

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Gustavo Balbinot

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E DA
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA ARTIFICIAL SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A UM
MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE DE JOELHO**

Porto Alegre
Março de 2013

Gustavo Balbinot

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E DA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA ARTIFICIAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE DE
JOELHO**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Neurociências do
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas: Neurociências.

Orientador:

Prof. Dr. Milton Antônio Zaro

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena

Porto alegre

Março de 2013

Gustavo Balbinot

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E DA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA ARTIFICIAL SOBRE O COMPORTAMENTO DE RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE DE
JOELHO**

Data da aprovação: _____

BANCA EXAMINADORA:

“Nós organizamos uma civilização global na qual os elementos mais cruciais – transporte, comunicação, e todas as outras indústrias; agricultura, medicina, educação, entretenimento, proteção ao meio ambiente; e até a instituição democrática do voto – dependem profundamente da ciência e da tecnologia.

Nós também arranjamos as coisas de forma que quase ninguém entende a ciência e a tecnologia. Esta é a receita para o desastre. Nós podemos escapar por enquanto, mas mais cedo ou mais tarde essa mistura combustível de ignorância e poder vai explodir na nossa cara.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço ao meu orientador Milton Zaro, por ter me oferecido a oportunidade de encerrar este grande desafio que foi realizar um mestrado em neurociências, por ter acreditado em mim, por ser esta pessoa dedicada à ciência e à docência, um exemplo de profissional. Eu lembro como se fosse hoje um dos períodos mais difíceis da minha vida, onde após ter trabalhado voluntariamente durante quase 3 anos em um grupo de pesquisa com Biomecânica da Locomoção buscava novos rumos e um pouco de valorização pelo meu trabalho. Foi então que o Zaro me propôs um mestrado nas neurociências, eu baixei a cabeça e estudei algo que eu nunca havia estudado, eu, acostumado com as derivadas e as integrais, programação, matemática pesada, comecei a estudar neurociências. Foi um mês de muito estudo, partindo da estaca zero até a aprovação como terceiro colocado no processo seletivo para o mestrado. Um agradecimento especial ao Zaro. Para o meu antigo orientador, Marco Vaz, por ter me ensinado a sempre buscar novos desafios e a nunca se acomodar, ser um eterno inconformado, por ter me ensinado que pessoas nota A procuram pessoas nota A para trabalharem ao seu lado, e também às de nota B e C, pois sabem que podem ajudá-las a melhorar, mas pessoas nota B não procuram pessoas nota A para trabalharem ao seu lado, elas têm medo e pouca humildade para admitir que ainda precisam aprender muito, e finalmente Marco Vaz aquela vez que tu me disseste: “existem diversas formas de chegar ao mesmo lugar”, isto me fez pensar muito e hoje em dia faz todo o sentido. Obrigado Marco por me ajudar a entender o que estava acontecendo comigo e com a minha carreira profissional naquele momento difícil, e me aceitar como parte do grupo GPBiC e da eterna sala 212 do LAPEX na EsEF onde fiz amigos que são para a vida toda (obrigado Mayra, Fábio e Bruno pela ajuda neste projeto). À minha co-orientadora Matilde Achaval pelos “puxões de orelha” e grandes aprendizados em sala de aula. Gostaria também de agradecer à CAPES pelo auxílio financeiro durante esta jornada.

Gostaria de agradecer à minha família de maneira especial, meu pai, Walter Balbinot que sempre apoiou os meus estudos de forma incondicional, juntos superamos as dificuldades que encontramos para a realização dos meus estudos no curso de Engenharia Elétrica na PUC, e depois na UFRGS. Conseguimos dar a volta

por cima, e hoje eu tenho certeza que estou no caminho certo, o caminho pelo qual eu escolhi seguir, e tu me apoiaste proporcionando essa oportunidade única de poder continuar estudando, isso mudou tudo e fará toda a diferença para meu futuro. À minha mãe que sempre me influenciou pela busca da ciência, na área biológica, e sempre foi um exemplo de profissional, uma professora de ciências que nunca desistiu de ensinar a ciência para seus alunos, mesmo nas situações mais precárias, em escolas perigosas, presenciando até situações de risco como tiroteios, entre outros. Aos meus irmãos, Eduardo, Guilherme e Luís Felipe, pelas produções de cerveja artesanal, que proporcionaram alívio para aqueles momentos de estresse, pelas descobertas astronômicas; um dia este satélite da nossa galáxia (BALBINOT1) vai nos ensinar de onde nós viemos e o quão pequeno nós somos, neste pálido ponto azul, cheios de ganância, ambições, falta de respeito pelo próximo, intrigas e perseguições, nós não vamos e não podemos fugir da nossa própria ignorância nestes diferentes cantos deste pálido ponto azul. E, obrigado pelas palhaçadas e “churras” que tornam a nossa vida muito mais feliz e são um exemplo do porque vivemos um dia após o outro (em busca do próximo “churras”). Para a Clarissa gostaria de agradecer muito, pois sem a tua ajuda nada, nada disso estaria acontecendo, tu participaste 24 horas por dia, 7 dias por semana desta conquista.

Sumário

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos	i
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1 Introdução	1
2 Referencial teórico	6
2.1 Mecanismos que contribuem para a dor articular	6
2.2 Neurônios reativos à estimulação mecânica da articulação	15
2.3 Terapia combinada no tratamento da osteoartrite de joelho.....	17
2.3.1 Laserterapia de baixa potência.....	17
2.3.2 Estimulação elétrica artificial	21
2.3.3 Terapia combinada.....	24
2.3.4 Objetivo	25
3 Materiais e métodos	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Indução do modelo experimental.....	26
3.3 Desenho experimental	28
3.4 Instrumentos de medida, tratamento e treinamento	29
3.4.1 Campo aberto	29
3.4.2 Analgesímetro	31
3.4.3 Descarga de peso.....	32
3.4.4 Laserterapia.....	34
3.4.5 Estimulação elétrica artificial	36
4 Tratamento estatístico	40

5 Resultados	41
5.1 Campo aberto	41
5.2 Descarga de peso	45
5.3 Analgesímetro.....	47
6 Discussão	51
6.1 Indução modelo de OA do joelho.....	51
6.2 Laserterapia de baixa potência	53
6.3 Estimulação elétrica artificial	56
6.4 Terapia combinada.....	59
7 Conclusões	62
8 Referências bibliográficas	64
ANEXO I – Carta de aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais	75
ANEXO II – Peso dos animais e valores brutos de descarga de peso.	76

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

AMPA	ácido a-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
AROUCA	lei Arouca para experimentação com animais
ATP	adenosina trifosfato
A δ	fibra nociceptiva rápida
BVR	bulbo ventromedial rostral
C	fibra nociceptiva lenta
CGRP	proteína relacionada ao gene da calcitonina
cm ²	centímetro quadrado (área)
COX-2	cicloxigenase-2
CREAL	centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório
DNA	ácido desoxirribonucleico
EEA	estimulação elétrica artificial
EsEF/UFRGS	Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
EVA	escala visual analógica
G	do inglês <i>gauge</i> : diâmetro da agulha
g	grama
gF	grama força
GFAP	proteína glial fibrilar ácida

GPBiC/UFRGS	grupo de pesquisa em biomecânica e cinesiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
GRD	gânglio da raiz dorsal
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Hz	hertz
ICBS/UFRGS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
IL-1	interleucina-1
IL-10	interleucina-10
IL-6	interleucina-6
IM	iodoacetato monosódico
J	joules
kg	quilograma
LAP	laserterapia de alta potência
LBP	laserterapia de baixa potência
LTD	depressão de longa duração
LTP	potenciação de longa duração
m	metro
mA	miliampere
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitro
MRI	imagem de ressonância magnética
ms	milisegundos
mW	miliwatts

nm	nanômetros
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP	núcleo parabraquial
NS	neurônio de segunda ordem da via nociceptiva; neurônio específico para nocicepção
°	graus
OA	osteoartrite
P	dia após a indução do modelo
p	índice de significância
P _c	descarga de peso na pata contralateral à lesão
PGE2	prostaglandina E2
P _{oa}	descarga de peso da pata ipsilateral à lesão
PÓS	após a indução da lesão e término das intervenções
PRÉ	antes da indução da lesão
s	segundos
SCP	substância cinzenta periaquedutal
SPSS	do inglês <i>statistical package for the social science</i>
TC	terapia combinada
TENS	neuroestimulação elétrica transcutânea
TGF	fator de transformação do crescimento
TNF	fator de necrose tumoral
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TRPA1	do inglês <i>transient receptor potential cation channel</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USA	Estados Unidos da América

WDR	neurônios de amplo espectro de resposta; neurônio de nocicepção não específico
x	abscissa
y	ordenada

Lista de figuras

FIGURA 1 - Grau de inibição muscular entre idosos saudáveis e pacientes com OA.	2
FIGURA 2 - Valores <i>root mean square</i> (RMS) médios do músculo Quadríceps Femoral dos grupos saudável e OA.....	3
FIGURA 3 - Corte sagital da articulação do joelho.....	7
FIGURA 4 - Vias nociceptivas da periferia ao encéfalo.....	9
FIGURA 5 - Desenho esquemático dos mecanismos de sensibilização periférica....	11
FIGURA 6 - Desenho esquemático dos mecanismos de sensibilização central.....	14
FIGURA 7 - Desenho experimental.....	29
FIGURA 8 - Campo aberto.....	30
FIGURA 9 - Analgesímetro digital.....	31
FIGURA 10 - Aparato para mensuração da descarga de peso.....	33
FIGURA 11 - Equipamento de LBP.....	35
FIGURA 12 - Equipamento de EEA.....	38
FIGURA 13 - Número de cruzamentos.....	42
FIGURA 14 - Número de <i>rearings</i>	44
FIGURA 15 - Indução do modelo: descarga de peso.....	45

FIGURA 16 - Resultados: descarga de peso.....	47
FIGURA 17 - Indução do modelo: analgesímetro.....	48
FIGURA 18 - Resultados: analgesímetro.....	49

Lista de tabelas

TABELA 1 - Sessões de treinamento durante os 14 dias de EEA.....	37
---	-----------

Resumo

Uma das principais doenças degenerativas, conhecida internacionalmente pelo nome de osteoartrite (OA), é uma condição patológica crônica e prevalente que traz prejuízos sociais, psicológicos e financeiros a 10% da população em geral e a mais de 50% dos idosos. Acima dos 75 anos de idade aproximadamente 85% dos idosos são acometidos por essa doença. A população no Brasil envelhece rápido, envelhecerá em 30 anos tanto quanto a Europa envelheceu em 200 anos. Assim, novas técnicas para o tratamento da OA de joelho são muito relevantes. Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos de uma Terapia Combinada (TC) sobre o comportamento de ratos submetidos a um modelo experimental de osteoartrite de joelho. Ratos *Wistar* machos e adultos foram submetidos à lesão do joelho direito pela injeção intra-articular de iodoacetato monossódico (IM). Quinze dias após a lesão foram aplicados 3 tratamentos por 14 dias: Laserterapia de Baixa Potência (LBP), Estimulação Elétrica Artificial (EEA) e TC (*i.e.*, LBP + EEA). Foram observados os efeitos agudos e crônicos destes tratamentos sobre o comportamento dos animais em 3 testes comportamentais: campo aberto, analgesímetro e descarga de peso. Os principais resultados do presente estudo indicam que (i) o modelo experimental de OA de joelho proposto foi induzido com sucesso e resultou em déficits agudos e crônicos ao longo de 30 dias de experimento; (ii) o tratamento com LBP resultou em diminuição dos déficits devido à hiperalgesia primária e secundária à lesão, porém não teve impacto sobre a funcionalidade geral do sistema de movimento dos animais; (iii) o treinamento com EEA resultou em diminuição dos déficits de hiperalgesia primária e teve impacto sobre a funcionalidade geral do sistema de movimento e (iv) a TC resultou em diminuição dos déficits de hiperalgesia primária e efeito moderado sobre a hiperalgesia secundária, além de impacto positivo sobre a funcionalidade geral do sistema de movimento. Com base nestes resultados, a TC apresentou efeitos benéficos tanto sobre o controle da dor, quanto para a menor incapacitação e melhor funcionalidade, sendo indicada para combater os efeitos deletérios da OA de joelho sobre o sistema de movimento.

Palavras-chave: osteoartrite, iodoacetato monossódico, neurociência do comportamento, terapia combinada.

Abstract

A major degenerative disease, internationally known as osteoarthritis (OA) is a prevalent and chronic pathological condition which results in social, psychological and financial impairments to 10% of the general population and to over 50% of the elderly. Above 75 years of age approximately 85% of the elderly are affected by this disease. In Brazil there is a fast ageing of population who will age during 30 years as much as Europe aged in 200 years. Thus, new techniques for the treatment of knee OA are very relevant. This work aimed to study the effects of a combined therapy (TC) on the behavior of rats submitted to an experimental model of knee osteoarthritis. Male adult *Wistar* rats underwent right knee injury by intra-articular injection of monosodium iodoacetate (IM). Fifteen days after injury received 3 treatments for 14 days: Low Power Laser Therapy (LBP), Artificial Electrical Stimulation (EEA) and TC (*i.e.*, LBP + EEA). We observed the acute and chronic effects of these treatments on the behavior of animals in 3 behavioral tests: open field, analgesymeter and weight bearing. The main results of this study indicate that (i) the proposed experimental model of knee OA was successfully induced and resulted in acute and chronic deficits over 30 days of experiment, (ii) treatment with LBP resulted in reduction of deficits due to primary and secondary hyperalgesia to the lesion, but had no impact on the overall functionality of the movement system, (iii) the training with EEA resulted in decreased deficits of primary hyperalgesia and impacted the overall functionality of the movement system (iv) the TC resulted in reduction of deficits due to primary hyperalgesia and moderate effect on secondary hyperalgesia, and positive impact on the overall functionality of the movement system. Based on these results, the TC showed beneficial effects on pain control and on less disability and better functionality, thus TC is indicated to combat the deleterious effects of knee OA on the motion system.

Keywords: osteoarthritis, monosodium iodoacetate, behavioral neuroscience, combined therapy.

1 Introdução

Uma das principais doenças degenerativas, conhecida internacionalmente pelo nome de OA, é uma condição patológica crônica e prevalente que traz prejuízos sociais, psicológicos e financeiros a 10% da população em geral e a mais de 50% dos idosos (MARCH & BACHMEIER, 1997). Acima dos 75 anos de idade aproximadamente 85% dos idosos são acometidos por essa doença (HURLEY & SCOTT, 1998; COOPER, 1998). Apesar de suas causas serem multifatoriais, acredita-se que as alterações na biomecânica normal das articulações têm papel importante no surgimento e na progressão da doença (RADIN *et al.*, 1985; BARRETT *et al.*, 1991).

A OA caracteriza-se também por ser uma doença silenciosa (HUNTER & ECKSTEIN, 2009), uma vez que a cartilagem hialina não é inervada, e o processo degenerativo da cartilagem articular só é percebido pelos pacientes quando a mesma já não reveste mais as superfícies articulares dos ossos, e os impactos mecânicos sobre o tecido ósseo é que geram os estímulos de dor. Além dos estímulos dolorosos provenientes do tecido ósseo, acredita-se que o processo inflamatório da membrana sinovial (membrana que reveste internamente a cápsula articular das articulações sinoviais, ricamente vascularizada e inervada) também é uma fonte importante de dor. Quando isso ocorre o processo degenerativo está tão avançado que, na maioria das vezes, o processo cirúrgico de artroplastia (ou substituição das superfícies ósseas articulares por uma prótese metálica) é a única solução para devolver a capacidade de movimento a esses pacientes e eliminar os estímulos dolorosos, possibilitando uma melhora da qualidade de vida.

As principais articulações acometidas pela OA são aquelas onde a descarga de peso ocorre, sendo, portanto, muito comum nas articulações do joelho e do quadril (MARCH & BACHMEIER, 1997). Como necessitamos dessas articulações para praticamente todas as atividades de vida diárias, a perda e/ou redução da capacidade de movimento dessas articulações tem um impacto não apenas para as funções do organismo em geral (comprometimento do sistema cardiovascular com o aumento do sedentarismo, e redução da função de todos os sistemas do organismo), mas também um impacto psicológico muito grande que pode levar a um processo de depressão (JESSEP *et al.*, 2009), comum nessa etapa da vida.

A identificação dos efeitos da OA sobre o sistema de movimento (que compreende os tecidos nervoso, muscular, ósseo, cartilaginoso e conjuntivo) pode auxiliar na determinação dos mecanismos relacionados com a gênese e/ou progressão da doença. Além disso, qualquer tipo de intervenção que possa estancar e/ou reverter os efeitos deletérios dessa doença tem uma relevância muito grande para os idosos em geral e para a sociedade, uma vez que podem ajudar a reduzir os custos elevados do sistema de saúde para o tratamento da doença em seus estágios mais avançados (MARCH & BACHMEIER, 1997; HURLEY & SCOTT, 1998; COOPER, 1998).

Em um estudo recente de um grupo de pesquisa¹ (dados preliminares e ainda não publicados) foi demonstrada uma tendência de que pacientes com OA apresentem quase o dobro do grau de inibição muscular (Figura 1) e redução da atividade eletromiográfica dos extensores do joelho (Figura 2) quando comparados com idosos assintomáticos para a OA.

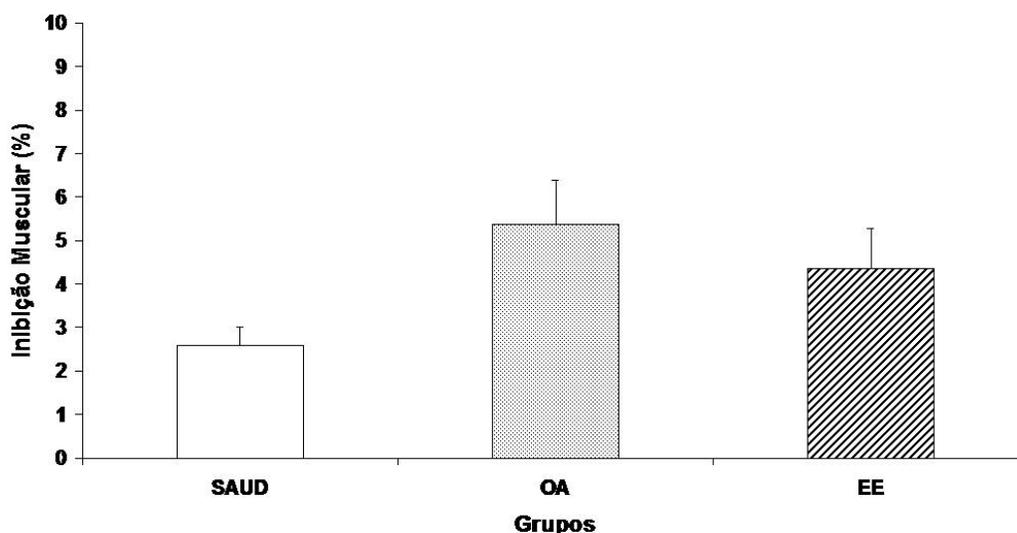


Figura 1. Grau de inibição muscular entre idosos saudáveis (SAUD, assintomáticos) e pacientes com OA (OA = sem intervenção; EE = OA com estimulação elétrica no período pré-intervenção).

¹ Grupo de Pesquisa em Biomecânica e Cinesiologia (GPBiC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

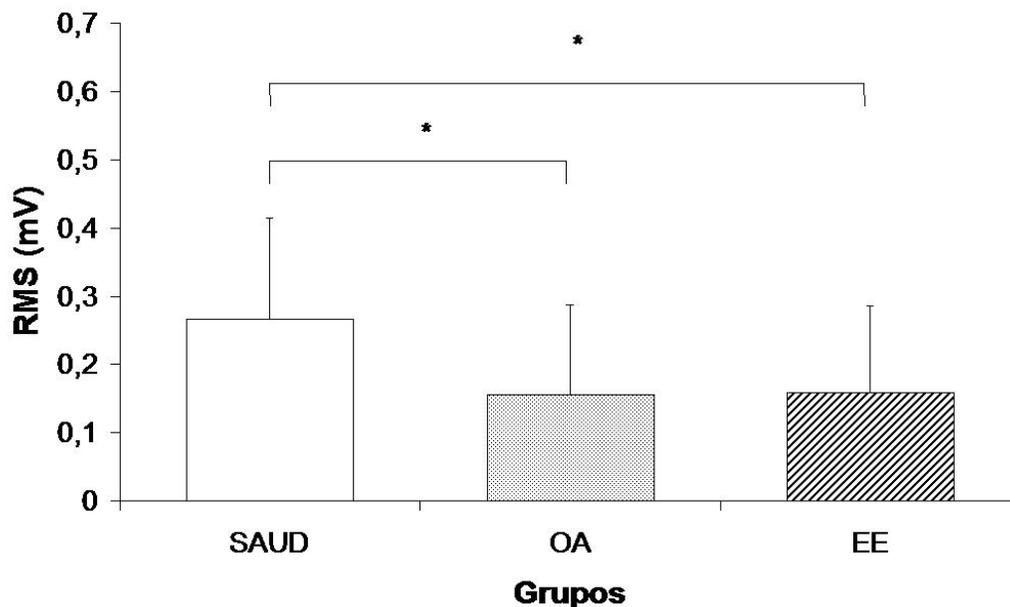


Figura 2. Valores *root mean square* (RMS) médios do sinal eletromiográfico (mV) do músculo Quadríceps Femoral dos grupos saudável (SAUD, assintomáticos) e OA (OA = sem intervenção; EE = OA com estimulação elétrica no período pré-intervenção).

Além da inibição muscular e da atividade elétrica do músculo quadríceps, os pacientes do grupo OA apresentaram adaptações estruturais nesse músculo condizentes com os efeitos deletérios da doença. Mais especificamente, esses pacientes apresentaram uma redução no comprimento dos fascículos do músculo vasto lateral, aumento no ângulo de penação dos fascículos e diminuição da espessura muscular. Também foi encontrada maior espessura do tecido adiposo subcutâneo.

Essas adaptações estruturais também estão associadas com hipotrofia muscular (redução do trofismo do músculo) e o processo de redução da massa muscular conhecido como sarcopenia (NARICI *et al.*, 2003, KARAMANIDIS & ARAMPATZIS, 2005, 2006). A associação de todos esses fatores leva a uma redução da capacidade de produção de força muscular e fraqueza muscular, culminando com redução da amplitude de movimento, menor mobilidade, maior sedentarismo, maior dependência e incapacitação.

Todos esses fatores são condizentes com o Modelo de Plasticidade Neuromuscular de Uso Reduzido, no qual o envelhecimento está inserido juntamente com a lesão, a imobilização, o repouso no leito e o ambiente de

microgravidade (BIOLO *et al.*, 2003). Essa redução do uso do sistema de movimento decorrente da presença da OA reduz a estrutura e a capacidade funcional desse sistema, aumentando a sobrecarga mecânica sobre as articulações, e aumentando dessa forma o processo degenerativo. Portanto, ações que possam intervir nesse ciclo vicioso devem ser tomadas a fim de que se possa tentar estancar o processo degenerativo e possivelmente reverter os efeitos deletérios da doença.

Os estudos clínicos com a OA em humanos proporcionam evidência quanto à presença de sarcopenia e sensibilização nociceptiva e a reversibilidade destes processos (BAJAJ, 2001; KOSEK & ORDEBERG, 2000). Porém, estes estudos não avaliam diretamente o papel de mediadores químicos e vias de transmissão envolvidas na alta nocicepção característica da OA. Frente à ausência de informação, em estudos com humanos, a respeito dos mecanismos da dor envolvidos neste processo, faz-se necessário desenvolver modelos animais de OA de joelho (FELSON & SCHAIBLE, 2009).

Estes modelos animais são dedicados a elucidar os mecanismos responsáveis pelos diferentes componentes da patologia articular e, são geralmente provados por meio da modulação de genes (MUNOZ-GUERRA *et al.*, 2004) ou expressão de proteínas (JOHNSON & TERKELTAUB, 2004), injeção de citocinas pró inflamatórias (HUI *et al.*, 2003) ou da modulação de enzimas (KIKUCHI *et al.*, 1998); outros são mecânicos, *e.g.*, induzido por impacto ou sobrecarga, trauma induzido ou cirurgicamente induzido por meio da instabilização da articulação (GUINGAMP *et al.*, 1997). O modelo animal de OA do joelho induzido pela injeção intra-articular de Iodoacetato Monosódico (IM) apresenta boa reprodutibilidade e mimetiza a dor característica da OA em humanos (COMBE *et al.*, 2004); estudos farmacológicos indicam que este modelo pode ser útil na investigação da dor crônica nociceptiva (*ibid.*, 2004). Ainda, este modelo proporciona alterações morfológicas e comportamentais que podem ser comparadas às observadas na dor neuropática, onde há a ativação de células da glia em estágios agudos (microglia) e crônicos (astrócitos) após a indução da lesão por IM (SAGAR *et al.*, 2011).

Desta forma, o presente estudo utilizou o modelo de monoartrite induzida pela injeção intra-articular de IM para estudar os mecanismos de dor e a reversibilidade destes processos frente a uma TC e não farmacológica (*i.e.*, LBP e EEA). É importante salientar que os modelos em animais apresentam como principal

desvantagem que a doença se desenvolve em dias ou semanas, e em humanos ocorre ao longo de décadas antes de tornar-se clinicamente aparente (AMEYE & YOUNG, 2006). Uma vez que a origem da dor na OA ainda não é muito bem entendida, ou seja: não é claro se a dor está associada ao começo ou a progressão da patologia (POOLE *et al.*, 2010), ainda não há uma relação clara entre os testes clínicos de imagem e a presença da dor (relação não conclusiva entre edema da medula óssea e a dor; YUSUF *et al.*, 2011) e, finalmente, o estado doloroso gerado pela OA apresenta um fator psicossocial importante (TURK, 2003); é de fundamental importância que as vias neurais específicas e responsáveis pela geração e modulação do estado doloroso ao nível celular sejam melhor entendidas (*e.g.*, sensibilização central e periférica). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da TC sobre o comportamento de ratos submetidos a um modelo experimental de OA de joelho. A principal hipótese testada foi de que a TC melhora o desempenho de animais submetidos ao modelo experimental de OA de joelho em testes de comportamento relacionado à sensação dolorosa.

2 Referencial teórico

2.1 Mecanismos que contribuem para a dor articular

A dor tem um papel fundamental nos déficits psicológico e funcional relativos à OA do joelho. As articulações são ricamente inervadas por uma variedade de fibras sensoriais, tanto de alto, quanto de baixo limiar de excitabilidade, as quais transmitem a informação para o sistema nervoso central. As aferências de alto limiar de excitabilidade terminam na membrana sinovial e no periósteo, e normalmente respondem apenas ao movimento articular além da amplitude fisiológica (FELSON & SCHAIBLE, 2009) (Figura 3). Ainda, a dor da OA degenerativa apresenta similaridades e diferenças em relação à dor da artrite inflamatória, na OA a dor é usualmente localizada na articulação acometida pela OA, porém, pode ser referida, *e.g.*, OA de quadril pode causar dor no joelho. A intensidade da dor pode ser variada e é normalmente amplificada pelo exercício físico e aliviada durante o descanso (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Outra variedade peculiar de dor em pacientes com OA é a dor noturna (SCOTT, 2006). A inflamação constitui um processo de fundamental importância no quadro doloroso e na fisiopatologia da OA degenerativa.

A inflamação da articulação é caracterizada pela hiperalgesia e dor persistente em repouso, usualmente mal localizada (KELLGREN & SAMUEL, 1950; KELLGREN, 1939; LEWIS, 1938). A localização da dor relacionada à OA é foco de discussão, uma vez que a cartilagem não é inervada (SCHAIBLE & GRUBB, 1993) e há uma fraca correlação entre os parâmetros radiológicos (*e.g.*, estreitamento do espaço articular e osteófitos) e a ocorrência de dor articular (SCOTT, 2006). Um estudo recente analisou a articulação do joelho acometido pela OA por meio de imagens de ressonância magnética (MRI) e raio X (YUSUF *et al.*, 2011); os resultados indicaram que a articulação acometida pela OA dolorosa apresenta mais anormalidades visíveis em MRI do que em raio X, tais como: a hipertrofia e o derrame na membrana sinovial e o edema da medula óssea subcondral (os quais podem elevar a pressão intra-óssea; FELSON, 2005).

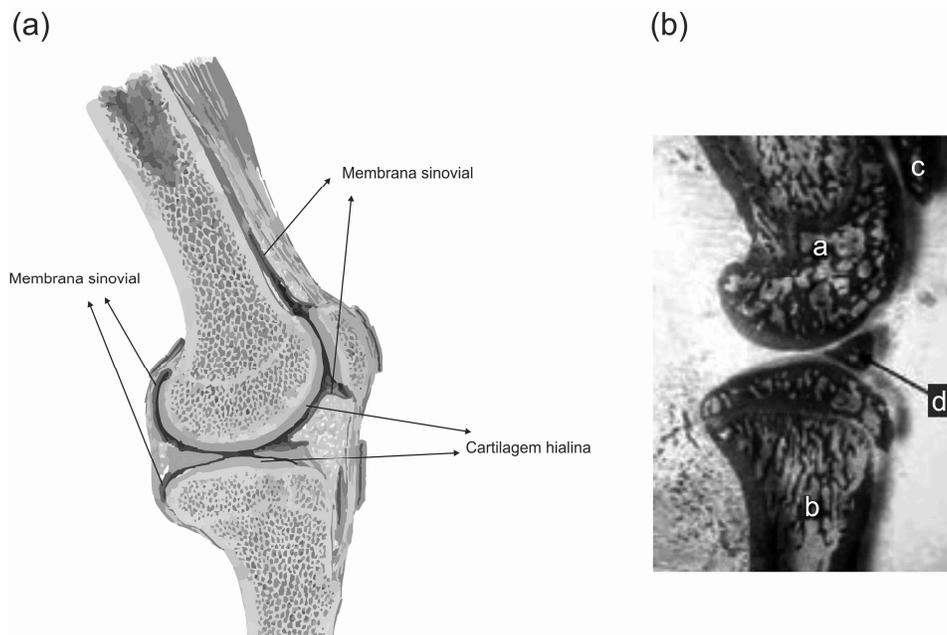


Figura 3. (a) Corte sagital da articulação do joelho humano²: a destruição progressiva da cartilagem hialina (aneural) resulta em sobrecarga direta sobre o periósteo (ricamente innervado). A hipertrofia e derrame na membrana sinovial são indicativos da articulação com OA dolorosa (FELSON, 2005). (b) Corte sagital da articulação do joelho de ratos *Wistar*: (a) côndilo femoral, (b) tíbia, (c) patela e (d) menisco.

Não obstante, podemos afirmar uma relação entre a dor na OA e o processo inflamatório evidenciada pela análise de MRI (FELSON, 2005). As propriedades de disparo dos nociceptores articulares refletem estes fenômenos subjetivos de dor articular (GUILBAUD *et al.*, 1985; SCHAIBLE & SCHMIDT, 1988; SCHAIBLE & GRUBB, 1993). Na articulação inflamada, aferências inicialmente sem sensibilidade mecânica (nociceptores silenciosos) são sensibilizados e podem tornar-se sensíveis aos estímulos mecânicos (SCHAIBLE & SCHMIDT, 1988). Fundamentalmente, os neurônios com aferências para a articulação inflamada apresentam hiperexcitabilidade (ou hiperalgesia) pronunciada ao estímulo mecânico, tanto na área afetada (hiperalgesia primária) quanto em estruturas adjacentes não afetadas (hiperalgesia secundária) (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Há uma redução do limiar excitatório (mecânico), em neurônios com alto limiar de excitação, e uma expansão do campo receptivo. Este estado de hipersensibilidade é mantido durante a inflamação crônica (*ibid.*, 2009).

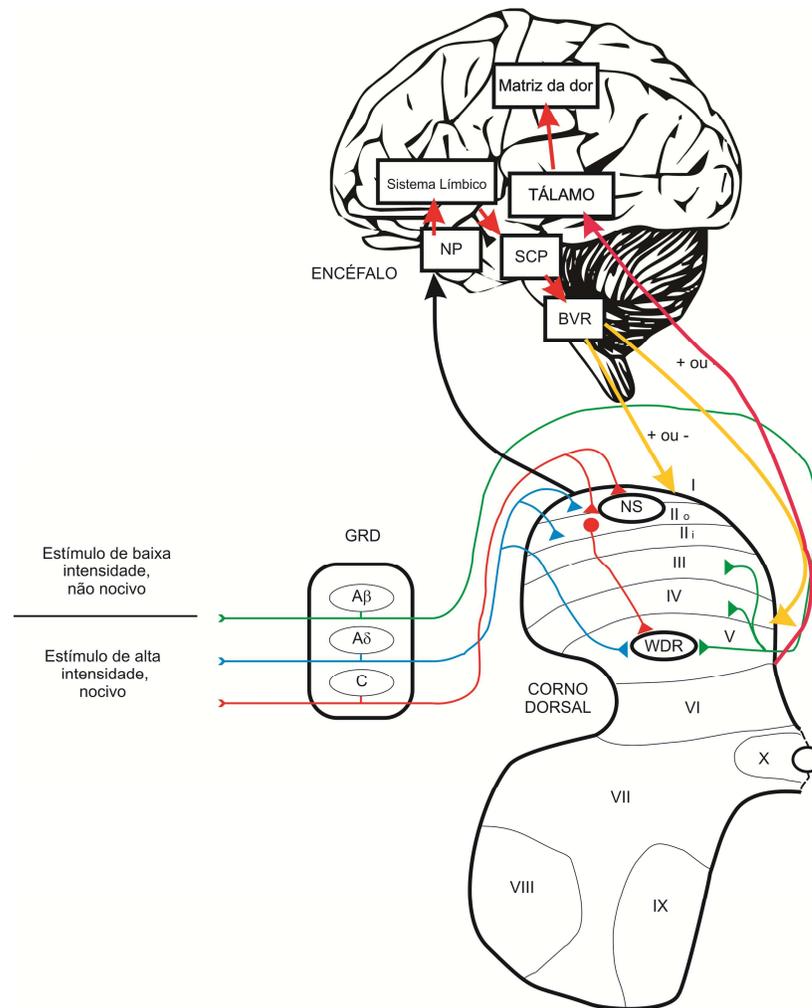
² Figura adaptada do software *Netter Interactive Atlas of Human Anatomy*.

Esta sensibilidade exacerbada à dor resulta do aumento da sensibilidade dos neurônios nociceptivos primários (hiperalgesia primária; SCHAIBLE, 2006a, 2006b) e hiperexcitabilidade dos neurônios nociceptivos do sistema nervoso central (hiperalgesia secundária; FELSON & SCHAIBLE, 2009). Os neurônios são controlados por meio de inibição descendente, a qual se apresenta aumentada durante a fase aguda da inflamação (por meio do *loop* e alça espinobulbospinal; Figura 4; D'MELO & DICKENSON, 2008).

O circuito descendente que modula a dor recebe aferências de múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingular rostral anterior, chegando à Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) e com aferências da SCP para a medula espinal. Os neurônios do núcleo da rafe e núcleo reticular gigantocelular, que estão incluídos na região do bulbo ventromedial rostral (BVR), direcionam suas aferências para o corno dorsal da medula espinal para diretamente ou indiretamente aumentar ou diminuir o tráfego nociceptivo, alterando a experiência dolorosa (OSSIPOV *et al.*, 2010). Estas vias descendentes são responsáveis por este processo de antinocicepção mediado, por exemplo, pela liberação de opióides endógenos ou noradrenalina e serotonina; ou pelo processo de facilitação da nocicepção mediado, por exemplo, pela liberação de serotonina no corno dorsal da medula espinal (Figura 4).

Figura 4. Vias nociceptivas da periferia ao encéfalo. Fibras aferentes primárias (tipo A β , A δ e C), cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (GRD), transmitem impulsos nervosos da periferia ao corno dorsal da medula espinal. Neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (neurônio específico para nocicepção; NS) encontram-se principalmente nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal (lâminas I-II), enquanto neurônios de amplo espectro de resposta (neurônio de nocicepção não específico; WDR) localizam-se profundamente (lâmina V). Neurônios de projeção da lâmina I inervam regiões do núcleo parabraquial (NP) e a substância cinzenta periaquedutal (SCP), as quais se comunicam com áreas do sistema límbico. Deste ponto, vias descendentes (setas amarelas) são ativadas, estas partem dos núcleos do tronco encefálico, *e.g.*, bulbo ventromedial rostral (BVM) e, modulam o processamento nociceptivo espinal. Neurônios da lâmina V projetam-se principalmente para o tálamo (trato espinotalâmico), a partir disto vários neurônios corticais são ativados, os quais compõe a “matriz da dor” (córtex somatossensorial primário e secundário, córtices insular, cingulado anterior e pré-frontal).

Fonte: adaptado de D'MELLO & DICKENSON, 2008.



Na medula espinal vários transmissores e mediadores químicos contribuem para a geração e manutenção da hipersensibilidade dos circuitos medulares causada pelo processo inflamatório (FELSON & SCHAIBLE, 2009). O processo de sensibilização ocorre em neurônios da medula espinal por meio de alterações neuroplásticas atividade-dependente. A estimulação repetitiva de fibras tipo C pode aumentar a resposta sináptica aguda (MENDELL & WALL, 1965) ou crônica (potenciação de longa duração; LTP; SANDKÜHLER, 2000). Neste processo, tanto o aumento de mecanismos excitatórios, quanto a redução de mecanismos inibitórios (e.g., por apoptose ou interneurônios inibitórios) estão envolvidos (SCHAIBLE, 2006a, 2006b). Ainda, estão envolvidos neste processo tanto neurônios quanto células da glia (INGLIS *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007; WATKINS & MAIER, 2005)

Os principais agentes envolvidos com a dor, em específico a dor na OA são: citocinas, neuropeptídeos, canabinóides e sensibilização central. No processo de inflamação da articulação muitas fibras mecanoinsensitivas tornam-se mecanosensitivas e, contribuem para as aferências nociceptivas na medula espinal (SCHAIBLE, 2006a). Diversos mediadores inflamatórios clássicos, *e.g.*, bradicinina e prostaglandinas (SCHAIBLE, 2006b), as citocinas (interleucina-6; IL-6; BRENN *et al.*, 2007; fator de necrose tumoral α ; TNF- α ; BOETTGER *et al.*, 2008) estão envolvidos. Como consequência desta sensibilização periférica há maior liberação intra espinal de glutamato (principal neurotransmissor das aferências nociceptivas; SORKIN *et al.*, 1992), do neuropeptídeo substância P, da neurocinina A, do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP; co-transmissor em aferências primárias e interneurônios), e da prostaglandina. Ainda, em um estudo sobre o conteúdo de neuropeptídeos das aferências da articulação do joelho para a medula espinal, Salo & Theriault (1997) constataram que 10% destas células expressam o neuropeptídeo substância P e 33% o CGRP. Estas substâncias são responsáveis pela geração e manutenção da hipersensibilidade em nível medular.

Os mecanismos celulares por meio dos quais a sensibilização periférica ocorre, envolvem alterações nos receptores ou canais iônicos e no fenótipo químico da célula (WOOLF & COSTIGAN, 1999). Alguns mediadores como a bradicinina, atuam nos mecanismos de dor pela ativação direta de nociceptores, outros são considerados agentes sensibilizadores. Isto pode resultar na alteração da sensibilidade de moléculas dos receptores ou na modulação de canais iônicos dependentes de voltagem. O glutamato liberado no terminal pós sináptico pode ativar canais do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores não-NMDA. Quando os canais tipo NMDA são ativados, em condições especiais de estimulação, há um influxo de cálcio para o neurônio levando a um processo de plasticidade neural, *i.e.*, LTP. Ainda, foi observado que os receptores tipo NMDA respondem principalmente aos estímulos nociceptivos (NEUGEBAUER *et al.*, 1993). Desta forma, os receptores de glutamato desempenham um papel importante na geração e manutenção da hiperexcitabilidade devido ao processo inflamatório, inclusive nas alterações de longa duração. Outros agentes também participam de maneira importante.

As prostaglandinas aumentam os níveis de AMPc intracelular e podem aumentar a sensibilidade de nociceptores ao diminuir o limiar de excitação dos

canais de sódio pela via da proteína cinase A (Figura 5b; ENGLAND *et al.*, 1996). Ainda, a aplicação experimental da prostaglandina E2 (PGE2) apresentou efeito sensibilizador dos nociceptores aos estímulos mecânico e químico (SCHAIBLE & GRUBB, 1993). As citocinas são mediadoras das interações entre as células e participam de maneira importante no início e no desenvolvimento de diversas doenças crônicas (FELSON & SCHAIBLE, 2009).

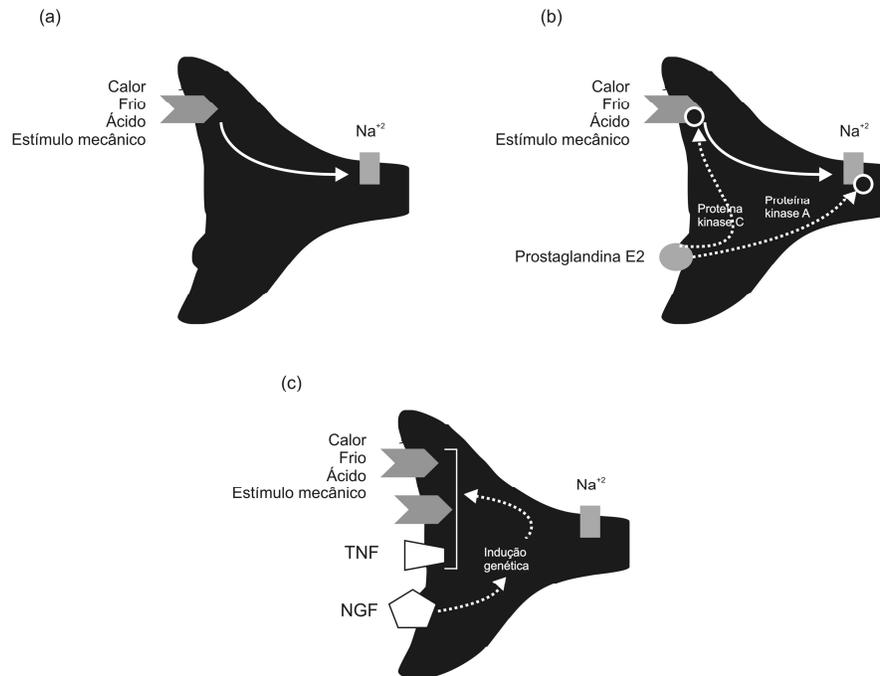


Figura 5. Desenho esquemático dos mecanismos de sensibilização periférica. (a) Dor aguda: o estímulo nocivo ativa uma série de receptores com alto limiar de excitabilidade, resultando na propagação de potenciais de ação pelo axônio; (b) Fase inicial da sensibilização: mediadores, como a prostaglandina E2 (PGE2) ativam cinases para fosforilar receptores ou canais iônicos e diminuem o limiar excitatório (seta tracejada); e (c) Fase final da sensibilização: indução de genes em resposta aos fatores de crescimento resultando em alteração do fenótipo celular.

Fonte: adaptado de FELSON & SCHAIBLE, 2009.

Na Figura 5 é apresentado um desenho esquemático da contribuição dos nociceptores periféricos, com foco no processo de sensibilização periférica. Na dor aguda (a) o estímulo nociceptivo ativa uma série de receptores com alto limiar de excitabilidade, como resultado há a propagação de potenciais de ação nos axônios. Na fase inicial da sensibilização (b) mediadores, *e.g.*, PGE2, ativam proteínas

cinases para fosforilar receptores ou canais iônicos, assim, ocorre uma diminuição do limiar de excitabilidade nestas células. Na fase final da sensibilização a resposta de genes aos fatores de crescimento resulta em alteração no fenótipo celular. O estado da arte aponta, principalmente, para a metilação do DNA como sendo responsável pela alteração epigenética associada à OA (ROACH *et al.*, 2011). Ainda, a participação de canais do tipo TRPA1 tem sido foco de estudos recentes envolvendo a dor e o seu controle farmacológico (McGARAUGHTY *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011). Estes receptores parecem ser de fundamental importância na transmissão neuronal de estímulos mecânicos.

O receptor TRPA1 parece ser expresso exclusivamente em neurônios nociceptivos primários e pode ser ativado indiretamente em resposta aos mediadores inflamatórios (McGARAUGHTY *et al.*, 2010). No processo de sensibilização dos nociceptores periféricos, característico da fisiopatologia da OA de joelho, a ativação ou sensibilização dos canais tipo TRPA1 pelos diferentes mediadores inflamatórios pode contribuir para a diminuição do limiar nociceptivo e conseqüentemente para a hiperalgesia inflamatória. O efeito do agonista seletivo do canal TRPA1, o A-967079, foi observado na atividade neuronal medular em modelo animal de OA (McGARAUGHTY *et al.*, 2010). Os autores concluíram que o bloqueio dos receptores TRPA1 interrompe a transmissão de estímulos de alta intensidade para a medula espinal, tanto em animais saudáveis, quanto em animais submetidos a um modelo de OA. Desta forma, os receptores TRPA1 desempenham um papel importante na mecanoccepção, tanto em condição normal, quanto patológica. Em outro estudo, Chen *et al.* (2011) analisaram o efeito do bloqueio seletivo dos canais TRPA1 em modelo de dor osteoartrítica em ratos (antagonista A-967079; CHEN *et al.*, 2011); os autores concluíram que o bloqueio seletivo dos canais TRPA1 diminuiu a dor na OA de joelho, sugerindo que o bloqueio seletivo do TRPA1 pode ser uma estratégia interessante para o controle da dor nessa patologia.

Outro mecanismo que contribui para a dor articular característica da OA pode ser comparado ao da dor neuropática crônica: o mecanismo de sensibilização central (SAGAR *et al.*, 2011). A atividade sustentada e repetitiva das aferências primárias da articulação do joelho resulta em alterações substanciais da função e da atividade de vias de transmissão em nível espinal e supra espinal (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Apesar de ser primariamente modulada por neurotransmissores,

a atividade destas vias pode ser modulada pelos mesmos mediadores inflamatórios envolvidos na sensibilização periférica; nestas circunstâncias os mediadores são oriundos de células não neuronais, incluindo a microglia e o astrócito (WATKINS & MAIER *et al.*, 2005). A glia pode ser ativada pelas aferências nociceptivas por meio da liberação de substância P, óxido nítrico, ATP, prostaglandinas, aminoácidos excitatórios ou fractalcina no corno dorsal da medula espinal e, quando ativada, pode liberar citocinas pró-inflamatórias (*e.g.*, TNF, TGF, IL-1, IL-6 e IL-10) e sintetizar diversos outros componentes relacionados à sensibilização de neurônios sensoriais (SCHOLZ & WOOLF, 2007). Como resultado pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio, a produção de óxido nítrico, a liberação de prostaglandinas, aminoácidos excitatórios e ATP (WATKINS & MAIER *et al.*, 2005). Finalmente, esta série de eventos pode levar ao aumento da liberação de transmissores relacionados com a nocicepção, a uma *upregulation* dos receptores tipo AMPA e NMDA ou alteração em sua condutividade e a uma excitabilidade neuronal aumentada (WATKINS & MAIER *et al.*, 2005). Na Figura 6, é mostrado um esquema simplificado dos mecanismos da sensibilização central.

A ativação da microglia e do astrócito na medula espinal é relatada em diversos modelos de dor crônica, e sua contribuição para mecanismos pró-inflamatórios medulares de sensibilização central são bem descritos na literatura (ver referências em WOOLF & SALTER, 2006). Em relação à OA de joelho, uma teoria foi postulada em um modelo animal de monoartrite de joelho por IM (ratos *Sprague Dawley* machos; SAGAR *et al.*, 2011); as alterações foram comprovadas por meio de técnicas histológicas com marcação por Iba1 (microglia) e imunofluorescência para GFAP (astrócito). A presença de microglia e astrócito ativados na medula espinal, neste modelo de OA de joelho, foi correlacionada significativamente com testes comportamentais de hiperalgesia primária (teste da descarga de peso) e secundária (teste dos monofilamentos de Von Frey) (SAGAR *et al.*, 2011). Ainda, neste estudo ocorreu a ativação de células da glia em estágios agudos (microglia, a partir do 7º dia) e crônicos (astrócitos, 28º dia) após a indução da lesão (SAGAR *et al.*, 2011), comportamento compatível ao encontrado durante os estágios da dor neuropática (MCMAHON *et al.*, 2005).

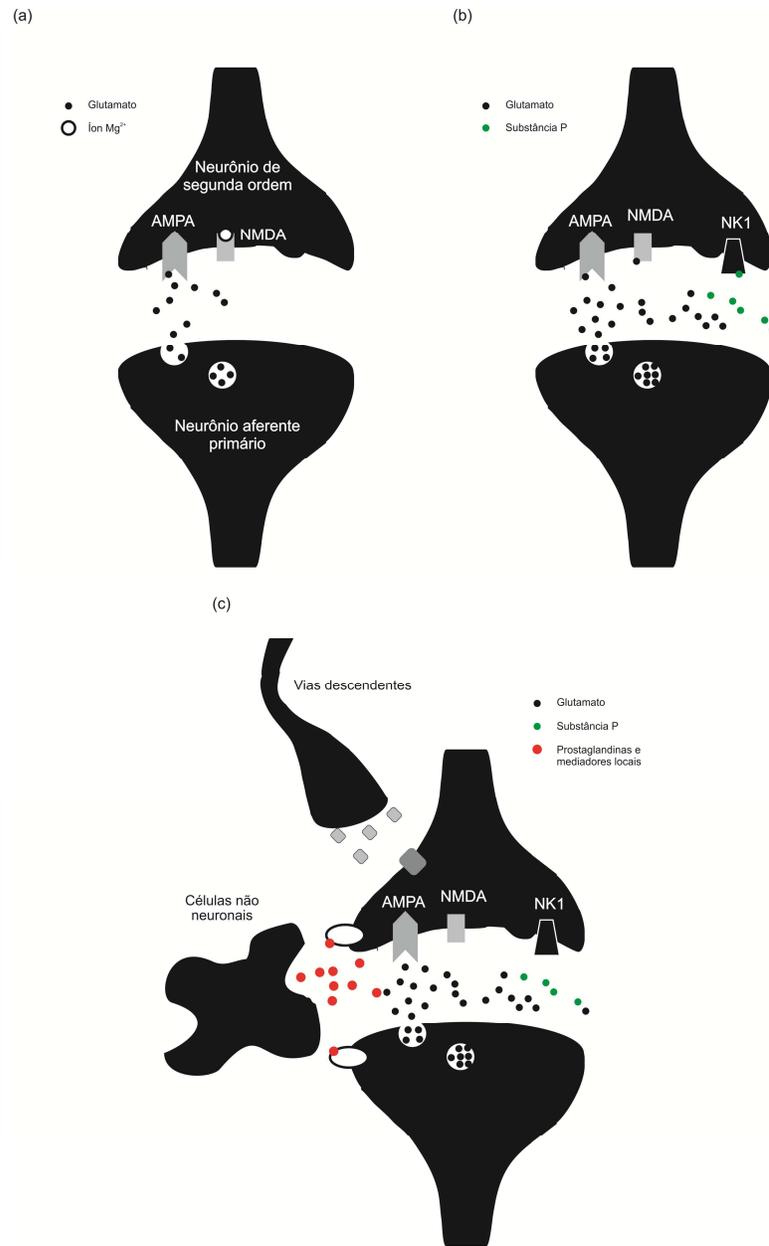


Figura 6. Desenho esquemático dos mecanismos de sensibilização central. Contribuição dos neurônios da medula espinal para a dor. (a) Dor aguda: a ativação de receptores do tipo AMPA pelo glutamato, note o bloqueio do canal tipo NMDA pelo íon Mg^{2+} ; (b) Fase inicial da sensibilização: a ativação dos canais tipo NMDA após a repulsão do íon Mg^{2+} para o espaço extracelular e ação via substância P sobre os receptores NK1; e (c) Fase final da sensibilização: indução de genes com produção de prostaglandinas aumentada e outros mediadores locais agindo sobre receptores relevantes. Modulação por meio de inibição/facilitação descendente.

Fonte: adaptado de FELSON & SCHAIBLE, 2009.

2.2 Neurônios reativos à estimulação mecânica da articulação

A inervação relativa à articulação do joelho de gatos, ratos e macacos chega à medula espinal através de diversas raízes dorsais, desta forma, projeta-se por vários segmentos medulares (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Em um estudo sobre o número e distribuição das aferências da articulação do joelho para a medula espinal, Salo & Theriault (1997) constataram que a maior quantidade de corpos neuronais destas aferências encontra-se, principalmente, nos GRDs relativos às regiões L3 e L4 da medula espinal (ratos *Wistar*: 44% das aferências para GRD de L3, 43% das aferências para GRD de L4 e 7% das aferências para GRD de L5). Devido a essa abrangência, as aferências articulares influenciam neurônios sensoriais e vias reflexas em diversos segmentos da medula espinal. Na substância cinzenta da medula espinal, as aferências advindas da articulação do joelho projetam-se para a lâmina basal I e para as profundas V-VII (SCHAIBLE & GRUBB, 1993).

As aferências mecanoceptivas são processadas nos neurônios do corno dorsal que respondem somente à estimulação mecânica dos tecidos profundos, ou em neurônios que respondem a estímulos tanto do tecido profundo quanto do superficial. O campo receptivo de um neurônio da medula espinal não é limitado à região da articulação podendo se estender para regiões adjacentes, *e.g.*, o neurônio pode ser ativado tanto por pressão aplicada à articulação do joelho quanto à pressão aplicada no músculo Quadríceps Femoral. Ainda, alguns neurônios da medula espinal podem apresentar um campo receptivo bilateral (SCHAIBLE & GRUBB, 1993).

Em relação ao limiar de excitação devido a um estímulo mecânico, os neurônios de segunda ordem na medula espinal podem ser específicos para nocicepção (NS) ou não específicos para nocicepção (WDR) (conforme descrito na Figura 4). Os neurônios NS respondem somente aos estímulos intensos, *i.e.*, pressão intensa ou movimento além da amplitude fisiológica articular, por outro lado, os neurônios WDR respondem tanto a estímulo inócuo quanto nocivo. Os neurônios NS apresentam pequeno campo receptivo e restrito aos tecidos profundos da articulação e músculo e, eles não apresentam campo receptivo na pele (SCHAIBLE & GRUBB, 1993; SCHAIBLE, 2006a, 2006b). Ainda, os neurônios NS são encontrados principalmente na camada superficial do corno dorsal da medula espinal (lâminas I-II), enquanto a maior parte dos neurônios WDR está localizada na

lâmina profunda (lâmina V; rever Figura 4) (D'MELO & DICKESON, 2008). Estes neurônios recebem a informação do neurônio aferente primário, os NS recebem apenas aferências nociceptivas (fibras do tipo tipo A δ e C) e os WDR recebem informações das fibras A β , A δ e C.

Os neurônios de segunda ordem que recebem aferências da articulação projetam-se para diferentes níveis supra espinhais, *e.g.*, cerebelo, tálamo, formação reticular, ou intra espinhais, *e.g.*, interneurônios e motoneurônios (SCHAIBLE & GRUBB, 1993). As projeções que ascendem para o tálamo após se dirigem para o trato espino talâmico, e ativam os sistemas tálamo corticais responsáveis pela sensação de dor (matriz da dor; D'MELO & DICKENSON, 2008). Por exemplo, foi comprovado que em gatos neurônios com o corpo celular no corno dorsal de medula espinal pertencem ao trato espino reticular e, respondem predominantemente à estimulação mecânica nociva do tecido profundo (FIELDS *et al.*, 1977; MEYERS & SNOW, 1982).

As projeções segmentares são importantes, pois regulam os movimentos e protegem o sistema motor de estímulos nocivos. Um estímulo nocivo na região do joelho, por exemplo, pode resultar em um reflexo de retirada (WOOLF & WALL, 1986). Durante o processo inflamatório os reflexos medulares são aumentados (WOOLF & WALL, 1986; FERRELL *et al.*, 1998; HE *et al.*, 1988). A disfunção articular e a deformação ligamentar pode resultar em espasmos musculares (MENSE, 1997). Porém, há evidência de que o padrão de resposta reflexa dos motoneurônios γ encontra-se alterado durante a inflamação, desta forma são gerados reflexos inibitórios (HE *et al.*, 1988). Essa ação antagonista entre aumento e inibição da resposta reflexa pode resultar em um equilíbrio do sistema de movimento, onde a perna com a articulação do joelho inflamado é mantida em uma posição neutra em que os estímulos nociceptivos são minimizados (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Com base no que foi descrito acima, podemos entender melhor a presença da inibição muscular em pacientes com OA de joelho (ver capítulo 1).

Portanto, os neurônios reativos à estimulação mecânica da articulação são controlados pela aferência primária (o estímulo mecânico), por propriedades intrínsecas dos neurônios e células da glia na medula espinal, pela circuitaria local e por vias descendentes.

2.3 Terapia combinada no tratamento da osteoartrite de joelho

No presente estudo, a TC para o tratamento da OA consistiu na utilização da LBP e da EEA, como veremos a seguir.

2.3.1 Laserterapia de baixa potência

Os lasers podem ser classificados em dois grupos: Lasers de Baixa Potência, com potência inferior a 1 Watt (utilizados para a LBP); e Lasers de Alta Potência, com potência superior a 1 Watt (LAP - Laserterapia de Alta Potência). Os lasers de alta potência possuem finalidade cirúrgica, sendo utilizados para corte, carbonização, vaporização, coagulação ou desnaturação de proteínas, através de efeito fototérmico (CHAVANTES & JATENE, 1990). Os lasers de baixa potência, ou não-cirúrgicos, servem para propósitos diagnósticos e terapêuticos, isolados ou em conjunto com outros tratamentos, sendo empregados na regularização de processos fisiológicos como a cicatrização e a inflamação, através de efeitos atérmicos (BASFORD, 1995).

A ação terapêutica da LBP tem sido alvo de pesquisas desde a década de 60, onde Mester (1966) lançou o conceito de efeito bioestimulatório, demonstrando pioneiramente os efeitos desta modalidade na aceleração da reparação tecidual de feridas cutâneas. A bioestimulação laser refere-se à aplicação de energia eletromagnética pela LBP aos tecidos biológicos, influenciando as funções celulares e alterando atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Porém, devido ao efeito dose-dependente da LBP, tanto a estimulação quanto a inibição são possíveis de acontecer. Assim, hoje se utiliza o termo biomodulação, dividindo-se este conceito em bioestimulação e bioinibição (SCHAFFER *et al.*, 1997), assumindo a existência de uma “janela terapêutica” de ação estimulatória da LBP, onde doses inferiores a este limiar nada provocam enquanto doses excessivas promovem efeitos inibitórios.

Ao longo dos anos, inúmeros trabalhos têm relatado o efeito cicatrizante da LBP em feridas cutâneas (AL-WATBAN & ZHANG, 1999; AL-WATBAN *et al.*, 2007), regeneração de tecidos tendinosos (ENWEMEKA & REDDY, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2009), musculares (BIBIKOVA & ORON, 1994) e nervosos (ROCHKIND, 2009a, 2009b), além do efeito analgésico (FERREIRA *et al.*, 2005; BJORDAL *et al.*, 2006, 2007) e anti-inflamatório (PESSOA *et al.*, 2004; LOPES-MARTINS *et al.*, 2005).

A LBP foi introduzida como uma alternativa não invasiva no tratamento da OA há mais de 20 anos, conforme revelam estudos de revisão sistemática (veja abaixo). Desde então, uma série de estudos vêm utilizando a LBP no tratamento desta condição patológica. Os autores utilizaram diferentes abordagens metodológicas e variados protocolos de tratamento com a LBP, associados ou não a outras modalidades de tratamento de origem física (como o exercício) e/ou farmacológica.

Bjordal *et al.* (2003), em sua revisão sistemática sobre a utilização da LBP na redução da dor em lesões articulares crônicas, explicita as razões pelas quais os resultados aparecem de maneira tão conflitante na literatura. Dos 20 estudos pré-selecionados, 14 (695 pacientes) foram considerados adequados metodologicamente para análise, sendo que somente 11 (565 pacientes) utilizaram parâmetros de aplicação recomendados. Entretanto, embora os autores atestem que a heterogeneidade das metodologias utilizadas exija cautela na interpretação dos resultados, a LBP parece ser uma modalidade efetiva na redução da dor nas lesões articulares crônicas.

Um abrangente ensaio clínico (GUR *et al.*, 2003) foi publicado no mesmo ano do artigo anteriormente citado, não sendo incluso, portanto, entre os trabalhos avaliados. Neste estudo, 90 pacientes com diagnóstico de OA de joelho (18 homens e 72 mulheres), com média de 59 anos de idade, foram divididos em três grupos: dois grupos que receberam LBP diariamente durante as duas primeiras semanas (10 sessões; 2 pontos por sessão; 2 J ou 3 J por ponto, conforme alocação nos grupos) de um protocolo de 14 semanas de reabilitação com exercícios de fortalecimento muscular; e o outro grupo que recebeu aplicação placebo nas duas primeiras semanas do mesmo protocolo de reabilitação com exercícios. Os resultados mostraram-se bastante favoráveis à LBP, de modo que os grupos que receberam a aplicação efetiva demonstraram alívio da dor mais precocemente e de maneira mais acentuada ao término do tratamento. Resultados semelhantes foram observados em relação à funcionalidade do segmento tratado e à qualidade de vida dos pacientes.

A revisão sistemática de Brosseau *et al.* (2005), específica sobre LBP e OA, apresenta os resultados conflitantes da literatura. Os autores consideraram para avaliação apenas 8 trabalhos (405 pacientes), dos quais 5 apresentaram resultado positivo para a LBP no alívio de dor em relação ao placebo, enquanto 3 não demonstraram diferenças entre as modalidades. Segundo os autores, apesar de

haver indícios favoráveis em relação ao alívio da dor, fatores relacionados aos diferentes parâmetros de LBP (comprimento de onda, tempo de tratamento, dose, sítio de aplicação, etc.) e distintas abordagens utilizadas pelos diferentes autores ainda não possibilitam retirar conclusões definitivas sobre os efeitos da LBP no tratamento da OA.

Bjordal *et al.* (2007), em sua meta-análise quanto à eficácia de intervenções físicas sobre o joelho artrítico doloroso, fazem ressalvas semelhantes ao estudo supracitado. Os autores apontam as diferenças metodológicas, o número insuficiente de participantes de alguns estudos e a falta de padronização nos parâmetros utilizados na LBP como fatores limitantes na obtenção de resultados conclusivos. Entretanto, concluem que tratamentos com duração de tempo entre 2 a 4 semanas parecem ser benéficos no alívio da dor de pacientes com OA, indo de encontro aos seus achados em um trabalho de revisão sistemática sobre LBP e dor aguda (BJORDAL *et al.* 2006), onde demonstram que doses adequadas de LBP produzem efeitos anti-inflamatórios e analgésicos significativos e semelhantes a medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs).

Hegedus *et al.* (2009) dividiram 27 pacientes de OA em dois grupos que receberam LBP ou placebo 2 vezes por semana durante 4 semanas. Os pacientes do grupo intervenção receberam 6 J por ponto em um total de 8 pontos por sessão, sem que nenhum outro tipo de terapia física ou farmacológica fosse associada no tratamento da OA. Como resultado, os autores observaram que o grupo que recebeu LBP apresentou significativa redução na dor e aumento de amplitude de movimento articular, sendo que estes achados positivos foram preservados até dois meses após o término do tratamento.

Embora o mecanismo exato da redução da dor pela LBP não tenha sido determinado, Brousseau *et al.* (2000) acreditam que o sucesso da LBP no tratamento da OA se deva a vários mecanismos desencadeados a partir dos efeitos fisiológicos mediados pela fotoestimulação em nível celular. A LBP já se mostrou efetiva no estímulo da síntese de proteoglicanos e colágeno na cartilagem em estudos envolvendo animais (HERMAM *et al.*, 1988; REED *et al.*, 1994). Segundo achados de Bassleer *et al.* (1985), em experimento com células cartilaginosas humanas cultivadas *in vitro*, este efeito estimulatório da LBP sobre a cartilagem pode ser extrapolado para o modelo humano. Gur *et al.* (2003) levantam outras hipóteses

para o alívio da dor pela aplicação de LBP. Segundo estes autores, alguns pesquisadores acreditam que o efeito anti-inflamatório da LBP observado em estudos com artrite reumatoide pode explicar o alívio da dor nos pacientes com OA submetidos à LBP. Também se acredita que o aumento do aporte sanguíneo local, levando à redução do edema e melhor oxigenação dos tecidos, podem contribuir para a reparação do tecido cartilaginoso. Além disso, evidências de efeitos sobre a estimulação nervosa periférica, interrompendo o mecanismo de propagação do sinal doloroso, também poderiam estar relacionados ao efeito analgésico da LBP.

Conforme descrito acima, a LBP parece ser uma técnica não invasiva de fácil utilização com efeitos promissores no combate da dor e dos efeitos deletérios da OA sobre o tecido cartilaginoso (processo inflamatório, redução da biossíntese celular, redução da matriz cartilaginosa). Entretanto, estudos sistemáticos necessitam ser desenvolvidos no sentido de determinar metodologias adequadas para o uso crônico dessa terapia com o objetivo de intervir na gênese e no agravamento da OA.

Em um estudo experimental o efeito da LBP na cicatrização de ferimentos foi comprovado. Ocorreu uma redução da reação inflamatória, aumento da deposição de colágeno e maior proliferação de miofibroblastos (ratos *Wistar*, MEDRADO *et al.*, 2003). Em um estudo recente o efeito da LBP transcranial em modelo animal de doença de Alzheimer foi avaliado, como resultado foi encontrado uma diminuição da formação das placas amilóides e aumento da função mitocondrial (McCARTHY *et al.*, 2011). Em relação à OA, o efeito da LBP sobre a regeneração da cartilagem articular foi comprovado; o resultado indica maior reposição dos condrócitos articulares no grupo tratado (coelhos; CHO *et al.*, 2004). Em outro estudo, os autores relatam o efeito da LBP sobre a regeneração da cartilagem apenas em menores doses (coelhos; 692,6 nm e 1 J.cm⁻²; PFANDER *et al.*, 2006). Ainda, outros estudos encontraram aumento da biossíntese da matriz cartilaginosa em modelo químico de OA (ratos *Wistar*, papaína; LIN *et al.*, 2006) e aumento das proteínas de estresse em condrócitos articulares sobre o efeito do mesmo modelo químico de OA (ratos *Wistar*, papaína; LIN *et al.*, 2004).

Em uma revisão sistemática Chow *et al.* (2011) identificaram uma série de efeitos inibitórios da LBP sobre diversos modelos de lesão nervosa periférica, onde ocorreu a redução da dor aguda pela inibição direta de nociceptores. Na dor crônica, alterações em nível medular, induzidas pela irradiação do laser podem resultar em

uma depressão de longa duração (LTD) da dor (CHOW *et al.*, 2011). Ainda, estes autores concluem que há um prejuízo na condução neural, principalmente das fibras A δ e C, *i.e.*, rompimento do citoesqueleto, diminuição da oferta de ATP, e déficit na condução nervosa dos nociceptores; estes fatores podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios da LBP na função nociceptiva (*ibid.*, 2011).

O efeito da LBP sobre a dor crônica em modelo animal após a compressão do nervo ciático foi comprovado, quando ocorreu uma redução da dor no teste comportamental³ empregado. Este efeito foi observado em animais tratados com duas doses diferentes de LBP (830 nm e 4 J.cm⁻²; 830 nm e 8 J.cm⁻²; BERTOLINI *et al.*, 2011a). Ainda, em um estudo deste mesmo grupo de pesquisa foi realizada a avaliação funcional da nocicepção do joelho de ratos tratados com LBP e natação (exercício forçado; BERTOLINI *et al.*, 2011b). O resultado indica que a LBP apresentou efeitos analgésicos, enquanto a natação produziu aumento do quadro de dor, o qual foi parcialmente revertido com o uso do laser associado (teste comportamental; ratos; BERTOLINI *et al.*, 2011b).

Em cultura de células, o efeito inibitório da LBP sobre a produção de PGE2 e COX-2 foi comprovado (SAKURAI *et al.*, 2000). Ainda, diversas pesquisas em modelos animais têm mostrado os efeitos da LBP na redução dos níveis de TNF- α (ratos *Wistar*; redução não é dose LBP dependente; estudo em lesão pulmonar; AIMBIRE *et al.*, 2006), de COX-2 (ratos *Wistar*; tecido subplantar; ALBERTINI *et al.*, 2007), de PGE2 (810 nm ; efeito dependente do tempo de administração; CASTANO *et al.*, 2007), de fibrinogênio (ratos *Suquia*; modelo de OA de joelho induzida por cristais de urato; CAMPANA *et al.*, 2004), de edema (ratos *Wistar*; 30 mW; 660-684 nm ; BORTONE *et al.*, 2008) e, de células inflamatórias (LOPES-MARTINS *et al.*, 2005).

2.3.2 Estimulação elétrica artificial

A aplicação de energia elétrica para o tratamento da dor é historicamente datada de milhares de anos aC. Os antigos egípcios e mais tarde os gregos e romanos possuíam o conhecimento de que o peixe elétrico era capaz de gerar choques elétricos para o alívio da dor. Nos séculos XVIII e XIX esses geradores

³ Teste comportamental que avalia o tempo de levantamento da pata acometida durante a marcha

naturais de energia elétrica foram substituídos pelos dispositivos elétricos artificiais. Em princípio ocorreu a aplicação de correntes elétricas estáticas produzidas por um gerador de atrito (e.g., gerador de Van de Graaff). Christian Kratzenstein (1723-1795) foi o primeiro a aplicá-las clinicamente, logo seguido por Benjamin Franklin (1706-1790). Depois foi a época do galvanismo, método de aplicação de corrente elétrica direta à pele através de meios químicos. Na terceira fase, a corrente elétrica foi induzida de forma intermitente e em direções alternadas. Na quarta fase ocorreu a utilização de correntes de alta frequência. O século XIX foi a "idade de ouro" da eletroterapia. Foi utilizada para inúmeros procedimentos odontológicos, neurológicos, psiquiátricos e ginecológicos. No entanto, no início do século XX a eletroterapia caiu em desuso. Ela foi desconsiderada devido à falta de uma base científica, além de ter sido utilizada indiscriminadamente por curandeiros e charlatões. Além disso, o desenvolvimento de drogas analgésicas eficazes diminuiu o interesse na eletricidade. Na segunda metade do século XX a eletroterapia passou por uma revitalização. Com base em experiências com animais e investigações clínicas, seus mecanismos neurofisiológicos foram elucidados em mais detalhes (texto adaptado de HEIDLAND *et al.*, 2013)

A EEA tem sido utilizada para aumentar a capacidade de produção de força em indivíduos saudáveis (SOO *et al.*, 1988; LIEBER & KELLY, 1991) e em indivíduos portadores de enfermidades diversas (QUITTAN *et al.*, 2001; ZANOTTI *et al.*, 2002), que apresentam redução do uso da musculatura. Selkowitz (1989), através de uma revisão de evidências experimentais, concluiu que existem trabalhos convincentes sobre o aumento de força muscular através da EEA. Ainda, na presença da inibição muscular característica da OA, a EEA parece ser a principal ferramenta para "acordar" o músculo quando o mesmo não consegue responder ao comando voluntário (FITZGERALD *et al.*, 2004). A utilização de um protocolo de EEA pode resultar não apenas em adaptações estruturais e funcionais dos músculos extensores do joelho, mas também rever os efeitos deletérios da OA sobre o sistema neuromuscular. A inibição muscular característica da OA leva a perda da função contrátil do músculo, similar aos modelos animais de denervação muscular. Nestes modelos, foi comprovado o efeito da EEA crônica onde um aumento de 39-66% na área de seção transversa muscular e 27-50% na força isométrica máxima foram constatados (coelhos; EEA 1h/dia, ondas de 20 ms, 4 mA, 20 Hz; ASHLEY *et al.*,

2007). O efeito da aplicação de EEA crônica sobre as propriedades contráteis dos músculos foi estudado, onde foi observado um aumento na produção de força de 7 e 20-55 vezes para os músculos Extensor Longo dos Dedos e Sóleo, respectivamente; ainda, as propriedades mecânicas musculares de tempo de contração e tempo de relaxamento permaneceram inalteradas entre estes dois músculos (músculos denervados de ratos; 3-8 semanas de EEA; al-AMOOD *et al.* 1991).

Além dos efeitos sobre a produção de força e diminuição da atrofia muscular devido à inibição muscular presente na OA, a EEA é utilizada no tratamento da dor devido às neuropatias periféricas e em diversas modalidades de aplicação além da utilizada no presente estudo (estimulação elétrica neuromuscular transcutânea; TENS, estimulação nervosa periférica e estimulação da medula espinal; DEER *et al.* 2012; WODLINGER *et al.*, 2005). A ação da eletricidade para aliviar a dor é explicada em dois mecanismos principais: inibição segmentar de sinais de dor ao tronco encefálico no corno dorsal da medula espinal, e ativação da via descendente inibitória com maior liberação de opióides endógenos e outros mediadores neuroquímicos (serotonina, a noradrenalina, ácido gama-aminobutírico, acetilcolina e adenosina) (HEIDLAND *et al.*, 2013). Wodlinger *et al.* (2005) utilizaram um modelo experimental em que um estímulo nocivo era aplicado na pata do animal, então a resposta reflexa devido a este estímulo era mensurada (por meio de eletromiografia); como resultado da aplicação de EEA neste modelo ocorreu uma diminuição da atividade eletromiográfica induzida pelo reflexo de retirada; os autores concluem que a atividade das fibras tipo C foi bloqueada pela aplicação de EEA (estímulo sinusoidal aplicado no nervo Sural; coelhos; 130 Hz; WODLINGER *et al.*, 2005). Em um estudo clínico Deer *et al.* (2012) utilizaram a EEA dos GRDs em pacientes com dor crônica, a diminuição da dor foi verificada após 3-7 dias de tratamento (utilizando a Escala Visual Analógica da dor - EVA). Em uma revisão sistemática Rutjes *et al.* (2009) concluem que não foi possível confirmar que a TENS é eficaz para alívio da dor; esta revisão sistemática não foi conclusiva, principalmente devido ao pequeno número amostral nos ensaios clínicos considerados. Por outro lado, Elboim-Gabyzon *et al.* (2012) afirmam que a EEA neuromuscular quando associada a um programa de exercício físico aumentou a eficácia do programa de treinamento pela diminuição da dor e pelo aumento da ativação voluntária, mas não foi encontrado efeito sobre o aumento da produção de

força muscular ou da performance funcional (EEA do músculo Quadríceps Femoral; 75 Hz, 6 semanas). Desta forma há dúvidas em relação aos efeitos da EEA para o alívio da dor, aparentemente os efeitos são dependentes do tipo de aplicação, entre outros fatores; ensaios clínicos com maior poder estatístico são recomendados (RUTJES *et al.*, 2009).

Finalmente, além do efeito sobre a diminuição da dor, a estimulação elétrica é de fundamental importância para a prevenção e/ou tratamento da disfunção muscular e sarcopenia. Além dos efeitos benéficos para combater a inibição muscular (FITZGERALD *et al.*, 2004) e a dor (HEIDLAND *et al.*, 2013) características da OA de joelho, em estudos clínicos controlados, a aplicação de EEA mostrou ser eficaz contra a sarcopenia de pacientes com doença cardíaca congestiva crônica, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica e doença renal terminal (HEIDLAND *et al.*, 2013). Desta forma, os efeitos benéficos da EEA são bem definidos na literatura, tanto em estudos clínicos, quanto experimentais. Porém, são necessários mais estudos clínicos com maior poder estatístico ou em modelos animais que verifiquem os efeitos nas vias específicas de modulação da dor.

2.3.3 Terapia combinada

As terapias combinadas são uma opção para o tratamento da OA de joelho. Porém não há resultados na literatura em relação aos efeitos da TC não farmacológica proposta no presente estudo sobre a OA de joelho. Como veremos a seguir.

Em um estudo recente Bertolini *et al.* (2011b) avaliaram o efeito da LBP e exercício físico forçado (como terapia combinada; TC), como resultado esta TC, quando comparada com a LBP, apresentou menor redução do quadro doloroso (ratos *Wistar*; exercício de natação forçada). Na OA a intensidade da dor pode ser variada e é normalmente amplificada pelo exercício físico e aliviada durante o descanso (FELSON & SCHAIBLE, 2009). A liberação de β -endorfina através da via descendente de modulação da dor é responsável pelo efeito analgésico após o exercício. Contudo, principalmente em casos crônicos, é possível que o exercício possa exacerbar uma condição dolorosa já existente (KOLTYN, 2000; KOLTYN & UMEDA, 2006). Em um estudo clínico, Zhang *et al.* (2012) analisaram o efeito de uma TC farmacológica com exercício físico e Diclofenaco Sódico sobre a OA de

joelho, como resultado o grupo TC apresentou diminuição dos níveis de citocinas e genes relacionados às citocinas no fluido sinovial e inibição da degradação da cartilagem articular (TNF- α , hs-CRP e MMP-3; ZHANG *et al.*, 2012). Em outra TC farmacológica, Mavrommatis *et al.* (2012) testaram o efeito da acupuntura associada ao fármaco Etoricoxib, como resultado o tratamento com a TC foi mais efetivo que os tratamentos *sham* e apenas com o fármaco. Ainda, em sua revisão sistemática, Wang *et al.* (2012) sugerem que há evidências inconclusivas sobre a eficácia do exercício físico para a diminuição do quadro doloroso em pacientes com OA de joelho e, que estudos futuros devem comparar terapias combinadas com o exercício físico (forma pela qual o exercício físico é geralmente administrado para tratamento da dor decorrente da OA de joelho; WANG *et al.*; 2012).

Desta forma, uma TC que vise à melhora do quadro inflamatório e nociceptivo por meios não farmacológicos (por meio da LBP), combinada com o fortalecimento da musculatura e aumento da ativação muscular (por meio da EEA) pode proporcionar resultados satisfatórios para o sistema de movimento.

2.3.4 Objetivo

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito da TC sobre o comportamento de ratos submetidos a um modelo experimental de OA de joelho. Em específico foi avaliar o efeito da LBP, da EEA e da TC sobre o desempenho dos animais nos testes do campo aberto, analgesímetro e descarga de peso.

3 Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos machos *Wistar* (ratos adultos, aproximadamente 90 dias de idade e pesando entre 300-400 g), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Poole *et al.* (2010) recomendam que a idade mínima para a utilização de ratos para modelos animais de OA é de aproximadamente 90 dias, baseados na maturidade do esqueleto ósseo. Os animais foram tratados conforme a Lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Eles receberam ração e água *ad libitum*, permaneceram em ciclo de 12/12 h claro/escuro e com a temperatura controlada (21 ± 2 °C). Foram mantidos 4 animais por caixa (caixa padrão de polipropileno, 49x34x16 cm).

O protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com as diretrizes da Lei AROUCA (Lei nº 11.794, de 08 de 10 de 2008) que estabelece procedimentos para uso científico de animais e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS (ANEXO I). Os animais foram divididos randomicamente em quatro grupos:

- (1) grupo experimental submetido ao modelo de OA (GUINGAMP *et al.*, 1997; Grupo Controle, n=10);
- (2) grupo experimental submetido ao modelo de OA e ao tratamento com LBP (Grupo LBP, n=10);
- (3) grupo experimental submetido ao modelo de OA e ao tratamento com EEA (Grupo EEA, n=10);
- (4) grupo experimental submetido ao modelo de OA e à terapia combinada (Grupo TC, n=10), *i.e.*, aplicação da LBP seguida pela aplicação da EEA.

3.2 Indução do modelo experimental

O método utilizado por Guingamp *et al.* (1997) foi reproduzido para induzir a lesão de OA do joelho nos animais do presente estudo. A injeção de IM induziu um modelo químico de OA de joelho por meio da inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, como resultado ocorreu a interrupção da glicólise nos

condrócitos articulares, levando à morte celular (GUINGAMP *et al.*, 1997; BEYREUTHER *et al.*, 2007). A perda progressiva dos condrócitos após a injeção de IM resulta em alterações morfológicas e histológicas da cartilagem articular semelhantes à patologia observada em pacientes com OA (BENDELE *et al.* 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2003). Este modelo foi escolhido, pois mimetiza a dor articular característica da OA em humanos (COMBE *et al.*, 2004) e, estudos farmacológicos indicam que este modelo pode ser útil na investigação da dor crônica nociceptiva (COMBE *et al.*, 2004).

Após a injeção de IM há a instalação do processo inflamatório (BOVE *et al.*, 2003). Esta inflamação foi caracterizada por Bove *et al.* (2003) por meio de análises histológicas como uma expansão da membrana sinovial por edema proteico e fibrina, com infiltração de macrófagos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos. No 7º dia o processo inflamatório na sinóvia e tecidos circundantes está praticamente resolvido (BOVE *et al.*, 2003). Ainda, a ação do IM apresenta um comportamento bifásico (GUINGAMP *et al.*, 1997; COMBE *et al.*, 2004), onde os déficits encontrados na primeira fase são possivelmente relacionados ao processo inflamatório (é máximo no 1º dia, é diminuído no 3º dia e é praticamente ausente a partir do 7º dia; COMBE *et al.*, 2004); e na segunda fase, são possivelmente relacionados às alterações estruturais na articulação (*i.e.*, alterações no osso subcondral) (*ibid.*, 2005). Além disto, este modelo proporciona alterações morfológicas e comportamentais que podem ser comparadas às observadas na dor neuropática, onde há a ativação de células da glia em estágios agudos (microglia: 7º dia) e crônicos (astrócitos: 28º dia) (SAGAR *et al.*, 2011).

A OA do joelho unilateral foi induzida por uma única injeção intra-articular de IM (Sigma, St. Louis, MO) (2 mg, em 50 µl de solução salina estéril) na cavidade do joelho direito, onde a pata posterior do lado direito foi flexionada até um ângulo de aproximadamente 90º, então a solução foi injetada através do ligamento patelar com uma agulha de 26G (calibre) e 0,5 polegadas (comprimento) (FERNIHOUGH *et al.* 2004; BOVE *et al.*, 2003). O joelho da pata posterior esquerda foi injetado com 50 µl de solução salina. A dosagem de 2 mg de IM produz hiperalgesia consistente e reprodutível com mínimo efeito na saúde geral dos animais (FERNIHOUGH *et al.* 2004) e, é capaz de produzir um efeito crônico e duradouro (evidenciado por testes

de hiperalgesia primária e secundária a partir do 7º dia e por até 63 dias; COMBE *et al.*, 2004).

Durante o procedimento os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma solução de cetamina e xilazina (Vetaset[®], Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) (0,2 mL a cada 100 g de peso do animal; ROSA *et al.*, 2012). Após o procedimento ocorreu um breve período para recuperação dos efeitos da anestesia (5-10 minutos), e então os animais foram devolvidos para suas gaiolas e aquecidos por meio de lâmpadas incandescentes. A analgesia após a lesão foi realizada por meio da administração de Metamizol de Sódio (Dipirona Sódica, Neo Química[®], Brasil) a uma dose de 0,1 mL/animal a cada 4 horas, por um período de 2 dias após a indução da lesão (ROSA *et al.*, 2012) (Figura 7). Os animais que não sobreviveram aos procedimentos foram substituídos (3 animais).

3.3 Desenho experimental

A indução do modelo químico de OA ocorreu no primeiro dia do experimento (P0) (injeção de IM, 2 mg), logo após a primeira avaliação comportamental. O modelo de OA utilizado no presente estudo resulta em diminuição da síntese de proteoglicanos e perda da mobilidade do animal a partir do 2º dia após a injeção de IM (aproximadamente 90% e aproximadamente 40%; respectivamente; 3 mg de IM; GUINGAMP *et al.*, 1997). A analgesia após a lesão foi realizada conforme descrito acima no 2º e 3º dias (seção 3.2). No 15º dia após a lesão (P15) começaram os tratamentos e treinamentos com LBP, EEA e TC (Figura 7). A intervenção ocorreu todos os dias durante 14 dias. Para a TC, foi aplicada a LBP e após foi aplicada a EEA. As avaliações comportamentais dos animais foram realizadas antes da indução da lesão (P0) e nos dias 4 (P4), 8 (P8), 15 (P15), 18 (P18), 22 (P22), 25 (P25) e 29 (P29) após a lesão. No 30º dia os animais foram perfundidos, dissecados e as amostras foram: crioprotetidas em sacarose 30% e congeladas adequadamente (-70°C) (GRD e medula espinal), embebidas em paraformaldeído 4% (articulação do joelho) e embebidas em glutaraldeído 2,5% (músculo Bíceps Femoral). Foram coletadas amostras da articulação do joelho bilateral, músculo Bíceps Femoral bilateral, GRD bilateral na região de L4 e medula espinal na região da intumescência lombar. As amostras foram coletadas para análise futura.

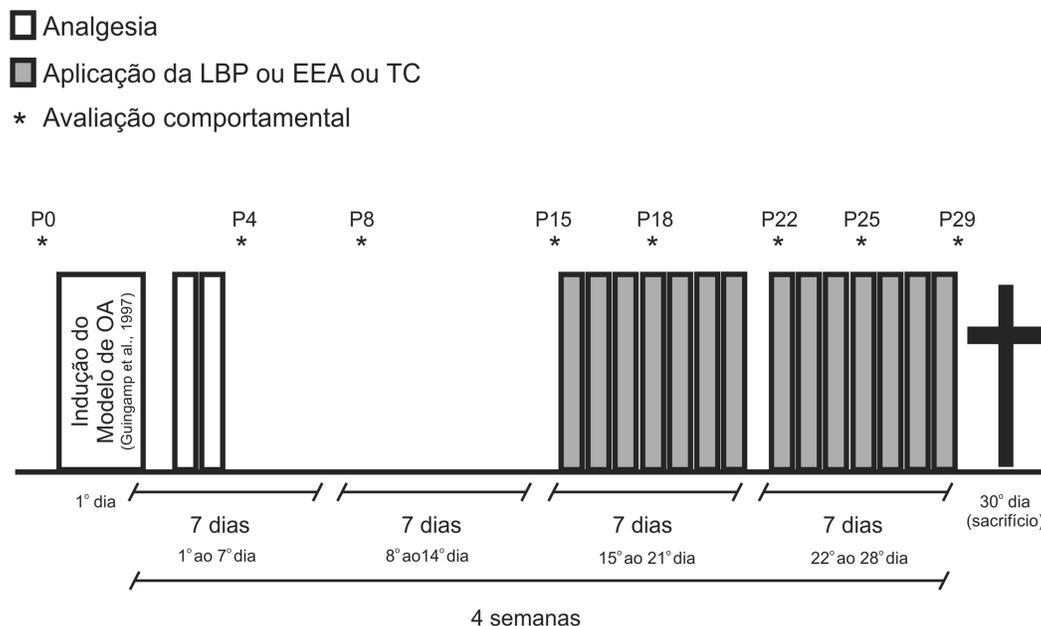


Figura 7. Desenho experimental para todos os grupos: os asteriscos indicam os momentos das 8 avaliações comportamentais. Os retângulos vazios indicam os dias onde foi administrado o analgésico e os retângulos cinzas indicam os dias nos quais foram aplicados os tratamentos e treinamentos. A cruz indica o dia da perfusão dos animais.

O grupo controle passou por todos os procedimentos, inclusive as manobras necessárias para realizar a LBP e EEA sem a aplicação dos tratamentos/treinamentos.

3.4 Instrumentos de medida, tratamento e treinamento

3.4.1 Campo aberto

O teste comportamental do campo aberto é utilizado normalmente para mensurar qualitativa e quantitativamente a atividade locomotora geral e o instinto de explorar o ambiente dos roedores; além disto, apresenta um componente emocional muito importante (STANFORD, 2007). O animal é posicionado no centro, ou próximo das paredes do aparato e os seguintes parâmetros comportamentais podem ser avaliados, por um período de tempo entre 2-20 min (normalmente 5 min): locomoção horizontal (número de cruzamentos das linhas marcadas na base do aparato), frequência de *rearings* (*i.e.*, levantamentos) ou inclinações (também chamado de atividade vertical) e *grooming* (lavagem prolongada da pelagem) (PRUT & BELZUNG, 2003). Foi utilizado um aparato, construído em nosso próprio laboratório

(Laboratório de Histologia Comparada do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS/UFRGS). Este consiste em uma caixa de vidro quadrada (38x38 cm) com a parte superior aberta e com as paredes de 36 cm de altura. Na parte de baixo da caixa existem 9 quadrantes marcados (Figura 8). A partir da filmagem (JVC GR-DVL 9800 – JVC Company of América, Wayne, New Jersey, USA) de 5 minutos de exploração do campo aberto pelo animal, os parâmetros analisados foram:

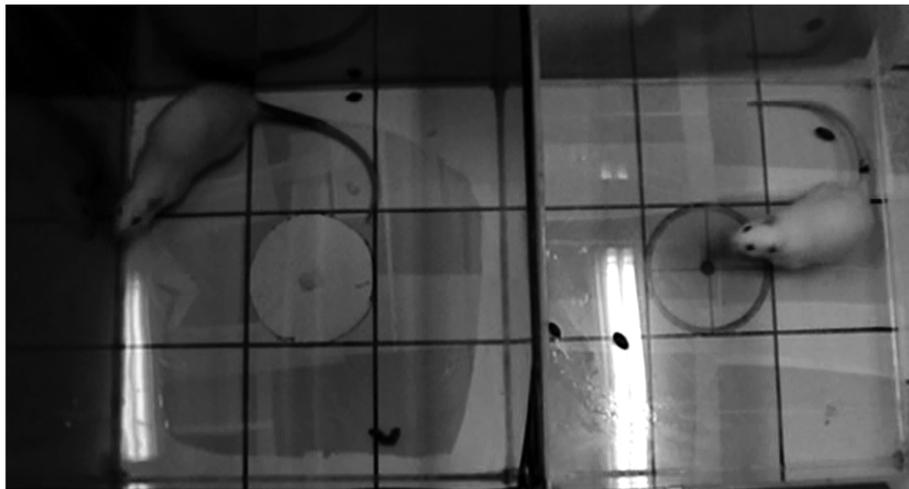


Figura 8. Imagem capturada pela câmera de vídeo utilizada no presente estudo. Em cada vídeo de 5 minutos foram registrados dois animais por vez. Esta avaliação comportamental foi realizada antes da indução do modelo e após o término do experimento (antes da perfusão). No total foram mais de 40 vídeos, totalizando aproximadamente 400 minutos de análises.

Número de cruzamentos ou atividade locomotora horizontal: É o número de vezes que o animal cruza algum dos 9 quadrantes com as quatro patas (BROWN *et al.*, 1999), é contabilizado durante o primeiro minuto, os 4 minutos restantes e os 5 minutos totais do teste. É um indicativo da normalidade geral do aparelho locomotor do animal.

Número de apoios bipodais ou “rearings”, inclinações ou atividade vertical: É o número de vezes que o animal levanta as patas dianteiras com o objetivo de explorar o ambiente (BROWN *et al.*, 1999); é contabilizado durante o primeiro minuto, os 4 minutos restantes e os 5 minutos totais do teste. O apoio bipodal demanda maior sobrecarga nos membros posteriores, e é um indicativo da normalidade geral e das articulações desses membros.

Após cada avaliação as caixas eram higienizadas com Etanol 70% e papel toalha. Posteriormente, os vídeos foram analisados visualmente por um avaliador utilizando-se um computador, uma folha de papel e uma caneta. Os resultados foram transcritos para planilhas do *software* Excel para posterior análise.

É importante citar que o teste do campo aberto foi descrito originalmente como um teste para mensurar o comportamento emocional dos animais (HALL, 1934) e é um teste muito utilizado para o estudo do comportamento de ansiedade (PRUT & BELZUNG, 2003). Portanto, no presente estudo o teste do campo aberto teve o objetivo de avaliar a saúde geral do sistema de movimento, tanto no aspecto neuromuscular, quanto no aspecto emocional resultante da sensação dolorosa (HALL, 1934; PRUT & BELZUNG, 2003; STANFORD, 2007).

3.4.2 Analgesímetro

Foi utilizado um analgesímetro digital (Insight[®], Ribeirão Preto, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 9). Este é capaz de registrar a força máxima aplicada na pata do animal, em gF, para que um reflexo de retirada ocorra. O estímulo é aplicado na pata posterior do animal em pontos específicos (VIVANCOS *et al.*, 2004) até que ocorra: a retirada, a retirada seguida por uma lambida (*licking*) ou a sacodida rápida (*flinch*). O valor máximo de força, em gF, é registrado pelo visor digital do aparelho (Figura 9a) e anotado pelo avaliador.

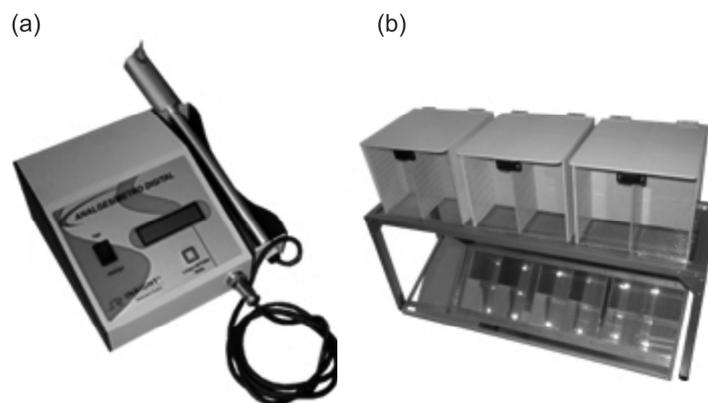


Figura 9. (a) Analgesímetro digital e caneta instrumentada com transdutor de força e (b) ambiente para confinamento dos animais com espelho.

O teste ocorreu da seguinte forma: os animais foram posicionados no ambiente confinado tendo como fundo uma grade metálica com um espelho posicionado à aproximadamente 45° (para permitir a visualização das patas dos animais pelo avaliador; Figura 9b) e, permaneceram durante 15 minutos para aclimação (VIVANCOS *et al.*, 2004). Em seguida, por meio da caneta instrumentada com célula de carga foi aplicado um estímulo mecânico por meio de um filamento de polipropileno (ponta de pipeta de 10 µL) (Figura 9a); este foi aplicado de forma crescente e gradual por aproximadamente de 1-4 segundos até que o animal retirasse a pata, a força máxima aplicada foi registrada. Foram registradas as forças em gF de pelo menos 6 testes, ou até 3 testes com valores similares; a cada teste era observado se o reflexo de retirada ocorria, conforme descrito anteriormente. Para a análise foram utilizados os 3 valores mais próximos entre si, considerando-se todas as tentativas registradas (VIVANCOS *et al.*, 2004). Nos casos de retirada instantânea ou em que o animal levantava a pata acometida pela lesão (não oferecendo descarga de peso) o valor de limiar de retirada da pata foi considerado com sendo 0 gF.

Este teste mensurou a hiperalgesia secundária, ou seja, a hipersensibilidade dolorosa em um local secundário a lesão (*i.e.*, pata) e é um comportamento resultante dos processos de sensibilização central descritos anteriormente.

3.4.3 Descarga de peso

Foram utilizadas duas balanças de precisão com resolução de $\pm 0,01$ g e capacidade máxima de 500 g (Portable Digital Pocket Scale, China) e um aparato em acrílico para o confinamento do animal durante o teste. Este equipamento foi desenvolvido e validado como parte do presente estudo e é descrito na Figura 10. Previamente às coletas de dados o equipamento foi calibrado e, a partir das curvas de calibração os resultados foram ajustados, quando necessário, garantindo uma maior precisão dos mesmos, conforme as equações 1 e 2 (Figura 10a):

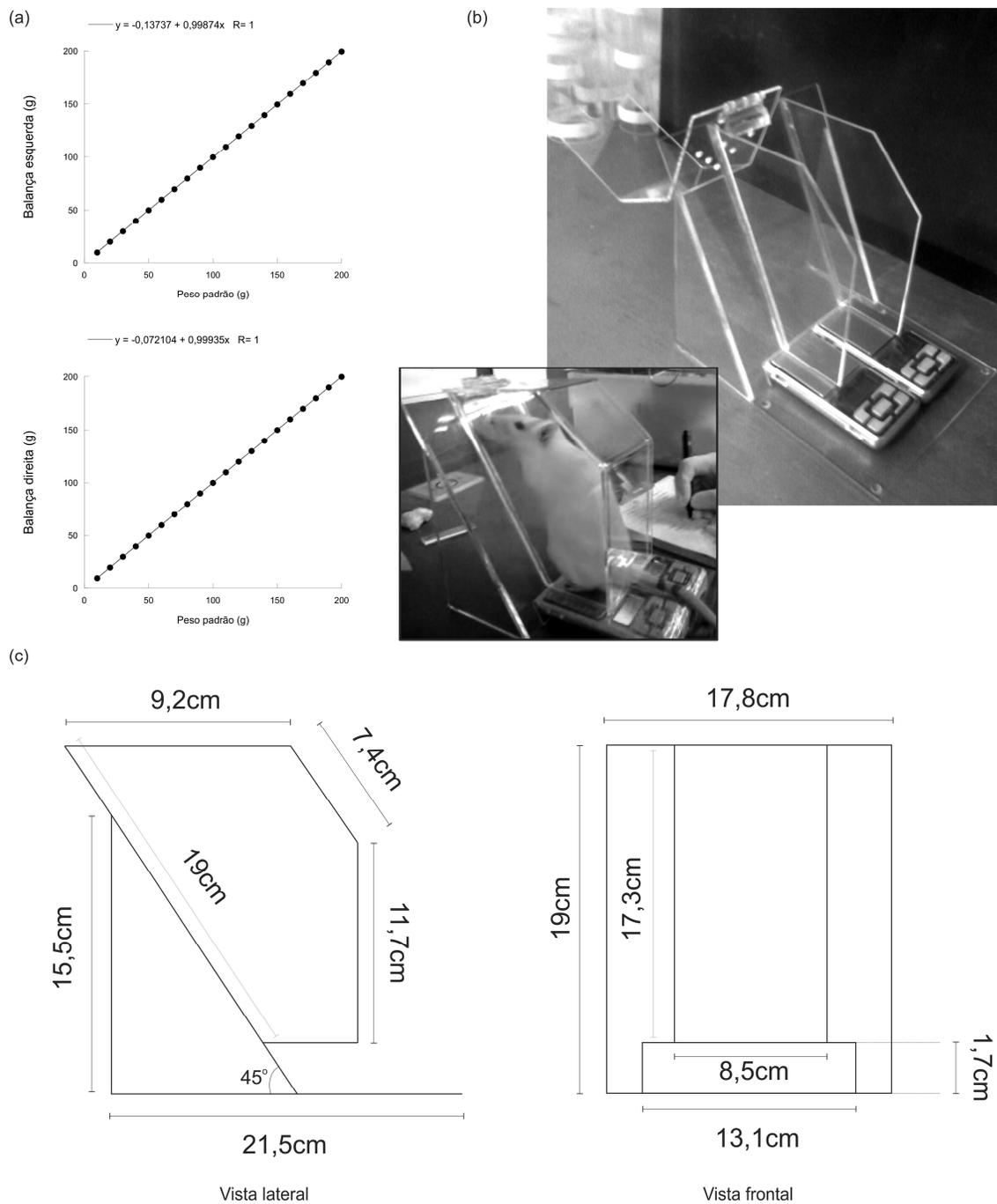


Figura10. (a) Curvas de calibração das balanças digitais e equações. (b) Posição do animal para o teste, aparato para confinamento durante a mensuração da descarga de peso e balanças digitais. (c) Vistas lateral e frontal com as principais medidas do aparato em acrílico.

$$y = -0,72104 + 0,99935x \quad (R=1) \quad (\text{Equação 1})$$

$$y = -0,13737 + 0,99874x \quad (R=1) \quad (\text{Equação 2})$$

em que,

y: é a massa mensurada pela balança eletrônica em g;

x: é a massa corrigida em g.

Foi mensurada a descarga de peso em cada uma das patas posteriores, da seguinte forma: o animal foi confinado dentro do aparato de 5-10 minutos para aclimação (a posição do animal deveria ser com cada pata posterior em uma das balanças, sem apoio das patas anteriores e com uma posição de tronco reta na vertical) (Figura 10b), então foi registrado o peso instantâneo em cada uma das balanças (BOVE *et al.*, 2003). Um medida média durante 5 segundos de análise foi registrada por 3 vezes. A descarga de peso na pata é menor se o animal estiver com dor ou desconforto na articulação do joelho deste membro (*ibid.*, 2003). Este teste mensura a hiperalgesia primária, ou seja, a hipersensibilidade dolorosa no local da lesão (*i.e.*, articulação do joelho), é um comportamento resultante dos processos de sensibilização periférica. Para o cálculo foi utilizada uma normalização pela descarga de peso total, conforme a Equação 3:

$$\text{Descarga de peso (\%)} = \frac{P_C - P_{OA}}{P_C + P_{OA}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

em que,

P_C: descarga de peso na pata contralateral à lesão, em gF;

P_{OA}: descarga de peso na pata ipsilateral à lesão, em gF.

3.4.4 Laserterapia

Para o tratamento da OA foi utilizado um equipamento da Chattanooga Intellect® (Hixson, TN, U.S.A.) (Figura 11a), com uma caneta de diodo simples com comprimento de onda de 850 nm e potência de 100 mW (Figura 11b). A LBP

(comprimento de onda 850 nm ; potência média 100 mW; dose 4 Jcm⁻²; duração 40 s; ROSA *et al.*, 2012) foi aplicada na articulação submetida à injeção de IM a partir do 15º dia após a lesão (P15), por um período de 14 dias (até P29). A irradiação por laser foi aplicada em 4 pontos através dos compartimentos transcutâneos da articulação: medial, lateral, anteromedial e anterolateral (*ibid.*, 2012) (Figura 11c). Os lasers com comprimento de onda entre 830 nm e 904 nm penetram no tecido cutâneo e tecidos adjacentes por vários centímetros (CHOW *et al.*, 2009). A distância entre a pele e a face da articulação é tipicamente de 1,5-3,0 cm sem pressão e ainda menor quando uma pressão é aplicada (mensurado por meio de ultrassonografia; CHOW *et al.*, 2009).



Figura 11. (a) Equipamento de LBP (Chattanooga Intellect®). (b) Caneta de diodo simples e com comprimento de onda de 850 nm e potência de 100 mW. (c) A irradiação por laser foi aplicada em 4 pontos através dos compartimentos transcutâneos da articulação: medial, lateral, anteromedial e anterolateral.

Desta forma, no presente estudo a escolha dos parâmetros para a aplicação da LBP visou à otimização do tratamento; ainda, foi realizada a tricotomia da região de aplicação da LBP com o uso de um aparelho elétrico específico para esta finalidade e creme depilatório. Durante a aplicação o animal foi imobilizado e teve a pata posterior direita estendida até um ângulo de 90°, com a ajuda de um auxiliar, então a LBP foi aplicada por um fisioterapeuta devidamente treinado. Durante a aplicação ambos os sujeitos utilizaram óculos de segurança específicos que acompanham o equipamento de LBP; a LBP não gera calor destrutivo, mas demanda cuidado principalmente com a proteção dos olhos, dependendo da classe do equipamento (classes de 3B e 4). Assim, é recomendada a utilização do equipamento de segurança em todos os estudos com LBP (CHOW *et al.*, 2009). Após a aplicação os animais foram devolvidos para suas gaiolas.

3.4.5 Estimulação elétrica artificial

Para o programa de fortalecimento muscular foi utilizado o equipamento de estimulação elétrica portátil Apollo[®] (FINEP/EsEF-UFRGS) adaptado para o uso em animais pelo setor de Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (corrente de 4 mA à 12 mA). Inicialmente foi utilizado 4 mA para a aclimação dos animais ao equipamento (1ª sessão de treino). A partir da 2ª sessão de treino, foram realizados incrementos de intensidade de corrente, conforme a tolerância de cada animal (cada animal apresentou uma sensibilidade diferente aos estímulos, como era esperado), desta forma a corrente variou entre 4 mA e 7 mA; respeitando os princípios do treinamento físico da adaptação, individualidade, progressão, especificidade e da sobrecarga (WILMORE & COSTILL, 2004). A escolha da intensidade da corrente para cada aplicação era baseada nos sinais de desconforto dos animais devido aos estímulos iniciais, sendo que a intensidade aplicada sempre foi a máxima possível. Foi observado que a sensibilidade dos animais aumentou com o passar dos dias de treinamento. Além do aumento da corrente, foi realizada uma diminuição dos tempos de intervalo, caracterizando um aumento do volume de treinamento. Dentro do programa de treinamento ainda ocorreu um dia de repouso. Em resumo, foi realizada a progressão do volume de

treino pela diminuição dos intervalos entre as estimulações, além do aumento gradual da intensidade da corrente (conforme a Tabela 1).

Tabela1. Sessões de treinamento aplicadas aos grupos EEA e TC durante os 14 dias de EEA.

Dia	Intensidade da corrente (mA)	Sessões de estimulação	Tempo de estimulação (s)
P15	4	6	120
P16	4 - 7	6	120
P17	4 - 7	6	120
P18	4 - 7	12	240
P19	4 - 7	12	240
P20	4 - 7	12	240
P21	4 - 7	12	240
P22	Repouso	Repouso	Repouso
P23	4 - 7	12	240
P24	4 - 7	12	240
P25	4 - 7	12	240
P26	4 - 7	12	240
P27	4 - 7	12	240
P28	4 - 7	12	240
P29	4 - 7	12	240

Misawa *et al.* (2001) encontraram melhores resultados na diminuição da atrofia muscular aguda e no aumento da produção de força muscular, após uma lesão medular, pela aplicação de EEA em altas frequências (100 Hz foi melhor que 20 Hz; ratos). Da mesma forma, Fujita *et al.* (2011) utilizaram a frequência de 100 Hz

para verificar a eficácia de dois tipos diferentes de treinamento com a aplicação de EEA crônica para o ganho de força muscular (ratos *Wistar*). No presente estudo, a EEA (4 mA; 100 Hz; 120 s/dia; FUJITA *et al.*, 2011) foi aplicada no músculo Bíceps Femoral da articulação submetida à injeção de IM a partir do 15º dia após a lesão (P15), por um período de 14 dias (até P29). Dois eletrodos de superfície foram utilizados para estimular o músculo Bíceps Femoral (Figura 12b). Um eletrodo (5 cm de diâmetro) foi posicionado nas costas do animal (ASHLEY *et al.*, 2007; FUJITA *et al.*, 2011) e, outro eletrodo (5 cm de diâmetro) foi fixado próximo ao ponto motor do músculo Bíceps Femoral. Foi realizada a tricotomia da região de aplicação da EEA, com o uso dos mesmos equipamentos descritos na seção 3.4.4.; ainda, para a melhor fixação dos eletrodos foi utilizado esparadrapo cirúrgico para envolver os eletrodos junto ao ponto motor do músculo Bíceps Femoral e ao dorso do animal. O protocolo consistiu na aplicação de um pulso em onda quadrada com 0,1 ms de duração e amplitude entre 4 mA e 7 mA, cada pulso foi aplicado com uma frequência de 100 Hz. Durante o protocolo de estimulação pulsos com duração de 1 s foram aplicados a cada 3 s (*i.e.*, 1 s estimulação; 2 s sem estimulação) durante 1 minuto seguido por 5 minutos de repouso ou seguido de 2,5 minutos, conforme a progressão do treinamento. Seis ou 12 estimulações consecutivas foram executadas uma vez por dia, resultando em uma estimulação total de 120 s/dia ou 240 s/dia (FUJITA *et al.*, 2011). Durante a aplicação o animal foi mantido em ambiente confinado (Figura 12a).

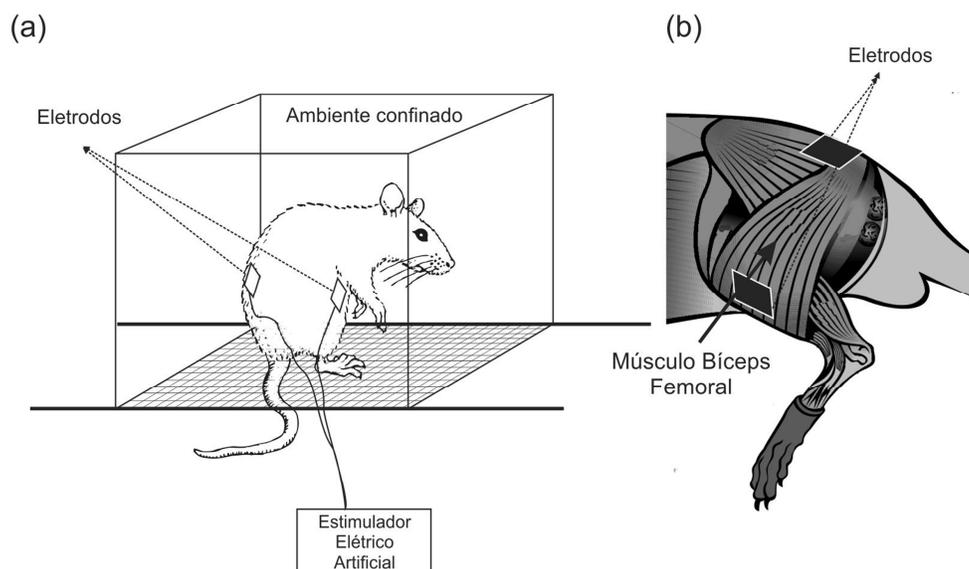


Figura 12. (a) Durante o experimento o animal foi mantido em ambiente confinado para restrição de movimento. A grade na parte inferior do aparato permitia a passagem dos fios dos eletrodos ao estimulador elétrico. (b) Um eletrodo (5 cm de diâmetro) foi posicionado no dorso do animal e, outro eletrodo (5 cm de diâmetro) foi fixado próximo ao ponto motor do músculo Bíceps Femoral.

4 Tratamento estatístico

Foi realizada uma análise exploratória dos dados com histogramas, curvas de normalidade e gráficos de *box plot* para verificação de *outliers*. Foi realizada uma análise qualitativa minuciosa previamente as comparações de médias. As comparações de médias foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), tendo como fator o tipo de tratamento (4 níveis: controle, LBP, EEA e TC) e/ou por meio do teste t de *Student* para amostras dependentes (para as análises dos dados dos testes pré e pós do campo aberto e para verificar a efeito da lesão). Quando necessário, a ANOVA foi seguida do teste tipo *post-hoc* de Bonferroni para múltiplas comparações. Ainda foi verificada a homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e a esfericidade dos dados (teste de Mauchly). A ANOVA foi considerada como um teste robusto suficiente para ser utilizado inclusive nos casos onde a normalidade dos dados não foi constatada. O nível de significância para todos os testes foi considerado $\alpha = 0,05$. O programa utilizado foi o *SPSS Statistics* (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 17.0.

5 Resultados

Os resultados são expressos em média e erro padrão e, divididos em 3 partes: (5.1) campo aberto, (5.2) descarga de peso e (5.3) limiar de retirada da pata.

5.1 Campo aberto

Para o teste comportamental do campo aberto foram avaliados 6 parâmetros: número de cruzamentos durante o primeiro minuto de teste, número de cruzamentos nos quatro minutos finais de teste, número total de cruzamentos, número de *rearings* durante o primeiro minuto de teste, número de *rearings* nos quatro minutos finais de teste e número total de *rearings*. Estas avaliações foram executadas em apenas dois momentos separados por 30 dias de intervalo: antes da indução do modelo experimental de OA do joelho (PRÉ) e após a indução do modelo e o término dos tratamentos e treinamentos (PÓS). O teste do campo aberto, quando repetido por muitas vezes ao longo do tempo, resulta em um aprendizado dos animais. Como o ambiente já é conhecido (habituação) há menos interesse dos animais e, assim ocorre uma diminuição natural da atividade exploratória devido a este efeito. Desta forma, foram escolhidos apenas dois momentos de teste e esses separados por um período longo de tempo (30 dias).

Na Figura 12 são descritos os números de cruzamentos. Nota-se que, devido à lesão, há um comportamento de diminuição dos valores quando comparados os momentos antes da indução do modelo (PRÉ) e 30 dias depois (PÓS), quando foram finalizadas as intervenções. Em relação ao número de cruzamentos durante o primeiro minuto (Figura 13a) os grupos Controle, LBP e EEA apresentaram uma diminuição de 38% ($p=0,004$), 33% ($p<0,001$) e 35% ($p=0,015$), respectivamente. Apenas o grupo TC apresentou uma diminuição não significativa de 14%, resultado que indica que este grupo apresentou um efeito positivo da TC, com o retorno do nível de atividade exploratória no 1º minuto aos valores de antes da indução do modelo experimental de OA do joelho. Em relação ao número de cruzamentos nos 4 minutos finais (Figura 13b) e totais (Figura 13c) apenas o grupo EEA apresentou uma diminuição não significativa de 1% e 16%, respectivamente. Os grupos Controle, LBP e TC apresentaram diminuição do número de cruzamentos nos 4 minutos finais e totais de 28% ($p=0,037$) e 32% ($p=0,006$), 55% ($p=0,001$) e 47% ($p<0,001$) e 30% ($p=0,003$) e 25% ($p=0,024$), respectivamente. Desta forma, para os

parâmetros de número de cruzamentos no teste do campo aberto, tanto a EEA quanto a TC exerceram um efeito positivo na atividade locomotora e exploratória dos animais, com o retorno dessas aos níveis basais antes da indução do modelo experimental de OA do joelho.

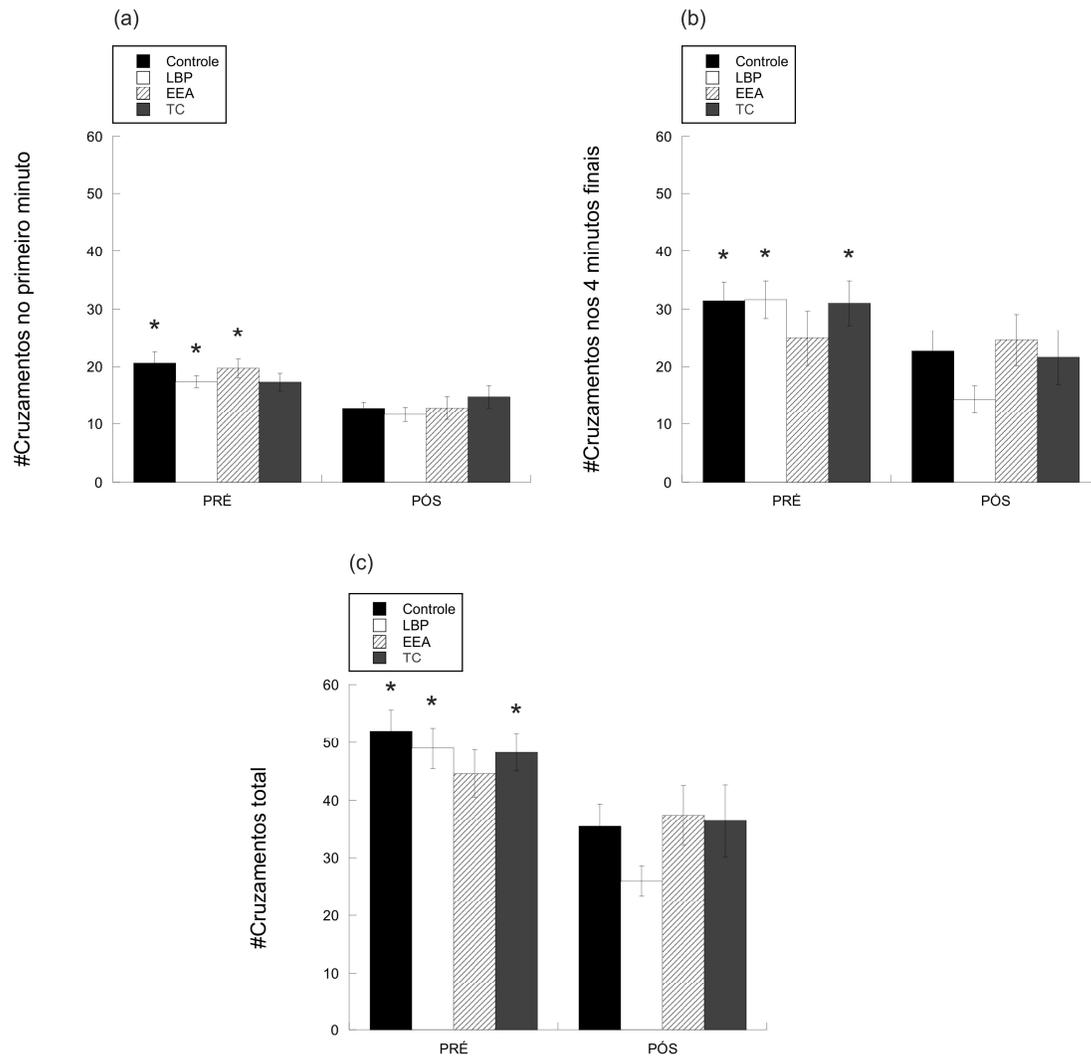


Figura 13. Média e erro padrão (n=10) para: (a) número de cruzamentos durante o primeiro minuto de teste, (b) número de cruzamentos nos quatro minutos finais de teste e (c) número total de cruzamentos. Os retângulos pretos cheios são os valores para o grupo Controle, os vazados para o grupo LBP, os hachurados para o grupo EEA e os cinzas cheios para o grupo TC.

(*) indica diferença significativa entre a avaliação antes da indução do modelo experimental de OA do joelho (PRÉ) e após o término dos tratamentos e treinamentos (PÓS). Foi utilizado o teste t de Student para amostras dependentes.

Na Figura 14 são descritos os números de apoios bipodais exploratórios ou de *rearings*. Nota-se que há um comportamento geral de diminuição dos valores quando comparados os momentos antes da indução do modelo (PRÉ) e 30 dias depois (PÓS), quando foram finalizadas as intervenções. Em relação ao número de *rearings* durante o primeiro minuto (Figura 14a) os grupos Controle, LBP e EEA apresentaram uma diminuição de 43% ($p=0,009$), 43% ($p<0,036$) e 27% ($p=0,014$), respectivamente. Apenas o grupo TC apresentou uma diminuição não significativa de 25%, resultado que indica que este apresentou um efeito positivo da TC, com o retorno do nível de atividade exploratória, e com o uso principalmente dos membros posteriores (membro acometido), aos valores de antes da indução do modelo experimental de OA do joelho.

Em relação ao número de *rearings* nos 4 minutos finais (Figura 14b) e totais (Figura 14c), apenas o grupo EEA apresentou um aumento significativo de 34% e 6%, respectivamente. Este resultado indica que a EEA não só reverteu os déficits motores resultantes da lesão, mas aprimorou a condição inicial dos animais do grupo tratado com EEA. Ainda, o grupo que recebeu a TC não apresentou diferença significativa entre os momentos PRÉ e PÓS, com uma diminuição de 21% para o número de *rearings* nos 4 minutos finais e 22% no número total de *rearings*. A LBP não exerceu nenhum efeito sobre a atividade exploratória com o uso principalmente dos membros posteriores (*rearings*), sendo que ocorreram diminuições de 43% ($p=0,036$), 38% ($p=0,008$) e 40% ($p<0,001$) para número de *rearings* no primeiro minuto, nos 4 minutos finais e nos totais; respectivamente. Desta forma, para os parâmetros de número de *rearings* no teste do campo aberto, tanto a EEA quanto a TC exerceram um efeito positivo na atividade locomotora e exploratória dos animais, com o retorno dessas aos níveis basais antes da indução do modelo experimental de OA do joelho e, no caso do grupo EEA com um aumento desta atividade em relação aos níveis basais.

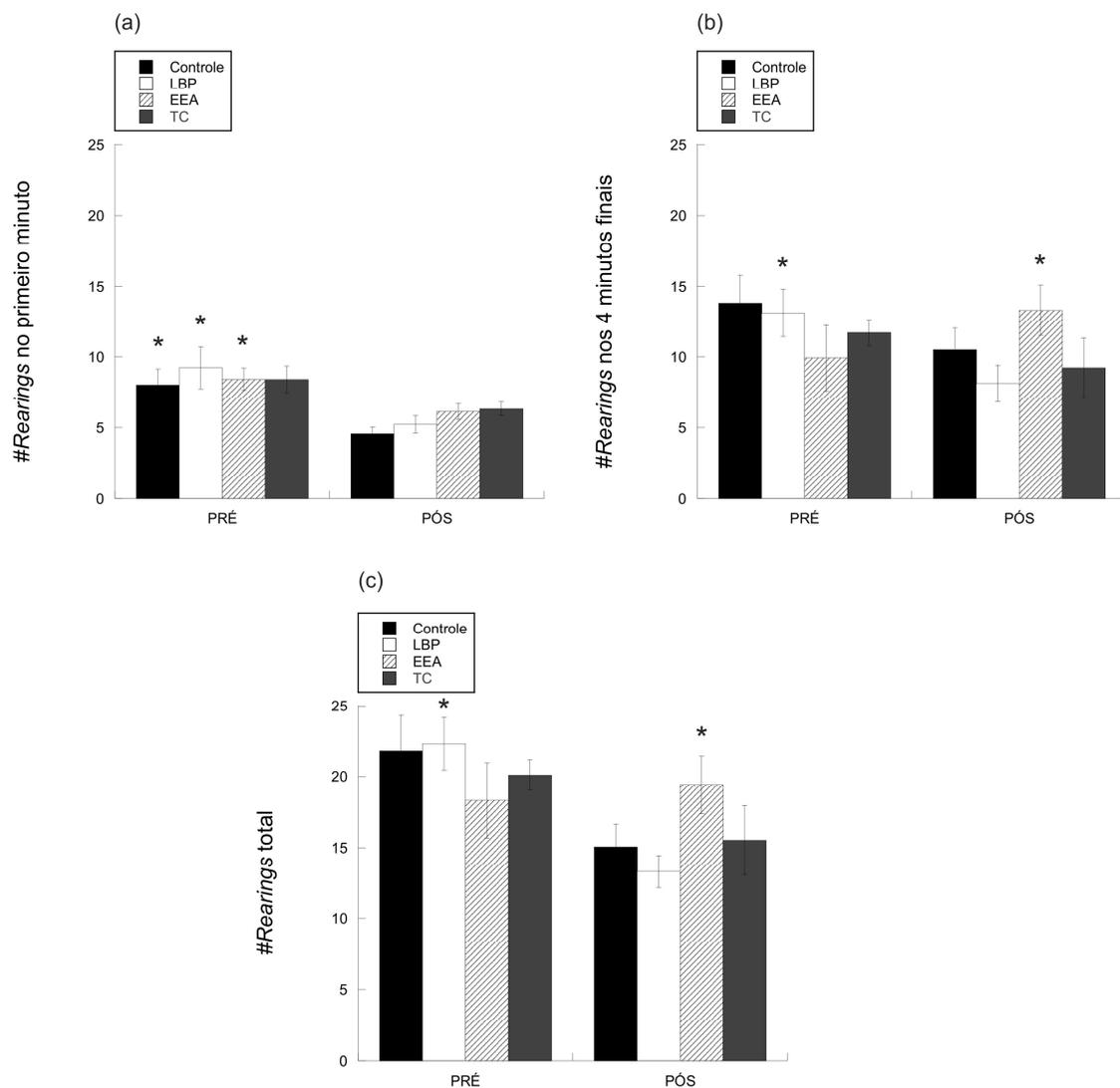


Figura 14. Média e erro padrão (n=10) para: (a) número de *rearings* durante o primeiro minuto de teste, (b) número de *rearings* nos quatro minutos finais de teste e (c) número total de *rearings*. Os retângulos pretos cheios são os valores para o grupo Controle, os vazados para o grupo LBP, os hachurados para o grupo EEA e os cinzas cheios para o grupo TC.

(*) indica diferença significativa entre a avaliação antes da indução do modelo experimental de OA do joelho (PRÉ) e após o término dos tratamentos e treinamentos (PÓS). Foi utilizado o teste t de Student para amostras dependentes e o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$

5.2 Descarga de peso

Para o teste comportamental de descarga de peso foi considerada a diferença dos valores da descarga de peso pela pata ipsilateral (P_{OA}) e contralateral (P_C) à lesão, normalizado pela descarga de peso total ($P_{OA} + P_C$) (Equação 3). Os valores são expressos em % e valores positivos indicam maior déficit de sustentar o peso corporal com a pata ipsilateral à lesão, e valores negativos indicam menor déficit. Primeiramente será apresentado o efeito da indução do modelo experimental de OA no parâmetro descarga de peso (Figura 15) (hiperalgesia primária devido aos processos de sensibilização periférica; conforme descrito na seção 2.1). Na Figura 15 é verificado o efeito da indução do modelo, a qual foi realizada após a avaliação prévia à lesão (P0). Nota-se que antes da indução do modelo experimental de OA do joelho os animais não apresentavam déficits na descarga de peso, *i.e.*, os valores estão muito próximos de zero. Após a lesão, ocorreu diferença significativa para todas as comparações com $p < 0,001$. Este resultado indica que o modelo experimental de OA do joelho foi corretamente induzido.

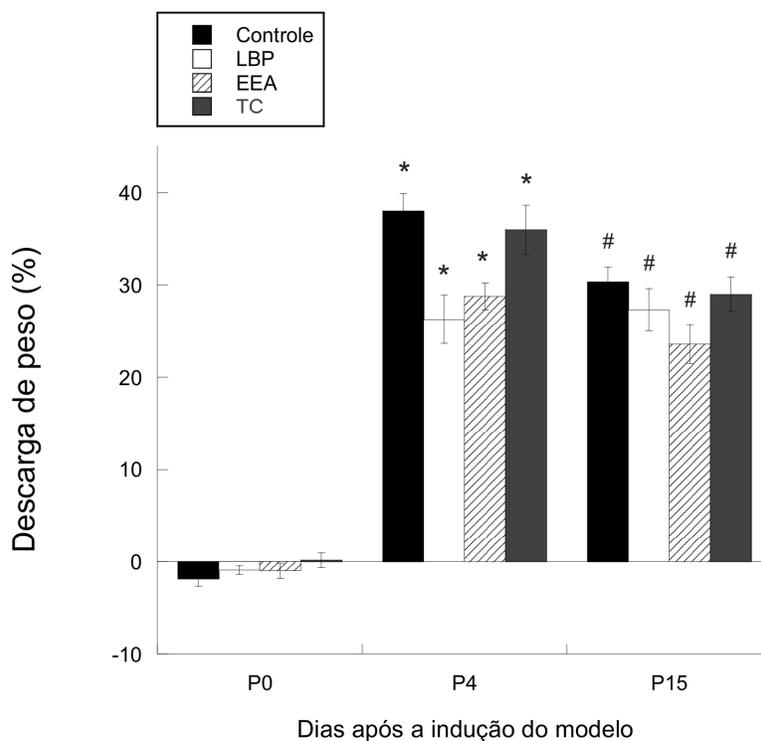


Figura 15. Média e erro padrão (n=10) para o parâmetro descarga de peso antes da indução do modelo (P0) na fase dos efeitos agudos (no quarto dia após a indução da lesão; P4) e crônicos (no 15º dia após a indução da lesão; P15).

(*) indica diferença significativa para todos os grupos entre P0 e P4.

(#) indica diferença significativa para todos os grupos entre P0 e P15.

Foi utilizado o teste t de Student para amostras dependentes e o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$

Na Figura 16a é descrito o comportamento da descarga de peso durante todo o período do experimento (29 dias). No quarto dia após a indução do modelo (P4) houve diferença entre os grupos Controle e LBP ($p=0,001$), entre os grupos Controle e EEA ($p=0,020$) e entre os grupos LBP e TC ($p=0,013$); esta diferença é devido à resposta individual de cada animal à indução do modelo, de forma que nos dias P8 e P15 (começo dos tratamentos/treinamentos) não há diferença significativa entre os grupos (Figura 16b). Após o P15 observamos o efeito da LBP, da EEA e da TC. No dia P18 apenas o grupo LBP diferiu do EEA, o último apresentou déficits de descarga de peso 35% maiores quando comparado com o primeiro ($p=0,001$); resultado que indica um efeito agudo da LBP sobre a modulação da dor. Ainda, apesar de não ter diferenciado estatisticamente dos grupos Controle e TC, o grupo LBP apresentou déficits 25% e 15% menores nesta comparação qualitativa. No P22, ou seja, após 1 semana de tratamento diário com LBP, este grupo foi diferente de todos os demais, sendo 74% ($p<0,001$), 65% ($p<0,001$) e 69% ($p<0,001$) menores os déficits do grupo LBP nesta comparação. Resultado que confirma o efeito agudo da LBP sobre o parâmetro descarga de peso. No P25 o resultado passa a ser favorável também às duas terapias que envolvem a EEA (*i.e.*, os grupos EEA e TC); ocorreu diferença de 39% ($p=0,025$) na comparação entre os grupos Controle e EEA. O grupo TC não apresentou diferença, mas os déficits foram 32% menores quando comparados aos do grupo Controle. Ainda no P25, o grupo LBP continua sendo diferente do Controle, com um déficit 40% menor ($p=0,019$). Finalmente na última avaliação, o P29, todos os grupos foram diferentes do Controle, com déficits 69% ($p<0,001$), 60% ($p<0,001$) e 49% ($p=0,029$), para os grupos LBP, EEA e TC; respectivamente. Na Figura 15b observa-se o comportamento da descarga de peso antes da indução do modelo, no P8 e P29; antes da aplicação dos tratamentos todos os grupos apresentavam o mesmo déficit devido à lesão (P8) e após os 14 dias de tratamento o grupo Controle apresentou o maior déficit quando comparado aos demais grupos (estatísticas citadas acima). Estes resultados indicam que todos os tratamentos promoveram uma

diminuição crônica dos déficits primários à lesão, ou seja, a dor devido à sensibilização periférica e a incapacidade da articulação do joelho.

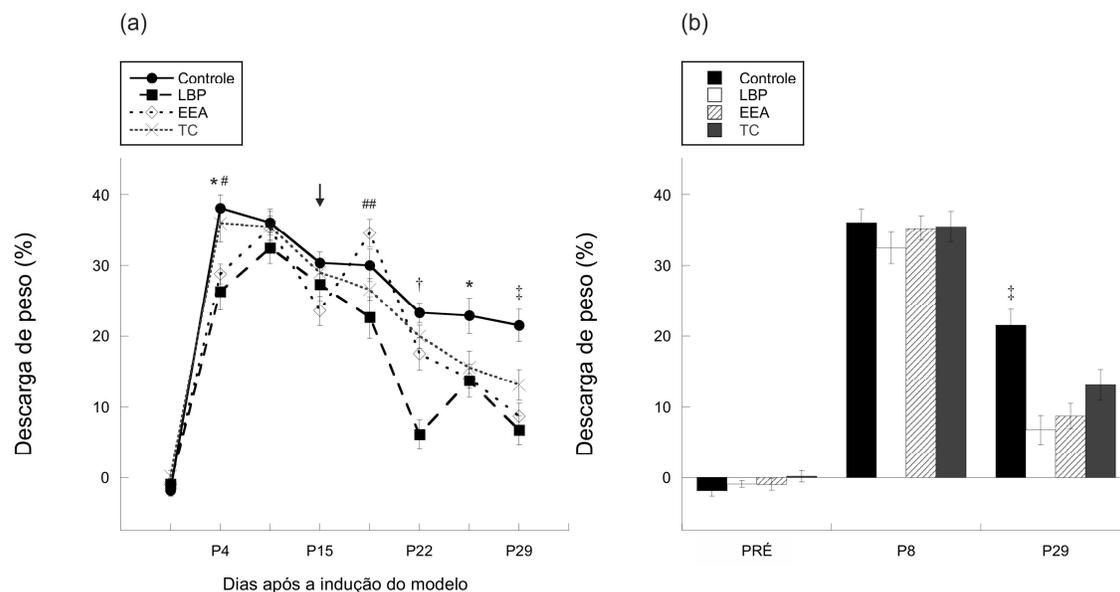


Figura 16. Média e erro padrão (n=10) para o parâmetro descarga de peso. A seta indica quando começou o tratamento/treinamento com LBP, EEA e TC. (a) Os redondos cheios são as avaliações para o grupo Controle, os retângulos cheios para o grupo LBP, os losangos vazados para o grupo EEA e os símbolos X para o grupo TC. (b) Os retângulos pretos cheios são os valores para o grupo Controle, os vazados para o grupo LBP, os hachurados para o grupo EEA e os cinzas cheios para o grupo TC.

(*) indica diferença significativa entre os grupos Controle e LBP e entre os grupos Controle e EEA.

(#) indica diferença entre os grupos LBP e TC

(##) indica diferença significativa entre os grupos LBP e EEA.

(†) indica diferença significativa entre o grupo LBP e os grupos Controle, EEA e TC.

(‡) indica diferença significativa entre o grupo Controle e os grupos LBP, EEA e TC.

Foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Bonferroni e o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$

5.3 Analgesímetro

Para o teste comportamental de analgesia foi utilizado o equipamento Von Frey eletrônico. O parâmetro limiar de retirada da pata foi mensurado e calculado diretamente pelo equipamento, os valores são expressos em gF (seção 3.4.2). Primeiramente será apresentado o efeito da indução do modelo experimental de OA sobre o limiar de retirada da pata (Figura 17) (hiperalgesia secundária devido aos processos de sensibilização central; conforme descrito na seção 2.1). Todos os

grupos apresentaram diferença significativa para todas as comparações com $p < 0,001$, com exceção da comparação entre P0 e P4 do grupo Controle que apresentou diferença significativa com $p = 0,005$. O grupo LBP não apresentou efeito agudo à indução do modelo em P4 ($p = 0,065$), porém após isto o efeito da indução do modelo foi verificado em P15 ($p < 0,001$). Este resultado indica que o modelo experimental de OA do joelho foi corretamente induzido em todos os grupos.

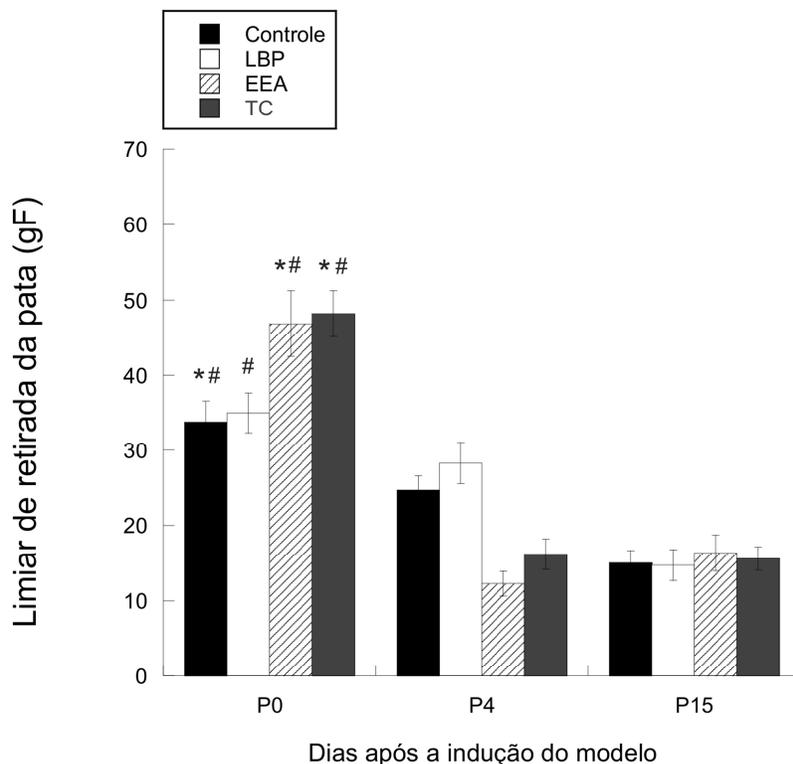


Figura 17. Média e erro padrão ($n=10$) para o parâmetro limiar de retirada da pata antes da indução do modelo (P0) na fase dos efeitos agudos (no quarto dia após a indução da lesão; P4) e crônicos (no 15º dia após a indução da lesão; P15).

(*) indica diferença significativa para todos os grupos entre P0 e P4.

(#) indica diferença significativa para todos os grupos entre P0 e P15.

Foi utilizado o teste *t* de Student para amostras dependentes e o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$

Na Figura 18a é descrito o comportamento do limiar de retirada da pata durante todo o período do experimento (29 dias). Na avaliação prévia à indução do modelo (P0) foi encontrada diferença entre os grupos Controle e EEA ($p=0,031$) e Controle e TC ($p=0,013$) além da diferença entre o grupo LBP e TC ($p=0,028$). Este resultado indica que os animais dos diferentes grupos apresentavam sensibilidades

diferentes antes da indução do modelo experimental de OA do joelho. Fato que se repetiu na avaliação do P4, na qual há diferença entre os grupos Controle e EEA ($p < 0,001$), entre os grupos Controle e TC ($p = 0,028$) e, entre o grupo LBP e os grupos EEA ($p < 0,001$) e TC ($p < 0,001$). No P8 ocorreu diferença significativa apenas entre os grupos Controle e LBP ($p = 0,011$). Finalmente no dia P15 não ocorreram diferenças significativas entre os grupos, formando a linha de base a partir da qual os efeitos da LBP, EEA e TC foram observados.

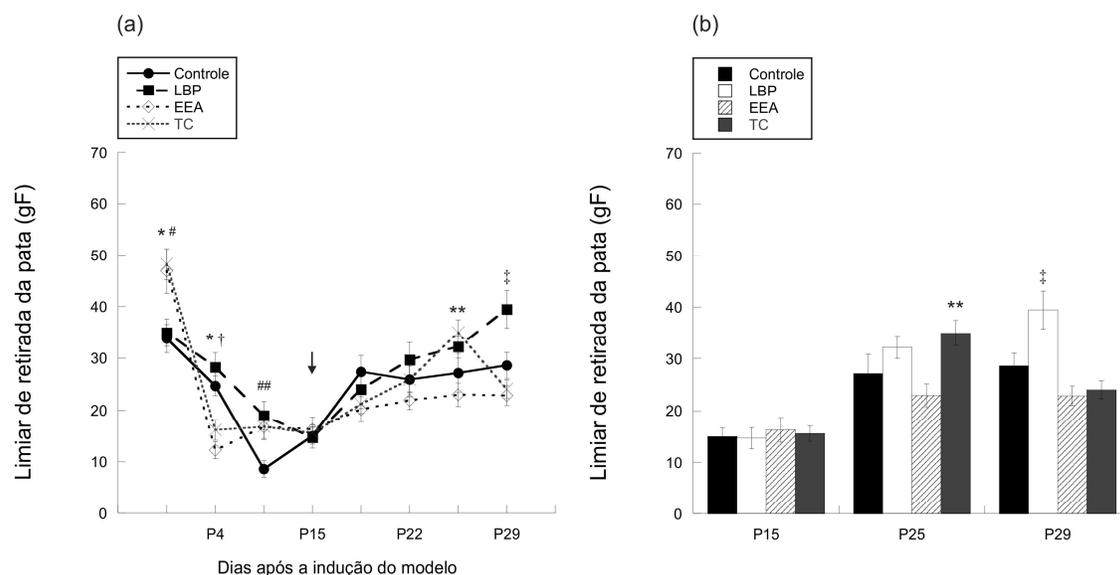


Figura 18. Média e erro padrão ($n=10$) para o parâmetro limiar de retirada da pata em gF. A seta indica quando começou o tratamento/treinamento com LBP, EEA e TC. (a) Os redondos cheios são as avaliações para o grupo Controle, os retângulos cheios para o grupo LBP, os losangos vazados para o grupo EEA e os símbolos X para o grupo TC. (b) Os retângulos pretos cheios são os valores para o grupo Controle, os vazados para o grupo LBP, os hachurados para o grupo EEA e os cinzas cheios para o grupo TC.

(*) indica diferença significativa entre os grupos Controle e EEA e Controle e TC.

(#) indica diferença significativa entre os grupos LBP e TC.

(†) indica diferença significativa entre o grupo LBP e os grupos EEA e TC.

(##) indica diferença significativa entre os grupos Controle e LBP.

(#) indica diferença significativa entre os grupos LBP e TC.

(**) indica diferença significativa entre os grupos EEA e TC.

(‡) indica diferença significativa entre o grupo LBP e os grupos Controle, EEA e TC.

Foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas seguida pelo post-hoc de Bonferroni e o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$

Nos dias P18 e P22 não ocorreram diferenças significativas entre os grupos. Resultado que indica que os tratamentos não apresentaram efeito agudo sobre o

quadro de hiperalgesia secundária. No dia P25 ocorreu diferença significativa entre os grupos EEA e TC ($p=0,012$) (Figura 18b). Este resultado indica, por subtração, que o efeito da TC pode ter sido benéfico principalmente pelo fato da aplicação da LBP, uma vez que o grupo EEA não apresentou melhora dos déficits. Porém ao final do experimento apenas o grupo LBP apresentou melhora nos déficits devido à lesão, de 38% ($p=0,019$), 73% ($p<0,001$) e 64% ($p<0,001$), quando comparado com os grupos Controle, EEA e TC; respectivamente. Estes resultados indicam que a TC e a LBP, mas principalmente a LBP, exercem um efeito positivo na diminuição da hiperalgesia secundária à lesão; ainda, este efeito só foi observado com a aplicação crônica da LBP, *i.e.* no 14^a dia de aplicação, não sendo observado nenhum tipo de efeito agudo nos 4^o e 8^o dias de aplicação (P18 e P22, respectivamente).

6 Discussão

A discussão é dividida em 4 partes: (6.1) indução do modelo de OA do joelho, (6.2) efeito da laserterapia de baixa potência, (6.3) efeito da estimulação elétrica artificial e (6.4) efeito da terapia combinada. Na primeira parte será discutida a eficácia da indução do modelo experimental de OA, na segunda, terceira e quarta partes serão discutidos os efeitos da LBP, EEA e TC, respectivamente.

6.1 Indução modelo de OA do joelho

O presente estudo avaliou o comportamento de ratos *Wistar* submetidos a um modelo experimental de OA do joelho (GUINGAMP *et al.*, 1997). O modelo utilizado para a lesão foi pela injeção intra-articular de Iodoacetato Monosódico (IM) e apresenta boa reprodutibilidade e mimetiza a dor característica da OA em humanos (COMBE *et al.*, 2004). Foram utilizados 3 testes para avaliar o comportamento dos animais frente aos efeitos agudos (*i.e.*, P4) e crônicos à lesão (*i.e.*, a partir de P8). Estudos farmacológicos indicam que o modelo experimental de OA do joelho induzido pela injeção de IM pode ser útil na investigação da dor crônica nociceptiva até o dia P63 (COMBE *et al.*, 2004). Baseado em resultados de testes comportamentais, os resultados do presente estudo indicam que o modelo experimental de OA foi induzido com sucesso e os tratamentos/treinamentos aplicados resultaram em efeitos positivos sobre este modelo de dor crônica. Porém, é importante ressaltar que para a confirmação da presença de OA no joelho dos animais utilizados no presente estudo será necessário que a morfologia desta articulação seja analisada.

Bove *et al.* (2003) descreveram déficits na descarga de peso por até 14 dias após a injeção, em animais submetidos ao mesmo modelo de OA do joelho utilizado no presente estudo; o grau máximo de déficits na distribuição de peso foi com a injeção de 1mg de IM e não foram encontradas diferenças nestes déficits quando a concentração foi maior do que 3mg (segundo cálculo tipo dose-resposta utilizando-se o modelo de Hill) (BOVE *et al.*, 2003). O presente estudo utilizou uma concentração intermediária de 2mg de IM por joelho injetado e, apresentou uma diferença média do déficit na distribuição de peso no dia 15 após a indução do

modelo (P15) de $\approx 81\text{gF}$ (massa dos animais de $\approx 357\text{g}$)⁴. O estudo de Bove *et al.* (2003) utilizou animais com massa entre 175-200g e encontrou déficits na distribuição de peso no P14 na ordem de $\approx 35\text{gF}$ (3mg IM). Estes déficits são similares aos do presente estudo, resguardadas as diferenças de massa dos animais (48% mais pesados no presente estudo quando comparado com o estudo de Bove *et al.*, 2003). Outro estudo de Combe *et al.* (2004) apresentou déficits na descarga de peso de $\approx 100\text{gF}$ nos P14 e P28, valor similar ao encontrado no presente estudo ($\approx 81\text{ gF}$); porém outra linhagem de rato foi utilizada, dificultando a comparação (ratos *Sprague-Dawley*). O estudo de Liu *et al.* (2011) encontrou déficits de descarga de peso no P28 na ordem de 40%⁵ (dose de 4,8mg de IM em 60 μL de solução salina); o presente estudo corrobora com o estudo de Liu *et al.* (2011), pois encontramos valores na ordem de 30-40% entre os P4 e P15 (antes do começo dos tratamentos/treinamentos) (Figura 15a e 15b). O estudo de Sagar *et al.* (2011) encontrou valores de déficits na descarga de peso⁵ de $\approx 60\%$ em P7 e $\approx 70\%$ de P14 a P28, valores acima dos encontrados no presente estudo; porém este estudo utilizou outra linhagem de ratos (ratos *Sprague-Dawley*; 160-190g; 1mg de IM).

O segundo teste que ajuda a dar consistência à indução do modelo utilizado no presente estudo é o do analgesímetro (ou Von Frey eletrônico). Woo *et al.* (2011) ao testar o efeito de um extrato de sementes de uva sobre o modelo experimental de OA de joelho em ratos *Wistar* (4mg de IM) encontraram diferenças na ordem de $\approx 52\%$, quando comparados antes da indução do modelo e em P4, P14 e P16. No estudo de Im *et al.* (2011) após a injeção com 3mg de IM os animais apresentaram uma redução de $\approx 28\%$ no limiar de retirada da pata e esta redução manteve-se até o P35. Ainda, o estudo de Sagar *et al.* (2011) descreve uma diminuição do limiar de retirada da pata para os dias P14-P28 na ordem de $\approx 33\%$. No presente estudo ocorreu uma redução média de $\approx 50\%$ após a injeção com 2mg de IM (P15). Estes resultados, quando comparados com alguns dos estudos supracitados, indicam que a diminuição do limiar de retirada da pata foi maior; e, isto pode ser explicado pelo tipo de equipamento utilizado. Enquanto a maioria dos estudos utiliza-se dos

⁴ Anexo II – Peso dos animais e valores brutos de descarga de peso.

⁵ Valor normalizado pela descarga de peso da pata contralateral, enquanto o presente estudo realizou a normalização pelo somatório da descarga de peso na pata ipsilateral e contralateral.

filamentos de Von Frey (IM *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; SAGAR *et al.*, 2011; COMBE *et al.*, 2004), o nosso estudo utilizou um equipamento eletrônico com sensibilidade diferente da encontrada em filamentos de Von Frey tradicionais (ver seção 3.4.2). Por outro lado, os nossos resultados corroboram com os de Woo *et al.* (2011) que utilizaram um equipamento similar ao utilizado no presente estudo (versão eletrônica dos filamentos de Von Frey; Ugo Basile, Comerio, Italy).

Desta forma, os resultados descritos nas Figuras 14 e 16 em conjunto com as afirmações expostas no texto acima, nos permitem concluir que o modelo experimental de OA proposto no presente estudo foi realizado com sucesso. Os nossos resultados são coerentes e corroboram com o referencial teórico exposto nesta seção. Assim a indução do modelo experimental de OA do joelho com 2mg de IM resultou nos efeitos esperados nos testes comportamentais de descarga de peso e analgesímetro; e permite que os efeitos das terapias sejam observados, como veremos a seguir.

6.2 Laserterapia de baixa potência

Acredita-se que o sucesso da LBP no tratamento da OA se deva a vários mecanismos desencadeados a partir dos efeitos fisiológicos mediados pela fotoestimulação em nível celular (BROUSSEAU *et al.*, 2000; HERMAM *et al.*, 1988; REED *et al.*, 1994; GUR *et al.*, 2003). Assim a LBP tem efeitos no combate à dor com ação sobre as terminações nervosas livres (CHOW *et al.*, 2011) e aos efeitos deletérios da OA sobre o tecido cartilaginoso com ação sobre o processo inflamatório (CASTANO *et al.*, 2007), a redução da biossíntese celular (CHO *et al.*, 2004) e a redução da matriz cartilaginosa (HERMAM *et al.*, 1988; REED *et al.*, 1994). No presente estudo, a diminuição dos déficits do grupo LBP poderia ser resultado tanto da (i) reparação da cartilagem articular (CHO *et al.*, 2004; HERMAM *et al.*, 1988; REED *et al.*, 1994) quanto da (ii) inibição direta das terminações nervosas (CHOW *et al.*, 2011). No primeiro caso, a reparação de cartilagem articular pode levar a um menor impacto sobre a articulação, *i.e.*, menor estresse de compressão e cisalhamento durante os movimentos articulares (NIGG & HERZOG, 2007). A LBP é efetiva no estímulo da síntese cartilaginosa de proteoglicanos e colágeno (estudos animais; HERMAM *et al.*, 1988; REED *et al.*, 1994), além da maior reposição dos condrócitos articulares (CHO *et al.*, 2004). Assim, o tratamento

com LBP tem como consequência uma cartilagem articular mais saudável e funcional: com a diminuição do estresse mecânico durante os movimentos articulares e maior revestimento do osso subcondral. Isto pode resultar na diminuição dos disparos de potencial de ação nas terminações nervosas livres da região articular e diminuição da estimulação repetitiva das fibras tipo C, as quais podem aumentar a resposta sináptica aguda (MENDELL & WALL, 1965) e crônica (LTP; SANDKÜHLER, 2000). No segundo caso, em uma revisão sistemática Chow *et al.* (2011) identificaram uma série de efeitos inibitórios da LBP sobre diversos modelos de lesão nervosa periférica, onde ocorreu a redução da dor aguda pela inibição direta de nociceptores (ação sobre a sensibilização periférica). Na dor crônica, alterações em nível medular, induzidas pela irradiação do laser podem resultar em uma LTD da dor (CHOW *et al.*, 2011) (ação sobre a sensibilização central). Ainda, os autores concluem que com a LBP há prejuízo da condução neural, principalmente nas fibras A δ e C, *i.e.*, rompimento do citoesqueleto, diminuição da oferta de ATP, e déficit na condução nervosa dos nociceptores; estes fatores podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios da LBP na função nociceptiva (*ibid.*, 2011). No presente estudo, a LBP resultou em efeitos sobre a sensibilização periférica (redução aguda e crônica da hiperalgesia primária) e sensibilização central (redução crônica da hiperalgesia secundária), resultados que corroboram o referencial teórico descrito acima.

No presente estudo, uma vez que o efeito agudo e crônico da LBP foi constatado pelo teste comportamental de descarga de peso e analgesia, respectivamente, é possível que a LBP tenha atuado, tanto na inibição direta das terminações nervosas livres (efeito agudo), quanto na indução da LTD no sistema nervoso central pela própria inibição do disparo de potenciais de ação pelas aferências nociceptivas à medula espinal (fibras C e A δ ; efeito crônico) (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Além da inibição direta do disparo de potenciais de ação é importante citar os efeitos da LBP na redução dos níveis de TNF- α (AIMBIRE *et al.*, 2006) e PGE2 (CASTANO *et al.*, 2007) agentes envolvidos no processo de sensibilização periférica (Figura 5). Assim, há um menor número de potenciais de ação conduzidos para os neurônios de segunda ordem na medula espinal. Como resultado, os neurônios NS, interneurônios e os neurônios WDR ficam menos excitáveis com o efeito crônico da LBP (D'MELLO & DICKENSON, 2008; para um

melhor entendimento ver a Figura 4). Desta forma, há uma diminuição dos disparos de potenciais de ação para as aferências do tálamo e, subsequentemente para o córtex cerebral (D'MELLO & DICKENSON, 2008). Essas afirmações são sustentadas pelos resultados do teste comportamental de analgesia, onde a hiperalgesia secundária diminuiu apenas na fase crônica do tratamento com LBP (P29) (Figura 17). Desta forma o tratamento com LBP por 14 dias resultou na inibição crônica dos disparos de potenciais de ação pelas terminações nervosas livres e levou a um aumento do limiar de excitabilidade dos neurônios de segunda ordem na medula espinal segundo a Regra de Hebb⁶ (via LTD; SANDKÜHLER, 2000).

Além do aumento do limiar de excitabilidade dos neurônios de segunda ordem na medula espinal, que levam as aferências ao tálamo, as vias de inibição muscular em nível medular podem ter sido afetadas de forma aguda e crônica. Os neurônios de segunda ordem que recebem aferências da articulação projetam-se, entre outros, para níveis intra-espinais (*i.e.*, interneurônios e motoneurônios; SCHAIBLE & GRUBB, 1993). Há evidência de que o padrão de resposta reflexa dos motoneurônios encontra-se alterado durante a inflamação característica da OA, desta forma reflexos inibitórios são gerados (HE *et al.*, 1988). Como resultado a articulação do joelho é mantida em uma posição neutra em que os estímulos nociceptivos são minimizados (FELSON & SCHAIBLE, 2009); caracterizando um quadro de inibição muscular que no presente estudo pode ter sido revertido pela aplicação da LBP. Essa afirmação é sustentada pelos resultados do teste comportamental da descarga de peso. Conforme os resultados expostos na seção 5.2, pode-se afirmar que os déficits de descarga de peso diminuíram a partir da 1ª semana de tratamento (P18) e mantiveram-se diminuídos até o final do tratamento (P29). Desta forma, com a diminuição da inibição muscular devido à LBP os animais conseguiram suportar mais peso corporal com o membro afetado, isto indica uma melhora significativa da capacidade de produção de força destes animais. Este resultado indica que o uso da LBP na OA de joelho pode ser um tratamento clínico efetivo para aumentar a capacidade de produção de força muscular e diminuir a

⁶ Donald Olding Hebb (1904-1985) foi um neurocientista Canadense. A Regra de Hebb descreve um mecanismo básico da plasticidade sináptica no qual um aumento na eficiência sináptica surge da estimulação repetida e persistente das células pós-sinápticas.

fraqueza muscular, culminando com aumento da amplitude de movimento, maior mobilidade, menor sedentarismo, menor dependência e menor incapacitação dos pacientes.

Apesar dos resultados favoráveis encontrados nos testes de descarga de peso e de analgesia, o grupo LBP não apresentou um bom desempenho no teste do campo aberto, que avaliou a saúde geral dos animais. Os resultados do campo aberto indicam que o grupo LBP apresentou pior desempenho em todos os parâmetros avaliados (Figuras 13 e 14). Isto indica que ao realizar movimento os animais sentiram dor ou desconforto, evitando assim o mesmo. É possível que apesar da resolução do quadro algico os animais ainda apresentem déficits funcionais, com comprometimento da biomecânica normal da articulação do joelho, e/ou déficits neuromusculares, os quais diminuem a eficiência do sistema de movimento. Portanto, apesar dos efeitos benéficos da LBP no tratamento sintomático da OA de joelho, talvez seja necessária uma complementação deste com outras terapias ou exercícios físicos para uma melhor resposta do sistema de movimento à lesão, como veremos a seguir. Ainda, é importante ressaltar que o alívio dos sintomas pode ser um sinal de tratamento real da lesão com efeitos sobre a integridade da cartilagem articular, porém esta afirmação só será possível após as análises morfológicas da articulação do joelho.

6.3 Estimulação elétrica artificial

A EEA é utilizada para aumentar a capacidade de produção de força em indivíduos saudáveis (SOO *et al.*, 1988; LIEBER & KELLY, 1991) e em indivíduos portadores de enfermidades diversas (QUITAN *et al.*, 2001; ZANOTTI *et al.*, 2002), que apresentam redução do uso da musculatura. Selkowitz (1989), através de uma revisão de evidências experimentais, concluiu que existem trabalhos convincentes sobre o aumento de força muscular através da EEA. Além do aumento da força muscular, há efeitos sobre o fluxo sanguíneo, a diminuição da atrofia, a cicatrização do tecido e a diminuição da dor (DOUCET *et al.*, 2012). No presente estudo a EEA resultou em efeitos positivos nos testes comportamentais, proporcionou uma diminuição dos déficits de descarga de peso (Figura 16) e um melhor desempenho no teste do campo aberto (Figuras 13 e 14). O grupo EEA teve uma diminuição dos déficits de descarga de peso nos P25 e P29, ou seja, um efeito que demorou 10 dias

para ocorrer e se manteve até o 14º dia de treinamento. Este resultado pode ter ocorrido devido ao efeito da EEA na diminuição da inibição muscular (FITZGERALD *et al.*, 2004; HEIDLAND *et al.*, 2013), na diminuição da dor (DOUCET *et al.*, 2012; DEER *et al.*, 2012; WODLINGER *et al.*, 2005) e no aumento da produção de força (SOO *et al.*, 1988; LIEBER & KELLY, 1991; QUITTAN *et al.*, 2001; ZANOTTI *et al.*, 2002).

Assim como o sistema músculo-esquelético, o tecido nervoso é afetado pelo treinamento, sendo este responsivo aos estímulos gerados sobre o mesmo (WILMORE & COSTILL, 2004). No presente estudo a diminuição dos déficits comportamentais foi devido tanto (i) ao fortalecimento da musculatura, com possíveis ganhos neuromusculares e de hipertrofia muscular, quanto (ii) pela diminuição da dor e da inibição muscular.

No primeiro caso, em humanos ao analisar a contribuição dos fatores neurais e hipertróficos para o ganho de força máxima ao longo do período relativo ao treinamento de força, é bem descrito que há principalmente ganhos neuromusculares na fase inicial do treinamento (de 4 a 8 semanas) e ganhos de hipertrofia na fase crônica (WILMORE & COSTILL, 2004). Na fase inicial do treinamento o aumento da produção de força muscular é associado ao aumento da atividade eletromiográfica muscular; assim há maior recrutamento das unidades motoras resultando em maior produção de força (fatores neurais). Na fase crônica, o aumento de força é principalmente devido à hipertrofia muscular (aumento da área de seção transversa fisiológica), uma vez que não há relação entre o ganho de força e a atividade eletromiográfica (fatores hipertróficos) (*ibid.*, 2004). Em modelos animais de hipotrofia muscular por denervação, foi comprovado o efeito da EEA crônica onde um aumento de 39-66% na área de seção transversa muscular e 27-50% na força isométrica máxima foram constatados (coelhos; EEA 1 h/dia, ondas de 20 ms, 4 mA, 20Hz; ASHLEY *et al.*, 2007); ainda, após 2 semanas de aplicação da EEA o peso dos músculos denervados do grupo que treinou com EEA era 60% maior do que o grupo controle (*ibid.*, 2007). Desta forma, no presente estudo as duas semanas de treinamento com EEA (de P15 a P29) podem ter sido suficientes para que tenha ocorrido um aumento de volume muscular com hipertrofia significativa. Então, parece razoável afirmar que no P29 os animais do presente estudo haviam sofrido as adaptações neuromusculares características do efeito

agudo do treinamento (WILMORE & COSTILL, 2004) e de hipertrofia em fases crônicas (ASHLEY *et al.*, 2007; al-Amood *et al.* 1991). Finalmente, os ganhos significativos com a diminuição dos déficits da descarga de peso só foram verificados após 10 e 14 dias de aplicação da EEA e este resultado corrobora com os achados de Ashley *et al.* (2007) para aumento da produção de força devido à hipertrofia muscular.

No segundo caso, pode ter ocorrido a inibição segmentar de sinais nociceptivos ao cérebro no corno dorsal da medula espinal e a ativação da via descendente inibitória com maior liberação de neurotransmissores (HEIDLAND *et al.*, 2013; WODLINGER *et al.*, 2005). Ainda, no presente estudo a posição dos eletrodos (*i.e.*, um dos eletrodos foi posicionado no dorso do animal junto à região da medula espinal) pode ter induzido a diminuição da dor por meio da estimulação elétrica dos GRDs da medula espinal (DEER *et al.* 2012). Ainda, na presença da inibição muscular característica da OA, a EEA parece ser a principal ferramenta para “acordar” o músculo quando o mesmo não consegue responder ao comando voluntário (FITZGERALD *et al.*, 2004). No presente estudo, a diminuição da inibição muscular resultante do treinamento físico com EEA pode ter levado a um aumento da função contrátil do músculo; do ponto de vista do funcional, leva a uma melhor economia de movimento, que é a razão entre o trabalho realizado e o custo energético (WINTER, 2005; HEGLUND & CAVAGNA, 1985). Os resultados do presente estudo apontam para uma melhora do desempenho dos animais no teste comportamental do campo aberto, o qual avaliou a saúde geral do sistema de movimento; com o retorno dos parâmetros número de cruzamentos nos 4 minutos finais e totais aos valores basais (antes da indução da lesão) (Figura 13b e 13c); assim como do número de *rearings*, neste caso com valores inclusive maiores do que os encontrados na linha de base, o que indica uma melhora muito importante nestes movimentos nos 4 minutos finais e totais do teste (Figura 14b e 14c). Assim, a economia de movimento aumentou e ocorreu uma maior capacidade de realização de trabalho para um mesmo tempo de teste (*ibid.*, 1985). Elboim-Gabyzon *et al.* (2012) afirmam que a EEA neuromuscular quando associada a um programa de exercício físico aumentou a eficácia do programa de treinamento pelo alívio da dor e pelo aumento da ativação voluntária, mas não foi encontrado efeito sobre o aumento de produção de força muscular ou da performance funcional. Desta forma, no

presente estudo, a diminuição dos déficits de descarga de peso pode ser explicada tanto pelo aumento da produção de força, quanto pela diminuição da inibição muscular com aumento da economia de movimento ao longo do período de treinamento com EEA.

6.4 Terapia combinada

A utilização da TC para o tratamento da OA visa a melhora do quadro inflamatório e algico (por meio da LBP) e fortalecimento da musculatura (por meio da EEA). As TCs são usualmente utilizadas para o tratamento da OA de joelho via fármacos associados a outras terapias (ZHANG *et al.*, 2012; MAVROMMATIS *et al.*, 2012). Em um estudo recente Bertolini *et al.* (2011b) avaliaram o efeito agudo da LBP e exercício físico (exercício de natação forçada), como resultado esta TC, quando comparada com a LBP, apresentou menor redução do quadro doloroso. A EEA é uma modalidade de exercício físico com pouca sobrecarga articular, quando comparada com a caminhada ou corrida (WINTER, 2005), e desta forma pode oferecer os benefícios do exercício físico sem sobrecarregar a articulação acometida pela lesão. No presente estudo, apesar de diminuir os déficits de descarga de peso, a TC não foi muito efetiva para melhorar a quadro de hiperalgesia secundária, como veremos ao final deste parágrafo (teste de analgesia). Nossos dados corroboram com os de Bertolini *et al.* (2011b) que avaliaram o efeito agudo da aplicação de LBP e exercício físico; desta forma, baseado nos resultados do presente estudo, parece que a LBP isolada foi também o único tratamento capaz de diminuir os efeitos crônicos de modulação da dor devido à OA de joelho. Com o acréscimo da EEA ocorreu uma diminuição do limiar de retirada da pata para o grupo TC. Isto pode ter sido devido ao aumento do nível de estresse dos animais pela aplicação de dois procedimentos manipulativos por dia. Era esperado que o grupo TC apresentasse os melhores resultados em todos os testes pelo efeito positivo da LBP associado a um protocolo de fortalecimento muscular com baixo impacto articular. Para o teste de analgesia os resultados foram favoráveis para a TC quando comparada com a EEA no P25, isto indica, por subtração, que quando a LBP foi acrescentada à EEA ocorreu uma diminuição significativa da hiperalgesia secundária em P25; porém não houve diferença com o grupo Controle (Figura 18). No dia P29 o grupo TC não apresentou bom desempenho quando comparado com o grupo Controle (Figura

18a). Este resultado contraditório pode ser explicado pelo nível de estresse dos animais citado anteriormente, desta forma pode-se afirmar que a TC resultou em um efeito moderado sobre o parâmetro limiar de retirada da pata.

Apesar dos resultados contraditórios para a diminuição da hiperalgesia secundária, a TC foi tão efetiva quanto a LBP e a EEA para melhorar os déficits crônicos de hiperalgesia primária (não há diferença entre os grupos LBP, EEA e TC no dia P29; Figura 16). A TC então exerce efeito de fortalecimento da musculatura e diminuição da dor, o resultado é uma melhor capacidade de o animal suportar o peso corporal pela pata afetada; se extrapolarmos estes resultados para estudos clínicos pode significar uma melhor funcionalidade do sistema de movimento, melhor qualidade da marcha e maior independência funcional. Porém, os resultados experimentais do presente estudo indicam que em casos de OA crônica a prescrição de exercício físico associado à LBP deve ser cautelosa. Aparentemente, tanto o exercício de natação forçada (BERTOLINI *et al*, 2011b), quanto a EEA (presente estudo), duas modalidades de exercício físico com baixo nível de impacto articular, podem resultar no aumento do quadro algico dos animais. A contração da musculatura da região afetada estimula as terminações nervosas livres articulares e, o disparo destas aferências induz alterações do tipo LTP (SANDKÜHLER, 2000), com a diminuição do limiar de excitabilidade dos neurônios de segunda ordem da medula espinal (FELSON & SCHAIBLE, 2009). Desta forma, conforme os resultados do presente estudo, o quadro de hiperalgesia secundária permanece relativamente não resolvido.

No teste do campo aberto o grupo TC apresentou recuperação do número de cruzamentos no primeiro minuto (Figura 13a), isto indica que no momento PÓS os animais exploraram o ambiente durante o primeiro minuto com a mesma intensidade do momento PRÉ (ver legenda da Figura 13 para as siglas). Esta maior movimentação indica que no começo do teste os animais não sentiram tanta incapacidade ao se movimentar, uma vez que o instinto dos animais é de exploração do ambiente, principalmente durante o 1º minuto de exposição. Este resultado indica que, em um primeiro momento os animais não sentiram dor ao se movimentar. Mas com o passar dos minutos de teste a estimulação das aferências nociceptivas devido ao movimento, resultou em diminuição da atividade exploratória nos quatro minutos finais e totais do teste (Figuras 13b e 13c). Este resultado vai ao encontro dos

resultados de resolução da hiperalgesia primária sem resolução completa da hiperalgesia secundária. É provável que os animais sentissem dor em repouso após o primeiro minuto de teste, diminuindo assim a atividade exploratória no tempo restante do teste. Em relação ao número de *rearings*, o grupo TC apresentou um desempenho igual ao antes da indução da lesão para todos os parâmetros, este resultado indica que a funcionalidade dos membros posteriores foi reestabelecida com a TC, onde há melhor desempenho do membro afetado na tarefa específica de sustentação do peso corporal. Os resultados descritos neste parágrafo indicam que a principal vantagem da TC em relação à LBP isolada foi este melhor desempenho em 4 dos 6 parâmetros analisados no teste do campo aberto (o grupo LBP não apresentou um bom desempenho em nenhum parâmetro). Assim, a TC foi efetiva para melhorar a saúde geral dos animais e não apenas na diminuição dos quadros algícos primários e secundários.

7 Conclusões

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da TC sobre o comportamento de ratos submetidos ao modelo experimental de osteoartrite de joelho por injeção intra-articular de IM. O resumo dos principais resultados e conclusões do presente estudo foram:

- i. O modelo experimental de OA de joelho proposto foi induzido com sucesso e resultou em déficits agudos e crônicos ao longo de 30 dias de experimento;
- ii. O tratamento com LBP resultou em diminuição dos déficits devido à hiperalgesia primária e secundária à lesão, porém não teve impacto sobre a funcionalidade geral do sistema de movimento dos animais. Desta forma, a LBP resultou no tratamento sintomático da OA de joelho;
- iii. O treinamento com EEA resultou em diminuição dos déficits de hiperalgesia primária e teve impacto sobre a funcionalidade geral do sistema de movimento. Desta forma, a EEA foi capaz de melhorar a condição geral do aparelho locomotor do animal;
- iv. A TC resultou em diminuição dos déficits de hiperalgesia primária e efeito moderado sobre a hiperalgesia secundária, além de impacto positivo sobre a funcionalidade geral do sistema de movimento. Desta forma a TC apresentou efeito sobre o tratamento sintomático e funcional da lesão.

Estes achados sugerem que com a análise do comportamento de ratos submetidos ao modelo experimental de osteoartrite de joelho foi possível verificar o efeito de 3 tipos diferentes de intervenções. A mensuração dos déficits de descarga de peso ofereceu um marcador importante sobre o nível de incapacidade, funcionalidade e de sensibilização da articulação acometida pela lesão. Como complemento, o teste de analgesia ofereceu a base para avaliar o nível de sensibilização central e permitiu analisar como a dor crônica e as intervenções alteraram os limiares de excitabilidade de neurônios de segunda ordem na medula espinal. Desta forma, a LBP tem efeito sintomático sobre a lesão, com a diminuição da sensibilização periférica e central; a EEA tem efeito funcional sobre a lesão, com o retorno da atividade exploratória e locomotora aos valores de base; e a TC

apresentou um efeito combinado com o tratamento sintomático oferecido pela LBP e com o efeito sobre a funcionalidade do aparelho locomotor dos animais pela EEA.

Baseado nestes resultados, a TC apresentou efeitos tanto sobre o controle da dor, quanto para a menor incapacitação e melhor funcionalidade, sendo indicada para combater os efeitos deletérios da OA de joelho sobre o sistema de movimento.

8 Referências bibliográficas

Aimbire, F., Albertini R., *et al.* Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF- α levels in acute inflammation. Photomed Laser Surg, v.24, p.33-37. 2006.

al-Amood W.S., Lewis D.M., Schmalbruch H. Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term denervated rat skeletal muscle. J Physiol 441:243–256. 1991.

Al-Watban, F. A. H. e X. Y. Zhang. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. Laser Ther, v.11, n.1, p. 6-11. 1999.

Al-Watban, F. A. H., X. Y. Zhang, *et al.* Low-level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. Photomed Laser Surg, v.25, n.2, p.72-77. 2007.

Albertini, R., F. Aimbire, *et al.* COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. Inflamm Res, v.56, p.228-229. 2007.

Ameye L.G. Young M.F. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the "Holy Grail". Current opinion in rheumatology. 18(5):537-47. 2006.

Ashley, Z., S. Salmons, *et al.* Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. J Muscle Res Cell Motil, v.28, p.203–217. 2007.

Bajaj, P., T. Graven-Nielsen, *et al.* Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental controlled study. Pain, v. 93, p.107–114. 2001.

Barrett, D. S., A. G. Cobb, *et al.* Joint proprioception in normal, osteoarthritic and replaced knees. J Bone Joint Surg Br, v.73, p.53–56. 1991.

Basford, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. Lasers Surg Med, v.16, n.4, p.331-342. 1995.

Bassleer, C., M. Datchy, *et al.* Human articular chondrocytes cultivated in three dimensions: Effects of IR laser irradiation. Proceedings of the International Congress on Lasers in Medicine and Surgery. Bologna. 381–385 p. 1985.

Bendele, A. M. Animal models of osteoarthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact, v.1, p.363-376. 2001.

Bertolini, G. R. F., E. L. Artifon, *et al.* Low-level laser therapy, at 830 nm for pain reduction in experimental model of rats with sciatica. Arq Neuropsiquiatr, v.69, p.356-359. 2011a.

Bertolini, G. R. F., C. M. P. Matos, *et al.* Avaliação Funcional da Nocicepção do Joelho de Ratos Tratada com Laser de Baixa Potência e Natação. Rev Bras Med Esporte, v.17, n.1, p.45-48. 2011b.

Beyreuther, B., N. Callizot, *et al.* Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. Arthritis Res Ther, v.9, p.R14. 2007.

Bibikova, A. e U. Oron. Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. Lasers Surg Med, v.14, n.4, p.355-361. 1994.

Biolo, G., M. Heer, *et al.* Microgravity as a model of ageing. Curr Opin Clin Nutr Metab Care v.6, n.1, p.31-40. 2003.

Bjordal, J. M., C. Couppé, *et al.* A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. Aust J Physiother v.42, n.2, p.107-116. 2003.

Bjordal, J. M., M. I. Johnson, *et al.* Short-term efficacy of physical interventions in osteoarthritic knee pain. A systematic review and meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. BMC Musculoskelet Disord v.8, p.51. 2007.

Bjordal, J. M., A. Klovning, *et al.* Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. Photomed Laser Surg, v.24, n.2, p.158-168. 2006.

Boettger, M. K., S. Hensellek, *et al.* Antinociceptive effects of TNF- α neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence for a neuronal target. Arthritis Rheum v.58, p.2368-2378. 2008.

Bortone, F., H. A. Santos, *et al.* Low level laser therapy modulates kinin receptors mRNA expression in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation. Int Immunopharmacol, v.8, p.206-210. 2008.

Bove, S. E., S. L. Calcaterra, *et al.* Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. OsteoArthritis and Cartilage 11, 821-830. 2003

Brenn, D., F. Richter, *et al.* Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve for mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat. An inflammatory mechanism of joint pain. Arthritis Rheum, v.56, p.351-359. 2007.

Brosseau, L., V. Robinson, *et al.* Low level laser therapy (Classes I, II and III) for treating rheumatoid arthritis. Cochrane Database Syst Rev., v.19, n.4. 2005.

Brosseau, L., V. Welch, *et al.* Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: A metaanalysis. J Rheumatol, v.27, p.1961-1969. 2000.

Brown, R. E., Corey, S. C., Moore, A. K. Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice. Behavior Genetics, 26, 263-271. 1999.

Campana, V. R., M. Moya, *et al.* Laser therapy on arthritis induced by urate crystals. Photomed Laser Surg, v.22, p.499-503. 2004.

Castano, A. P., T. Dai, *et al.* Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: importance of illumination time. Lasers Surg Med, v.39, p.543-550. 2007.

Chavantes, M. C. e A. D. Jatene. Aplicação do laser na área cardiovascular. Arg Bras Cardiol, v.54, p. 63-68. 1990.

Chen J. Joshi S.K. *et al.* Selective blockade of TRPA1 channel attenuates pathological pain without altering noxious cold sensation or body temperature regulation. Pain. 152: 1165-1172. 2011.

Cho, H. J., S. C. Lim, *et al.* The influence of laser irradiation of low-power density on an experimental cartilage damage in rabbit knee-joints: An in vivo investigation considering macroscopic, histological and immunohistochemical changes. In Vivo, v.18, n.5, p.585-592. 2004

Chow, R., M. I. Johnson, *et al.* 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; 374: 1897–908, 2009.

Chow, R., P. Armati, *et al.* Inhibitory Effects of Laser Irradiation on Peripheral Mammalian Nerves and Relevance to Analgesic Effects: A Systematic Review. Photomedicine and Laser Surgery, v.29, n.6, p.365–381. 2011.

Combe *et al.* The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? Neuroscience Letters 370, 236–240. 2004.

Cooper, C. Epidemiology. Mosby, London. 1998

D'Melo R. A. H.Dickenson. Spinal cord mechanisms of pain. British Journal of Anaesthesia 101 (1): 8–16. 2008.

Deer T.R., Grigsby E., *et al.* A Prospective Study of Dorsal Root Ganglion Stimulation for the Relief of Chronic Pain. Neuromodulation. Dec 14. doi: 10.1111/ner.12013. [Epub ahead of print], 2012.

Doucet B., A. Lam, *et al.* Neuromuscular Electrical Stimulation for Skeletal Muscle Function. Yale Journal Of Biology And Medicine. 85, pp.201-215, 2012.

Elboim-Gabyzon M., Rozen N., Laufer Y. Does neuromuscular electrical stimulation enhance the effectiveness of an exercise programme in subjects with knee osteoarthritis? A randomized controlled trial. Clin Rehabil. [Epub ahead of print], 2012.

- England, S., S. J. Bevan, *et al.* Prostaglandin E2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP—protein kinase A cascade. J Physiol v.495, p.429–440. 1996.
- Enwemeka, C. e K. Reddy. The biological effects of laser therapy and other physical modalities on consecutive tissue repair process. Laser Ther, v.12, p.22-30. 2000.
- Felson, D. T. The sources of pain in knee osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol v.17, p.624–628. 2005.
- Felson, D.T., Schaible, H. G. Pain in osteoarthritis. New Jersey. Wiley-Blackwell. 2009.
- Fernihough, J., C. Gentry, *et al.* Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. Pain, v.112, p.83-93. 2004.
- Ferreira, D. M., R. A. Zângaro, *et al.* Analgesic effect of He-Ne (632.8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. Photomed Laser Surg, v.23, n.2, p.177-181. 2005.
- Ferrell, W. R., L. Wood, *et al.* The effect of acute joint inflammation on flexion reflex excitability in the decerebrate, low spinal cat. J Exp Physiol, v.373, p.353–365. 1998.
- Fields, H. L., C. H. Clanton, *et al.* Somatosensory properties of spinoreticular neurons in the cat. Brain Res Rev, v.120, p.49–66. 1977.
- Fitzgerald, G. K., S. R. Piva, *et al.* Quadriceps activation failure as a moderator of the relationship between quadriceps strength and physical function in Individuals with knee osteoarthritis. Arthr & Rheum, v.51, n.1, p.40-48. 2004.
- Fujita *et al.* The Combined Effect of Electrical Stimulation and High-Load Isometric Contraction on Protein Degradation Pathways in Muscle Atrophy Induced by Hindlimb Unloading. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.
- Guilbaud, G., A. Iggo, *et al.* Sensory receptors in ankle joint capsules of normal and arthritic rats. Exp. Brain Res., v.58, p.29–40. 1985.
- Guingamp, C., P. Gegout-Pottie, *et al.* Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. Arthritis Rheum, v.40, p.1670–1679. 1997.
- Gur, A., A. Cosut, *et al.* Efficacy of different therapy regimes of low-power laser in painful osteoarthritis of the knee: a double-blind and randomized-controlled trial. Lasers Surg Med, v.33, n.5, p.330-338. 2003.
- Hall C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. J Comp Psychol. 18:385–403, 1934.

- He, X., U. Proske, *et al.* Acute inflammation of the knee joint in the cat alters responses of flexor motoneurons to leg movements. J Neurophysiol, v.59, p.326–340. 1988.
- Hegedus, B., V. L., *et al.* 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.
- Heglund N.C., G.A. Cavagna. Efficiency of vertebrate locomotory muscles. J Exp Biol. p. 115:283-92, 1985.
- Heidland A., Fazeli G., *et al.* Neuromuscular electrostimulation techniques: historical aspects and current possibilities in treatment of pain and muscle wasting. Clin Nephrol. Sup;79(13):12-23, 2013.
- Herman, J. H. e R. C. Khosla. In vitro effects of Nd: YAG laser radiation on cartilage metabolism. J Rheumatol v.15, p.1818–1826. 1988.
- Hui W, Rowan AD, Richards CD, Cawston TE. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metalloproteinase expression in vitro and in vivo. Arthritis Rheum 48:3404–3418. 2003.
- Hunter, D. J. e F. Eckstein. Exercise and osteoarthritis. J. Anat, v.214, p.197-207. 2009.
- Hurley, M. V. e D. L. Scott. Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. Br J Rheumatol., v.37, p.1181-1187. 1998.
- Im H. K. Jaesung. Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. Arthritis Rheum. 62(10): 2995–3005, 2010.
- Inglis, J. J., C. A. Notley, *et al.* Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia. Functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade. Arthritis Rheum v.56, p.4015–4023. 2007.
- Jessep, S. A., N. E. Walsh, *et al.* Long-term clinical benefits and costs of an integrated rehabilitation programme compared with outpatient physiotherapy for chronic knee pain. Osteoarthr Cartil. [ahead of print], 2009.
- Johnson K, Terkeltaub R. Upregulated ank expression in osteoarthritis can promote both chondrocyte MMP-13 expression and calcification via chondrocyte extracellular PPI excess. Osteoarthritis Cartilage 12:321–335. 2004.
- Karamanidis, K. e A. Arampatzis. Mechanical and morphological properties of different muscle-tendon units in the lower extremity and running mechanics: Effect of aging and physical activity. J Exp Biol, v.208, n.20, p.3907-3923. 2005.

_____. Mechanical and morphological properties of human quadriceps femoris and triceps surae muscle-tendon unit in relation to aging and running. J Biomech, v.39, n.3, p.406-417. 2006.

Kellgren, J. H. Some painful joint condition and their relation to osteoarthritis. Clin Sci, v.4, p.193–205. 1939.

Kellgren, J. H. e E. P. Samuel. The sensitivity and innervation of the articular capsule. J Bone Joint Surg, v.32, p.84–91. 1950.

Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. Osteoarthritis Cartilage 6:177–186. 1998.

Kobayashi, K., R. Imaizumi, *et al.* Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. J Vet Med Sci, v.65, p.1195-1199. 2003.

Koltyn, K. F. Analgesia following exercise. Sports Med, v.29, p.85-98. 2000.

Koltyn, K. F. e M. Umeda. Exercise, hypoalgesia and blood pressure. Sports Med, v.36, p.207-214. 2006.

Kosek, E. e G. Ordeberg. Lack of pressure pain modulation by heterotopic noxious conditioning stimulation in patients with painful osteoarthritis before, but not following, surgical pain relief. Pain, v.88, p.69–78. 2000.

Lewis, T. Suggestions relating to the study of somatic pain. Br Med J, v.1, p.321–325. 1938.

Lieber, R. L. e M. J. Kelly. Factors influencing quadriceps femoris muscle torque using transcutaneous neuromuscular electrical stimulation. Phys. Ther, v.71, p.715-723. 1991.

Lin, Y. S., M. H. Huang, *et al.* Effects of helium-neon laser on levels of stress protein and arthritic histopathology in experimental osteoarthritis. Am J Phys Med Rehabil, v.83, p.758 –765. 2004.

Lin, Y. S., M. Scy, *et al.* Effects of helium e neon laser on the mucopolysaccharide induction in experimental osteoarthritic cartilage. OsteoArthritis and Cartilage, v.14, p.377-383. 2006.

Liu P., A. Okun. Ongoing pain in the MIA model of osteoarthritis. Neuroscience Letters. 493: 72–75, 2011.

Lopes-Martins, R. A., R. Albertini, *et al.* Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. Photomed Laser Surg, v.23, n.4, p.377-381. 2005.

March, L. M. e C. J. M. Bachmeier. Economics of osteoarthritis: a global perspective. Baillieres Clin Rheumatol, v.11, p.817–834. 1997.

Mavrommatis C.I., Argyra E., *et al.* Acupuncture as an adjunctive therapy to pharmacological treatment in patients with chronic pain due to osteoarthritis of the knee: a 3-armed, randomized, placebo-controlled trial. Pain. 153(8):1720-6. Epub 2012.

Mccarthy, T., S. Richieri, *et al.* Transcranial laser therapy alters amyloid precursor protein processing and improves mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. Mechanisms for Low-Light Therapy. VI. San Francisco, California, 2011.

McGarughty S. Chu K.L. Perner R.J. DiDomenico S. Kort M.E. Kym P.R. TRPA1 Modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. Molecular Pain. 6:14, 1-14. 2010.

McMahon SB, W. B. Cafferty, F. Marchand: Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. Exp Neurol, 192:444-462. 2005.

Medrado A.P. Pugliese L.S. *et al.* Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. Lasers Surg Med. 32:239-244. 2003.

Mendell, L. M. e P. D. Wall. Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibers. Nature, v.206, p.97–99. 1965.

Mense, S. Pathophysiologic basis of muscle pain syndromes. Myofasc Pain Update in Diagnosis and Treatment, v.8, p.23–53. 1997.

Mester, E. A Laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban (The use of the laser beam in therapy). Orv Hetil, v.107, n.22, p.1012-1016. 1966.

Meyers, D. E. R. e P. J. Snow. The responses to somatic stimuli of deep spinothalamic tract cells in the lumbar spinal cord of the cat. J Physiol, v.329, p.355–371. 1982.

Misawa A., Shimada Y., Matsunaga T., Sato K. The effects of therapeutic electric stimulation on acute muscle atrophy in rats after spinal cord injury. Arch Phys Med Rehabil 82:1596–1603, 2001.

Munoz-Guerra, M. F., Delgado-Baeza, E. Sanchez-Hernandez J.J. Garcia-Ruiz J.P. Chondrocyte cloning in aging and osteoarthritis of the hip cartilage: morphometric analysis in transgenic mice expressing bovine growth hormone. Acta Orthop Scand 75:210–216. 2004.

Narici, M. V., C. N. Maganaris, *et al.* Effect of aging on human muscle architecture. J. Appl. Physiol, v. 95, p.2229-2234. 2003.

Neugebauer, V., T. Lücke, *et al.* N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurones during development of acute arthritis in rat's knee joint. J Neurophysiol, v.70, p.1365–1377. 1993.

Nigg B. W. Herzog. Biomechanics of the Musculo-skeletal System. 3^a Ed., Wiley, 2007.

Oliveira, F. S., C. E. Pinfieldi, *et al.* Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon. Lasers Surg Med, v.41, n.4, p.271-276. 2009.

Ossipov, M. H., G. O. Dussor, F. Porreca. Central modulation of pain. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 20: 11. 2010.

Pessoa, E. S., R. M. Melhado, *et al.* 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.

Pfander, D., B. Jörgensen, *et al.* Effect of low-level laser therapy on osteoarthropathy in rabbit. Biomedizinische Technik v.51, n.3, p.131-138. 2006.

Poole, R., Blake, S., *et al.* Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage, v.18, pS10-S16. 2010.

Prut L., Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. European Journal of Pharmacology. 463: 3–33, 2003.

Quittan, M., G. F. Wiesinger, *et al.* Improvement of thigh muscles by by neuromuscular stimulation in patients with refractory heart failure: a single-blind, randomized, controlled trial. Am J Phys Med Rehabil, v.80, p.206-214. 2001.

Radin, E. L., D. B. Burr, *et al.* Mechanical factors influencing cartilage damage. Paris, France. 90–99 p. Osteoarthritis: current clinical and fundamental problems, 1985.

Reed, S. C., R. W. Jackson, *et al.* An in vivo study of the effect of excimer laser irradiation on degenerate rabbit articular cartilage. Arthroscopy v.10, n.1, p.78-84. 1994.

Roach H.I. Bronner F. Oreffo R.O.C. Epigenetic aspect of chronic diseases. Springer-Verlag London. 2011.

Rochkind, S. Phototherapy in peripheral nerve injury for muscle preservation and nerve regeneration Photomed Laser Surg, v.27, n.2, p.219-220. 2009a.

_____. Phototherapy in peripheral nerve regeneration: From basic science to clinical study. Neurosurg Focus, v.26, n.2. 2009b.

Rosa A. S., Santos A. F., *et al.* Effects of Low-level Laser Therapy at Wavelengths of 660 and 808 nm in Experimental Model of Osteoarthritis. Photochemistry and Photobiology, 88: 161–166. 2012.

Rutjes A.W., Nüesch E., *et al.* Transcutaneous electrostimulation for osteoarthritis of the knee. Cochrane Database Syst Rev. Oct 7;(4):CD002823, 2009.

Sagar D. S., Burston J. J., *et al.* The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. Molecular Pain, 7 :88. 2011.

Sakurai, Y., Yamaguchi M., *et al.* Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. European Journal of Oral Sciences, v.108, n.1, p.29–34. 2000.

Salo, P. T. e E. Theriault. Number, distribution and neuropeptide content of rat knee joint afferents. J. Anat. 190, pp. 515-522. 1997.

Sandkühler, J. Learning and memory in pain pathways. Pain, v.88, p.113–118. 2000.

Schaffer, M., R. Sroka, *et al.* Biomodulative effects induced by 805 nm laser light irradiation of normal and tumor cells. J Photochem Photobiol B, v.40, n.3, p.253-257. 1997.

Schaible, H. G. Basic mechanisms of deep somatic pain. Amsterdam: Elsevier. 2006a.

_____. Peripheral and central mechanisms of pain generation. Berlin, v.177. 2006b.

Schaible, H. G. e B. D. Grubb. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. Pain, v.55, p.45–54. 1993.

Schaible, H. G. e R. F. Schmidt. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. J. Neurophysiol, v.60, p.2180–2195. 1988.

Scholz J, C. J. Woolf. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat Neurosci 10(11):1361–1368. 2007.

Scott DL. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In McMahon SB and Koltzenburg M (eds.) Wall and Melzackus Textbook of Pain, 5th ed. Amsterdam: Elsevier, pp. 653–667. 2006.

Selkowitz D.M. High frequency electrical stimulation in muscle strengthening. Am. J Sports Med. 17:103-111, 1989.

Soo, C. L., D. P. Carrier, *et al.* Augmenting voluntary torque of healthy muscle by optimization of electrical stimulation. Phys Ther, v.68, p.333-337. 1988.

- Sorkin, L. S., K. N. Westlund, *et al.* Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. Brain Res Rev v.17, p.39–50. 1992.
- Stanford, S. C. The Open Field Test: Reinventing the Wheel. Journal of Psychopharmacology 21 (2): 134-4, 2007.
- Sun, S., H. Cao, *et al.* New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. Pain, v.129, p.64–75. 2007.
- Turk D. C. Cognitive-behavioral approach to the treatment of chronic pain patients. Reg Anesth Pain Med 28(6):573–579. 2003.
- Vivancos GG, Verri WA JR *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. Braz J Med Biol Res. Mar;37(3):391-9. 2004.
- Wang SY, Olson-Kellogg B, *et al.* Physical therapy interventions for knee pain secondary to osteoarthritis: a systematic review. Ann Intern Med.;157(9):632-44., 2012.
- Watkins, L. R. e S. F. Maier. Glia and pain: past, present, and future. Seattle: IASP Press. 2005
- Wilmore J, Costill D. Physiology of Sport and Exercise. 3ª edição. 2004.
- Winter, D.A., Biomechanics and motor control of human movement. New Jersey: John Wiley & Sons Ltda. 325, 2005.
- Wodlinger B., Rashid S., Durand D.M. Block of Peripheral Pain Response by High-Frequency Sinusoidal Stimulation. Muscle Nerve. 32(6):782-90, 2005.
- Woo Y.J, Y.B. Joo. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Experimental and molecular medicine, Vol. 43, No. 10, 561-570, 2011.
- Woolf C. J., M. W. Salter. Plasticity and pain: role of the dorsal horn. In Wall and Melzack 's Textbook of Pain. Volume 5.. 5 edition:91-105. Edited by: SB McMahon, M Koltzenburg. London: Elsevier; 2006.
- Woolf, C. J. e M. Costigan. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci, v.96, p.7723–7730. 1999.
- Woolf, C. J. e P. D. Wall. Relative effectiveness of C primary afferent fibres of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. J Neurosci, v.6, p.1433–1442. 1986.
- Yusuf *et al.* Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review. Ann Rheum Dis; 70:60–67. 2011.

Zanotti, E., G. Felicetti, *et al.* Peripheral muscle strength training in bed-bound patients with COPD receiving mechanical ventilation: effect of electrical stimulation. Chest v.124, p.292-296. 2003.

Zhang S.L., Liu H.Q., *et al.* Effects of exercise therapy on knee joint function and synovial fluid cytokine levels in patients with kneeosteoarthritis. Mol Med Report. doi: 10.3892/mmr.2012.1168. [Epub ahead of print], 2012.

ANEXO I – Carta de aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais**U F R G S**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO****Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:****Número:** 23354**Título:** EFEITO DA TERAPIA COMBINADA NA OSTEOARTRITE DE JOELHO: LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E EXERCÍCIO FÍSICO**Pesquisadores:****Equipe UFRGS:**

MATILDE ACHAVAL ELENA - coordenador de 01/08/2012 até 01/03/2013

MILTON ANTONIO ZARO - pesquisador de 01/08/2012 até 01/03/2013

MARCO AURELIO VAZ - pesquisador de 01/08/2012 até 01/03/2013

Gustavo Balbinot - pesquisador de 01/08/2012 até 01/03/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 40 ratos machos, Wistar de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 17 de Julho de 2012


FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de éticaJoão Edgar Schmidt
Pró-Reitor de Pesquisa
PROPESQ/UFRGS

ANEXO II – Peso dos animais e valores brutos de descarga de peso.

