Shaiane da Silva Tomazoni

Efeitos da laserterapia de baixa potência, anti-inflamatório não-esteroidal tópico e atividade física no tratamento de osteoartrite induzida por papaína

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

São Paulo
2015

Shaiane da Silva Tomazoni

Efeitos da laserterapia de baixa potência, anti-inflamatório não-esteroidal tópico e atividade física no tratamento de osteoartrite induzida por papaína

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Tomazoni, Shaiane da Silva.

Efeitos da laserterapia de baixa potência, anti-inflamatório não-esteroidal tópico e atividade física no tratamento de osteoartrite induzida por papaína / Shaiane da Silva Tomazoni. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Farmacologia e terapêutica experimental.

Versão do título para o inglês: Effects of low-level laser therapy, topical non-steroidal anti-inflammatory drug and physical activity on papain induced.

1. Osteoartrite 2. Papaína 3. Anti-inflamatório não-esteroidal tópico
4. Natação 5. Laserterapia de baixa potência I. Martins, Prof. Dr.
Rodrigo Álvaro Brandão Lopes II. Universidade de São Paulo. Instituto
de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB036/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Shaiane da Silva Tomazoni.

Título da Tese: Efeitos da laserterapia de baixa potência, anti-inflamatório não-esteroidal tópico e atividade física no tratamento de osteoartrite induzida por papaína.

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **077** nas fls. **130** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeitos da laserterapia de baixa potência, antiinflamatório não-esteroidal tópico e atividade física no tratamento de osteoartrite induzida por papaína"* do qual participam o(s) aluno(s) **Shiane da Silva Tomazoni, Rodney Capp Pallotta** e o pesquisador **Ernesto Cesar Pinto Leal Junior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **25.09.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 27 de setembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

A Deus, por me abençoar e por iluminar meu caminho, me guiando em todas as decisões e situações.

Aos meus pais, Ivo e Ionira, que nunca mediram esforços para que todos os meus sonhos se realizassem. A eles, que deram todas as condições para o meu crescimento profissional e pessoal. A eles que estiveram ao meu lado, mesmo que algumas vezes de forma não presencial, porém em todos os momentos me apoiando e me incentivando a ser um ser humano maior e melhor.

Ao meu amor Ernesto, por compartilhar comigo seu conhecimento, sua experiência e sua dedicação. Por acompanhar pacientemente o meu crescimento profissional e pessoal. E principalmente, por ser meu grande companheiro e parceiro na vida.

A todos os meus familiares e amigos, por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso, em especial a Jêniifer, minha prima e melhor amiga, que sempre demonstrou que amizades verdadeiras são essenciais e que quando se tem bons amigos, a vida de fato, faz sentido.

A todas as pessoas que de alguma forma fazem parte da minha vida, mesmo que sutilmente, e que com certeza, contribuem para eu ser a pessoa que sou.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins**, por me proporcionar a chance de conquistar o título de Doutor e realizar um trabalho relevante para a população, que contribuirá para o bem da sociedade e para o meio científico. Por confiar em mim e no meu trabalho, e finalmente, por todos ensinamentos passados nesta caminhada.

Ao **Professor Dr. Ernesto Cesar Pinto Leal Junior**, por dar uma alternativa na minha vida profissional, me mostrando que coisas diferentes das comuns poderiam ser realizadas. Por ter me provado que quando damos o nosso melhor, trabalhamos sério e com responsabilidade, as melhores coisas podem acontecer e o esforço é recompensado. Por ter acreditado em mim e ter me proporcionado grandes aprendizados e oportunidades.

Ao **Professor Dr. Lúcio Frigo**, pelo aprendizado que me proporcionou ao longo do mestrado e do doutorado.

À técnica do nosso laboratório **Patrícia de Almeida Silva**, pelo auxílio prestado ao longo desta caminhada. Obrigada pela paciência e dedicação ao longo destes anos.

À especialista de laboratório **Dra. Simone Aparecida Teixeira**, por ter despendido horas de seu trabalho, com toda paciência e dedicação, para me auxiliar em todas as análises bioquímicas do meu trabalho, bem como, me auxiliar na correção desta tese.

Aos meus antigos colegas de laboratório **Maria Carla Petrellis e Rodney Capp Pallotta** pela ajuda e conhecimento transferidos.

Às secretarias do departamento de Farmacologia **Camila Gonçalves Trindade, Miriam Anraku e Mônica Nunes da Silva** que estiveram disponíveis para sanar qualquer dúvida e prestaram a mim, auxílio com assuntos burocráticos.

Ao funcionário do biotério **Manoel Messias Pereira da Silva** que permitiu que a amostra do meu trabalho fosse bem cuidada e estivesse nas melhores condições para minha pesquisa.

Aos meus queridos amigos **Rafael Paolo Rossi** e **Vanessa de Godoi** que me ajudaram de uma maneira inexplicável no início da minha vida em São Paulo. Que me deram um lar, me apoiaram, me ensinaram e me dedicaram todo carinho e amizade. À vocês, não tenho palavras para tamanha gratidão que sinto.

À **todas as pessoas** que estiveram de uma forma ou outra ao meu lado, família, amigos e pessoas especiais, me auxiliando de qualquer forma, acreditando e torcendo por minha vitória, e por meu sucesso, entendendo a importância e dedicação deste momento, os meus mais sinceros agradecimentos.

Meu agradecimento especial à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão da bolsa de doutorado (2011/18785-9).

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

RESUMO

TOMAZONI, S. S. **Efeitos da laserterapia de baixa potência, anti-inflamatório não esteroidal tópico e atividade física no tratamento de osteoartrite induzida por papaína.** 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Introdução: A osteoartrite (OA) é uma doença que comumente afeta os seres humanos, sendo caracterizada como um processo degenerativo que abrange as articulações. A OA afeta a cartilagem articular, osso subcondral, ligamentos, cápsula articular, membrana sinovial e músculos periarticulares. O tratamento para esta desordem se baseia em terapia farmacológica, não farmacológica e cirúrgica, isoladamente ou em combinação, a fim de maximizar os efeitos benéficos e minimizar os efeitos indesejáveis. O presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar os efeitos isolados e combinados da terapia farmacológica com anti-inflamatório não-esteroidal (AINE) de uso tópico, aos efeitos da atividade física, e por fim, aos efeitos da laserterapia de baixa potência (LBP), em um modelo experimental de OA. **Materiais e Métodos:** A OA foi induzida por injeção de papaína intra-articular no joelho direito de ratos Wistar machos. Após 21 dias os animais começaram a ser tratados com AINE de aplicação tópica e/ou com atividade física (natação) e/ou LBP. Os tratamentos foram realizados 03 vezes por semana, durante 08 semanas, perfazendo um total de 24 sessões de terapia. Foram realizadas análises bioquímicas e morfológicas da articulação do joelho, compreendendo análise histológica, contagem total de células, atividade de mieloperoxidase (MPO), RT-PCR (COX-1, COX-2, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MMP-3 e MMP-13), análise de citocinas pelo método de ELISA (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10), PGE₂ e por fim, a análise de Western-Blot (COX-1 e COX-2). **Resultados, discussão e conclusão:** Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com laserterapia de baixa potência é o mais eficiente em diminuir os danos à articulação e modular o processo inflamatório induzido pela injeção de papaína na articulação do joelho de ratos.

Palavras-chave: Osteoartrite. Papaína. Anti-inflamatório não-esteroidal tópico. Natação. Laserterapia de Baixa Potência.

ABSTRACT

TOMAZONI, S. S. **Effects of low-level laser therapy, topical non-steroidal antiinflammatory drug and physical activity on papain-induced osteoarthritis.** 2015. 100 p. [Ph.D. thesis (Pharmacology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Introduction: Osteoarthritis (OA) is a disease that commonly affects humans and it is characterized as a degenerative process that reaches joints. OA affects the articular cartilage, subchondral bone, ligaments, joint capsule, synovial membrane and periarticular muscles. The treatment for this disorder is based on pharmacological therapy, non-pharmacological therapy and surgery, alone or in combination, in order to maximize the beneficial effects and minimize side effects. This research project aims to evaluate and compare the isolated and combined effects of pharmacological therapy with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) of topical use, to effects of physical activity and finally to effects of low-level laser therapy (LLLT) in an experimental model of osteoarthritis. **Materials and Methods:** OA was induced by intra-articular injection of papain in the right knee of male Wistar rats. After 21 days animals started to be treated with topical NSAID and/or physical activity (swimming) and/or LBP. Treatments was performed 3 times per week for 8 weeks, a total of 24 therapy sessions. It was performed morphological and biochemical analysis of the knee joint, including histology, counting of total cells, activity of myeloperoxidase (MPO), RT-PCR (COX-1, COX-2, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , MMP-3 and MMP-13) cytokines analysis by ELISA (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10), PGE₂, and finally Western- Blot analysis (COX-1 and COX-2). **Results, discussion and conclusion:** The results of this project indicate that treatment with low-level laser therapy is more efficient in order to decrease damage in joint and to modulate inflammatory process induced by papain injection in rats' knee joint.

Keywords: Osteoarthritis. Papain. Non-steroidal anti-inflammatory drug. Swimming. Low level laser therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da cartilagem articular humana	20
Figura 2 - Fluxograma do estudo	36
Figura 3 - Tanque de natação utilizado no protocolo de exercício físico	38
Figura 4 - Parâmetros da LBP	40
Figura 5 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Hígido	47
Figura 6 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo OA	49
Figura 7 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Exerc	50
Figura 8 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Diclo	51
Figura 9 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo LBP	52
Figura 10 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Exerc + Diclo	54
Figura 11 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Exerc + LBP	55
Figura 12 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Diclo + LBP	56
Figura 13 - Caracterização histológica do joelho nos animais do grupo Exerc + Diclo + LBP	58
Figura 14 - Caracterização histológica do joelho de todos os grupos experimentais.....	59
Figura 15 - Contagem total de leucócitos	60
Figura 16 - Análise da atividade de MPO	61
Figura 17 - Quantificação da expressão gênica de TNF- α por RT-PCR	62
Figura 18 - Quantificação da expressão gênica de IL-1 β por RT-PCR	63
Figura 19 - Quantificação da expressão gênica de IL-6 por RT-PCR	64
Figura 20 - Quantificação da expressão gênica de IL-10 por RT-PCR	65
Figura 21 - Quantificação da expressão gênica de COX-1 por RT-PCR	66
Figura 22 - Quantificação da expressão gênica de COX-2 por RT-PCR	67
Figura 23 - Quantificação da expressão gênica de MMP-3 por RT-PCR	68
Figura 24 - Quantificação da expressão gênica de MMP-13 por RT-PCR	69
Figura 25 - Análise dos níveis de TNF- α no tecido articular dosados por meio do método de ELISA	70
Figura 26 - Análise dos níveis de IL-1 β no tecido articular dosados por meio do método de ELISA	71
Figura 27 - Análise dos níveis de IL-6 no tecido articular dosados por meio do método de ELISA	72

Figura 28 - Análise dos níveis de IL-10 no tecido articular dosados por meio do método de ELISA.....	73
Figura 29 - Análise dos níveis de PGE ₂ dosador por meio do método de ELISA	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de adaptação ao exercício físico	39
Tabela 2 - Protocolo do exercício físico	39
Tabela 3 - Classificação dos achados histológicos através do escore	42
Tabela 4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados na expressão de mRNA por meio de RT-PCR ..	44
Tabela 5 - Escore dos achados histológicos do grupo Hígido	48
Tabela 6 - Escore dos achados histológicos do grupo OA	49
Tabela 7 - Escore dos achados histológicos do grupo Exerc	50
Tabela 8 - Escore dos achados histológicos do grupo Diclo	52
Tabela 9 - Escore dos achados histológicos do grupo LBP	53
Tabela 10 - Escore dos achados histológicos do grupo Exerc + Diclo	54
Tabela 11 - Escore dos achados histológicos do grupo Exerc + LBP	55
Tabela 12 - Escore dos achados histológicos do grupo Diclo + LBP	57
Tabela 13 - Escore dos achados histológicos do grupo Exerc + Diclo + LBP	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D- CT – tomografia computadorizada em 3 dimensões
AINEs – anti-inflamatório não-esteroidal
ANOVA – análise de variância
BSA – albumina sérica bovina
cDNA – DNA complementar
COX – ciclooxigenase
DNA – ácido desoxirribonucleico
ELISA – ensaio imunoenzimático
EROs – espécies reativas de oxigênio
HPRT – hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
HE – hematoxilina e eosina
HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônia
IGF- 1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL – interleucinas
LBP – laserterapia de baixa potência
OA – osteoartrite
MMP – metaloproteinase da matriz
MPO - mieloperoxidase
NO – óxido nítrico
PGE₂ – prostaglandina E₂
RNA – ácido ribonucleico
RT- PCR – reação em cadeia de polimerase em tempo real
TENS – estimulação nervosa elétrica transcutânea
TGF- β – fator de transformação do crescimento β
TMB – 3.3'5.5' tetrametilbenzidina
TNF- α – fator de necrose tumoral
UA – unidade de absorvância

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – celsius

μg – micrograma

μl – microlitro

μM – micromolar

μm – micrometro

μmol – micromol

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

g – grama

GaAlAs – arseneto de gálio-alumínio

GaAs – arseneto de gálio

h – horas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HeNe – hélio neônio

J – joules

M – mol

max – máxima

mg – miligrama

mM – milimolar

min – minuto

ml - mililitro

mW – miliwatt

NaCl – cloreto de sódio

nm – nanômetro

pg – picogramas

pH – potencial de hidrogênio

rpm – rotação por minuto

seg - segundo

v – velocidade

W - watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Osteoartrite</i>	19
2.2 <i>Modelo experimental de indução de OA por meio de papaína</i>	22
2.3 <i>Terapias utilizadas no tratamento de OA</i>	23
2.3.1 Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais	24
2.3.2 Exercício físico	26
2.3.3 Laserterapia de baixa potência	28
3 HIPÓTESE DE PESQUISA	32
4 OBJETIVOS	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 <i>Animais</i>	34
5.2 <i>Grupos experimentais</i>	34
5.3 <i>Procedimentos</i>	36
5.3.1 Indução de OA de joelho	36
5.3.2 Aplicação do anti-inflamatório não-esteroidal	37
5.3.3 Protocolo de exercício físico	37
5.3.4 Aplicação da LBP	40
5.3.5 Coleta do lavado intra-articular	40
5.3.6 Coleta do tecido articular	41
5.3.7 Coleta de plasma sanguíneo	41
5.4 <i>Análises</i>	41
5.4.1 Análise histológica por microscopia de luz (microscopia óptica)	41
5.4.2 Contagem total de leucócitos	42
5.4.3 Análise da atividade de MPO	42
5.4.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR	43
5.4.5 Análise dos níveis de citocinas presentes no tecido articular dosados por meio do método de ELISA	44
5.4.6 Avaliação dos níveis de prostaglandina E ₂ presentes no plasma sanguíneo dosados por meio do método de ELISA	45
5.5 <i>Análise estatística</i>	46
6 RESULTADOS	47

6.1 Caracterização histológica da articulação do joelho por coloração HE e escore dos achados histológicos	47
6.2 Contagem total de leucócitos	59
6.3 Análise da atividade de MPO	60
6.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR	61
6.4.1 Quantificação da expressão gênica de TNF- α por RT-PCR	61
6.4.2 Quantificação da expressão gênica de IL-1 β RT-PCR	62
6.4.3 Quantificação da expressão gênica de IL-6 por RT-PCR	63
6.4.4 Quantificação da expressão gênica de IL-10 por RT-PCR	64
6.4.5 Quantificação da expressão gênica de COX-1 por RT-PCR	65
6.4.6 Quantificação da expressão gênica de COX-2 por RT-PCR	66
6.4.7 Quantificação da expressão gênica de MMP-3 por RT-PCR	67
6.4.8 Quantificação da expressão gênica de MMP-13 por RT-PCR	68
6.5 Análise dos níveis de citocinas dosados por meio do método de ELISA	69
6.5.1 Análise dos níveis de TNF α no tecido articular	69
6.5.2 Análise dos níveis de IL-1 β no tecido articular	70
6.5.3 Análise dos níveis de IL-6 no tecido articular	71
6.5.4 Análise dos níveis de IL-10 no tecido articular	72
6.6 Análise dos níveis de PGE₂ dosados por meio do método de ELISA	73
7 DISCUSSÃO	75
8 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é a forma de artrite que mais acomete os seres humanos (TSANG, 1990), sendo caracterizada como uma doença degenerativa que atinge as articulações, principalmente joelho e quadril (ESCALANTE et al., 2010). Múltiplos são os fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença (SEED et al., 2011), incluindo obesidade, idade avançada associada com depósito intra-articular de cristais, desalinhamento e/ou instabilidade articular, fraqueza muscular, além de neuropatia periférica (GOLDRING; GOLDRING, 2007). Entretanto, independente da etiologia envolvida na OA, os resultados clínicos, morfológicos e biológicos são similares em todos os casos (BRANDT et al., 1986).

A partir de todas as alterações metabólicas, bioquímicas, morfológicas e biomecânicas desencadeadas pela doença, pacientes com OA apresentam um quadro clínico de dor e sensibilidade articular, limitação de movimento, crepitação, graus variados de inflamação sem efeitos sistêmicos (KUETTNER; GOLDBERG, 1995) e consequentemente, dificuldades na realização de atividades de vida diária.

As diversas terapias que podem ser utilizadas no tratamento de OA, tem como principais objetivos controlar os sintomas, prevenir a progressão da doença, minimizar a incapacidade funcional e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (SEED et al., 2011). O tratamento para OA divide-se em três categorias principais: farmacológico, não farmacológico e cirúrgico, podendo estes, ser aplicados isoladamente ou de maneira combinada (ESCALANTE et al., 2010).

Entre as três possíveis linhas de tratamento para a OA, o não farmacológico inclui a educação do paciente em relação a doença, alimentação adequada e perda de peso, atividade física, fisioterapia e terapia ocupacional, dispositivos de assistência ao paciente (como o uso de muletas, por exemplo) (SEED et al., 2011) e terapias complementares, como a acupuntura, estimulação nervosa elétrica transcutânea (TENS) (JAMTVEDT et al., 2008) e laserterapia de baixa potência (LBP) (HEGEDUS et al., 2009).

O tratamento farmacológico é utilizado para aliviar a dor em casos leves e moderados de OA. O tratamento inclui principalmente o uso de acetaminofeno e outros AINEs, a despeito dos importantes efeitos adversos destas drogas (ZHANG et al., 2004). Além desses agentes, podem ser utilizados analgésicos e anti-inflamatórios tópicos, glucosamina e condroitina, fármacos opióides, agentes modificadores da doença e injeções intra-articulares de glicocorticoides e ácido hialurônico (SEED et al., 2011).

Por fim, o tratamento cirúrgico deve ser utilizado apenas como última estratégia para diminuição da sintomatologia em pacientes com OA, que sejam resistentes e refratários a métodos menos invasivos. Entretanto, não há nenhuma evidência que o tratamento cirúrgico seja mais eficaz que os tratamentos não-cirúrgicos (MOSELEY et al., 2002), além da existência dos riscos de complicações iminentes a qualquer cirurgia (SEED et al., 2011).

Apesar de encontrarmos na literatura diversas opções de tratamentos para a OA, poucos estudos fazem a associação de mais de uma terapia visando aumentar a eficácia e minimizar os possíveis efeitos indesejados do tratamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Osteoartrite

As articulações são estruturas constituídas por duas superfícies ósseas e recobertas por uma membrana sinovial, formando a cápsula articular. Os sinoviócitos (células do tecido sinovial) produzem o líquido sinovial, responsável por preencher a cápsula articular e promover a lubrificação da articulação, desse modo reduzindo o atrito e facilitando o movimento. Já a cartilagem articular, é uma estrutura resistente e elástica que recobre a superfície dos ossos que compõe a articulação, sendo composta predominantemente por matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico) e condrócitos, e sua manutenção dependerá do equilíbrio entre as atividades catabólicas e anabólicas (HAUPT et al., 2005). Na figura 1 podemos observar a estrutura da cartilagem articular humana, demonstrando as zonas de distribuição celular e pericelular e organização da matriz (POOLE et al., 2001).

Figura 1 – Estrutura da cartilagem articular humana.

FONTE: Adaptado de Poole et al, 2001.

A OA é a forma de artrite mais comumente encontrada em humanos (TSANG, 1990), sendo caracterizada como uma doença degenerativa que atinge as articulações, principalmente joelho e quadril (ESCALANTE et al., 2010). A OA de joelho pode ser observada radiograficamente em 33% da população com mais de 60 anos de idade, sendo responsável por aumento na incidência de incapacidade das pessoas acometidas, em relação a qualquer outra condição crônica (BOSOMWORTH, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a osteoartrite já está entre as dez doenças mais incapacitantes em países desenvolvidos. Estimativas mundiais apontam que 9.6% dos homens e 18.0% das mulheres com mais de 60 anos apresentam osteoartrite sintomática. 80% das pessoas acometidas por osteoartrite apresentarão limitação de

movimento e 25% não podem realizar grandes atividades de vida diária (WORLD HEALTH ORGANIZATION).

Múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento da OA, como por exemplo, carga excessiva e lesões. A idade avançada, obesidade, atividades realizadas no passado, participação em determinadas atividades esportivas, trauma na articulação e histórico familiar, compreendem os fatores de risco mais frequentes envolvidos na etiologia dessa doença (SEED et al., 2011). Entretanto, independente da etiologia envolvida na OA, os resultados clínicos, morfológicos e biológicos são similares em todos os casos (BRANDT et al., 1986).

A OA é um processo degenerativo que afeta a articulação como um todo, podendo afetar tanto cartilagem articular, osso subcondral, ligamentos, cápsula articular, membrana sinovial e músculos periarticulares (KUETTNER; GOLDBERG, 1995). Os efeitos sobre esses componentes da articulação manifestam-se através da ruptura da cartilagem articular, formação de osteófitos, esclerose subcondral, alterações na membrana sinovial (KRASNOKUTSKY et al., 2007), inflamação sinovial variável e aumento do fluxo sanguíneo metafisário (BRANDT et al., 1986; KRASNOKUTSKY et al., 2007).

Sinais metabólicos e de degradação, como a produção de mediadores inflamatórios e ativação da cascata de citocinas, são aspectos importantes envolvidos na patogenia da cartilagem nos casos de OA. Pacientes com OA produzem níveis elevados de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico, adicionalmente ocorre a diminuição na síntese de colágeno e aumento nas proteases degradativas, incluindo metaloproteinases da matriz (MMPs) (KRASNOKUTSKY et al., 2007).

A inflamação sinovial na OA é responsável por causar dano às estruturas adjacentes, fazendo com que haja liberação de proteinases e citocinas, acelerando o processo de destruição de cartilagem (KRASNOKUTSKY et al., 2007). Além disso, na OA há formação de osteófitos e espessamento do osso subcondral, no entanto, os mediadores inflamatórios envolvidos no processo da doença, especificamente nos danos causados ao osso, não estão bem elucidados. Parece haver contribuição do óxido nítrico, sendo responsável por alterações no osso subcondral, além de haver produção elevada de fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e TGF- β (KRASNOKUTSKY et al., 2007).

Além das alterações bioquímicas e metabólicas, a OA é responsável por desencadear alterações morfológicas, como a fragmentação da superfície e formação de fendas verticais na cartilagem, deposição variável de cristais, e remodelamento ósseo e da cartilagem. Entre as

alterações biomecânicas decorrentes dessa doença, pode ser observada alteração das propriedades mecânicas de tração, compressão e cisalhamento e da permeabilidade hidráulica da cartilagem, provocando edema excessivo (BRANDT et al., 1986).

A partir de todas as alterações metabólicas, bioquímicas, morfológicas e biomecânicas desencadeadas pela doença, pacientes com OA apresentam quadro clínico de dor e sensibilidade articular, limitação de movimento, crepitação, graus variados de inflamação sem efeitos sistêmicos (KUETTNER; GOLDBERG, 1995) e consequentemente, dificuldade na realização de atividades de vida diária. Sendo assim, esta desordem frequentemente progride para a incapacidade, especialmente em pacientes idosos (GUCCIONE et al., 1990).

Dessa forma, o tratamento para OA se torna inevitável, sendo que o mesmo divide-se em três categorias principais: farmacológico, não farmacológico e cirúrgico, podendo estes, ser aplicados isoladamente ou de maneira combinada (ESCALANTE et al., 2010).

2.2 Modelo experimental de indução de OA por meio de papaína

A OA tem atraído crescente interesse na área da pesquisa científica, fazendo com que uma série de estudos relacionados a essa doença estejam sendo realizados. Diversos métodos têm sido desenvolvidos e testados para induzir a OA de maneira artificial em animais (CHO et al., 2004), como coelhos, cães, equinos, ovelhas, camundongos e ratos (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; BAI et al., 2002; BROWN et al., 1998; CLEMMONS et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2014; PALLOTTA et al., 2012). Dentre os métodos utilizados para indução de OA podemos citar a injeção de papaína (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; BROWN et al., 1998; DA ROSA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014; TANAKA et al., 1992;), fluoresceína (OEGEMA e al., 1997), colagenase (KIKUCHI et al., 1998; VAN DEN BERG, 2001) e outros (BAI et al., 2002; HASHIMOTO et al., 2002; PALLOTTA et al., 2012; RATKAY et al., 1994;).

Como citado anteriormente, uma diversidade de estudos têm utilizado o modelo de indução de OA através da papaína (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; DOS SANTOS et al., 2014; HUANG et al., 1997; MURAT et al., 2007;). A papaína é uma enzima proteolítica extraída dos frutos do mamão, que pode ser utilizada com eficácia na indução experimental de OA, pois é responsável por liberar sulfato de condroitina do complexo polissacarídeo-proteína da matriz articular da cartilagem (HUANG et al., 1997).

O estudo de Murat et al. (2007) avaliou a progressão das alterações estruturais decorrentes do uso intra-articular de papaína no joelho de ratos. Para a indução de OA, foram

realizadas 3 injeções intra-articulares (com intervalo de dois dias entre elas) de uma solução de papaína com M cisteína (utilizada como ativador). A coleta de material amostral (articulação do joelho) foi realizada uma, duas e quatro semanas após a última injeção de papaína. Através da análise histopatológica do material, observou-se hipercelularidade, incluindo aglomerados de células e coloração reduzida na zona de transição entre a cartilagem não calcificada e a cartilagem calcificada (*Zona Tidemark*) nos animais sacrificados uma semana após a última injeção de papaína. Nos animais sacrificados duas semanas após a última injeção de papaína, observou-se superfície articular irregular, fibrilação, irregularidade e dilatação das células na superfície articular (zona superficial) e hipocelularidade nas zonas intermediária e profunda da cartilagem articular, além da presença de fenda na transição entre cartilagem não calcificada e cartilagem calcificada (*Tidemark*). Nos animais sacrificados quatro semanas após a última injeção de papaína, observou-se fibrilação, irregularidade e dilatação das células na zona superficial da cartilagem, hipocelularidade nas zonas intermediária e profunda, e presença de fenda na transição da cartilagem não calcificada e cartilagem calcificada (*Tidemark*). Murat et al. (2007) concluíram que o grau de degeneração da cartilagem pelo uso de papaína foi diretamente proporcional ao tempo decorrido após a indução de OA. Segundo Murat et al. (2007) após duas semanas da injeção intra-articular de papaína, já podem ser observadas alterações condizentes a um estágio inicial de OA.

A utilização de um modelo experimental animal validado permite a realização de estudos mais aprofundados sobre a patogênese, a etiologia e possíveis tratamentos para a OA. Isso acontece pelo fato dos animais apresentarem características mais homogêneas se comparados aos humanos. Existem estudos histopatológicos reportando que a injeção de papaína, em animais, induz a OA de forma muito semelhante a encontrada em seres humanos (ABATANGELO et al., 1989; KIKUCHI et al., 1998).

2.3 Terapias utilizadas no tratamento de OA

Diversas terapias podem ser utilizadas no tratamento de OA, sendo que os principais objetivos são controlar os sintomas, prevenir a progressão da doença, minimizar a incapacidade funcional e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (SEED et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, podem ser utilizados tratamentos não farmacológico, farmacológico e cirúrgico para o controle da doença. Entre as três linhas de tratamento, o não farmacológico inclui a educação do paciente em relação a doença, alimentação adequada e perda de peso, atividade física, fisioterapia e terapia ocupacional,

dispositivos de assistência ao paciente (como o uso de muletas, por exemplo) (SEED et al., 2011) e terapias complementares, como a acupuntura, estimulação nervosa elétrica transcutânea (TENS) (JAMTVEDT et al., 2008) e laserterapia de baixa potência (LBP) (HEGEDUS et al., 2009).

O tratamento farmacológico é utilizado para aliviar a dor em casos leves e moderados de OA. O tratamento inclui principalmente o uso de acetaminofeno e AINEs, a despeito dos importantes efeitos adversos destas drogas (ZHANG et al., 2004). Além desses agentes, podem ser utilizados analgésicos e anti-inflamatórios tópicos, glucosamina e condroitina, fármacos opióides, agentes modificadores da doença e injeções intra-articulares de glicocorticoides e ácido hialurônico (SEED et al., 2011).

Por fim, o tratamento cirúrgico deve ser utilizado apenas como última estratégia para diminuição da sintomatologia em pacientes com OA, que sejam resistentes e refratários a métodos menos invasivos. Entretanto, não há nenhuma evidência que o tratamento cirúrgico seja mais eficaz que os tratamentos não-cirúrgicos (MOSELEY et al., 2002), além da existência dos riscos de complicações iminentes a qualquer cirurgia (SEED et al., 2011).

Apesar de encontrarmos na literatura diversas opções de tratamentos para a OA, poucos estudos fazem a associação de mais de uma terapia visando aumentar a eficácia e minimizar os possíveis efeitos indesejados do tratamento. Segundo Rompe et al. (2008), a ausência de estudos de boa qualidade pode levar a incertezas e dificuldades de escolha em relação ao melhor tratamento a ser empregado.

2.3.1 Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são os fármacos mais amplamente prescritos no mundo inteiro, constituindo um grupo heterogêneo e possuindo ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória, sendo largamente utilizados em casos de febre e dor aguda ou crônica (LITALIEN; JACQZ-AIGRAIN, 2001).

O tratamento farmacológico para pacientes com OA normalmente costuma ser baseado inicialmente no uso de acetaminofeno, progredindo para a utilização de outros AINEs clássicos ou agentes seletivos para COX-2 (FULLER; ROTH, 2011). A terapia com esses fármacos representa a base do tratamento farmacológico, embora sua eficácia seja discutível (BJORDAL et al, 2004; TANNENBAUM et al., 2006). Em uma meta-análise Bjordal et al. (2004) analisaram mais de 13.000 pacientes com relação a patologias inflamatórias crônicas e utilização de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, incluindo

drogas de última geração como os coxibs. Neste estudo, os autores demonstraram que em patologias inflamatórias de longa duração, drogas anti-inflamatórias apresentaram efeito ligeiramente superior ao placebo, e que este fato não suporta o uso de tais drogas nas referidas patologias, principalmente se levados em conta os efeitos adversos apresentados por estes fármacos. Este artigo suscitou grande interesse na comunidade científica e não científica, a respeito da utilização de novas terapias em patologias inflamatórias de longa duração, bem como, a comprovação de sua eficácia terapêutica. Sendo assim, a investigação de novas terapias para utilização em patologias inflamatórias de longa duração, principalmente aquelas não farmacológicas, assume papel de destaque na área médica, onde a maioria dos fármacos existentes não apresenta evidências científicas que suportem sua eficácia.

O uso tópico de AINEs passou a ser uma alternativa potencialmente mais segura para o tratamento de OA, já que quando aplicados topicamente, penetram lentamente e em quantidades pequenas na circulação (HEYNEMAN et al., 2000), fazendo assim, com que haja diminuição da exposição sistêmica do fármaco ao organismo. Ao mesmo tempo, o uso tópico provoca aumento da concentração do fármaco no tecido alvo, diminuindo dessa forma a ocorrência de efeitos indesejáveis sistêmicos (MOORE et al., 2008). A biodisponibilidade e a máxima concentração plasmática após a aplicação de um AINE de uso tópico, geralmente é menor do que 5% e 15%, respectivamente, em comparação com a administração de um AINE oral equivalente (HEYNEMAN et al., 2000).

A utilização de AINEs de uso tópico pode representar um impacto não apenas sobre as taxas de absorção, mas também na profundidade de penetração que o fármaco poderá alcançar. Em comparação com a administração por via oral, a aplicação tópica leva a uma concentração elevada de AINE na derme, enquanto a concentração do fármaco no tecido abaixo do local da aplicação é variável, entretanto sendo equivalente a obtida com a administração oral (HEYNEMAN et al., 2000). O diclofenaco é o AINE mais frequentemente prescrito e utilizado na terapia da OA, sendo que o fármaco utilizado topicamente, é reconhecido por ser amplamente utilizada nos sinais e sintomas da OA de joelho (TANNENBAUM et al., 2006).

Alguns estudos potencialmente relevantes para o tratamento de OA de joelho testaram a eficácia de AINEs de uso tópico (BRÜHLMANN; MICHEL, 2003; DREISER; TISNE-CAMUS, 1993; GRACE et al., 1999). Nestes estudos, houve a comparação entre diclofenaco na forma de gel ou emplastro, ou seja, de aplicação tópica, versus aplicação placebo. Os resultados demonstraram que ambos os grupos (diclofenaco e placebo) apresentaram melhora em comparação a um grupo controle, entretanto, o grupo diclofenaco apresentou alterações

estatisticamente significantes em relação ao grupo placebo, sugerindo assim, que a terapia com AINE aplicado topicamente é eficaz no tratamento de pacientes com OA de joelho.

Dessa forma, torna-se cada vez mais importante a realização de estudos que utilizem AINE tópico no tratamento da OA, visando diminuir os sinais e sintomas decorrentes desta desordem, com o mínimo de efeitos indesejáveis possíveis.

2.3.2 Exercício físico

O exercício físico em pacientes acometidos por OA pode propiciar melhora importante dos fatores desencadeadores de incapacidade. Na realidade, são poucas as terapias que apresentam habilidade tão multifacetada como o exercício físico. Por exemplo, um treinamento de resistência demonstrou ser efetivo em melhorar não apenas a força muscular em pacientes com OA de joelho (O'REILLY et al., 1999), mas também a sua propriocepção e capacidade funcional (HURLEY; SCOTT, 1998).

Os benefícios do exercício físico para saúde de pessoas acometidas por OA estão bem estabelecidos, incluindo a prevenção da obesidade (fator de risco para o desenvolvimento de OA), retardo na limitação física e funcional e preservação das articulações sadias (HOOTMAN et al., 2003).

Além disso, o exercício físico pode ser importante para melhorar a amplitude de movimento da articulação do paciente acometido por OA e o seu condicionamento cardiovascular. Adicionalmente, pode ser responsável por abrandar as comorbidades frequentemente associadas a esta doença, como diabetes e hipertensão (SEALS et al., 1984; CAMPBELL et al., 1994;).

Exercícios físicos moderados como a dança, natação, caminhadas e ciclismo são recomendadas para pessoas que apresentam OA de joelho (HOOTMAN et al., 2003). A eficácia do exercício físico na OA de joelho está atribuída a habilidade de reverter a disfunção sensorio-motora do músculo (fraqueza, fadiga e controle motor debilitado), prevenindo movimentos anormais e promovendo a restauração da biomecânica normal da articulação, dessa forma, proporcionando uma marcha mais adequada, melhorando a função e permitindo o alívio da dor (HURLEY; WALSH, 2009).

O estudo de Siebelt et al. (2014) avaliou se a realização de exercícios físicos moderados seria capaz de beneficiar a articulação do joelho de ratos, com depleção de sulfato de glicosamina, decorrente de injeção de papaína. Ou, se os exercícios físicos moderados aumentariam a suscetibilidade da cartilagem à degeneração. Os animais foram submetidos a

um protocolo de corrida (nos primeiros 5 minutos a uma velocidade de 20 cm/seg, e nos 25 minutos seguintes, a uma velocidade de 35 cm/seg) realizado uma vez por dia, durante 6 semanas. Os resultados observados demonstraram que a prática de exercícios físicos moderados em ratos submetidos à indução de OA por uso de papaína, aumenta a progressão da doença e não protege contra o desenvolvimento da OA, sendo observado dano à cartilagem, esclerose subcondral, ativação de macrófagos sinoviais e formação de osteófitos na articulação destes animais.

De acordo com Racunica et al. (2007) a prática de exercício físico vigoroso tem sido associada com melhora na integridade das articulações em pessoas com idade entre 50 e 79 anos. Esse fato pôde ser confirmado pelo estudo de Ding et al. (2010), o qual reportou que mulheres que praticam caminhadas regulares, tem menor propensão a apresentar os sinais iniciais condizentes com o desenvolvimento de OA, como por exemplo, a degeneração da cartilagem articular. Adicionalmente, apesar de haver conflitos sobre o papel que a força do músculo quadríceps exerce na OA de joelho, idosos que apresentam maior massa muscular, presumivelmente em decorrência da prática de exercício físico regular, apresentaram diminuição de perda de cartilagem, sugerindo dessa forma, que o aumento da força e massa muscular podem ser responsáveis por proteger as articulações de doenças articulares degenerativas (DING et al., 2010).

Segundo recente revisão sistemática, com meta-regressão de ensaios clínicos randomizados controlados, a terapia com exercícios físicos é eficiente em reduzir dor em pacientes com OA (JUHL et al., 2014). Entretanto ainda existe grande controvérsia em relação ao tipo de exercício a ser executado (aeróbico, fortalecimento, etc.), intensidade, duração e quantidade de sessões de exercício por semana (EGAN; MENTES, 2010; JUHL et al., 2014). A partir da análise dos estudos incluídos na revisão sistemática realizada por Juhl et al. (2014), foi concluído que o programa ideal de exercício físico para OA de joelho deve ser focado na melhora da capacidade aeróbia, na força do músculo quadríceps e em melhor desempenho dos membros inferiores. Para melhores resultados, o programa de exercício deve ser supervisionado, realizado 3 vezes por semana e ter a duração de, no mínimo, 12 semanas (JUHL et al., 2014). Entretanto, por ainda não haver um consenso em relação ao melhor programa de treinamento para pessoas idosas e acometidas por OA, faz-se necessário a realização de mais estudos que investiguem os exercícios ideais para estes pacientes.

2.3.3 Laserterapia de baixa potência

O termo LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. O laser foi desenvolvido na década de 1960, sendo uma luz com propriedades especiais como monocromaticidade e baixa divergência. A laserterapia de baixa potência (LBP) consiste na aplicação de luz (geralmente um laser de baixa potência na faixa de 1 mW – 500 mW) a uma doença. A luz é tipicamente de faixa espectral estreita, indo do espectro vermelho ao infravermelho próximo (600 nm-1000 nm) (HUANG et al., 2009), podendo ser administrada com diferentes comprimentos de onda: HeNe (632,8 nm), Ga-Al-As (805 ou 650 nm) e Ga-As (904 nm) (ORON et al., 2007), com uma densidade de potência (irradiância) entre 1 mW a 5W/cm² (HUANG et al., 2009).

A LBP tem sido utilizada no tratamento de lesões teciduais e em processos inflamatórios desde a década de 60. Entretanto, o primeiro ensaio clínico randomizado investigando os efeitos da LBP em distúrbios do sistema músculo-esquelético foi realizado nos anos 80 e avaliou os efeitos da LBP em pacientes com artrite reumatoide (GOLDMAN et al., 1980). Desde então, o tratamento clínico utilizando irradiação de LBP tem atraído atenção, fazendo com que haja extensa variedade de estudos utilizando a terapia em condições dolorosas, neurogênicas e musculoesqueléticas (ROCHKIND et al., 2001; WALKER et al., 2000). Estudos recentes vêm demonstrando que a LBP promove regeneração tecidual, modulação da inflamação e alívio da dor (HUANG et al., 2009).

A LBP demonstrou possuir capacidade para reduzir a duração da fase aguda da inflamação (PESSOA et al., 2004) e acelerar o reparo tecidual em lesões de tendão e músculo (BIBIKOVA; ORON, 1993), além de ser utilizada para o tratamento de dor muscular (CHOW et al., 2005). Em ambiente clínico, a LBP tem demonstrado alguns resultados positivos em cervicalgias e em condições como fibromialgia (GÜR, 2002) que podem estar relacionadas à fadiga do músculo esquelético (LEAL JUNIOR et al., 2009). A vantagem terapêutica da LBP nas doenças inflamatórias tem sido sugerida por diversos autores (BJORDAL et al., 2003; BLIDDAL et al., 1987). Entretanto, os parâmetros ideais de sua aplicação não estão completamente estabelecidos (CHOW et al., 2009).

Ao longo do tempo observou-se que a LBP apresenta padrão bifásico de dose-resposta. Isto significa que doses intermediárias situadas em uma “janela terapêutica” desencadeiam efeitos de estimulação no tecido biológico, enquanto doses abaixo e/ou acima desta janela não desencadeiam efeito algum (CHOW et al., 2009; HUANG et al., 2009; LEAL JUNIOR et al., 2010). Porém, as “janelas terapêuticas” variam de acordo com a desordem a

ser tratada (WALT, 2011). Da mesma forma, a potência e o tempo de irradiação empregados na terapia são parâmetros extremamente importantes para obtenção dos melhores resultados da terapia. Sabe-se que tempos de irradiação curtos e potência de aplicação demasiadamente baixa ou alta também podem levar a resultados nulos (WALT, 2011).

A reparação do tecido é um processo interativo e dinâmico, que envolve algumas mudanças bioquímicas e celulares (SILVEIRA et al., 2009). A LBP tem sido amplamente utilizada nas ciências biomédicas com a finalidade de promover a regeneração tecidual, já que diversos estudos demonstram que o processo cicatricial é aprimorado com o uso de LBP (LILGE et al., 2000; SCHLAGER et al., 2000;). A cicatrização muscular apresenta 3 fases: destruição, proliferação e remodelamento do tecido. Estudos vêm demonstrando que a bioestimulação produzida pela LBP é o efeito primário durante a fase de proliferação no processo de cicatrização muscular (O'BRIEN et al., 1998; YU et al., 1997). A nível celular, a fotoirradiação em baixa potência causa efeitos biológicos significantes, como as proliferações celulares (supraticidas), síntese de colágeno, liberação de fatores de crescimento celular e estimulação de macrófagos e linfócitos (O'BRIEN et al., 1998; YU et al., 1997).

Efeitos positivos da LBP podem estar relacionados com a modulação da cadeia oxidativa. A pesquisa de Lubart et al. (2005) demonstrou que a LBP pode alterar a atividade redox celular, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) ou aumentando a capacidade de redução celular, promovendo processos fotobioestimulativos.

De acordo com o estudo de Silveira (2009), a laserterapia de baixa potência aplicada após lesão muscular aumenta a atividade da cadeia respiratória mitocondrial dos complexos I, II, III e IV, e succinato desidrogenase. Os resultados enfatizam que o tratamento com LBP pode induzir um aumento na síntese de ATP e que este pode acelerar o processo de cicatrização muscular.

Em muitos estudos, o laser de baixa potência tem sido utilizado como uma modalidade terapêutica não invasiva que tem demonstrado melhorar a vasodilatação e a circulação periférica, aumentar os níveis de capacidade de oxigênio no tecido e aumentar ATP mitocondrial (IHSAN, 2005; ORON et al., 2007).

Como citado anteriormente, muitos métodos são utilizados para o tratamento da OA (ESCALANTE et al., 2010), entretanto a grande maioria desses métodos apresentam complicações ou efeitos adversos, fazendo-se necessário o desenvolvimento de fármacos ou técnicas de tratamento que não sejam prejudiciais e não provoquem nenhum tipo de efeito colateral (TIMOFEYEV et al., 2001). Dessa forma, tem sido crescente o interesse e a

preferência na prescrição do uso de LBP, por se tratar de uma terapia não invasiva e alternativa a outros métodos de tratamento para a OA (CHO et al., 2004).

Atualmente há aumento no reconhecimento de que a LBP pode ter efeitos fisiológicos mediados por ações fotoquímicas a nível celular (HERMAN; KHOSLA, 1988). Tem sido demonstrado em modelos de experimentação animal que a LBP pode regular a proliferação de condrócitos, proteoglicanos, colágeno, proteínas não colágenas e síntese de DNA (HERMAN; KHOSLA, 1988; SCHULTZ et al., 1985).

O estudo de Cho et al. (2004) procurou determinar se a LBP seria capaz de recuperar o dano à cartilagem em articulações de coelhos acometidas por OA induzida. Para isso, foram realizadas as análises de atividade de superóxido dismutase, radiografias simples, imagens em 3D-CT, análise histopatológica e aparência da superfície articular e tecidos moles periarticulares. Os resultados demonstraram que a LBP foi efetiva no tratamento da OA, porém a melhora significativa foi observada apenas após 4 semanas de tratamento.

Já um estudo duplo-cego, randomizado e placebo-controlado realizado por Hegedus et al. (2009), teve como objetivo avaliar os efeitos da LBP no alívio da dor, além de possíveis alterações micro circulatórias (observadas por meio de termografia) em pacientes com OA de joelho. Neste estudo, o tratamento com LBP ocorreu duas vezes por semana, durante 4 semanas consecutivas, utilizando laser com comprimento de onda de 830 nm, em modo contínuo, potência de 50 mW e energia de 6 Joules por ponto. Os resultados demonstraram que a LBP foi capaz de melhorar a microcirculação na área irradiada e diminuir a dor em pacientes com dores leve ou moderada decorrentes de OA de joelho.

Nos últimos anos, estudos têm analisado os efeitos da LBP sobre a OA induzida pelo uso de papaína em ratos (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; DA ROSA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014). Os resultados encontrados apontam que a laserterapia de baixa potência é efetiva em estimular angiogênese, reduzir a formação de fibrose, reparar o tecido (diminuindo a expressão de colágeno tipo III e aumentando a expressão de colágeno tipo I), reduzir a quantidade de metaloproteinases da matriz (MMPs), reduzir a quantidade de células inflamatórias e diminuir a expressão de citocinas inflamatórias, dessa forma, demonstrando que a LBP é capaz de reduzir a degradação do tecido articular, modular o processo inflamatório decorrente da OA e possivelmente, auxiliar no reparo tecidual.

A partir dos efeitos observados, tanto em estudos com animais quanto em estudos clínicos, acredita-se que a LBP seja uma terapia interessante no tratamento de OA, sendo uma alternativa mais segura comparada ao uso de anti-inflamatórios não- esteroidais. Entretanto, faz-se cada vez mais necessário a realização de estudos, para determinar os parâmetros ideais

e mais eficazes no tratamento da OA, e assim, poder consolidar o uso de LBP em pacientes afetados por OA.

3 HIPÓTESE DE PESQUISA

Com base em estudos anteriores envolvendo tratamentos farmacológicos, não farmacológicos e cirúrgicos em casos de OA, apresentamos a hipótese de que a LBP associada à realização de atividade física, acarretará em modulação do processo inflamatório decorrente desta desordem, levando a uma diminuição significativa de marcadores inflamatórios e características típicas decorrentes da OA. Dessa forma, promovendo possível redução da dor e melhora da funcionalidade da articulação envolvida, sem a presença de efeitos adversos comumente observados com o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais.

4 OBJETIVOS

Com estes fatores em mente, o presente projeto de pesquisa tem como objetivos:

1. Avaliar e comparar os efeitos da LBP, exercício físico e uso de AINE com aplicação tópica, sobre a OA de joelho de ratos, induzida por injeção de papaína.
2. Avaliar e comparar os efeitos da associação do tratamento com LBP e exercício físico, LBP e AINE com aplicação tópica, exercício físico e AINE, e por fim, LBP associada ao exercício físico e ao AINE com aplicação tópica, sobre a OA de joelho de ratos, induzida por injeção de papaína

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando em torno de 200-250 g, com oito a dez semanas de vida, provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura (22 a 24 °C), umidade relativa (40 a 60%), ciclo de 12 horas claro-escuro, com água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), sob o número 077, nas folhas 130 do livro 02.

5.2 Grupos Experimentais

Os animais foram randomizados e divididos em grupos experimentais de 6 animais por grupo como descrito a seguir:

- **Grupo Hígido** – os animais não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento ou tratamento.
- **Grupo Controle/Osteoartrite (OA)** – os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito, entretanto não receberam nenhum tipo de tratamento.
- **Grupo Osteoartrite + Laser (LBP)** – os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento com LBP. A aplicação da LBP foi realizada em 1 único ponto da articulação, uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.
- **Grupo Osteoartrite + Exercício (Exerc)** – os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento através de exercício físico (natação). Os animais foram submetidos à natação uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.
- **Grupo Osteoartrite + Diclofenaco Sódico tópico (Diclo)** - os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento com diclofenaco sódico de aplicação tópica na articulação, uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.
- **Grupo Osteoartrite + Exercício + Laser (Exerc + LBP)** - os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento através de

exercício físico (natação), seguido por tratamento com LBP aplicado em 1 único ponto da articulação, uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.

- **Grupo Osteoartrite + Diclofenaco Sódico tópico + Laser (Diclo + LBP)** - os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento com diclofenaco sódico de uso tópico, seguido por aplicação de LBP sobre um 1 ponto da articulação uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.

- **Grupo Osteoartrite + Exercício + Diclofenaco Sódico tópico (Exerc + Diclo)** - os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento através de exercício físico (natação), seguido por aplicação de diclofenaco sódico de uso tópico na articulação, uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.

- **Grupo Osteoartrite + Exercício + Diclofenaco Sódico tópico + Laser (Exerc + Diclo + LBP)** - os animais foram submetidos à indução de OA no joelho direito e após 21 dias iniciaram tratamento através de exercício físico (natação), seguido por aplicação de diclofenaco sódico de uso tópico na articulação, posteriormente sendo aplicada LBP sobre 1 único ponto da articulação uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento.

Após as 8 semanas consecutivas de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, 72 horas após o último tratamento, com o objetivo de coletar material biológico (lavado intra-articular, tecido articular e plasma sanguíneo) para posteriores análises.

No intuito de facilitar o entendimento do desenho experimental do presente estudo, apresentamos na figura 2 o fluxograma do estudo.

Figura 2- Fluxograma do estudo

FONTE: Próprio autor, 2015.

5.3 Procedimentos

5.3.1 Indução de OA no joelho

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente; König, Avellaneda, Argentina) por via intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram submetidos à indução de OA no joelho, por meio de injeção de papaína, de acordo com Murat et al. (2007). Um total de 0,2 ml de solução de papaína a 4%, com 0,1 ml de 0,03 M cisteína, utilizado como ativador, foram injetados intra-articularmente com uma microseringa no joelho direito do animal. Este procedimento foi repetido no quarto e no sétimo dia após a primeira aplicação. O bisel da agulha foi posicionado medialmente ao ligamento patelar, realizando a injeção em direção à superfície articular distal do fêmur. A seguir, os animais foram mantidos aquecidos até o encerramento

do efeito anestésico, evitando desta forma a morte acidental decorrente da hipotermia causada pelo anestésico.

Baseando-se nos dados encontrados por Murat et al. (2007), no presente estudo optamos por realizar o tratamento para OA após 21 dias da indução da mesma com papaína, por já haver sido observado anteriormente que a instalação da doença ocorre neste período. As terapias nos grupos tratados ocorreram uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de tratamento, de acordo com os grupos experimentais descritos anteriormente. Após as 8 semanas consecutivas de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Ao final, foi realizada a coleta do lavado intra-articular, tecido articular e plasma sanguíneo para posteriores análises.

5.3.2 Aplicação do anti-inflamatório não-esteroidal

No presente estudo utilizamos diclofenaco sódico gel genérico 10 mg/g da marca EMS (Santo André, São Paulo, Brasil), comprado em farmácia. Em estudos pilotos realizados em nosso laboratório, utilizamos uma dose de diclofenaco sódico tópico adaptada ao peso do animal, a partir da posologia prescrita na bula do fármaco. Baseando-se nestes estudos, utilizamos a dose de 1 g de diclofenaco sódico gel sobre a articulação do joelho submetida a indução de OA por injeção de papaína. A aplicação do fármaco ocorreu de acordo com os grupos experimentais citados anteriormente. O tratamento ocorreu uma vez ao dia, 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de terapia.

5.3.3 Protocolo de exercício físico

21 dias após a indução de OA com injeção de papaína, os animais selecionados foram adaptados ao protocolo de natação. O exercício físico ocorreu em um sistema composto por um tanque de vidro de 100x50x75 cm e uma temperatura da água de 31 ± 1 °C (HARRI e KUUSELA, 1986). A figura 3 demonstra o tanque utilizado para a realização do protocolo de exercício físico.

Figura 3 – Tanque de natação utilizado no protocolo de exercício físico

FONTE: Próprio autor, 2015.

O protocolo de exercício físico empregado no presente trabalho foi adaptado do estudo de Lima et al. (2005). Os animais foram submetidos ao tratamento 1 vez por dia, realizados 3 vezes por semana (em dias alternados), durante 8 semanas consecutivas (totalizando 24 sessões de terapia), das quais, as 2 primeiras foram destinadas à adaptação dos animais à atividade física. O protocolo de adaptação empregado nas duas primeiras semanas de tratamento, ocorreu segundo a tabela 1.

Tabela 1 – Protocolo de adaptação ao exercício físico.

Semana	Dia	Séries	Ativ/recuper	Sobrecarga	Tempo total
1ª semana	1º dia	5	1 min: 1 min	3% peso corporal	10 min
	2º dia	10	1 min: 1 min	3% peso corporal	20 min
	3º dia	8	1 min: 1 min	5% peso corporal	16 min
2ª semana	4º dia	10	1 min: 1 min	7% peso corporal	20 min
	5º dia	10	1 min: 1 min	9% peso corporal	20 min
	6º dia	10	1 min: 1 min	10% peso corporal	20 min

FONTE: Próprio autor, 2015.

Decorridas as duas semanas de adaptação, foi iniciado o treinamento. Durante esta fase, o tratamento com natação também ocorreu uma vez ao dia, três vezes por semana, durante seis semanas consecutivas. Foi mantida a sobrecarga de 10% do peso corporal (por uso de anéis de chumbo presos ao rabo), e aplicada uma progressão contínua no tempo das sessões diárias, conforme a tabela 2 a seguir.

Tabela 2- Protocolo de exercício físico.

Semana	Séries	Ativ/recuper	Sobrecarga	Tempo total
3ª semana	11	1 min: 1 min	10% peso corporal	22 min
4ª semana	12	1 min: 1 min	10% peso corporal	24 min
5ª semana	13	1 min: 1 min	10% peso corporal	26 min
6ª semana	14	1 min: 1 min	10% peso corporal	28 min
7ª semana	15	1 min: 1 min	10% peso corporal	30 min
8ª semana	15	1 min: 1 min	10% peso corporal	30 min

FONTE: Próprio autor, 2015.

O treinamento consistiu de um minuto de atividade, sendo que o animal nadou com uma sobrecarga igual a 10% do peso corporal, seguido por um minuto de recuperação passiva (cumprido fora da água). Foram efetuadas inicialmente onze séries em cada sessão diária, seguindo a progressão no tempo total de treinamento, como descrito na tabela acima. Esse treinamento foi realizado uma vez ao dia, três vezes por semana, durante seis semanas consecutivas. Para que as discrepâncias ocorridas com o ganho ou perda de peso fossem

corrigidas, os animais foram pesados semanalmente e a sobrecarga corporal foi alterada, para que a proporção fosse mantida.

5.3.4 Aplicação da LBP

A LBP foi aplicada de acordo com os grupos experimentais citados anteriormente. O tratamento ocorreu uma vez ao dia, três vezes por semana, durante oito semanas consecutivas, totalizando 24 sessões de terapia. Os parâmetros que foram utilizados estão descritos na figura 2. Todos os parâmetros da LBP empregados no presente estudo foram escolhidos baseando-se em um estudo prévio realizado em nosso laboratório (PALLOTA et al., 2012).

Figura 4 – Parâmetros da LBP

Comprimento de onda: 830 nm (infravermelho)
Frequência: modo contínuo
Potência: 100 mW
Diâmetro do spot: 0,06 cm
Área do spot: 0,0028 cm ²
Densidade de potência: 35,71 W/cm ²
Energia: 6 Joules por ponto
Densidade de energia: 2.142 J/cm ²
Tempo de tratamento: 60 segundos por ponto
Número de pontos irradiados: 1 ponto sobre a articulação

FONTE: Próprio autor, 2015.

5.3.5 Coleta do lavado intra-articular

Após as 8 semanas consecutivas de tratamento e o sacrifício dos animais, foi realizada a coleta do lavado intra-articular para análise de contagem total de células. O lavado intra-articular foi obtido por meio da injeção e aspiração, com auxílio de uma microseringa (Ultrafine 29G, BD), de um volume final de 300 µl (3 x 100 µl) de solução PBS + EDTA (4 µM). Este lavado intra-articular foi transferido para tubos de Eppendorfs e centrifugado na velocidade de 1500 rpm (centrífuga citospin – FANEN), durante 10 minutos, para contagem total de células.

5.3.6 Coleta do tecido articular

Após as 8 semanas consecutivas de tratamento e o sacrifício dos animais, foi realizada a coleta de tecido articular – membrana sinovial e cartilagem articular, para posteriores análises de atividade de MPO, RT-PCR e citocinas pelo método de ELISA. O tecido articular foi obtido por meio de um corte na região do joelho, expondo a articulação do animal. O tecido articular foi transferido para tubos de Eppendorfs e armazenados a -80 °C até o momento da realização das análises bioquímicas.

5.3.7 Coleta de plasma sanguíneo

Após as 8 semanas consecutivas de tratamento, foi realizada a coleta de 3 ml de sangue dos animais através de punção cardíaca imediatamente antes do sacrifício destes animais. Para coleta sanguínea, foi utilizado uma seringa contendo heparina. Após a coleta, o material foi centrifugado e apenas o conteúdo sobrenadante decorrente da centrifugação foi armazenado em freezer a – 80 °C na forma de plasma para posterior análise.

5.4 Análises

5.4.1 Análise histológica por microscopia de luz – microscopia óptica

O método empregado para montagem das lâminas histológicas foi baseado no estudo de Murat et al. (2007). Amostras da articulação do joelho foram lavadas com salina e fixadas em formol tamponado neutro a 10%. Posteriormente as amostras foram descalcificadas com ácido fórmico aquoso a 10% e embebidas em parafina para formação de cortes de 4 µm. Uma vez procedido o preparo das amostras, os cortes foram colocados em lâminas para serem corados com hematoxilina e eosina (HE). Após a coloração, os cortes foram montados em lâminas permanentes para posterior análise com o microscópio óptico da marca Nikon®, modelo Eclipse E-200. Posteriormente, os cortes foram fotografados por meio de uma câmera de microfotografia marca Dino-Lite Digital Microscope®, modelo DinoEye AM423X conectada a um microcomputador. Foram obtidas fotos de todos os grupos experimentais utilizando o aumento original de 100x. Os aspectos avaliados foram: superfície articular, celularidade e estrutura geral da cartilagem. O processo de análise do material foi

realizado de forma cega, sendo que a identificação das lâminas foi revelada apenas após a elaboração do escore. O escore dos achados foi classificado conforme a tabela abaixo:

Tabela 3 – Classificação dos achados histológicos através do escore.

Símbolo Representativo	Quantidade do Achado
-	Ausente
+	Leve
++	Moderado
+++	Intenso

FONTE: Próprio autor, 2015.

5.4.2 Contagem total de leucócitos

Alíquotas do lavado intra-articular foram centrifugadas na velocidade de 1500 rpm (centrífuga citospin – FANEN), durante 10 minutos até haver formação de *pellet* de células. O *pellet* foi ressuspenso em 200 µl de solução de PBS + EDTA 4µM + 0,1% BSA, para então iniciar-se a contagem total dos leucócitos. Para isso, foi utilizado 20 µl de lavado intra-articular diluído em solução de Turk (380 µl) e uma câmara de Neubauer acoplada a um microscópio óptico (Carl Zeiss) com um aumento de 40x. Os resultados das contagens de leucócitos foram expressos como o número total de leucócitos por cavidade articular. Mais uma vez, os dados foram analisados por um avaliador que não tinha conhecimento sobre a alocação dos animais nos diferentes grupos experimentais.

5.4.3 Análise da atividade de MPO

Para determinar os níveis de mieloperoxidase (MPO), o tecido articular – membrana sinovial – foi homogeneizado em solução HTAB 0,5% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), usando 1 ml de tampão para cada 50 mg de tecido. O homogenato foi colocado em tubos de Eppendorfs e aquecidos durante 2 horas em estufa à 60 °C para inativação da atividade endógena da catalase. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 g durante 5 minutos. Em seguida, 10 µl do sobrenadante foram pipetados (em duplicata) em uma microplaca de 96 poços e acrescidos a 200 µl de uma solução tampão fosfato de potássio

(pH 6.0), contendo 0.164 mg/ml de diidrocloreto *o*-dianisidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 0.0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Alemanha). O nível de absorbância foi mensurado em um leitor de ELISA (Espectra max plus 384, Sunnyvale, CA, USA) em 460 nm durante 20 minutos, com gravações feitas a cada vinte segundos de intervalo. Gráficos demonstraram a variação de absorbância em função do tempo e a Vmax/seg (velocidade máxima da reação por segundo) foi calculada a partir destes gráficos. O tempo de intervalo foi mensurado a partir da linearidade demonstrada na variação de absorbância observada no gráfico (densidade óptica ou absorbância) em função do tempo em segundos, obtendo o valor Vmax/seg. A atividade de MPO é definida como a degradação em micromol (μmol) de H_2O_2 por minuto. Considerando que 1 μmol de H_2O_2 por minuto corresponde a variação de 0.0113 UA (unidade de absorbância), a atividade de MPO foi expressa em unidades de MPO (UMPO/g).

5.4.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR

A expressão gênica das enzimas COX-1 e COX-2, bem como as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF- α) e por fim as metaloproteinases da matriz MMP-3 e MMP-13 foram quantificadas através da reação em cadeia da polimerase reversa em tempo real (RT-PCR). O material amostral utilizado nesta análise compreendeu tecido articular – cartilagem articular – o qual foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e em seguida armazenado a -80 °C até o processamento e análise do material. O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Gibco BRL, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foram processadas pelo método da transcriptase reversa empregando a enzima SuperScript (Invitrogen) a partir de 2 μg de RNA total e na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. Os experimentos de RT-PCR foram programados da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 10 min a 95 °C e 40 ciclos de amplificação (30 seg de desnaturação a 95 °C e 1 min de anelamento e extensão a 60 °C). As sequências dos primers foram as mesmas utilizadas por Wang et al. (2004) e estão representadas na tabela 4. Os resultados foram interpretados usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado à expressão do gene controle HPRT.

Tabela 4 – Sequência dos *primers* utilizados na expressão de mRNA por meio de RT-PCR.

PRIMER	SEQUÊNCIA
HPRT	FOWARD: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA REVERSE: TGATTCAAATCCCTGAAGTGC
COX-1	FOWARD: CCTCACCAGTCATTCCCTGT REVERSE: CCGTGCGAGTACAGTCACAT
COX-2	FOWARD: AGATCAGAAGCGAGGACCTG REVERSE: CCATCCTGGAAAAGTCGAAG
IL-1β	FOWARD: TGACCCATGTGAGCTGAAAG REVERSE: GGGATTTTGTCTGTTGCTTGT
IL-6	FOWARD: ACCACCCACAACAGACCAGT REVERSE: CAGAATTGCCATTGCACAAC
IL-10	FOWARD: CATGGGTCTTGGGAAGAGAA REVERSE: GCTTTCGAGACTGGAAGTGG
TNF-α	FOWARD: CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG REVERSE: CCTTGGTCTGGTAGGAGACG
MMP-3	FOWARD: CCCGTTTCCATCTCTCTCAA REVERSE: GTGGGTACCACGAGGACATC
MMP-13	FOWARD: GATGGGCCTTCTGGTCTTCT REVERSE: GAGCTGCTTGTCCAGGTTTC

FONTE: Próprio autor, 2015.

5.4.5 Análise dos níveis de citocinas presentes no tecido articular dosados por meio do método de ELISA

Após coleta do tecido articular – cartilagem articular – as amostras foram homogeneizadas em tampão TRIS.HCl 50 mM, pH 7,4 contendo PMSF 1 mM (1 g tecido: 5 mL de tampão). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos para formação de *pellet*. Em seguida, foi coletado o sobrenadante proveniente da homogeneização do tecido e armazenado a -80 °C até o momento da análise. As dosagens das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 das amostras do tecido articular foram realizadas pelo teste imunoenzimático (ELISA), seguindo instruções do kit comercial (R&D System, EUA). Para isto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ l/poço de anticorpo monoclonal

para cada citocina: anti IL-1 β e anti IL-6 foram diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), enquanto anti IL-10 e anti TNF- α foram diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2M, pH 6,5). As placas foram incubadas a 4 °C durante 18 h. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) por 4 vezes e depois preenchidas com 300 μ l/poço de solução bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma), a qual permaneceu nas placas durante 3 horas a 37 °C. Após, as mesmas foram submetidas a um novo ciclo de quatro lavagens. A seguir, 100 μ l/poço das amostras, devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes, foram adicionadas à placa e deixadas durante 18 horas em temperatura de 4 °C. Após lavagem, 100 μ l/poço dos respectivos anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por uma hora em temperatura ambiente (22 °C). Posteriormente a lavagem das placas, o volume de 100 μ l/poço de estreptavidina- peroxidase foi adicionado e deixado por uma hora em temperatura ambiente (22 °C), seguido por um novo ciclo de quatro lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100 μ l/poço da solução de 3.3'.5.5'tetrametilbenzidina (TMB) e interrompida pela adição de 50 μ l/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção a 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1 β , IL-10 e TNF- α foi de 1,95 pg/ml, enquanto para IL-6 foi de 15,6 pg/ml.

5.4.6 Avaliação dos níveis de prostaglandina E₂ presentes no plasma sanguíneo dosados por meio do método de ELISA

Para análise de prostaglandina E₂ (PGE₂) foram coletados 3 ml de sangue do animal por meio de punção cardíaca imediatamente antes da eutanásia. Para coleta sanguínea, foi utilizado uma seringa contendo heparina. Após a coleta, o material foi centrifugado e apenas o conteúdo sobrenadante decorrente da centrifugação foi armazenado em freezer a -80 °C na forma de plasma até o momento da análise. A quantificação dos níveis de PGE₂ foi feita através do *kit* – R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) contendo anticorpo anti-PGE₂ aderido à placa. Em seguida, foi adicionado 150 μ l/poço de solução contendo antígeno PGE₂ em diferentes concentrações para a confecção da curva padrão. Posteriormente, foi adicionado 100 μ l de amostra nos poços da placa de leitura, juntamente com 50 μ l do anticorpo primário e 50 μ l do conjugado de PGE₂. A placa foi incubada durante 16 horas sob agitação. Em seguida, foi realizada lavagem da placa com 200 μ l/poço de solução tampão (wash buffer) por

4 vezes. A seguir, foi adicionado à placa uma solução de substrato (solução A + solução B, em proporções iguais) proveniente do *kit*. Após o tempo estabelecido na bula do *kit*, adicionamos 50 µl/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção a 570 nm.

5.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média ($\pm$ EPM) e analisados através da análise de variância (ANOVA), seguido da aplicação do teste *Tukey* para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização histológica da articulação do joelho por coloração HE e escore dos achados histológicos

A figura 5 representa um corte longitudinal da articulação do joelho de um rato componente do grupo Hígido. Podemos observar que a superfície articular está regular, os condrócitos estão distribuídos de maneira homogênea e existe zona de cartilagem em repouso.

Figura 5 – Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Hígido. Fotomicrografia – Superfície articular regular (A). Condrócitos distribuídos de maneira homogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Aumento original = 100 x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 5 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Hígido.

Tabela 5 – Escore dos achados histológicos do grupo Hígido.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	+++
Superfície articular irregular	-
Condrócitos – maneira homogênea	+++
Condrócitos – maneira heterogênea	-
Cartilagem em repouso	+++
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	-

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na figura 6 observamos um corte longitudinal da articulação do joelho de um rato componente do grupo OA. Verificamos a presença de uma superfície articular irregular, com condrócitos distribuídos de maneira heterogênea. Além disso, observamos zonas de cartilagem em repouso e cartilagem hipertrófica, e invaginação profunda de tecido ósseo.

Figura 6 - Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo OA. Fotomicrografia – Superfície articular irregular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Zona de cartilagem hipertrófica (D). Invaginação do tecido ósseo (E). Aumento original = 100x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 6 observamos o escore dos achados histológicos do grupo OA.

Tabela 6 – Escore dos achados histológicos do grupo OA.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	-
Superfície articular irregular	+++
Condrócitos – maneira homogênea	-
Condrócitos – maneira heterogênea	+++
Cartilagem em repouso	+++
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	+
Invaginação do tecido ósseo	+++

FONTE: Próprio autor, 2015.

A figura 7 representa um corte longitudinal da articulação do joelho de um rato componente do grupo Exerc. Verificamos que a superfície articular está regular, há presença de condrócitos distribuídos de maneira heterogênea e homogênea e, por fim, zona de cartilagem em repouso.

Figura 7 – Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Exerc. Fotomicrografia - Superfície articular regular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Condrócitos distribuídos de maneira homogênea (C). Zona de cartilagem em repouso (D). Aumento original = 100x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 7 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Exerc.

Tabela 7 – Escore dos achados histológicos do grupo Exerc.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	+++
Superfície articular irregular	-
Condrócitos – maneira homogênea	++
Condrócitos – maneira heterogênea	++

Cartilagem em repouso	+
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	-

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na figura 8 verificamos o corte longitudinal da articulação do joelho de um rato pertencente ao grupo Diclo. Podemos observar a superfície articular irregular, a presença de condrócitos distribuídos de maneira heterogênea e zonas de cartilagem seriada e hipertrófica.

Figura 8 – Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Diclo. Fotomicrografia - Superfície articular irregular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Zona de cartilagem seriada (C). Cartilagem hipertrófica (D). Aumento original = 100 x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 8 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Diclo.

Tabela 8 – Escore dos achados histológicos do grupo Diclo.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	-
Superfície articular irregular	+++
Condrócitos – maneira homogênea	-
Condrócitos – maneira heterogênea	++
Cartilagem em repouso	-
Cartilagem seriada	+++
Cartilagem hipertrófica	++
Invaginação do tecido ósseo	-

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na figura 9 podemos verificar um corte longitudinal da articulação do joelho de um rato pertencente ao grupo LBP. Observamos uma superfície articular regular, condrócitos distribuídos de forma homogênea, apresentando zona de cartilagem em repouso.

Figura 9 - Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo LBP. Fotomicrografia – Superfície articular regular (A). Condrócitos distribuídos de maneira homogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Aumento original = 100x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 9 observamos o escore dos achados histológicos do grupo LBP.

Tabela 9 – Escore dos achados histológicos do grupo LBP.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	+++
Superfície articular irregular	-
Condrócitos – maneira homogênea	+++
Condrócitos – maneira heterogênea	-
Cartilagem em repouso	+++
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	-

FONTE: Próprio autor, 2015.

A figura 10 representa o corte longitudinal da articulação do joelho de um rato componente do grupo Exerc + Diclo. Observamos que a superfície articular está irregular, os

condrócitos estão distribuídos de maneira heterogênea e há presença de zona de cartilagem em repouso.

Figura 10 - Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Exerc + Diclo. Fotomicrografia - Superfície articular irregular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Aumento original = 100x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 10 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Exerc + Diclo.

Tabela 10 – Escore dos achados histológicos do grupo Exerc + Diclo.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	-
Superfície articular irregular	++
Condrócitos – maneira homogênea	-
Condrócitos – maneira heterogênea	++
Cartilagem em repouso	+
Cartilagem seriada	-

Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	-

Fonte: Próprio autor, 2015.

Na figura 11 verificamos o corte longitudinal da articulação do joelho de um rato pertencente ao grupo Exerc + LBP. Podemos observar superfície articular irregular. Além disso, os condrócitos estão distribuídos de maneira heterogênea e há zona de cartilagem em repouso.

Figura 11 – Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Exerc + LBP. Fotomicrografia - Superfície articular irregular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Aumento original = 100x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 11 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Exerc + LBP.

Tabela 11 – Escore dos achados histológicos do grupo Exerc + LBP.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	-
Superfície articular irregular	++

Condrócitos – maneira homogênea	-
Condrócitos – maneira heterogênea	+++
Cartilagem em repouso	+++
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	-

FONTE: Próprio autor, 2015.

A figura 12 representa o corte longitudinal da articulação do joelho de um rato componente do grupo Diclo + LBP. Verificamos que a superfície articular está irregular, há presença de condrócitos distribuídos de maneira heterogênea, zona de cartilagem em repouso e invaginação do tecido ósseo.

Figura 12– Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Diclo + LBP. Fotomicrografia - Superfície articular irregular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Invaginação do tecido ósseo (D). Aumento original = 100 x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 12 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Diclo + LBP.

Tabela 12– Escore dos achados histológicos do grupo Diclo + LBP.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	-
Superfície articular irregular	++
Condrócitos – maneira homogênea	-
Condrócitos – maneira heterogênea	+++
Cartilagem em repouso	+++
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	++

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na figura 13 verificamos o corte longitudinal da articulação do joelho de um rato pertencente ao grupo Exerc + Diclo + LBP. Podemos verificar que há presença de superfície articular irregular, condrócitos distribuídos de maneira heterogênea, zona de cartilagem em repouso e invaginação do tecido ósseo.

Figura 13– Caracterização histológica da articulação do joelho nos animais do grupo Exerc + Diclo + LBP. Fotomicrografia - Superfície articular irregular (A). Condrócitos distribuídos de maneira heterogênea (B). Zona de cartilagem em repouso (C). Invaginação do tecido ósseo (D). Aumento original = 100x.

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na tabela 13 observamos o escore dos achados histológicos do grupo Exerc + Diclo + LBP.

Tabela 13 – Escore dos achados histológicos do grupo Exerc + Diclo + LBP.

ASPECTOS AVALIADOS	QUANTIDADE DO ACHADO
Superfície articular regular	-
Superfície articular irregular	+++
Condrócitos – maneira homogênea	-
Condrócitos – maneira heterogênea	++
Cartilagem em repouso	++
Cartilagem seriada	-
Cartilagem hipertrófica	-
Invaginação do tecido ósseo	++

FONTE: Próprio autor, 2015.

Na figura 14 observamos a análise histológica de todos os grupos experimentais de forma sumarizada.

Figura 14 – Caracterização histológica da articulação do joelho de todos os grupos experimentais

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.2 Contagem total de leucócitos

A figura 15 demonstra a quantidade total de leucócitos por cavidade articular dos animais dos grupos experimentais Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Os resultados demonstraram que houve aumento estatisticamente significativo da quantidade total de leucócitos nos grupos OA, Exerc, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo Hígido. Além disso, podemos observar que houve redução estatisticamente significativa da quantidade total de leucócitos nos grupos Diclo e LBP em relação ao grupo OA. Adicionalmente verificamos que houve diminuição estatisticamente significativa da quantidade total de leucócitos nos grupos Diclo e LBP em relação aos grupos Exerc, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP.

Figura 15 – Aumento estatisticamente significativo da quantidade total de leucócitos nos grupos OA, Exerc, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP quando comparados ao grupo Hígido, com $*p<0,05$. Redução estatisticamente significativa da quantidade total de leucócitos nos grupos Diclo e LBP em relação ao grupo OA, com $\#p<0,05$. Diminuição da quantidade total de leucócitos nos grupos Diclo e LBP quando comparados aos grupos Exerc, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP, com $**p<0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.3 Análise da atividade de MPO

Na figura 16 verificamos a atividade de MPO no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Podemos observar que houve aumento estatisticamente significativo da atividade de MPO no grupo OA em relação a todos os demais grupos experimentais. Adicionalmente, verificamos que houve redução da atividade de MPO nos grupos LBP e Exerc + LBP em comparação ao grupo OA. Além disso, constatamos uma redução estatisticamente significativa da atividade de MPO tanto nos grupos LBP, quanto no grupo Exerc + LBP quando comparados aos grupos Exerc, Diclo e Diclo + LBP.

Figura 16 – Aumento estatisticamente significativo da atividade de MPO no grupo OA quando comparada a todos os demais grupos, com $*p<0,05$. Redução da atividade de MPO dos grupos LBP e Exerc + LBP em relação ao grupo OA, com $\#p<0,05$. Redução da atividade de MPO dos grupos LBP e Exerc + LBP,

em relação aos grupos Exerc, Diclo e Diclo + LBP com $**p<0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR

6.4.1 Quantificação da expressão gênica de TNF- α por RT-PCR

A figura 17 exibe os níveis de expressão gênica de TNF- α no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Com a análise dos resultados, certificamos que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão gênica de TNF- α no tecido articular entre os grupos experimentais.

Figura 17 – Níveis de expressão gênica de TNF- α no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

Fonte: Próprio autor, 2015.

6.4.2 Quantificação da expressão gênica de IL-1 β por RT-PCR

Na figura 18 verificamos os níveis de expressão gênica de IL-1 β no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Podemos constatar que houve aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-1 β nos grupos OA, Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP quando comparados ao grupo Hígido. Além disso, verificamos redução estatisticamente significativa nos níveis de expressão gênica de IL-1 β no grupo LBP em relação ao grupo OA. Ademais, constatamos redução estatisticamente significativa nos níveis de expressão gênica de IL-1 β no grupo LBP quando comparado aos grupos Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Por fim, observamos diminuição estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de IL-1 β no grupo Exerc + LBP quando comparados aos grupos Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP.

Figura 18 – Níveis de expressão gênica de IL-1 β no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão gênica de IL-1 β nos grupos OA, Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo Hígido, com $*p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de IL-1 β no grupo LBP em relação ao grupo OA, com $\#p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de IL-1 β no grupo

LBP quando comparado aos grupos Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP, com $**p<0,05$. Diminuição estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de IL-1 β no grupo Exerc + LBP, quando comparados aos grupos Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP, com $***p<0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4.3 Quantificação da expressão gênica de IL-6 por RT-PCR

Na figura 19 observamos os níveis de expressão gênica de IL-6 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Analisando os resultados obtidos, notamos que não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão gênica de IL-6 no tecido articular entre os grupos experimentais.

Figura 19 – Níveis de expressão gênica de IL-6 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4.4 Quantificação da expressão gênica de IL-10 por RT-PCR

A figura 20 retrata os níveis de expressão gênica de IL-10 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. De acordo com os resultados, podemos reparar que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de IL-10 no tecido articular entre os grupos experimentais.

Figura 20 – Níveis de expressão gênica de IL-10 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4.5 Quantificação da expressão gênica de COX-1 por RT-PCR

Na figura 21 observamos os níveis de expressão gênica de COX-1 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Analisando os resultados, verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de COX-1 no tecido articular entre os grupos experimentais.

Figura 21 – Níveis de expressão gênica de COX-1 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4.6 Quantificação da expressão gênica de COX-2 por RT-PCR

A figura 22 demonstra os níveis de expressão gênica de COX-2 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. De acordo com os resultados, observamos que houve aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão gênica de COX-2 nos grupos OA, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP, em relação ao grupo Hígido. Além disso, verificamos redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de COX-2 no grupo LBP quando comparado aos grupos OA, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP.

Figura 22 – Níveis de expressão gênica de COX-2 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão gênica de COX-2 nos grupos OA, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo Hígido, com $*p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de COX-2 no grupo LBP quando comparado ao grupo OA, com $\#p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de COX-2 no grupo LBP em relação aos grupos Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP, com $**p < 0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4.7 Quantificação da expressão gênica de MMP-3 por RT-PCR

Na figura 23 verificamos os níveis de expressão gênica de MMP-3 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. A partir dos resultados obtidos, percebemos aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão gênica de MMP-3 no grupo OA quando comparados ao grupo Hígido. Além disso, verificamos redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de MMP-3 dos grupos Diclo, LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA.

Figura 23 – Níveis de expressão gênica de MMP-3 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis da expressão gênica de MMP-3 no grupo OA quando comparados ao grupo Hígido, com $*p < 0.05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis da expressão gênica de MMP-3 nos grupos Diclo, LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA, com $\#p < 0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.4.8 Quantificação da expressão gênica de MMP-13 por RT-PCR

A figura 24 retrata os níveis de expressão gênica de MMP-13 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Com a análise dos resultados, observamos aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão gênica de MMP-13 nos grupos OA e Diclo + LBP em relação ao grupo Hígido. Além disso, notamos redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de MMP-13 dos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP quando comparados ao grupo OA. Adicionalmente, observamos redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de MMP-13 dos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo Diclo + LBP. Por fim, percebemos redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica do grupo LBP em relação ao grupo Exerc + LBP.

Figura 24 – Níveis de expressão gênica de MMP-13 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão gênica de MMP-13 dos grupos OA e Diclo + LBP, quando comparados ao grupo Hígido, com $*p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de MMP-13 dos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA, com $\#p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de expressão gênica de MMP-13 dos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP

quando comparados ao grupo Diclo + LBP, com $**p<0,05$. Redução dos níveis de expressão gênica de MMP-13 do grupo LBP em relação ao grupo Exerc + LBP, com $***p<0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.5 Análise dos níveis de citocinas dosados por meio do método de ELISA

6.5.1 Análise dos níveis de TNF- α no tecido articular

Na figura 25 podemos observar os níveis de TNF- α no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. A partir dos resultados obtidos, verificamos aumento estatisticamente significativo dos níveis de TNF- α nos grupos OA, Exerc e Exerc + Diclo quando comparados ao grupo Hígido. Ademais, constatamos redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α nos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA. Além disso, podemos notar redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α nos grupos LBP e Exerc + LBP quando comparados aos grupos Exerc e Exerc + Diclo. Por fim, observamos redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α nos grupos Diclo, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo Exerc.

Figura 25 – Níveis de TNF- α no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de TNF- α nos grupos OA, Exerc e Exerc + Diclo em relação ao grupo Hígido, com $*p<0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α nos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP quando comparados ao grupo OA, com $\#p<0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α nos grupos LBP e Exerc + LBP em relação aos grupos Exerc e Exerc + Diclo, com $**p<0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de TNF- α nos grupos Diclo, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP quando comparados ao grupo Exerc, com $***p<0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste Tukey).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.5.2 Análise dos níveis de IL-1 β no tecido articular

Na figura 26 constatamos os níveis de IL-1 β no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Verificamos que houve aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-1 β nos grupos OA, Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP quando comparados ao grupo Hígido. Além disso, observamos redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β nos grupos Diclo, LBP, Exerc + LBP e Diclo + LBP em relação ao grupo OA. Ademais, notamos redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β no grupo LBP em relação ao grupo Exerc + Diclo. Adicionalmente, percebemos redução estatisticamente

significante dos níveis de IL-1 β no grupo Exerc + LBP quando comparados aos grupos Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP.

Figura 26 – Níveis de IL-1 β no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-1 β nos grupos OA, Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo Hígido, com * $p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β nos grupos Diclo, LBP, Exerc + LBP e Diclo + LBP quando comparados ao grupo OA, com # $p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β no grupo LBP em relação ao grupo Exerc + Diclo, com ** $p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β no grupos Exerc + LBP quando comparados com os grupos Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP, com *** $p < 0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.5.3 Análise dos níveis de IL-6 no tecido articular

A figura 27 relata os níveis de IL-6 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. A partir da análise dos dados, observamos aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-6 nos grupos OA, Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Diclo + LBP em relação ao grupo Hígido. Além disso, verificamos redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-6 nos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP quando

comparados ao grupo OA. Por fim, notamos redução estatisticamente significativa dos grupos Exerc + LBP e LBP quando comparados aos grupos Exerc, Diclo e Exerc + Diclo.

Figura 27 – Níveis de IL-6 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de IL-6 nos grupos OA, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + Diclo quando comparados ao grupo Hígido, com $*p<0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-6 nos grupos Exerc, Diclo, LBP, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA, com $\#p<0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de IL-6 nos grupos Exerc + LBP e LBP quando comparados com os grupos Exerc, Diclo e Exerc + Diclo, com $**p<0,05$. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.5.4 Análise dos níveis de IL-10 no tecido articular

Na figura 28 observamos os níveis de IL-10 no tecido articular dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. De acordo com os resultados, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de IL-10 no tecido articular dos animais entre os grupos experimentais.

Figura 28 – Níveis de IL-10 no tecido articular dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Os dados representam a média $\pm$ EPM, $n=6$ (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

6.6 Análise dos níveis de PGE_2 dosados por meio do método de ELISA

A figura 29 considera os níveis de PGE_2 presentes no plasma sanguíneo dos animais dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Podemos verificar que houve aumento estatisticamente significativo dos níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo dos animais dos grupos OA, Exerc, Diclo e Exerc + Diclo, quando comparados ao grupo Hígido. Ademais, observamos redução estatisticamente significativa dos níveis de PGE_2 nos grupos Diclo, LBP, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA. Adicionalmente, podemos notar redução estatisticamente significativa dos níveis de PGE_2 no grupo LBP, quando comparados com os grupos Exerc, Diclo, Exerc + Diclo, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP. Por fim, percebemos redução estatisticamente significativa dos níveis de PGE_2 no grupo Exerc + LBP em relação aos grupos Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Diclo + LBP.

Figura 29 – Níveis de PGE_2 no plasma sanguíneo dos grupos Hígido, OA, LBP, Exerc, Diclo, Diclo + LBP, Exerc + LBP, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP. Aumento estatisticamente significativo dos níveis de PGE_2 nos grupos OA, Exerc, Diclo e Exerc + Diclo, quando comparados ao grupo Hígido, com $*p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de PGE_2 nos grupos Diclo, LBP, Exerc + Diclo, Exerc + LBP, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP em relação ao grupo OA, com $\#p < 0,05$. Redução estatisticamente significativa dos níveis de PGE_2 no grupo LBP quando comparado aos grupos Exerc, Diclo, Exerc + Diclo, Diclo + LBP e Exerc + Diclo + LBP, com

****p<0,05.** Redução estatisticamente significativa dos níveis de PGE₂ no grupo Exerc + LBP em relação aos grupos Exerc, Diclo, Exerc + Diclo e Diclo + LBP, com *****p<0,05**. Os dados representam a média $\pm$ EPM, n=6 (ANOVA, seguido do teste *Tukey*).

FONTE: Próprio autor, 2015.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo procuramos reproduzir uma condição de OA, por meio da injeção de papaína intra-articular no joelho de ratos, para posteriormente avaliar os efeitos de diferentes terapias (AINE, exercício físico e LBP, de forma isolada ou combinada) sobre a articulação acometida.

A OA desencadeia alterações metabólicas e bioquímicas, além de morfológicas, que podem ser observadas através da fragmentação da superfície articular e formação de fendas verticais na cartilagem, deposição variável de cristais e remodelamento ósseo e da cartilagem (BRANDT et al., 1986).

No estudo de Murat et al. (2007), foram avaliadas as mudanças estruturais na articulação do joelho de ratos em relação ao tempo com o uso do escore de Mankim, após a indução de OA pelo uso de papaína. Segundo o autor, todos os grupos que receberam injeção de papaína no joelho, exibiram irregularidade e fibrilação na superfície articular e diminuição no número de células na articulação.

Já o estudo de Lin et al. (2006) investigou os efeitos do tratamento com LBP em ratos submetidos à indução de OA na articulação do joelho através da injeção de papaína. Para isso, uma das análises realizadas, foi a análise histopatológica. Morfologicamente, observou-se que o uso de papaína na articulação do joelho de ratos provocou mudanças na cartilagem articular, como descamação da superfície, fibrilação superficial, alargamento de condrócitos, hialinização da cartilagem e colapso parcial e total da cartilagem, de acordo com a severidade de deterioração da OA.

O estudo de Alves et al. (2013a) realizou análise histopatológica da articulação do joelho de ratos, a fim de observar os efeitos do tratamento com LBP, em diferentes tempos após a indução de OA com papaína. Sete dias após a indução de OA com papaína, observou-se a presença de um processo inflamatório intrínseco, o qual foi substituído gradualmente por sinais de cronicidade. Adicionalmente, verificou-se que houve um processo de degeneração no espaço intra-articular, ativado pelo uso de papaína.

Os resultados histológicos do presente trabalho, corroboram com os estudos supracitados, visto que os grupos que receberam injeção de papaína a fim de induzir OA, sofreram alterações condizentes ao quadro da doença, quando comparados ao grupo Hígido (que não foi submetido a nenhum tipo de intervenção). O grupo OA que recebeu indução de OA no joelho direito, entretanto não foi submetido a nenhum tipo de tratamento, apresentou alterações significantes em sua morfologia. Entre as quais, podemos observar que a superfície

articular apresentou-se irregular, inclusive apresentando pequena área de fissura, além de conter células distribuídas de maneira heterogênea e invaginação profunda do tecido ósseo. Todas as modificações verificadas na análise histológica da articulação indicam, que a papaína foi eficaz em induzir em joelhos de ratos a OA de forma muito semelhante a encontrada em seres humanos e descrita em diversos estudos anteriores, tanto em humanos, quanto em animais.

Entre os grupos que sofreram algum tipo de tratamento, tanto isolado, quanto combinado, verificamos que a terapia com LBP parece ser a mais eficiente em controlar os sinais e as alterações provocadas pela injeção de papaína. No estudo de Alves et al. (2013a), os grupos tratados com LBP após a indução de OA com papaína, apresentaram aceleração do processo de cicatrização, com presença de células mononucleares e de reparo ósseo, além de apresentar cartilagem hialina homogênea com aspecto normal. No presente estudo, verificamos que o grupo LBP também apresentou sinais de cicatrização e reparo, bem como superfície articular regular, células distribuídas de maneira homogênea e zonas de cartilagem em repouso, dessa forma, demonstrando características muito próximas as do grupo Hígido.

No grupo Exerc verificamos alguns sinais referentes a um possível processo de cicatrização ou reparo articular. Percebemos que a articulação apresenta superfície articular regular e condrócitos distribuídos tanto de maneira heterogênea, como de maneira homogênea. Observamos que não há sinais de invaginação do tecido ósseo ou fissura na superfície articular, sugerindo que a terapia com exercício físico pode ser uma alternativa interessante no tratamento com OA, eficiente em reverter o quadro instalado e proporcionar o reparo do tecido. Ainda existe grande controvérsia em relação ao tipo, intensidade, duração e quantidade de sessões que devem ser aplicados em casos de OA (EGAN; MENTES, 2010; JUHL et al., 2014), dessa forma, podemos sugerir que se houvessem algumas alterações nos parâmetros do exercício físico utilizados no presente estudo (tempo de duração, frequência semanal e período total de tratamento) resultados ainda melhores poderiam ter sido encontrados.

O estudo realizado por Siebelt et al. (2014) que avaliou os efeitos da realização de exercícios físicos moderados (por meio de corrida na esteira) sobre a articulação do joelho submetida à indução de OA em ratos, observou que corrida moderada não protege a articulação contra o desenvolvimento da doença, além de, atuar negativamente sobre a cartilagem articular (degradação da cartilagem, com depleção de glicosaminoglicanos) e osso subcondral, contribuindo para desenvolvimento de esclerose, ativação de macrófagos sinoviais e formação de osteófitos. Por outro lado, o estudo de Fallah Mohammadi et al.

(2013) que investigou os efeitos de quatro semanas de exercício físico moderado (por meio de corrida na esteira) em ratos submetidos à indução de OA pelo uso de iodoacetato monossódico, verificou na análise histológica que os grupos tratados com exercício físico apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo sem tratamento, apresentando diminuição da profundidade da lesão e redução na largura da degeneração total de cartilagem. Os resultados deste estudo indicaram que um programa de exercício físico moderado atua de forma benéfica na OA em ratos. Apesar do presente estudo também contemplar a realização de exercício físico como tratamento para OA induzida em joelhos de ratos, o método de indução de OA, o tempo de tratamento, a eleição do exercício físico, bem como os aspectos avaliados, foram distintos. Entretanto, apesar das diferenças metodológicas, resultados semelhantes foram encontradas, indicando efeitos benéficos desencadeados por meio do exercício físico em casos de OA induzida.

Como uma opção de tratamento para OA, a terapia farmacológica costuma ser baseada no uso de acetaminofeno, progredindo para a utilização de outros AINEs clássicos ou agentes seletivos para COX-2 (FULLER; ROTH, 2011). Entretanto, o tratamento com os fármacos em questão, apresenta eficácia discutível (BJORDAL et al, 2004; TANNENBAUM et al., 2006;). No estudo de Bjordal et al. (2004), foi verificado que em patologias inflamatórias de longa duração, drogas anti-inflamatórias apresentaram efeito ligeiramente superior ao placebo, o que não suportaria o uso de tais drogas nas referidas patologias.

Alguns estudos potencialmente relevantes para o tratamento de OA de joelho testaram a eficácia de AINEs de uso tópico (BRÜHLMANN; MICHEL, 2003; DREISER; TISNE-CAMUS, 1993; GRACE et al., 1999). Nestes estudos, houve a comparação entre diclofenaco na forma de gel ou emplastro, ou seja, de aplicação tópica, versus aplicação placebo. Os resultados demonstraram que ambos os grupos (diclofenaco e placebo) apresentaram melhora em comparação ao grupo controle, entretanto, o grupo diclofenaco apresentou alterações estatisticamente significantes em relação ao grupo placebo, sugerindo assim, que a terapia com AINE aplicado topicamente é eficaz no tratamento de pacientes com OA de joelho.

Diferentemente, no presente estudo, no grupo Diclo verificamos a presença de superfície articular bastante irregular e células distribuídas de maneira heterogênea. Entretanto, observamos início de cicatrização e reparo articular, demonstrados através de zonas de cartilagem seriada. Dessa forma, podemos concluir que possivelmente um período maior de terapia, bem como a aplicação do fármaco mais vezes por semana, e até mesmo por dia, poderiam representar resultados mais positivos em favor do diclofenaco. No entanto, com o tempo de tratamento utilizado, demonstramos que o tratamento com o anti-inflamatório

não-esteroidal, não é a terapia mais indicada para o tratamento de OA, visto que não parece ser o tratamento mais eficaz em promover o reparo da lesão articular, ainda que demonstre alguns sinais claros de início de reparo tecidual.

Apesar de encontrarmos na literatura diversas opções de tratamentos para OA, inclusive sugerindo a combinação de mais de um tratamento (ESCALANTE et al., 2010), poucos estudos fazem a associação de mais de uma terapia visando aumentar a eficácia e minimizar os possíveis efeitos indesejáveis. No presente estudo combinamos diferentes tratamentos, entretanto, morfológicamente, observamos que os tratamentos com LBP, exercício e diclofenaco, demonstraram maior eficácia quando aplicados de forma individual. A associação das terapias não foi capaz de promover cicatrização e reparo do tecido articular lesionado decorrente ao uso de papaína na articulação.

A associação de terapias como a LBP e diclofenaco já foi estudada anteriormente. O estudo de De Paiva Carvalho et al. (2013) avaliou os efeitos da LBP e o uso tópico e intramuscular de diclofenaco, de maneira isolada ou combinada, sob aspectos bioquímicos em um modelo experimental de estiramento muscular em ratos. Como resultado, foi observado que a terapia combinada foi eficaz na modulação do processo inflamatório decorrente de lesão muscular por estiramento. Contudo, a comparação entre o estudo De Paiva Carvalho et al. (2013) e o presente estudo apresenta limitações, visto que não se trata de uma mesma patologia e método de indução, apenas de tratamentos semelhantes.

A partir dos resultados histológicos constatados no presente estudo, podemos inferir que o tratamento com LBP, com os parâmetros utilizados, é capaz de provocar efeitos benéficos na OA induzida pelo uso de papaína. Da mesma forma, o tratamento com exercício físico parece colaborar na cicatrização e reparo tecidual provocado por OA induzida. O uso de anti-inflamatório não-esteroidal não parece ser o método de tratamento mais eficaz em melhorar o quadro de OA. Adicionalmente, podemos recomendar que o tratamento com terapias combinadas não é capaz de maximizar os benefícios de cada tratamento individual, assim não suportando a utilização do mesmo.

Os sinais e sintomas observados na OA, que abrangem dor, inchaço e rigidez articular (indicadores de sinovite) e o risco de progressão da perda de cartilagem, são fatores intimamente ligados à inflamação. A sinovite inclui infiltração de células mononucleares na membrana sinovial, bem como, produção de mediadores pró-inflamatórios: IL-1 β , TNF- α e quimiocinas (SELLAM; BEREMBAUM, 2010). Adicionalmente, são encontrados no tecido sinovial, infiltrados de células imunes, como células-T e células-B, além de macrófagos (SAKKAS et al., 1998). Ademais, imunoglobulinas e complexos imunes são detectados na

cartilagem, líquido sinovial e plasma de pacientes com OA (JASIN, 1988). Por fim, no líquido sinovial é encontrado o aparecimento de infiltrados de linfócitos (LINGEN, 2001) e neutrófilos (STEINBECK et al., 2007) e a presença abundante de infiltrados celulares de macrófagos (WALSH et al, 2007).

Com o propósito de analisar o processo inflamatório, composto de diversas alterações no organismo, incluindo a infiltração de células inflamatórias, o estudo de Pallotta et al. (2012) investigou os efeitos da LBP sobre a inflamação induzida em joelhos de ratos através da injeção de kaolin associado à carragenina. Os resultados do referido trabalho demonstraram que houve aumento significativo da contagem total de células presentes na cavidade articular dos animais que sofreram indução de inflamação na articulação, analisada através do lavado intra-articular.

Da mesma forma, o trabalho de Alves et al. (2013b) examinou os efeitos da LBP operando em 50mW e 100 mW sobre a inflamação articular de joelhos de ratos, induzida através do uso de papaína. Foi observado por meio dos dados obtidos, que o grupo que foi submetido a indução de inflamação articular por injeção de papaína, sofreu aumento estatisticamente significativo da quantidade de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) em relação ao grupo que não sofreu nenhum tipo de intervenção.

Por fim, no estudo de Dos Santos et al. (2014), foram avaliados os efeitos da LBP com doses de 2 J e 4 J sobre a inflamação articular induzida por papaína no joelho de ratos. Uma das análises realizadas foi a contagem diferencial de células inflamatórias. Os dados constataram que houve aumento estatisticamente significativo na contagem de células inflamatórias, tanto neutrófilos, quanto macrófagos, no grupo submetido à indução de inflamação articular pelo uso de papaína, quando comparado ao grupo controle (hígido), o qual não sofreu nenhum tipo de intervenção.

Corroborando os resultados dos trabalhos supracitados, constatamos em nosso estudo uma elevação na contagem das células inflamatórias (contagem total de células) presentes no lavado intra-articular dos animais submetidos à indução de OA pelo injeção de papaína. Com esses dados, podemos inferir que a papaína foi efetiva em induzir um processo inflamatório na articulação dos animais, uma vez que, houve liberação de células inflamatórias na região articular do grupo OA.

Adicionalmente, detectamos um aumento na contagem das células inflamatórias presentes no lavado intra-articular dos grupos Exerc, Exerc + Diclo e Exerc + Diclo + LBP, em relação ao grupo OA. Visto que esses animais foram submetidos à indução de OA por meio da injeção de papaína, esses dados nos levam a crer que os tratamentos aos quais esses

animais foram submetidos, não foram eficientes em reduzir a contagem total de leucócitos no lavado intra-articular, e portanto, em modular o processo inflamatório decorrente da OA. Por outro lado, os grupos Diclo e LBP, ambos de maneira isolada, reduziram de forma estatisticamente significativa a contagem total de leucócitos no lavado intra-articular quando comparados ao grupo OA, por exemplo.

Nossos resultados confirmam o que foi encontrado e descrito nos estudos de Alves et al. (2013b) e Dos Santos et al. (2014), em que a injeção de papaína foi eficaz em induzir um processo inflamatório na articulação do joelho de animais, caracterizado pela liberação de células inflamatórias na cavidade articular. Além disso, confirmamos que o uso de diclofenaco e LBP foram capazes de diminuir a contagem de células inflamatórias. Dessa forma, sugerimos que o tratamento com LBP é eficiente na modulação do processo inflamatório decorrente da indução de OA pelo uso de papaína. Adicionalmente, o tratamento com diclofenaco também diminui a quantidade de células inflamatórias no lavado intra-articular dos animais submetidos às referidas intervenção e terapias.

Evidências científicas apontam para a teoria de que o processo inflamatório gerado na OA contribui para a sintomatologia e progressão da doença (ABRAMSON, 2004; GARNERO; DELMAS, 2003; BONNET; WALSH, 2005;), comumente sendo encontrado nestes casos, sinais de sinovite aguda e infiltração de neutrófilos (LINGEN, 2001). Pacientes com OA em estágio inicial, apresentam níveis elevados de MPO, dessa forma, indicando envolvimento inflamatório no desenvolvimento da OA (STEINBECK et al., 2007).

No estudo de Punzi et al. (2012) foram avaliados os níveis de MPO em 82 pacientes, sendo que 57 apresentavam OA de mãos, enquanto 20 não apresentavam OA de mãos. Segundo os dados, foi constatado um aumento nos níveis de MPO nos pacientes portadores de OA de mãos.

Ainda analisando a atividade de MPO em casos de OA, o trabalho de Cifuentes et al. (2010) verificou os níveis de MPO em ratos que sofreram indução de OA por iodoacetato monossódico e foram submetidos a um tratamento com exercício de impacto. Os animais foram divididos em três grupos experimentais: controle (não sofreram indução ou tratamento), OA (sofreram indução de OA) e OA somado a exercício (sofreram indução de OA e foram submetidos ao tratamento com exercício). A análise de MPO foi realizada com lavado intra-articular e amostra de cápsula articular. Os resultados obtidos neste estudo constataram elevação nos níveis de MPO dos grupos submetidos à indução de OA por iodoacetato monossódico.

Os resultados encontrados em nosso estudo, são capazes de fortalecer o que foi

verificado por Punzi et al. (2012) e Cifuentes et al. (2010). Em nosso trabalho, o grupo submetido à indução de OA por injeção de papaína apresentou aumento dos níveis de atividade de MPO, em relação a todos os demais grupos experimentais, assim como foi observado nos estudos supracitados. Este resultado sugere que a OA induzida por uso de papaína, é capaz de desencadear processo inflamatório, com suas fases clássicas, entre elas, a liberação de células como neutrófilos e consequente atividade aumentada de MPO.

Por outro lado, verificamos que todos os grupos que foram submetidos aos tratamentos, independente de qual modalidade, apresentaram redução na atividade de MPO em relação ao grupo OA, apresentando-se de forma muito semelhante aos dados do grupo Hígido. Entretanto, verificamos que apenas os tratamentos com LBP aplicada de forma isolada e exercício associado à LBP, foram eficazes em reduzir de forma estatisticamente significativa a atividade de MPO, nos grupos que sofreram indução de OA. Dessa forma, podemos inferir que as referidas terapias podem ser capazes de modular o processo inflamatório, decorrente de uma condição osteoartrítica, além de podermos sugerir, que todas as terapias utilizadas no presente estudo apresentam tendência a reduzir a atividade de MPO após indução de OA por meio de papaína.

Diversos estudos contemplam a eficácia da LBP em casos de inflamação articular e OA (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; DOS SANTOS et al., 2014; PALLOTTA et al., 2012). Nossos resultados corroboram as teorias apresentadas, confirmando a redução de biomarcadores inflamatórios com o uso de laserterapia de baixa potência. Dessa forma, acreditamos que os dados encontrados no presente estudo, em que o exercício físico associado à LBP foi capaz de reduzir os níveis de MPO, se dêem principalmente pelo uso da LBP, sendo menor a contribuição da atividade física. Nossos resultados indicam discreta eficiência, e não sinais claros de que o exercício físico pode modular o processo inflamatório decorrente de OA induzida por meio de papaína, diferentemente dos resultados referentes ao uso da LBP, que indicam que a terapia é eficaz na modulação do processo inflamatório.

Estudos apontam que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais são capazes de inibir a atividade de MPO em condições inflamatórias (KETTLE; WINTERBOURN, 1991; NÈVE et al., 2001). O trabalho de Pallotta et al. (2012) demonstrou que os níveis de MPO no grupo tratado com diclofenaco, diminuíram em relação ao grupo que não foi submetido a nenhum tipo de tratamento para a inflamação articular induzida pelo uso de kaolin associado à carragenina. Em nosso estudo, constatamos que não houve redução estatisticamente significativa na atividade de MPO nos grupos tratados com diclofenaco. Neste caso, podemos deduzir que o fato de termos utilizado diclofenaco sódico de uso tópico, talvez tenha

contribuído para a sua falta de efetividade, visto que nos estudos acima citados, foram utilizados anti-inflamatórios não-esteroidais de uso sistêmico. Adicionalmente, podemos pressupor que a dose ou a frequência de uso de AINE utilizada, não tenha sido a ideal para desencadear a redução da atividade de MPO no processo inflamatório induzido.

Além da presença de atividade de MPO e de células inflamatórias, em condições osteoartriticas pode haver a liberação de diversas e diferentes citocinas. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α são frequentemente estudadas e detectadas. Ademais, IL-6 e IL-10 também podem ser encontradas.

No presente estudo, realizamos as análises de expressão gênica e expressão proteica de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias, além de outros marcadores de inflamação e degradação, a fim de identificar a presença de processo inflamatório, lesão articular e possível reparo no tecido submetido à OA induzida por meio de papaína na articulação de animais.

Estudos realizados previamente, utilizando o mesmo método de indução de OA, por meio de injeção de papaína na articulação, muniram-se de análises similares às realizadas no presente estudo. Por exemplo, o estudo conduzido por Alves et al. (2013b) quantificou a expressão gênica de IL-1 β e IL-6, além da expressão proteica de TNF- α após indução de OA pela uso de papaína na articulação de joelhos de ratos. Os resultados demonstraram que tanto a expressão gênica de IL-1 β e IL-6, quanto a expressão proteica de TNF- α apresentaram aumento significativo em relação ao grupo que não sofreu indução de OA.

Da mesma forma, o estudo de Dos Santos et al. (2014) realizou a análise da expressão proteica de TNF- α , bem como, a análise da expressão gênica de IL-1 β , IL-6 e IL-10 após a injeção de papaína para indução de OA. Os dados encontrados apontaram para a elevação significativa de expressão de mRNA de IL-1 β e IL-6, adicionalmente ao aumento da expressão proteica de TNF- α , no grupo portador de OA, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, foi verificado que a expressão gênica de IL-10 foi reduzida quando comparada a do grupo não submetido à indução de OA.

Em nosso trabalho identificamos um aumento da expressão de mRNA de IL-1 β nos animais que receberam indução de OA, quando comparados ao grupo Hígido. Entretanto, a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-10 não apresentou alterações significantes. Por outro lado, observamos a elevação da expressão proteica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no grupo acometido por OA, quando comparado ao grupo que não recebeu a indução, o grupo Hígido. Ademais, a expressão proteica de IL-10 não apresentou alterações entre os grupos

experimentais.

Estes resultados demonstram que o modelo experimental de indução de OA pelo uso de papaína utilizado no presente trabalho, assim como nos estudos supracitados (ALVES et al., 2013b; DOS SANTOS et al., 2014), de fato desencadeia processo inflamatório no tecido articular, fazendo com que haja liberação de citocinas inflamatórias. Dessa forma, podemos inferir que o referido modelo experimental é adequado para o estudo e descoberta do tratamento ideal para a doença.

A partir dos dados encontrados no presente estudo em relação à expressão gênica e proteica de citocinas inflamatórias e pró-inflamatórias, fomos capazes de verificar que o tratamento com LBP isolada e exercício associado à LBP desencadearam melhores resultados em relação aos demais tratamentos. De maneira geral, os grupos LBP e Exerc + LBP foram efetivos em reduzir a expressão de mRNA e a expressão proteica das citocinas inflamatórias analisadas.

Estudos comprovam que a LBP é eficaz em reduzir níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (ALVES et al., 2013b; DOS SANTOS et al., 2014) em casos de OA induzida por papaína. Entretanto, ainda existem controvérsias em relação aos melhores parâmetros a serem utilizados. A partir dos resultados apresentados no estudo em questão, podemos inferir que a LBP utilizando potência de 100 mw e dose de 6J por ponto, é capaz de diminuir a expressão de citocinas inflamatórias e, dessa forma, contribuir para a modulação do processo inflamatório gerado pelo uso de papaína na articulação.

Marcadores inflamatórios podem ser afetados pela realização de exercícios físicos, dependendo do tipo e contração muscular, assim como, intensidade, duração e consistência da prática do exercício (THOMAS, 2013). A partir do que verificamos em nossos resultados, podemos sugerir que a realização de exercício físico, no caso, por meio de sessões de natação progressiva, com o tempo de duração e carga utilizados no presente estudo, não foi eficiente em reduzir de forma estatisticamente significativa os níveis de marcadores inflamatórios decorrentes do processo de OA induzida por meio de papaína. Entretanto, observamos que a expressão proteica de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no grupo Exerc apresentou uma tendência à redução, ficando muito próxima aos resultados de expressão proteica do grupo Hígido.

Os efeitos benéficos do laser utilizado como terapia isolada puderam ser comprovados no presente estudo, e juntamente com a prática de natação, foi capaz de modular o processo inflamatório decorrente da OA induzida. Acreditamos que a associação de LBP ao exercício físico seja uma boa alternativa de tratamento nos casos de OA induzida, visto que comprovamos a redução de marcadores inflamatórios por meio da LBP, observamos uma

tendência do grupo Exerc em reduzir a expressão proteica (próxima a do grupo Hígido) de algumas citocinas inflamatórias e comprovamos a efetividade na associação das duas terapias. A combinação de LBP e exercício físico pode contribuir de maneira interessante no tratamento de OA, pois há a associação de todos os efeitos positivos, já citados anteriormente, de ambas as terapias.

Ademais a estes resultados, verificamos que todos os tratamentos, quando comparados ao grupo OA, foram capazes de diminuir, mesmo que de forma discreta, os níveis de expressão proteica de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Dessa forma, inferimos que todos os tratamentos utilizados no presente estudo, tem potencial para diminuir a liberação de citocinas inflamatórias decorrentes da OA induzida por meio de papaína. Possivelmente a alteração de alguns parâmetros nos tratamentos, como por exemplo, dose e frequência de terapia, poderiam contribuir para resultados mais efetivos.

Como citado anteriormente, pacientes com OA produzem níveis elevados de biomarcadores inflamatórios, como citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-8, IL-6 e TNF- α), além de produzir um aumento nos níveis de PGE₂ e óxido nítrico, adicionalmente a uma diminuição na síntese de colágeno e um aumento nas proteases degradativas, incluindo metaloproteinases da matriz (MMPs) (KRASNOKUTSKY et al., 2007). As MMPs são responsáveis pela destruição da cartilagem nos casos de OA, sendo os macrófagos responsáveis por produzir um amplo espectro destas proteases e de mediadores que podem induzir a sua expressão, como IL-1 e TNF- α (FAN et al., 2005; FLANNELLY et al., 2002).

O estudo de Mehraban et al. (1998) teve como objetivo definir a regulação de MMP-3 e tecido inibidor de MMP-1 em condrócitos e líquido sinovial presente em OA experimental. Os resultados demonstraram que em quatro semanas após a indução de OA, houve resposta inflamatória no líquido sinovial acompanhada por atividade de MMP-3.

No estudo de Pickarski et al. (2011) foi descrito um confiável e consistente método para examinar as mudanças no perfil da expressão gênica de agrecanase-1 e MMP-13 na cartilagem articular e osso subcondral, após indução de OA em ratos. Os dados demonstraram aumento nos níveis de mRNA de MMP-13 uma semana após a indução.

Com o propósito de investigar os efeitos da LBP sobre a OA induzida pelo uso de papaína no tecido articular do joelho de ratos, o estudo conduzido por Alves et al. (2014) realizou a análise da produção de MMP-2 e MMP-9 no tecido lesionado. Como resultado, foi observado um aumento na produção de MMP-2 e MMP-9 no grupo submetido à indução de OA.

Corroborando as evidências científicas, em nosso estudo fomos capazes de verificar aumento na expressão de mRNA de MMP-3 e MMP-13 nos grupos submetidos à indução de OA pela injeção de papaína. Esses dados, somados à análise morfológica do estudo, nos levam a crer que a papaína é eficiente em provocar degradação da matriz extracelular da cartilagem, sendo este um sinal compatível com a presença de OA.

Segundo o estudo de Alves et al. (2014), a LBP foi capaz de reduzir os níveis de MMP-2 e MMP-9 nos animais que foram submetidos à indução de OA pelo uso de papaína. Em nosso estudo, semelhantemente observamos que nos animais que foram submetidos à indução de OA, o tratamento com LBP apresentou melhores resultados na redução dos níveis de expressão gênica de MMP-3 e MMP-13, assim como os tratamentos associados à LBP. Além disso, os grupos tratados com diclofenaco e os grupos com associação de diclofenaco e outras terapias, também apresentaram bons resultados na redução de MMP-3 e MMP-13. Houve redução dos níveis de MMP-3 nos grupos experimentais submetidos a todos os tratamentos, sendo que esses níveis se mantiveram muito próximo aos níveis observados no grupo Hígido. Entretanto, essa diminuição não foi estatisticamente significativa. Além disso, houve redução dos níveis de MMP-13 em todos os grupos experimentais tratados, exceto no grupo Diclo + LBP, porém, da mesma forma, essa diminuição não foi estatisticamente significativa.

A partir destes resultados, podemos inferir que todos os tratamentos utilizados no presente estudo, tem potencial para reverter e reduzir a degradação da matriz extracelular da cartilagem provocada por meio da injeção de papaína. Os resultados demonstram que os tratamentos, porém de forma mais clara e eficiente a LBP, são capazes de reduzir os níveis das enzimas MMPs de forma que eles se aproximem aos níveis normais, encontrados no grupo Hígido.

Os dados encontrados na análise das MMPs confirmam os demais resultados encontrados no presente estudo, em que o grupo LBP apresentou resultados mais semelhantes aos do grupo Hígido (que não foi submetido à indução de OA e nenhum tipo de tratamento), indicando que a LBP é efetiva em regredir o quadro instalado, sendo capaz de modular o processo inflamatório, reduzir alterações morfológicas e reduzir a degradação da matriz extracelular, de maneira mais efetiva que os demais tratamentos.

As evidências científicas que correlacionam o uso de LBP, uso de anti-inflamatórios não-esteroidais e exercício físico aos níveis de MMPs, são escassas, sendo este, um fator limitante no embasamento dos dados encontrados no presente estudo.

Além da degradação da matriz extracelular da cartilagem em casos de OA,

adicionalmente pode ser encontrado um processo inflamatório. A ciclooxigenase (COX) é a enzima chave utilizada na conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas. A COX-1 é expressa em diversos tecidos de forma constitutiva e desempenha um papel na homeostase. Por outro lado, a COX-2 não é expressa constitutivamente de forma considerável por tecidos saudáveis, sendo rapidamente induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e oncogenes (VANE et al., 1998; DUBOIS et al., 1998). A expressão excessiva de COX-2 é importante em alguns estágios patofisiológicos de algumas doenças e processos como inflamação, câncer, angiogênese, doença de Alzheimer e algumas formas de artrite (MARTEL-PELLETIER, 2003).

No estudo de Kang et al. (1996) foi avaliada a expressão gênica de COX-2 em artrite reumatoide em humanos e artrite induzida em ratos, para observar o envolvimento de COX-2 na inflamação decorrente das referidas patologias. Os resultados detectaram a expressão de COX-2 em células do revestimento sinovial, agregados linfoides e vasos sanguíneos. Entretanto, não demonstraram a expressão de COX-2 em membrana sinovial normal. Os autores sugerem que a expressão de COX-2 é aumentada em doenças inflamatórias articulares.

Já o estudo de Siegle et al. (1998) comparou a expressão de COX-1 e COX-2 no tecido sinovial de pacientes com diferentes formas de artrite inflamatória: artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriática e OA. Os dados encontrados demonstraram um aumento na expressão de COX-2, e nenhuma alteração na expressão de COX-1 no tecido sinovial destes pacientes.

A cartilagem com OA, libera espontaneamente PGE₂ em níveis 50 vezes maiores que uma cartilagem normal e níveis 18 vezes maiores que uma cartilagem normal estimulada por citocinas e endotoxinas (AMIN et al., 1997). Estes dados indicam que a expressão de COX-2 é aumentada na membrana sinovial e cartilagem artrítica, sugerindo que a inibição de COX-2 pode resultar em melhora das doenças artríticas (MARTEL-PELLETIER et al., 2003).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram aumento na expressão gênica de COX-2 nos animais submetidos à indução de OA pelo uso de papaína e nenhuma alteração na expressão gênica de COX-1 entre os grupos experimentais. Estes resultados nos levam a crer, que assim como as evidências científicas apontam, a OA é capaz de aumentar os níveis de expressão de COX-2 e não alterar os níveis de expressão de COX-1. Os presentes dados são importantes no sentido de conduzir a busca para um tratamento ideal, visto que sabe-se que a inibição de COX-2 pode trazer resultados benéficos em casos de OA.

Entre os tratamentos aplicados no presente estudo, verificamos que a LBP, foi efetiva em reduzir os níveis de expressão gênica de COX-2 nos animais acometidos por OA induzida por papaína e por outro lado, não alterou os níveis de COX-1 em todos os animais do estudo. Estes resultados sugerem que a LBP é capaz de modular o processo inflamatório decorrente da OA, reduzindo claramente marcadores indicativos de presença de processo inflamatório. Além disso, estes dados podem indicar que a LBP é uma alternativa interessante aos fármacos anti-inflamatórios no tratamento de casos de OA, visto que inibe apenas a expressão gênica de COX-2, não alterando a expressão gênica de COX-1, ou seja, não interferindo na forma constitutiva de COX presente em diferentes tecidos e responsável pela homeostase no organismo. Dessa forma, os efeitos adversos relacionados à inibição de COX-1 não seriam observados com o uso da LBP.

Diferentes estudos reportam a LBP na redução da expressão de COX-2 em situações inflamatórias (DE PAIVA CARVALHO et al., 2013; MARCOS et al. 2011, 2012). Entretanto, o uso da terapia laser na expressão de COX em casos de OA ainda é uma área pouco explorada, e que embora tenha apresentado efeitos positivos no presente estudo, necessita de maior conhecimento em relação a parâmetros capazes de alterar os níveis de expressão desta enzima.

As enzimas COX desempenham um papel fundamental na síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Sendo que a prostaglandina E_2 é o principal mediador de inflamação em doenças como artrite reumatoide e OA (PARK et al., 2006).

A PGE_2 é grande responsável pela indução de degradação da cartilagem, provocando aumento da síntese de DNA e inibição de colágeno (O'KEEFE et al., 1992). Além disso, a PGE_2 é mediadora do aumento de metaloproteinasas produzidas em condrócitos humanos (BUNNING; RUSSELL, 1989), fibroblastos sinoviais (MEHINDATE et al., 1995) e na cartilagem, em casos de OA (AMIN et al., 1997). Adicionalmente, a PGE_2 amplia o processo inflamatório local, estimulando a expressão de IL-1 β (LORENZ et al., 1995). Assim sendo, a inibição da síntese de PGE_2 tem sido uma importante estratégia anti-inflamatória nos últimos 100 anos (VANE; BOTTING, 2003).

O estudo de Guay et al. (2004) demonstrou aumento nos níveis de PGE_2 em animais que sofreram indução de artrite através do uso de carragenina na pata. Da mesma forma, Pallotta et al. (2012) também verificou aumento nos níveis de PGE_2 nos animais que foram submetidos à indução de inflamação articular.

No presente estudo, assim como nos supracitados, observamos um aumento dos níveis de PGE_2 no grupo submetido à indução de OA pelo uso de papaína. Este resultado, em adição

a todos os demais encontrados, sugere que a papaína é eficiente em desencadear um processo na articulação, com sinais inflamatórios, compatíveis com a presença de OA. Ademais, verificamos que todos os tratamentos utilizados no presente trabalho, exceto o tratamento com exercício físico de forma isolada, acarretaram na redução dos níveis de PGE₂ no plasma sanguíneo, quando comparados ao grupo OA.

O estudo de Pallotta et al. (2012) observou que o tratamento com diclofenaco intramuscular, de uso sistêmico, e com LBP com doses de 3J e 6J foi capaz de reduzir os níveis de PGE₂ em relação ao grupo de animais que não sofreu nenhum tipo de tratamento para a inflamação articular decorrente do uso de kaolin associado à carragenina. Resultado este, semelhante ao nosso, em que todos os grupos tratados com diclofenaco sódico, porém de uso tópico e LBP foram capazes de diminuir os níveis de PGE₂. Esses dados nos levam a crer, que de fato, o tratamento com AINEs e LBP são interessantes na modulação do processo inflamatório provocado pela OA, levando à redução de biomarcadores encontrados na inflamação.

Por outro lado, observamos que o tratamento isolado com exercício físico não foi efetivo em alterar os níveis de PGE₂ encontrados nos animais submetidos à indução de OA por meio de papaína, entretanto, quando aplicado de maneira combinada a outras terapias, ele foi capaz de reduzir os níveis de PGE₂. Esses dados sugerem que o exercício físico parece não ter a mesma efetividade que outros tratamentos em reduzir os níveis de todos os marcadores presentes no processo inflamatório e analisados no presente estudo, porém percebemos que o protocolo de exercício físico foi eficaz em interferir em alguns marcadores inflamatórios analisados. Dessa forma, acreditamos que possivelmente o protocolo de exercício físico utilizado no presente estudo não seja o mais adequado para este fim, sendo que alterações a respeito do tipo, duração e frequência semanal do exercício poderiam ser capazes de alterar os resultados encontrados.

Entre os tratamentos realizados para OA induzida pela papaína, as terapias que apresentaram melhores resultados em reduzir os níveis de PGE₂ foram a LBP de forma isolada e a LBP combinada com exercício físico. A LBP é conhecida como importante ferramenta na modulação de inflamação decorrente de OA, sendo que diversos estudos certificam o seu uso para redução de marcadores inflamatórios (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; DOS SANTOS et al., 2014; PALLOTTA et al., 2012;). De acordo com nossos resultados, inferimos que a LBP é o tratamento que apresenta melhores resultados em diminuir PGE₂ no plasma sanguíneo de animais submetidos à indução de OA pelo uso de papaína.

Além disso, acreditamos que os bons resultados encontrados no grupo que associa LBP ao exercício físico, se dê principalmente pelos benefícios do laser na redução de PGE_2 em casos de OA, visto que o grupo experimental submetido ao tratamento isolado com natação não foi efetivo em diminuir os níveis de PGE_2 . A escassez de estudos que utilizam tratamento com exercício físico para OA, mensurando marcadores inflamatórios, impossibilita a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

Através dos dados verificados no presente estudo, observamos que a associação de terapias foi eficiente em reduzir os níveis de PGE_2 presentes no plasma sanguíneo de animais submetidos à indução de OA pelo uso de papaína. Porém, os melhores resultados foram encontrados com o uso de uma terapia isolada (LBP), indicando que neste caso, não há necessidade de tratamento combinado para potencializar os efeitos benéficos das terapias.

A partir de estudos realizados previamente, somos capaz de conhecer os benefícios do uso isolado de AINEs (DRAY, 1995; GALLELLI et al., 2013; PALLOTTA et al., 2012;) e LBP (ALVES et al., 2013a; ALVES et al., 2013b; PALLOTTA et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014) na modulação do processo inflamatório decorrente da OA. Sendo que, as referidas terapias são capazes de reduzir os níveis de biomarcadores inflamatórios. Entretanto, a associação de terapias ainda está fracamente elucidada.

A partir da análise conjunta de todos os resultados apresentados no presente estudo, podemos inferir que a LBP é uma terapia segura e eficiente na modulação do processo inflamatório decorrente da OA induzida pelo uso de papaína na articulação do joelho de animais. A mesma, é capaz de diminuir a presença de sinais de degradação no tecido articular, bem como, reduzir a presença de marcadores de inflamação.

A terapia com diclofenaco sódico de uso tópico (com dose e frequência semanal utilizada no presente estudo) não parece ser a mais adequada para o tratamento no caso acima referido. O fármaco não apresentou apenas resultados positivos nas análises propostas. Portanto, podemos sugerir que a dose, ou até mesmo a frequência de uso, podem ter sido responsáveis pelos resultados menos efetivos. Para fins de comparação de todas as terapias empregadas, utilizamos a mesma frequência de tratamento (três vezes por semana, durante oito semanas consecutivas), porém pode não ter sido o suficiente para o fármaco surtir efeitos. Além disso, podemos sugerir que o uso de AINE de uso tópico não é o tratamento mais adequado para casos de OA, visto que o seu uso pode desencadear diversos efeitos adversos, mesmo em casos de uso tópico.

Existem evidências de que o exercício físico pode ser adjuvante no combate à dor, incapacidade e diminuição de funcionalidade em pacientes acometidos pela OA. Além disso,

o exercício físico empregado no tratamento da doença pode ser eficiente em colaborar com o bem estar do paciente, ajudar na redução da massa corporal e diminuir a sobrecarga articular. No presente estudo, verificamos que a terapia com exercício físico aplicado de forma isolada, não foi a terapia mais eficiente em modular o processo inflamatório e interferir no processo de degradação articular decorrente de OA, agindo apenas em alguns marcados inflamatórios e de degradação.

A associação de terapias no tratamento da OA ocorre para que haja uma potencialização dos efeitos benéficos e uma redução (ou anulação) dos efeitos adversos, que podem ocorrer com o uso de determinadas terapias. A partir dos nossos resultados, podemos inferir que a associação de terapias não parece produzir malefícios à articulação acometida por OA, visto que em nenhum dos grupos experimentais vimos uma piora no quadro de inflamação ou degradação na articulação. Além disso, observamos melhoras significativas com a associação de LBP e exercício físico.

Dessa forma, sugerimos que entre as combinações de tratamentos utilizados no presente estudo, a LBP associada ao exercício físico parece ser a mais interessante em casos de OA. Os bons resultados da LBP em relação ao processo inflamatório e de degradação da cartilagem articular, aliados aos já comprovados, e citados anteriormente, benefícios do exercício físico em casos de OA podem contribuir de forma efetiva e segura no tratamento da osteoartrite.

Por fim, acreditamos que seja de extrema importância a condução de estudos complementares que sejam capazes de analisar de forma mais específica o papel do exercício físico no tratamento da OA, bem como, analisar a associação de tratamentos sob outros aspectos relacionados à doença, como dor e perda de funcionalidade.

8 CONCLUSÃO

O modelo experimental utilizado através da injeção intra-articular de papaína no joelho de ratos, demonstrou-se satisfatório em induzir OA, sendo desta forma, adequado para responder os objetivos propostos no presente estudo. Através das análises realizadas, conseguimos observar que a papaína é capaz de induzir adequadamente, de maneira muito similar, a OA encontrada em seres humanos, com presença de degeneração da cartilagem articular e processo inflamatório.

Os resultados do presente estudo apontam que, entre os tratamentos isolados, a laserterapia de baixa potência foi a mais eficiente em diminuir os danos e modular o processo inflamatório decorrente da injeção de papaína na articulação do joelho de ratos. Adicionalmente, verificamos que a terapia com exercício físico atuou de maneira menos eficiente sobre a articulação submetida à indução de OA, entretanto, demonstrando sinais discretos de melhora na condição osteoartítica. A terapia com diclofenaco não apresentou resultados, em sua maioria, efetivos em relação à OA induzida por meio de papaína. Em relação à associação de terapias, pudemos observar que o tratamento com laserterapia de baixa potência associado ao exercício físico foi capaz de reduzir alguns sinais da OA e do processo inflamatório decorrente desta patologia.

Dessa forma, concluímos que a associação de laserterapia de baixa potência com a prática de exercício físico é o melhor tratamento para OA induzida por meio de papaína, pois alia os bons resultados da LBP em relação ao processo inflamatório e de degradação envolvidos na OA, com os conhecidos benefícios do exercício físico para a saúde de uma maneira geral.

REFERÊNCIAS*

- ABATANGELO, G.; BOTTI, P.; DEL BUE, M.; GEI, G.; SAMSON, J.C.; CORTIVO, R.; DE GALATEO, A.; MARTELLI, M. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. I. Biochemical results. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 241, p. 278-285, 1989.
- ABRAMSON, S.B. Inflammation in osteoarthritis. **J. Rheumatol. Suppl.**, v. 70, p. 70-76, 2004.
- ALVES, A. C.; ALBERTINI, R.; DOS SANTOS, S. A.; LEAL-JUNIOR, E. C; SANTANA, E.; SERRA, A. J.; SILVA-JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P. Effect of low-level laser therapy on metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 production and percentage of collagen types I and III in a papain cartilage injury model. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, n. 3, p. 911-919, 2013a.
- ALVES, A. C.; VIEIRA, R.; LEAL-JUNIOR, E. C; DOS SANTOS, S.; LIGEIRO, A. P.; ALBERTINI, R.; JUNIOR, J.; DE CARVALHO, P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v. 15, n. 5, p.R116, 2013b.
- AMIN, A. R.; ATTUR, M. G.; PATEL, R. N.; THAKKER, G. D.; MARSHALL, P. J.; REDISKE, J.; STUCHIN, S. A.; PATEL, I. R.; ABRAMSON, S. B. Superinduction of cyclooxygenase-2-activity in human osteoarthritis-affected cartilage: influence of nitric oxide. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n.6, p.1231-1237, 1997.
- BAI, Y. H.; AN, T. H.; LIM, S. C.; PAK, S. C.; BAE, C. S. Effect of alginate acid on experimentally induced arthropathy in rabbit model. **Korean J. Vet. Res.**, v. 42, p. 153-162, 2002.
- BIBIKOVA, A.; ORON, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. **Anat. Rec.**, v. 235, n. 3, p. 374-380, 1993.
- BJORDAL, J. M.; COUPPÉ, C.; CHOW, R. T.; TUNÉR, J.; LJUNGGREN, E. A. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. **Aust. J. Physiother.**, v. 49, n. 2, p. 107-116, 2003.
- BJORDAL, J. M.; LJUNGGREN, A. E.; 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**, v. 329, n. 7478, p. 1317, 2004.
- BLIDDAL, H.; HELLESEN, C.; DITLEVSEN P. Soft-laser therapy of rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 16, n.4, p.225-228, 1987.
- BONNET, C. S.; WALSH, D. A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. **Rheumatology**, v. 44, p. 7-16, 2005.
- BOSOMWOTH, N. J. Exercise and knee osteoarthritis benefit or hazard. **Csn Fam Physician.**, v. 55, n. 9, p. 871-878, 2009.
- BRANDT, K. D.; MANKIN H. J.; SHULMAN, L. E. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 13, p. 1126-1160, 1986.
- BROWN, M. P.; WEST, L. A.; MERRITT, K. A.; PLAAS, A. H. Changes in sulfation patterns of chondroitin sulfate in equine articular cartilage and synovial fluid in response to aging and osteoarthritis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 59, n. 6, p. 786-791, 1998.
- BRÜHLMANN, P.; MICHEL, B. A. Topical diclofenac patch in patients with knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, controlled clinical trial. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 21, n. 2, p. 193-198, 2003.

* *De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUNNING, R. A.; RUSSEL, R. G. The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. **Arthritis Rheum.**, v. 32, n. 6, p. 780-784, 1989.

CAMPBELL, W. W.; CRIM, M. C.; DALLAL, G. E.; YOUNG, V. R.; EVANS, W. J. Increased protein requirements in elderly people: new data and retrospective reassessments. **Am J Clin Nutr.**, v. 60, n. 4, p. 501-509, 1994.

CHO, H. J.; LIM, S. C.; KIM, S. G.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; CHOI, S. H.; CHO, Y. S.; BAE, C. S. Effect of low-level laser therapy on osteoarthropathy in rabbit. **In Vivo**, v. 18, n. 5, p. 585-591, 2004.

CHOW, R. T.; BARNESLEY, L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. **Lasers Surg. Med.**, v. 37, n. 1, p. 46-52, 2005.

CHOW, R. T.; JOHNSON, M. I.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **Lancet**, v. 374, n. 9705, p. 1897-1908, 2009.

CIFUENTES, D. J.; ROCHA, L. G.; SILVA, L. A.; BRITO, A. C.; RUEFF-BARROSO C. R.; PORTO, L. C.; PINHO, R. A. Decrease in oxidative stress and histological changes induced by physical exercise calibrated in rats with osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate. **Osteoarth. Cartilage**, v. 18, n. 8, p. 1088-1095, 2010.

CLEMMONS, D. R.; BUSBY, W. H. JR, GARMONG, A.; ALTMAN, R. D.; KARR, R. Inhibition of insulin-like growth factor binding protein 5 proteolysis in articular cartilage and joint fluid results in enhanced concentrations of insulin-like growth factor 1 and is associated with improved osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 3, p. 694-703, 2002.

DA ROSA, A. S.; DOS SANTOS, A. F.; DA SILVA M. M.; FACCO, G. G.; PERREIRA, D. M.; ALVES, A. C.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; DE CARVALHO, P. Effects of low-level laser therapy at wavelengths of 660 and 808 nm in experimental model of osteoarthritis. **Photochem. Photobiol.**, v. 88, n. 1, p. 161-166, 2012.

DE PAIVA CARVALHO, R. L.; LEAL-JUNIOR, E. C.; PETRELLIS, M. C.; MARCOS, R. L.; DE CARVALHO, M. H.; DE NUCCI, G.; LOPES-MARTINS, R. A. Effects of low-level laser therapy (LLLT) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats. **Photochem Photobiol.**, v. 89, n. 2, p. 508-512, 2013.

DING, C.; JONES, G.; WLUKA, A. E.; CICUTTINI, F. What can we learn about osteoarthritis by studying a healthy person against a person with early onset of disease? **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 22, n. 5, p. 520-527, 2010.

DOS SANTOS, S. A.; ALVES, A. C.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; ALBERTINI, R.; VIEIRA, R de P.; LIGEIRO, A. P.; JUNIOR, J. A.; DE CARVALHO, P de T. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, n.3, p. 1051-1058, 2014.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

DREISER, R. L.; TISNE-CAMUS, M. DHEP plasters as a topical treatment of knee osteoarthritis--a double-blind placebo-controlled study. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 19, n. 3, p. 117-123, 1993.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

EGAN, B. A.; MENTES, J. C. Benefits of physical activity for knee osteoarthritis: a brief review. **J. Gerontol. Nurs.**, v. 36, n. 9, p. 9-14, 2010.

ESCALANTE, Y.; SAAVEDRA, J. M.; GARCÍA-HERMOSO, A.; SILVA, A. J.; BARBOSA, T. M. Physical exercise and reduction of pain in adults with lower limb osteoarthritis: a systematic review. **J. Back Musculoskelet. Rehabil.**, v. 23, n. 4, p. 175-186, 2010.

FALLAH MOHAMMADI, M.; HAJIZADEH MOGHADDAM, A.; MIKARIMPUR, H. The effects of a moderate exercise program on knee osteoarthritis in male wistar rats. **Iran J. Basic Med. Sci.**, v. 16, n. 5, p. 683-688, 2013.

FAN, Z.; BAU, B.; YANG, H.; SOEDER, S.; AIGNER, T. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin 1- β . **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 1, p. 136-143, 2005.

FLANNELLY, J.; CHAMBERS, M. G.; DUDHIA, J.; HEMBRY, R. M.; MURPHY, G.; MASON, R. M.; BAYLISS, M. T. Metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression. In the murine STR/ort modelo f osteoarthritis. **Osteoarth. Cartilage**, v. 10, n.9, p. 722-733, 2002.

FULLER, P.; ROTH, S. Diclofenac sodium topical solution with dimethyl sulfoxide, a viable alternative to oral nonsteroidal anti-inflammatories in osteoarthritis: review of current evidence. **J. Multidiscip. Healthc.**, v. 4, p. 223-231, 2011.

GALLELLI, L.; GALASSO, O.; FALCONE, D.; SOUTHWORTH, S.; GRECO, M.; VENTURA, V.; ROMUALDI, P.; CORIGLIANO, A.; TERRACCIANO, R.; SAVINO, R.; GULLETTA, E.; GASPARINI, G.; DE SARRO, G. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on clinical outcomes, synovial fluid cytokine concentration and signal transduction pathways in knee osteoarthritis. A randomized open label trial. **Osteoarth. Cartilage**, v. 21, n. 9, p. 1400-1408, 2013.

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Biomarkers in osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 15, p. 641-646, 2003.

GOLDMAN, J. A.; CHIAPELLA, J.; CASEY, H.; BASS, N.; GRAHAM, J.; McCLATCHEY, W.; DRONAVALLI, R. V.; BROWN, R.; BENNETT, W. J.; MILLER, S. B.; WILSON, C. H.; PEARSON, B.; HAUN, C.; PERSINSKI, L.; HUEY, H.; MUCKERHEIDE, M. Laser therapy of rheumatoid arthritis. **Lasers Surg Med.**, v. 1, n. 1, p. 93-101, 1980.

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Osteoarthritis. **J. Cell Physiol.**, v. 213, n. 3, p. 626-634, 2007.

GRACE, D.; ROGERS, J.; SKEITH, K.; ANDERSON, K. Topical diclofenac versus placebo: a double blind, randomized clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee. **J. Rheumatol.**, v. 26, n. 12, p. 2659-2663, 1999.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E₂ (PGE₂) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE₂ synthase-1. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 23, p. 24866-24872, 2004.

GUCCIONE A. A.; FELSON, D. T.; ANDERSON, J. J. Defining arthritis and measuring functional status in elders: methodological issues in the study of disease and physical disability. **Am. J. Public. Health.**, v. 80, n. 8, p. 945-949, 1990.

GÜR, A.; KARAKOÇ, M.; NAS, K.; CEVIK, R.; SARAÇ, J.; DEMIR, E. Efficacy of low power laser therapy in fibromyalgia: a single-blind, placebo-controlled trial. **Lasers Med. Sci.**, v. 17, n. 1, p. 57-61, 2002.

HARRI M.; KUUSELA P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol. Scand.**, v.126, n. 2, p.189-197, 1986.

HASHIMOTO, S.; CREIGHTON-ACHERMANN, L.; TAKAHASHI, K.; LOTZ, M. Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. **Osteoarth. Cartilage**, v. 10, n. 3, p. 180-187, 2002.

HAUPT, J. L.; FRISBIE, D. D.; McILWRAITH, C. W.; ROBBINS, P. D.; GHIVIZZANI, S.; EVANS, C. H.; NIXON, A. J. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. **J. Orthop. Res.**, v. 23, n. 1, p. 118-126, 2005.

- HEGEDUS, B.; VIHAROS, L.; GERVAIN, M.; GALFI, M. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. **Photomed. Laser Surg.**, v. 27, n. 4, p. 577-584, 2009.
- HERMAN, J. H.; KHOSLA, R. C. In vitro effects of Nd:YAG laser radiation on cartilage metabolism. **J. Rheumatol.**, v. 15, n. 12, p. 1818-1826, 1988.
- HEYNEMAN, C. A.; LAWLESS-LIDAY, C.; WALL, G. C. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. **Drugs**, v. 60, n. 3, p. 555-574, 2000.
- HOOTMAN, J. M.; MACERA, C. A.; HAM, S. A.; HELMICK, C. G.; SNIEZEK, J. E. Physical activity levels among the general US adult population and in adults with and without arthritis. **Arthritis & Rheum.**, v. 49, n. 1, p. 129-135, 2003.
- HUANG, Y. Y.; CHEN, A. C.; CARROL, J. D.; HAMBLIM, M. R. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, n. 4, p. 358-383, 2009.
- HUANG, M. H.; DING, H. J.; CHAI, C. Y.; HUANG, Y. F.; YANG, R. C. Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 24, n. 10, p. 1978-1984, 1997.
- HURLEY, M. V.; SCOTT, D. L. Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. **Br. J. Rheumatol.**, v. 37, n. 11, p. 1181-1187, 1998.
- HURLEY, M. V.; WALSH, N. E. Effectiveness and clinical applicability of integrated rehabilitation programs for knee osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 21, n. 2, p. 171-176, 2009.
- IHSAN, F. R. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. **Photomed. Laser Surg.**, v. 23, n. 3, p. 289-294, 2005.
- JAMTVEDT, G.; DAHM, K. T.; CHRISTIE, A.; MOE, R. H.; HAAVARDSHOLM, E.; HOLM, I.; HAGEN, K. B. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews. **Phys Ther.**, v. 88, n. 1, p. 123-136, 2008.
- JASIN, H. E. Immune mediated cartilage destruction. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 76, p. 111-116, 1988.
- JUHL, C.; CHRISTENSEN, R.; ROOS, E. M.; ZHANG, W.; LUND, H. Impact of exercise type and dose on pain and disability in knee osteoarthritis: a systematic review and meta-regression analysis of randomized controlled trials. **Arthritis Rheumatol.**, v. 66, n. 3, p. 622-636, 2014.
- KANG, R. Y.; FREIRE-MOAR, J.; SIGAL, E.; CHU, C.Q. Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 35, n. 8, p. 711-718, 1996.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C.C. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, n. 10, p. 1485-1492, 1991.
- KIKUCHI, T.; SAKUTA, T.; YAMAGUCHI, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. **Osteoarth. Cartilage**, v. 6, n. 3, p. 177-186, 1998.
- KRASNOKUTSKY, S.; SAMUELS, J.; ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis in 2007. **Bull NYU Hosp. Jt. Dis.**, v. 65, n. 3, p. 222-228, 2007.
- KUETTNER K.; GOLDBERG V.M. Introduction. In: _____ editors. **Osteoarthritic disorders**. Rosemont (IL): American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1995. p.xxi-v.
- LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; DE ALMEIDA, P.; RAMOS, L.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur. J. Appl. Physiol.**, V. 108, n. 6, p. 1083-1088, 2010.

- LEAL JUNIOR, E. C.; LOPES-MARTINS, R. A.; VANIN, A. A.; BARONI, B. M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V. V.; BJORDAL, J. M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 3, p. 425-431, 2009.
- LILGE, L.; TIERNEY, K.; NUSSBAUM, E. Low-level laser therapy for wound healing: feasibility of wound dressing transillumination. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 18, n. 5, p. 235-240, 2000.
- LIMA, W. P.; CARNEVALI, L. C. JR.; EDER, R.; COSTA ROSA, L. F.; BACCHI, E. M.; SEELAENDER, M. C. Lipid metabolism in trained rats: effect of guaraná (Paullinia cupana Mart.) supplementation. **Clin. Nutr.**, v. 24, n. 6, p. 1019-1028, 2005.
- LIN, Y. S.; HUANG, M. H.; CHAI, C. Y. Effects of helium-neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. **Osteoarth. Cartilage**, v. 14, n. 4, p. 377-383, 2006.
- LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 125, p. 67-71, 2001.
- LITALIEN, C.; JACQZ-AIGRAIN, E. Risks and benefits of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children: a comparison with paracetamol. **Paediatr. Drugs**, v. 3, n. 11, p. 817-858, 2001.
- LORENZ, J. J.; FURDON, P. J.; TAYLOR, J. D.; VERGHESE, M. W.; CHANDRA, G.; KOST, T. A.; HANELINE, S. A.; RONER, L. A.; GRAY, J. G. A cyclic adenosine 3',5'- monophosphate signal is required for the induction of IL-1 beta by TNF-alpha in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 155, n.2, p.836-844, 1995.
- LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H. SHAINBERG, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomed. Laser Surg.**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2005.
- MARCOS, R. L.; LEAL-JUNIOR, E. C.; MESSIAS F de M.; DE CARVALHO, M. H.; PALLOTA, R. C.; FRIGO, L.; DOS SANTOS, R. A.; RAMOS, L.; TEIXEIRA, S.; BJORDAL, J. M.; LOPES-MARTINS, R.A. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat achilles tendinitis: a consistent alternative to drugs. **Photochem Photobiol.**, v. 87, n. 6, p. 1447-1452, 2011.
- MARCOS, R. L.; LEAL-JUNIOR, E. C.; ARNOLD, G.; MAGNET, V.; RAHOUDJ, R.; WANG, X.; DEMEURIE, F.; MAGDALOU, J.; DE CARVALHO, M. H.; LOPES-MARTINS, R. A. Low level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. **J. Orthop. Res.**, v. 30, n. 12, p. 1945-1951, 2012.
- MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 33, n. 3, p. 155-167, 2003.
- MEHINDATE, K.; AL-DACCAK, R.; DAYER, J. M.; KENNEDY, B. P.; KRIS, C.; BORGEAT, P.; POUBELE, P. E.; MOURAD, W. Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E₂: evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A₂. **J. Immunol.**, v. 155, n. 7, 1995.
- MEHRABAN, F.; LARK, M. W.; AHMED, F. N.; XU, F.; MOSKOWITZ, R. W. Increased secretion and activity of matrix metalloproteinase-3 in synovial tissues and chondrocytes from experimental osteoarthritis. **Osteoarth. Cartilage**, v. 6, n.4, p. 286-294, 1998.
- MOORE, R. A.; DERRY, S.; MCQUAY, H. J. Topical agents in the treatment of rheumatic pain. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 34, n. 2, p. 415-432, 2008.
- MOSELEY, J. B.; O'MALLEY, K.; PETERSEN, N. J.; MENKE, T. J.; BRODY, B. A.; KUYKENDALL, D. H.; HOLLINGSWORTH, J.C.; ASHTON, C.M.; WRAY, N.P. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 2, p. 81-88, 2002.
- MURAT, N.; KARADAM, B.; OZKAL, S.; KARATOSUN, V.; GIDENER, S. Quantification of papain-induced rat osteoarthritis in relation to time with the Mankin score. **Acta Orthop. Traumatol. Turc.**, v. 41, n. 3, p. 233-237, 2007.

- NÈVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILEVSKY, N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 417, n. 1-2, p. 37-43, 2001.
- O'BRIEN, T. P.; LI, Q.; ASHRAF, M. F.; MATTESON, D. M.; STARK, W.J.; CHAN, C.C. Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. **Arch. Ophthalmol.**, v. 116, n. 11, p. 1470-1474, 1998.
- OEGEMA, T. R.; CARPENTER, R. J.; HOFMEISTER, F.; THOMPSON, R. C. Jr. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. **Microsc. Res. Tech.**, v. 37, n. 4, p. 324-332, 1997.
- O'KEEFE, R. J.; CRABB, I. D.; PUZAS, J. E.; ROSIER, R.N. Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. **J. Bone Miner. Res.**, v. 7, n. 4, p. 397-404, 1992.
- O'REILLY, S. C.; MUIR, K. R.; DOHERTY, M. Effectiveness of home exercise on pain and disability from osteoarthritis of the knee: a randomised controlled trial. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 58, n. 1, p. 15-19, 1999.
- ORON, U.; ILIC, S.; DE TABOADA, L.; STREETER, J. Ga-As (808 nm) laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 3, p. 180-182, 2007.
- PALLOTTA, R. C.; BJORDAL, J. M.; FRIGO, L.; LEAL JUNIOR, E. C.; TEIXEIRA, S.; MARCOS, R. L.; RAMOS, L.; DE MOURA MESSIAS, F.; LOPES-MARTINS, R. A. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. **Lasers Med. Sci.**, 2011. v. 27, n.1, p. 71-78, 2012.
- PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S.B. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: The role of PGE₂ synthases. **Clin. Immunol.**, v. 119, n. 3, p. 229-240, 2006.
- PESSOA, E. S.; MELHADO, R. M.; THEODORO, L. H.; GARCIA, V. G. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. **Photomed. Laser Surg.**, v. 22, n.3, p. 199-204, 2004.
- PICKARSKI, M.; HAYAMI, T.; ZHUO, Y.; DUONG LE T.; Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 12, p. 197, 2011.
- POOLE, A. R.; KOJIMA, T.; YASUDA, T.; MWALE, F.; KOBAYASHI, M.; LAVERTY, S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 391 Suppl, p. 26-33, 2001.
- PUNZI, L.; RAMONDA, R.; DEBERG, M.; FRALLONARDO, P.; CAMPANA, C.; MUSACCHIO, E.; HENROTIN, Y. Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in erosive and non-erosive osteoarthritis of the hands. **Osteoarth. Cartilage**, v. 20, n.6, p. 557-561, 2012.
- RACUNICA, T. L.; TEICHTAHL, A. J.; WANG, Y.; WLUKA, A. E.; ENGLISH, D.R.; GILES, G.G.; O'SULLIVAN, R.; CICUTTINI, F.M. Effect of physical activity on articular knee joint structures in community-based adults. **Arthritis Rheum.**, v. 57, n. 7, p. 1261-1268, 2007.
- RATKAY, L. G.; CHOWDHARY, R. K.; NEYNDORFF, H. C.; WATERFIELD, J. D.; LEVY, J. G. Photodynamic therapy; a comparison with other immunomodulatory treatments of adjuvant-enhanced arthritis in MRL-lpr mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 95, n. 3, p. 373-377, 1994.
- ROCHKIND, S.; NISSAN, M.; ALON, M.; SHAMIR, M.; SALAME, K. Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats. **Lasers Surg. Med.**, v. 28, n. 3., p. 216-219, 2001.
- ROMPE, J. D.; FURIA, J. P.; MAFFULLI, N. Mid-portion Achilles tendinopathy – current options for treatment. **Disabil. Rehabil.**, v. 30, n. 20-22, p. 1666-1676, 2008.

- SAKKAS, L. I.; SCANZELLO, C.; JOHANSON, N.; BURKHOLDER, J.; MITRA, A.; SALGAME, P.; KATSETOS, C. D.; PLATSOUKAS, C. D. T cells and T-cell cytokine transcripts in the synovial membrane in patients with osteoarthritis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.5, n.4, p.430-437, 1998.
- SCHLAGER A.; KRONBERGER, P.; PETSCHKE, F.; ULMER, H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. **Lasers Surg. Med.**, v. 27, n.1, p. 39-42, 2000.
- SCHULTZ, R. J.; KRISHNAMURTHY, S.; THELMO, W.; RODRIGUEZ, J. E.; HARVEY, G. Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage: A preliminary study. **Lasers Surg. Med.**, v. 5, n. 6, p. 577-588, 1985.
- SEALS, D. R.; HAGBERG, J. M.; HURLEY, B. F.; EHSANI, A. A.; HOLLOSZY, J. O. Effects of endurance training on glucose tolerance and plasma lipid levels in older men and women. **JAMA**, v. 252, n. 5, p. 645-649, 1984.
- SEED, S. M.; DUNICAN, K. C.; LYNCH, A. M. Treatment options for osteoarthritis: considerations for older adults. **Hosp. Pract. (Minneapolis)**, v. 39, n. 1, p. 62-73, 2011.
- SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 6, p. 625-635, 2010.
- SIEBELT, I.; GROEN, H. C.; KOELEWIJN, S. J.; DE BLOIS, E.; SANDKER, M.; WAARSING, J. H.; MÜLLER, C.; VAN OSCH, G. J.; DE JONG, M.; WEINANS, H. Increased physical activity severely induces osteoarthritic changes in knee joints with papain induced sulfate-glycosaminoglycan depleted cartilage. **Arthritis Res. Ther.**, v. 16, n. 1:R32, 2014.
- SIEGLE, I.; KLEIN, T.; BACKMAN, J. T.; SAAL, J. G.; NÜSING, R. M.; FRITZ, P. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 1, p. 122-129, 1998.
- SILVEIRA, P. C.; SILVA, L. A.; FRAGA, D. B.; FREITAS, T. P.; STRECK, E. L.; PINHO, R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 4;95, n. 2, p. 89-92, 2009.
- STEINBECK, M. J.; NESTI, L. J.; SHARKEY, P. F.; PARVIZI, J. Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. **J. Orthop. Res.**, v. 25, n. 9, p. 1128-1135, 2007.
- TANAKA, H.; KITO, Y.; KATSURAMAKI, T.; TANAKA, M.; KITABAYASHI, N.; FUJIMORI, S.; UMEMOTO, J.; NAMBA, K. Effects of SL-1010 (sodium hyaluronate with high molecular weight) on experimental osteoarthritis induced by intra-articularly applied papain in guinea pigs. **Nihon Yakurigaku Zasshi.**, v. 100, n. 1, p. 77-86, 1992.
- TANNENBAUM, H.; BOMBARDIER, C.; DAVIS, P.; RUSSELL, A. S.; Third Canadian Consensus Conference Group. An evidence-based approach to prescribing nonsteroidal antiinflammatory drugs. Third Canadian Consensus Conference. **J. Rheumatol.**, v. 33, n. 1, p. 140-157, 2006.
- THOMAS, J. L. Helpful or harmful? Potential effects of exercise on select inflammatory conditions. **Phys. Sportsmed.**, v. 41, n. 4, p. 93-100, 2013.
- TIMOFEYEV, V. T.; PORYADIN, G. V.; GOLOVIZNIN, M. V. Laser irradiation as a potential pathogenetic method for immunocorrection in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 8, n. 1, p. 35-40, 2001.
- TSANG, I. K. Update on osteoarthritis. **Can. Fam. Physician.**, v. 36, p. 539-614, 1990.
- VAN DEN BERG, W. B. Lessons from animal models of osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 13, n. 5, p. 452-456, 2001.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb. Res.**, v. 110, n. 5-6, p. 255-258, 2003.

WALSH, D. A.; BONNET C. S.; TURNER, E. L., WILSON, D.; SITU, M., McWILLIAMS, D. F. Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. **Osteoarth. Cartilage**, v. 15, n.7, p. 743-751, 2007.

WANG, X.; LIANG, J.; KOIKE, T.; SUN, H.; ICHIKAWA, T.; KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M.; SHIKAMA, H.; WATANABE, T.; SASAGURI, Y.; FAN, J. Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. **Am. J. Pathol.**, v. 165, n. 4, p. 1375-1383, 2004.

WALKER, M. D.; RUMPF, S.; BAXTER, G. D.; HIRST, D. G.; LOWE, A. S. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg. Med.**, v. 26, n. 1, p. 41-47, 2000.

WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY - WALT: Dosage recommendation. Recommended treatment doses for low level laser therapy. Disponível em: <http://www.walt.nu/dosage-recommendations.html>. Acessado em 10 de agosto de 2011

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Programmes: Chronic diseases and health promotion. Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/#>. Acessado em 23 de setembro de 2014.

YU, W.; NAIM, J. O.; MCGOWAN, M. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem. Photobiol.**, v. 66, n. 6, p. 866-871, 1997.

ZHANG, W.; JONES, A.; DOHERTY, M. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 63, n. 8, p. 901-907, 2004.