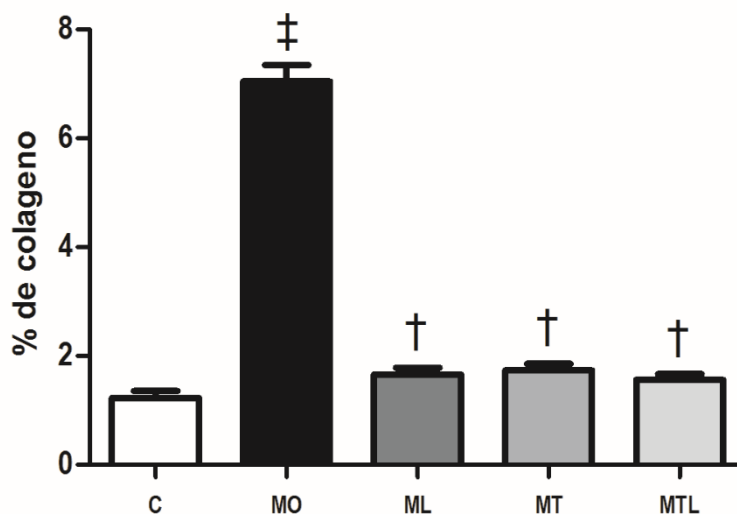


Figura 28 A e B. Sessões de membrana sinovial coradas com Pricosirius red, analisadas sob luz polarizada e quantificadas. Grupo C notar a birrefringência somente em vermelho. Grupo MO, birrefringência em amarelo – laranja decorrente de fibras de colágeno grossas (fibrose) (seta branca). Grupo ML, grupo MT e grupo MTL apresenta acentuada diminuição da birrefringência para amarelo – laranja. Barra de escala $50\ \mu\text{m}$ e objetiva de 20 x. O gráfico representa resultados da quantificação de 15 imagens por animal, com medidas de perímetro padronizadas utilizando mensuração por pixels realizada em software Image J. valores em percentuais expressos como média \pm E.p.m. 5-6 animais. ‡ $P < 0,05$ vs C. † $P < 0,05$ vs MO. (ANOVA).

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigado o uso de terapias não invasivas, como o laser de baixa intensidade (LBI) e o treinamento aeróbico (TA), em modelo experimental de monoartrite na articulação do joelho direito de ratos *Wistar*, verificando as alterações orgânicas sistêmicas e locais. O Colégio Americano de Reumatologia recomenda terapias não invasivas como o LBI e exercícios físicos para o tratamento de artrite.

A artrite de joelho, dentre vários sinais clínicos, apresenta alterações na função locomotora resultado do processo inflamatório intra-articular, incorrendo em dor articular, promovendo dificuldade de deambulação e, conseqüente, hipocinesia. O modelo experimental, ao qual optou-se e já descrito na literatura [48], evidenciou que os animais tiveram dificuldade de deambulação (característica da artrite), situação esta observada 24 horas após a indução da artrite com ZY, sendo que ratos controle, que foram injetados com salina, se movimentavam sem quaisquer alterações aparentes. Esses dados são similares aos observados em teste de incapacidade articular [48], no qual foi mostrado que os animais com artrite induzida, apresentaram hiperalgesia articular.

Neste estudo, utilizou-se o treinamento físico através da corrida de intensidade moderada, mensurado com teste de esforço máximo (TEM) utilizado na literatura científica [56]. O *Canadian Institutes of Health Research* e o *Canadian Arthritis Network, Toronto*, 2002, apontam para a complexidade ao desgaste articular natural em doenças reumatóides, sendo o treinamento físico regular e de moderada intensidade um fator de prevenção e terapêutico [62], porém o treinamento de alta intensidade um preditor de desgaste articular precoce e ineficaz a longo prazo.

Os nossos resultados mostraram que os grupos treinados apresentaram uma melhora na capacidade funcional em relação aos grupos sedentários na avaliação do teste de esforço máximo (TEM) final. Já o grupo tratado com o LBI, ao avaliar o TEM intermediário, verificamos uma resposta eficaz, o que sinaliza a eficiência do Laser como terapia na recuperação de lesões e, conseqüentemente, a melhora da capacidade funcional dos portadores das mesmas.

Quando avaliamos o ganho de peso dos animais, verificamos o aumento de peso dos animais dos grupos sedentários em relação aos dos grupos treinados. Descargas biomecânicas elevadas nas articulações relacionadas ao sedentarismo, além do incremento do tecido adiposo estão relacionadas com disfunções musculares e um maior risco de osteoartrite (OA). Sendo assim, TA é uma tática eficaz para a alteração deste quadro contribuindo na regulação do metabolismo lipídico [63, 64].

Pacientes em estágio avançado da AR denotam altas taxas de mortalidade em decorrência de disfunções autonômicas cardiovasculares como arritmia e infarto do miocárdio [65]. O treinamento físico é comumente descrito na literatura como um aliado ao melhor controle autonômico, contribuindo, assim, para uma melhor função cardiovascular e do sistema nervoso autonômico. O exercício físico também é capaz de estimular fatores vasodilatadores no endotélio, em experimentos *in vivo* e em estudos clínicos [66]. A força de cisalhamento (*shear stress*) atua sobre as células endoteliais por meio de uma cascata de eventos, que estimula a liberação de fatores como o NO e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), reduzindo assim os níveis de pressão arterial (PA). [67] Neste sentido, ratas hipertensas ooforectomizadas (menopausadas) submetidas à treinamento físico aeróbico e resistido durante oito semanas demonstraram níveis reduzidos de pressão arterial e frequência cardíaca, quando comparadas a ratas hipertensas ooforectomizadas sedentárias [67].

Recentemente, foi demonstrado o efeito agudo do LBI (4 aplicações diárias durante 3 dias na semana) nos níveis de PA sistêmica em ratos Wistar obesos e idosos, e houve uma diminuição estatisticamente significativa na média da pressão arterial de 8 mmHg após tratamento com laser, sinalizando, assim, que o LBI poderia atuar no decréscimo dos níveis pressóricos em animais [68].

O estudo clínico realizado por Madi (2015), em gestantes com pre-eclampsia, também evidenciou uma redução da resistência vascular periférica, incorrendo em queda da PAS e melhorando a condição clínica destas pacientes [69].

O trabalho clínico realizado por Chavantes e col. demonstrou também que a Laserterapia foi capaz de reduzir a pressão arterial sistêmica por meio de decréscimo da resistência vascular periférica em pacientes hipertensos, mas sem alterar a PA de indivíduos normotensos [70].

Para melhor compreender o efeito do LBI associado ao treinamento físico, em nosso modelo experimental, além da capacidade funcional dos animais, verificamos as alterações hemodinâmicas. Verificou-se uma redução da média da frequência cardíaca nos grupos treinados, o que demonstra um menor esforço do sistema cardiovascular para manter um débito cardíaco eficiente no organismo, sugerindo uma melhor performance do sistema cardiovascular em relação ao grupo artrite. Quando mensurados os níveis pressóricos sistólicos, diastólico e da Pressão Arterial Média, todos os animais do estudo apresentaram-se dentro dos padrões normais [56].

Os resultados autonômicos mostraram que as ações do sistema simpático e parassimpático indicam que os ciclos cardíacos de um determinado período de tempo tem uma melhora da variabilidade da frequência cardíaca mais baixa no grupo MO comparado ao grupo C, o que implica ao organismo um comprometimento no balanço autonômico ou simpático/parassimpático [71]. Já os grupos MT e MTL revelaram maior

VFC situação que aumenta a adaptabilidade do organismo, representando um organismo bem mais saudável.

No resultado da variável BF% percebe-se, que o tratamento nos grupos MT e MTL predispõe o organismo acometido de artrite a uma menor atividade simpática, situação oposta quando se compara o grupo MO e ML ao grupo C. Encontrou-se também na AF% que a associação LBI combinado ao TA mostra uma maior atividade vagal do grupo comparado aos demais. Isto ocorreu devido ao reflexo simpatovagal decorrente do resultado da razão BF/AF, levando a uma interação contínua entre a modulação vagal (parasimpática) e simpática [72]. Estes benefícios são corroborados pelo resultado do VAR IP, onde os grupos MT e MTL, demonstraram uma maior variância, logo um maior controle autonômico e cardiovascular (equilíbrio da resposta hemodinâmica) ao ser comparado ao grupo MO.

Também verificamos no nosso estudo, que a razão entre BF/AF mostra-se menor no grupo MTL em comparação com o grupo MO, situação que indica uma maior atividade simpática do grupo MO em comparação com o grupo MTL, implicando assim numa menor predisposição a complicações cardiovasculares [73].

Atualmente, tem-se discutido muito o papel da inflamação na gênese da HAS e na progressão das lesões de órgãos alvo. A inflamação crônica de baixo grau tem sido identificada, como uma das causas de doenças vasculares, podendo estar também implicada na gênese e no desenvolvimento da HAS [74]. A morbidade e mortalidade cardiovascular não é simplesmente o resultado de alterações hemodinâmicas, mas sim o efeito da desregulação do sistema nervoso autônomo, elevando a resposta inflamatória do sistema imunitário inato e adaptativo [75].

Nosso grupo realizou um estudo experimental em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) avaliou o estresse oxidativo e a modulação autonômica

cardiovascular pós-irradiação com LBI por semanas. Os resultados desse trabalho demonstraram que o LBI foi capaz de reduzir os efeitos em FC, PAD e na PAM [66].

No presente estudo existe um processo inflamatório instalado no organismo, (a monoartrite) e, conseqüentemente, não só um perfil inflamatório, como também alteração do sistema imunológico, que está em maior atividade. Ao estudar a VAR PAS observa-se maior atividade desta nos grupos MO e ML comparado com grupo C. Já nos grupos MT e MTL tiveram menor valor desta última variável, a qual além de indicar hiperatividade simpática vascular tem grande correlação com predição de risco cardiovascular [76, 77]. Corroborando assim para esta análise, o resultado do BF PAS aumentou a atividade simpática vascular nos grupos MO e ML em comparação com grupo C. Assim, a capacidade de controle autonômico normal ou sensibilidade barorreflexa se encontra em disfunção no grupo MO comparando ao grupo C, identificado no índice ALFA o tratamento com TA isolado e com associação do LBI foi bastante eficaz em melhorar este índice.

Para desencadear a resposta inflamatória no interior da cápsula articular foi empregado neste estudo o zymosan, que já foi utilizado em outros estudos do nosso grupo de pesquisa [48]. Ao se observar a contagem diferencial dos leucócitos foi encontrado maior presença de células polimorfonucleadas e mononucleadas no grupo artrite, com significativa diminuição nos outros grupos do estudo, situação que supomos uma aceleração do processo de reparo e ou bioproteção advinda de ambas as terapias. Vários estudos demonstraram a eficácia da Laserterapia em reduzir a migração leucocitária em diversos processos inflamatórios. Neste sentido a literatura mostra redução de leucócitos em artrite experimental [78, 79], tendinite [80]; inflamação pulmonar [81]; mastite [82] entre outros [83]. Nas observações histológicas das amostras de sinovia se observou a formação de edemas e infiltrado inflamatório no

grupo monoartrite comparado ao grupo controle. Desta forma, pode-se inferir que este efeito seja devido ao aumento de células inflamatórias no local, com consequente liberação de mediadores inflamatórios e degradação tecidual [84].

Estudos sugerem que a fotobiomulação, empregando laser de baixa intensidade, atua nas fases inflamatórias e proliferativas de reparo tissular, através da modulação da síntese de mediadores inflamatórios bem como nas espécies reativas de oxigênio (ROS) [85,83]. As imagens das seções da membrana sinovial das amostras que tiveram a intervenção com o LBI e TA revelaram alterações de rearranjo morfológico do tecido com um decréscimo do influxo inflamatório, sugerindo aceleração do processo de reparo com a presença de capilares (angiogênese) e dilatação destes [84], ademais com um efeito sistêmico advindo do TA.

Foi mostrado que a contribuição do TA, durante o processo inflamatório tem atuação na proliferação de neutrófilos, linfócitos e células *natural killer*, logo age no metabolismo do sistema imune, contribuindo ademais no reparo tecidual [86]. A literatura ainda demonstra que o LBI participa deste processo através do papel fundamental na comunicação celular, ativação de macrófagos, melhora a absorção do fluido intersticial, contribui na resposta imune, promove vasodilatação [87], como também desencadeia o processo de biomodulação e auxilia na cicatrização [43,83].

Quando se analisa as sessões de membrana sinovial com luz polarizada, nota-se pontos de birrefringência (amarelo), consistindo em maior depósito de fibras, situação decorrente do processo de fibrose e de reparo do colágeno neste processo. Tal birrefringência denota que a intervenção do LBI e TA promoveram uma melhor reorganização das fibras de colágeno tipo I e III [88].

Tomando em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho evidenciam que a inflamação articular aguda, causam um desequilíbrio local (articular) e no sistema

simpático, sugerindo um envolvimento autonômico precoce, que no curso da doença reumática progressiva crônica podem afetar também o sistema cardiovascular. Além disso, um programa de exercício físico moderado associado com LBI podem exercer efeitos preventivos eficazes. Esses benefícios foram relacionados ao equilíbrio autonômico cardiovascular e à capacidade funcional otimizada.

CONCLUSÕES

- ✓ No teste de esforço máximo os grupos com treinamento aeróbico apresentaram melhora da resposta na capacidade funcional comparado com grupos sedentários;
- ✓ Os animais sedentários tiveram elevação de peso significante em relação aos animais treinados;
- ✓ A avaliação hemodinâmica demonstrou redução da frequência cardíaca em repouso nos grupos treinados e tratados com LBI;
- ✓ As avaliações autonômicas demonstraram que os grupos treinados e combinados com a terapia de fotobiomodulação tiveram uma menor atividade simpática, revelando uma proteção cardiovascular importante;
- ✓ Os grupos com associação de treinamento aeróbio e laserterapia demonstraram uma melhora significante em relação aos outros grupos, no processo inflamatório, avaliado pela migração celular e histologia.

REFERÊNCIAS

- 1 Umay, E. K.; Gurkay, E.; Karsli, P. B.; Cakci, A. Sensory disturbance and polyneuropathy in rheumatoid arthritis patients with foot deformity. *Rev. Bras. Reumatol.* vol.56, n.3, pp.191-197, Maio/Junho 2016.
- 2 Walker, J. Relief From Chronic Pain By Low Power Laser Irradiation. *Neuroscience Letters*, 43, 1983.
- 3 Nakano, J; Kataoka, H; Sakamoto, J; Origuchi, T; Okita, M; Yoshimura, T. Low level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol.* 2009; 94 (9): 1005-15.
- 4 Bjordal, J., Couppé, C., Chow, R. Tuner, J. and Ljunggren, E. A Systematic Review Of Low Level Laser Therapy With Location-Specific Doses For Pain From Chronic Joint Disorders. *Australian Journal of Physiotherapy*, Vol.49, 2003.
- 5 Hegedus, B., Viharos, L. Gervain, M. and GALL, M. The Effect of Low-Level Laser in Knee Osteoarthritis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Photomedicine and Laser Surgery Original Article*, Vol 27, 2009.
- 6 Enwemeka, C. and Reddy, K. The Biological Effects Of Laser Therapy And Other Physical Modalities On Connective Tissue Repair Processes. *Laser Therapy*, vol. 12, 2001.
- 7 Barber, A. Luger, J., Karpf, A., Salame, K., Shlomi, B. Kogam, G., Nissan, M., Alon, M. and Rochkind, S. Advance in Laser Therapy for Bone Repair. *Laser Therapy* vol. 13, 2001.
- 8 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 2013.
- 9 Julkunen, P., Halmesmaki, E., Iivarinen, J., Rieppo, L., Narhi, T., Marjanen, J., Arokoski, J., Brama, P., Jurvelin, J. and Helminen, J. Effects of growth and exercise on composition, structural maturation and appearance of osteoarthritis in articular cartilage of hamsters. *J.Anat.*217, 2010.
- 10 Otterness, I., Eskra, J., Bliven, M., Shay, A., Pelletter, J. and Milici, A. Exercise Protects Against Articular Cartilage Degeneration In The Hamster. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, vol. 41, 1998.
- 11 Davis, J.M.; Matteson, E.L. My treatment approach to rheumatoid arthritis. *Mayo Clinic Proceedings*, Rochester, v. 87, n. 7, p. 659-673, july 2012.
- 12 Mota, L.M.H.; Laurindo, I.M.M.; Santos Neto, L.L.S. Características demográficas e clinicas de uma coorte de pacientes com artrite reumatoide inicial. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 235-248, 2010.

- 13 Costa, J.P.; Beck, S.T. Avanços no diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide. Saúde (Santa Maria), Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 65-76, 2011.
- 14 Samiento-Monroy, J.; Amaya-Amaya, J., Espinosa-Sena, J. S., Herrera-Diaz, C., Anaya, J.M. and Rojas-Villarraga, A.. Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis A Systematic Literature Review in Latin America. Arthritis, vol. 2012.
- 15 Lawrence, J.S. Hypertension in Relation to Musculoskeletal Disorders. Ann. rheum. Dis. 34, 1974.
- 16 Freed, J.F, Nies KM, Boyer RS, Louie JS. Acute monoarticular arthritis. A diagnostic approach. JAMA 1980;243:2314-6.
- 17 Almeida, Sérgio CL et al. Avaliação do paciente com artrite. Medicina (Ribeirão Preto. Online), v. 43, n. 3, p. 283-291, 2010.
- 18 Baker, D.G, Schumacher HR Jr. Acute monoarthritis. N Engl J Med 1993;329:1013-20.
- 19 Silva, C, Velazquez C, Mody A, et al. Diagnosing acute monoarthritis in adults: a practical approach for the family physician. Am Fam Physician 2003;68:83-90.
- 20 Doria, A, Icardino L, Ghirardello A, et al. Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 2006, 119:700-6.
- 21 Gabriel, S.E, Crowson CS, Kremers HM, et al. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. Arthritis Rheum. 2003, 48:54-8.
- 22 Turesson, C, Jacobsson LT, Matteson EL. Cardiovascular co-morbidity in rheumatic diseases. Vasc Health Risk Manag. 2008 4(3):605-14.
- 23 Tracey, K.J. The inflammatory reflex. Nature 2002;420(6917):853-9.
- 24 Camm, A. and Malik, M. London, (Co-chairmen *et al* Members). Heart rate variability Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. (Membership of the Task Force listed in the Appendix), European Heart Journal, 17, 1996.
- 25 Vanderlei, L.C.M., Pastre, C.M., Hoshi, R.A., Carvalho, T.D. and Godoy, M.F.. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. Rev Bras Cir Cardiovasc, 24(2): 2009.
- 26 Montano, N; Porta, A; Cogliati, C; Constantino, G; Tobaldini, E; Casali, K.R; Lellamo, F. Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2009; 33(2): 71-80.

- 27 Nottin, S.; Vinet, A.; Stecken, F.; N'guyen, L.D.; Ounissi, F.; Lecoq, A.M.; Obert, P. Central and peripheral cardiovascular adaptations to exercise in endurance-trained children. *Acta Physiol Scand*, n. 175, p. 85-92, 2002.
- 28 Droste, C.; Greenlee, M.; Schreck, M.; Roskmann, H. Experimental pain thresholds and plasma β -endorphin levels during exercise. *Med Sci Sports Exerc*; n. 23, p. 334-342, 1991.
- 29 Petruzzello, S.J.; Landers, D.M.; Hatfield, B.D.; Kubit, K.A.; Salazar, W. A meta-analysis on the anxiety-reducing effects of acute and chronic exercise. *Outcomes and mechanisms. Sports Med*; v. 11, p. 143-182, 1991.
- 30 Oliveira, C.A.M.; Luciano, E.; Mello, M.A.R. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. *Experimental Physiology*, V.90, P. 79-86, 2005.
- 31 Pillis, W.; Zarzeczny, R.; Langfort, J.; Kaciuba-Uscilko, H.; Nazar, K.; Wojtyna, J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol*, n. 106 p. 285-289, 1993.
- 32 Hollmann, W. & Hettinger, Th. *Medicina do esporte*. Rio de Janeiro. Manole, p.298-385, 1983.
- 33 Gomes, R. P. Atividade física no tratamento de artrite induzida por adjuvante de Freud: Efeitos na nocicepção, edema e migração celular. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- 34 Belotto, M. F. Efeito do exercício físico sobre o estado inflamatório de diabéticos. *EFDesportes.com: Revista digital*. Buenos Aires, v16, n. 159, Ago. 2011. Disponível em www.efdeportes.com/efd159/efeito-do-exercicio-fisico-sobre-diabeticos.htm.
- 35 Skou, S., Odgaard, A., Rasmussen, J. and Roos, E.. Group education and exercise is feasible in knee and hip osteoarthritis. *Danish Medical Journal*, 59, 20012.
- 36 Farr, J., Goings, S., Lohman, T., Rankin, L., Kastle, S., Cornett, M. and Cussler, E. Physical Activity Levels in Patients With Early Knee Osteoarthritis Measured by Accelerometry. *Arthritis & Rheumatism*, vol.59, pp1229-1236, 2008.
- 37 Henriques, A.C.G.; Cazal, C.; Castro J.F.L. Ação da laserterapia no processo de proliferação celular: revisão de literatura. *Rev Col Bras Cir.*;37, n. 4, 295-302, 2010.
- 38 Catão, M.H.C.V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral*. 2004; 3:214-8.
- 39 Rocha Junior, A.M, Vieira B.J, Andrade LCF, Monteiro A. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contribution of in vitro and in vivo experimental studies. *J Vasc Bras*. 2007;6:258-66.
- 40 Bourguignon Filho, A.M.; Feitosa, A.C.F.; Beltrão, G.C.; Pagnoncelli, G.C. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 2005;46(1);37-43.

- 41 Channual, J.; Choi, B.; Osann, K.; Pattanachinda, D.; Lotfi, J; Kelly, K.M. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. *Lasers Surg Med.*; v. 40, n. 9, p. 644-50, 2008.
- 42 Walsh, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr Dental J.* 1997;42:247-54.
- 43 Pinto, N.C.; Pereira, H.C.; Stolf, N.A.G.; Chavantes, M.C. Laser de baixa intensidade em deiscência aguda safenectomia: proposta terapêutica. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* ;24(1), P. 88-91, 2009.
- 44 Balint, G., Barabas, Z., Zeitler, Z, Bakos, J., Kekesi, K.A., Pethes, A., Nagy, E., Lakatos, T., Balint, P., and Szecanecz, Z. Ex Vivo Soft-Laser Treatment Inhibits the Synovial Expression of Vimentin and-Enolase, Potential Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. *PHYS THER*, 91, 2011.
- 45 Huang, Y., Sharma, S., Carroll, J. and Hamblin, M. Biphasic dose response in low level light therapy an update. *Dose-Response*, 9, 2011.
- 46 Manadam, A.M, Block JA. Rheumatoid Arthritis: Beyond Tumor Necrosis Factor-[alpha] Antagonists, B Cell Depletion, and T Cell Blockade. *American journal of therapeutics.* 2008;15(1):53.
- 47 Bjordal, J.M, Ljunggren AE, Klovning A, Slørdal L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including cyclo-oxygenase-2 inhibitors, in osteoarthritic knee pain: meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *bmj.* 2004;329(7478):1317.
- 48 Morais, NCR., Vale, ML., Villaverde, AB., Lima, CJ., Cogo, JC. & Zamuner, SR. Anti-inflammatory effect of low level laser and light-emitting diode in zimosan-induced arthritis. *Photomedicine and laser surgery*, vol. 28, 2010.
- 49 Castano, A.P. Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, et al. Low level laser therapy for zymosan induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2007;39(6):543-50.
- 50 Silva, E.M, Gomes SP, Ulbrich LM, Giovanini AF. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2007;4:29-35.
- 51 Conlam, M.J, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. *J Clin Periodontol.* 1996;23:492-6.
- 52 Aimbire. F, Ligeiro de Oliveira A, Albertini R, Correa J, Ladeira de Campos C, Lyon J, et al. Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1 levels in airway and lung from rat subjected to LPS induced inflammation. 2008;31(3):189-97.
- 53 Magee, D. J. Avaliação Musculoesquelética. 3. ed. São Paulo: Manole, 837, p. 525-526, 2002.

- 54 Kitchen, S; Partridge C. A review of low intensity laser therapy: Parts I and II: Background, physiological effects and hazard. *Physiotherapy*. 1991;77:161-8.
- 55 Os Princípios Éticos na Experimentação Animal (1991), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Cobea, <http://www.cobea.org.br/etica.htm>
- 56 Rodrigues, B., Figueroa, D., Mostarda, C., Heeren, M., Irigoyen, M. & De Angelis, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rat. *Cardiovascular Diabetology*, 6 - 38, 2008.
- 57 Sanches, I.C. Controle cardiovascular em fêmeas ooforectomizadas diabética: efeito do treinamento físico dinâmico aeróbico, resistido ou combinado. USP/FM/DBD. Tese, São Paulo, 2012.
- 58 Jorge, L., Pureza, P., Dias, D., Conti, F., Irigoyen, M. & Deangelis, K. Dynamic Aerobic Exercise Induces Baroreflex Improvement in Diabetic Rats. *Experimental Diabetes Research*, Vol 2012.
- 59 Barbosa, AM., Vilaverde, AB., Souza, LG., Ribeiro, W., Cogo., JC. & Zamuner, SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by Bothrops Jararacussu snake venom. *Toxicon* 51, 1236 - 1244, 2008.
- 60 Goodfelollow. A.M., Williams, A.S., Levim, J.L., Williams, B.D. and Morgam, B.P. Local therapy with soluble complement receptor 1 (sCR1) suppresses inflammation in rat mono-articular arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 52, 1997.
- 61 Yasukawa, A., Ohru, H., Koyama, Y., Nagai, M. and Takakuda, K. 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.
- 62 Golightly, Y.M., Allen, K.D. and Caine, D.J. Comprehensive review of the effectiveness of different exercise programs for patients with osteoarthritis. *Phys Sport Med*, vol 40, 2012.
- 63 Miller, G.D., Jenks, M.Z., Vendela, M., Norris, J. and Muday, G.K.. Influence of Weight Loss, Body Composition, and Life style Behaviors on Plasma Adipokines: A Randomized Weight Loss Trial in Older Men and Women with Symptomatic Knee Osteoarthritis. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Obesity*, vol 2012.
- 64 Aquino, A.E.J., Sene-Fiorese, M., Paolilio, F.R., Duarte, F.O., Oishi, J.C., Pena, A.A.J., Duarte, A.C. Hamblin, M.R. Bagnato, V.S. and Parizotto, N.A.. Low-level laser therapy (LLLT) combined with swimming training improved the lipid profile in rats fed with high-fat diet. *Laser Med*, 14, 2012.
- 65 Kingwell, B.A, "Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease." *The FASEB jornal*.2000; 14: 1685-1696.
- 66 Tomimura, S., Silva-Assumpção, B.P., Sanches, I.C., Felipe De Angelis, K., Colombo, F.C., Chavantes, M.C. Efeito Hemodinâmico da Laserterapia em Ratos

Esponaneamente Hipertensos. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo , v. 103, n. 2, p. 161-164, Aug. 2014 .

67 Sanches, I.C, Brito JO, Candido GO, Dias DS, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Cardiometabolic benefits of exercise training in na experimental modelo of metabolic syndrome and menopause. Menopause. 2011;19(5): 562-568.

68 Fernanda, R, Roque,I , Ursula Paula Reno,´ Soci, I. Katia De Angelis, II Marcele ,A. Coelho,I . Cristina, R. Furstenau,I Dalton V. Vassallo,III Maria Claudia Irigoyen,II Edilamar M. Oliveira Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats CLINICS 2011;66(12):2105-2111

69 Chavantes, MC; Pinto, N. C. ; Holanda, V. M. ; Tomimura, S. ; Madi, O.; Bezerra, V. A.; Duarte, I. S. O uso do laser no Brasil. In: Aplicação do laser de baixa intensidade em várias especialidades médicas. Wolferson & Ferreira. (Org.). 1ed. São Paulo: Dilivros. 2016, v. 1, p. 273-285.

70 Chavantes, MC; Morais, TL; Pinto, NC; Tomimura, S; Silva-Assumpção, BP; Canal, M; Pinto, NC; Nakata, LS; Callado, IS; Lopes, H; Consolim-Colombo, F. Study's Significance from Arterial Elasticity and Variation in Arterial Blood Pressure for Normotensive and Hypertensive Patients applying Pre and Post Lasertherapy: Preliminary Results. SPIE, 2014. BIOS- USA. Proceedings 46 (8926-8977).

71 Yadav, R.K., Gupta, R. and Deepak, K.K.. A pilot study on short term heart rate variability & is correlation with disease activity in Indian patients with rheumatoid arthritis. Indina Journal Medicine Res. 136, 2012

72 Vanderlei, L.C.M., Pastre, C.M., Hoshi, R.A., Carvalho, T.D. and Godoy, M.F.. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. Rev Bras Cir Cardiovasc, 24(2): 2009.

73 Katia De Angelis, Danielle D. Senador, Cristiano Mostarda, Maria C. Irigoyen, and Mariana Morris. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R950–R957, 2012

74 Boos, C.J, Lip GYH. Is Hypertension an Inflammatory Process? Current Pharmaceutical Design. 2006; 12(13):1623-1635.


75 Abboud, F.M, Harwani SC, Chapleau MW. Autonomic Neural Regulation of the Immune System:Implications for Hypertension and Cardiovascular Disease. Hypertension. 2012; 59(4): 755–762.

76 Bruno Rodrigues, Fabio S. Lira, Fernanda M. Consolim-Colombo, Juraci A. Rocha, Erico C. Caperuto,1 Kátia De Angelis,4 and Maria-Cláudia Irigoyen. Role of Exercise Training on Autonomic Changes and Inflammatory Profile Induced by Myocardial Infarction Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume 2014, Article ID 702473, 11 pages

- 77 Edward Pringlea, Charles Phillipsa, Lutgarde Thijsb, Christopher Davidsona, Jan A. Staessenb, Peter W. de Leeuw, Matti Jaaskivid, Choudomir Nacheve, Gianofranco Paratiff, Eoin T. O'Brieng, Jaakko Tuomilehtoh, John Websteri, Christopher J. Bulpittj and Robert H. Fagardb, on behalf of the Syst-Eur Investigators Systolic blood pressure variability as a risk factor for stroke and cardiovascular mortality in the elderly hypertensive population *Journal of Hypertension* 2003, Vol 21 No 11
- 78 Carlos, F.P, de Paula Alves da Silva M, de Lemos Vasconcelos Silva Melo E, Costa MS, Zamuner SR. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(2):757-63
- 79 Pallota, R.C, Bjordal JM, Frigo L, Leal Junior EC, Teixeira S, Marcos RL, Ramos L, Messias Fde M, Lopes-Martins RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):71-78.
- 80 Xavier, M, David DR, Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, Silva Jr. JA, Salgado MACS, Aimbire F, Albertini R. Anti-Inflammatory Effects of Low-Level Light Emitting Diode Therapy on Achilles Tendinitis in Rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2010, 42:553–558.
- 81 Miranda Da Silva, C, Peres Leal M, Brochetti RA, Braga T, Vitorette LB¹ Saraiva Câmara NO, Damazo AS, Ligeiro-de-Oliveira AP, Chavantes MC, Lino-Dos-Santos-Franco. A Low Level Laser Therapy Reduces the Development of Lung Inflammation Induced by Formaldehyde Exposure. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142816
- 82 Wang, Y, He X, Hao D, Yu D, Liang J, Qu Y, Sun D, Yang B, Yang K, Wu R, Wang J. Low-level laser therapy attenuates LPS-induced rats mastitis by inhibiting polymorphonuclear neutrophil adhesion. *J Vet Med Sci.* 2014;76(11):1443-50.
- 83 Chavantes, M.C. *Laser em Biomedicina*. Atheneu (ed.). São Paulo, Brasil. 2009.
- 84 Cruvinel, W.M., Júnior, D.M., Araújo, J.A.P., Catelan, T.T.T., Souza, A.W.S., Silva and Andrade, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, 50, 2010.
- 85 Mafra De Lima, F, Costa MS, Albertini R, Silva Jr JA, Aimbire F. Low level laser therapy (LLLT): Attenuation of cholinergic hyperreactivity, β 2-adrenergic hyporesponsiveness and TNF- α mRNA expression in rat bronchi segments in E. coli lipopolysaccharide-induced airway inflammation by a NF- κ B dependent mechanism. *Lasers Med Sci.* 2009; 41(1): 68–74.
- 86 Navarro, F., Bacurau, V.N., Almeida, S.S., Barros, C.C., Moraes, M.R., Pesqueiro, J.L., Ribeiro, S.M.L., Araujo, R.C., Rosa, L.F.B.P.C. and Bacurau, F.P. Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. *Cell Biochem Funct*, 28, 2010.
- 87 Hawkins, D. and Abrahams, H.. Phototherapy — a treatment modality for wound healing and pain relief. *African Journal of Biomedical Research*, vol. 10, 2007.

88 Rich, L. and Whittaker, P.. Collagen And Picrosirius Red Staining: A Polarized Light Assessment, Braz. J. morphol. Sci. 22, 2005

ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL Nº AN009/2014


UNINOVE
Universidade Nova de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº 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, Theralase DMC®. Os parâmetros a serem utilizados serão comprimento de 685 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 Picosinus 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 hemodinâmica 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 ketamima 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-peritonal.

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 antiinflamatório 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:

☒ (X) **Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.**

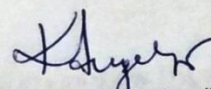
☐ () Com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

☐ () 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